



Universidade de Brasília

Programa de pós-graduação em Botânica

**Metabólitos extracelulares de *Chlorella sorokiniana*
e seu potencial biotecnológico**

Amanda Laís Jácome Monte

Brasília-DF

Setembro/2023



Universidade de Brasília

Mestrado em Botânica

**Metabólitos extracelulares de *Chlorella Sorokiniana*
e seu potencial biotecnológico**

Amanda Laís Jácome Monte

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Setembro/2023

“To the stars who listen...and
the dreams that are answered.”

Sarah J. Maas

Agradecimentos

Agradeço,

À **Deus**, pelo dom da vida e por todo conforto e coragem.

Aos meus pais, **Maria Jácome** e **Antônio Matias** e aos meus irmãos, **Antônio Lucas** e **Arthur Luan**, por todo amor, apoio e incentivo durante cada dia dessa jornada. Por terem vivenciado ao meu lado todo o estresse e ansiedade pelos quais passei e assim me acolhido, especialmente por ter entrado no mestrado em um momento tão difícil quanto uma pandemia. Aos meus familiares, em especial a **Jackeline Martins**, **Maria Laura** e em memória do meu padrinho **Joel Casimiro**, que sempre acreditou em mim e me incentivou, mas infelizmente deixou este mundo no meio dessa jornada. Aos meus amigos e irmãos de coração, **Ralph**, **Gigi** e **Meg**, pelo companheirismo e amor incondicionais.

Ao meu Orientador, **Dr. Thomas Christopher Rhys Williams**, que foi exemplar em todos os momentos, por toda ajuda, paciência, compreensão e por tudo que aprendi com ele sobre profissionalismo, cuidado e dedicação.

Ao meu parceiro de vida, **Gustavo Rodrigues**, por todas as noites acordado me ajudando e por todo apoio e amor incondicionais.

A todos os meus amigos, alguns que me acompanham desde a escola, alguns que conheci na época do vestibular e alguns na graduação. Mas todos foram fundamentais em toda minha jornada e sou muito grata por tê-los em minha vida: **Alessandro Zanard**, **Alex Silva**, **Caio Azevedo**, **Evaldo Oliveira**, **Francielly Bruna**, **João “Shaolin”**, **Juliana Oliveira**, **Karoline Cruz**, **Karolina Queiroz**, **Letícia Moreschi** e **Lília Ramos**, agradeço por cada palavra de apoio, cada abraço, por todo carinho e pela compreensão com minha ausência durante esse período. E em especial a **Giovanna Dutra**, por todo companheirismo, por cada dia e noite estudando juntas e por todo apoio emocional.

Aos companheiros de laboratório, todos os professores e técnicos - que não encontrei tanto quanto eu gostaria devido a pandemia de COVID-19- agradeço pela ajuda e companheirismo nos poucos momentos que nos encontramos.

Ao CNPQ, CAPES e a FAPDF pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Resumo

Microalgas são organismos fotossintéticos que realizam biofixação de CO₂ e produzem compostos de alto valor agregado a partir da biomassa de seu cultivo. Existem espécies capazes de liberar metabólitos extracelulares com perspectiva de aplicação, porém, somente a biomassa é processada para obtenção desses produtos. Enquanto isso, grandes volumes de meios de cultivo permanecem inexplorados. A otimização dos meios de cultivo de microalgas, têm como foco as fontes de nitrogênio e a seleção de espécies mais promissoras, como a *Chlorella sorokiniana*. Portanto, o presente estudo teve como objetivo, analisar o impacto do cultivo em diferentes fontes de nitrogênio combinadas, na produção de compostos extracelulares. Foram utilizados quatro meios de cultivo, BG11 como controle; um meio com a principal fonte de nitrogênio sendo a Ureia (BGU), um meio com a principal fonte de nitrogênio sendo o nitrato de potássio (BGK) e um meio com três fontes de nitrogênio combinadas: ureia, nitrato de potássio e nitrato de amônio (BGCON). O crescimento das culturas foi monitorado por densidade óptica, contagem de células e pesagem da biomassa seca. A detecção dos compostos foi feita utilizando cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas. Os metabólitos foram identificados por comparação dos espectros de massas utilizando a biblioteca NIST e quantificados utilizando o software *MetAlign*. A ureia (BGU) foi a fonte mais eficaz de nitrogênio para o crescimento em comparação com o meio controle no intervalo entre os dias 1 ao 8. Dentre os nove compostos com diferenças significativas que foram identificados dentre todas as análises, três deles foram ácidos graxos: ácido propanoico, ácido hexadecanóico (palmítico) e ácido octadecanóico (esteárico). O perfil de metabólitos dos meios BG11 (controle) e BGK é formado em sua maioria de ácidos graxos, um fato que já é bastante citado na literatura, sendo que, um desses compostos foi o ácido linolênico (C18:3), popularmente conhecido como ômega-3, que foi secretado no meio BG11. Os resultados desse estudo mostraram que independente do meio, o perfil de crescimento da espécie foi muito similar, assim pode-se observar como *C. Sorokiniana* é uma espécie capaz de se adaptar a diferentes condições. Além disso, houve a confirmação que BGK pode ser um bom meio de cultivo para essa espécie, tanto para obtenção de biomassa seca, quanto para traçar perfis metabólicos, uma vez que o maior número de compostos com diferenças significativas foi encontrado comparando este meio com o controle (BG11). Estudos posteriores poderão apresentar a produção em larga escala de biomassa ou de algum dos compostos identificados neste trabalho, utilizando a espécie e os meios descritos. No futuro, os outros compostos poderão ser identificados, quantificados e possuir importantes aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: microalgas; *Chlorella sorokiniana*; metabólitos extracelulares; cromatografia gasosa.

Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms capable of biofixing CO₂ and producing high value compounds from the biomass in their cell growth. Some species can release extracellular metabolites with potential applications, but only the biomass is processed to obtain these products. Meanwhile, huge volumes of cell growth-medium remain unexplored. Microalgae's growth-medium optimization is focussed on nitrogen sources and the selection of most promising species, like *Chlorella Sorokiniana*. Therefore, the present study aimed to analyse the impact of *C. Sorokiniana*'s growth under a mixture of three nitrogen sources combined in the production of extracellular compounds. Four culture media were used: the species standard (BG11) as control; a culture with urea (BGU) as the main nitrogen source, a culture with potassium nitrate (BGK) as the main nitrogen source, and a culture with a mix of urea, potassium nitrate and ammonium nitrate (BGCON) as the main nitrogen source. Culture growth was monitored using optical density, cell Count and weighing the dry biomass. Compound detection was done using gas chromatography in conjunction with mass spectrometry. Metabolites were identified by comparing them to mass spectra using the NIST Research Library and were then quantified using the *MetAlign* software. Urea (BGU) was the most effective nitrogen source for growth compared to the control medium in the range from day 1 to day 8. Among the nine compounds with significant differences identified in all analyses, three of them were fatty acids: propanoic acid, hexadecanoic acid (palmitic acid), and octadecanoic acid (stearic acid). The metabolite profile of BG11 (control) and BGK media was primarily composed of fatty acids, a fact that is well-documented in the literature. One of these compounds was linolenic acid (C18:3), popularly known as omega-3, which was secreted in the BG11 medium. The results of this study showed that regardless of the medium, the growth profile of the species was very similar, indicating that *C. Sorokiniana* is a species capable of adapting to different conditions. Furthermore, it confirmed that BGK could be a good culture medium for this species, both for obtaining dry biomass and for tracing metabolic profiles, as the greatest number of compounds with significant differences was found when comparing this medium to the control (BG11). Subsequent studies may present the large-scale production of biomass or some of the compounds identified in this work using the species and the described media. In the future, other compounds may be identified, quantified, and have important biotechnological applications.

Key-words: Microalgae; *Chlorella Sorokiniana*; Metabolites; Extracellular; Gas Chromatography.

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. HIPÓTESES	17
3. OBJETIVOS	17
3.1 <i>Objetivo geral</i>	17
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 <i>Microalgas</i>	18
4.2 <i>Chlorophyta (Algas verdes)</i>	18
4.2.1 <i>Chlorella Sorokiniana</i>	19
4.3 <i>Principais fatores para o crescimento de Microalgas</i>	20
4.3.1 <i>Curva de crescimento de microalgas</i>	20
4.3.2 <i>Luz</i>	21
4.3.3 <i>Temperatura</i>	22
4.3.4 <i>Agitação</i>	22
4.3.5 <i>pH</i>	22
4.3.6 <i>Tipos de cultivo</i>	23
4.3.6.1 <i>Cultivo fotoautotrófico de microalgas</i>	23
4.3.6.2 <i>Cultivo heterotrófico de microalgas</i>	24
4.3.6.3 <i>Cultivo mixotrófico de microalgas</i>	24
4.3.6.4 <i>Cultivo fotoheterotrófico de microalgas</i>	25
4.3.7 <i>Meios de cultivo</i>	25
4.4 <i>Composição bioquímica das microalgas e suas aplicações Biotecnológicas</i>	26
4.7 <i>Metabolômica e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e suas aplicações</i>	28
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1. <i>Local de realização dos experimentos</i>	31
5.2. <i>Cepa de microalgas e condições de cultivo</i>	31
5.3 <i>Meios de cultivo</i>	32

5.4 <i>Delineamento Experimental</i>	34
5.4.1. Pré-inóculo	34
5.4.2 Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio e separação da biomassa do meio.....	34
5.4.3 Preparo e análise das amostras para o GC-MS	36
5.4.3.1 Limpeza das amostras para segunda análise	37
5.4.4. Identificação dos metabólitos.....	38
5.4.5. Análises de dados estatísticos	38
5.4.6 Mutagênese UV.....	38
5.4.7 Triagem dos mutantes	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6. 1. <i>Curvas de crescimento</i>	39
6.2. <i>Contagem de células</i>	42
6.3 <i>Quantificação de Biomassa seca</i>	42
6.4 <i>Identificação dos metabólitos</i>	44
6.5 <i>Mutagênese UV</i>	56
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. MATERIAL SUPLEMENTAR	79
9. 1 <i>Tabelas</i>	79

Lista de Figuras

- Figura 1** Gráfico representando o modelo das frases de crescimento de um microrganismo. 21
- Figura 2** Metodologia de diluição seriada, utilizando a proporção 1/10, para isolar uma colônia da microalga utilizada na pesquisa. 32
- Figura 3** Ilustração representando os passos para a realização da mutagênese, baseado em Vigeolas et al. (2012). 39
- Figura 4** Curvas de crescimento de *Chlorella Sorokiniana* em escala logarítmica em diferentes meios de cultivo medido por Densidade ótica (D.O) a 750nm. Em azul, curva de crescimento de BG11 com barra de erro (Desvio padrão). Em laranja, curva de crescimento de BGK com barra de erro (Desvio padrão). Em verde, curva de crescimento de BGU com barra de erro (Desvio padrão). Em amarelo, curva de crescimento de BGCON com barra de erro (Desvio padrão). As médias comparadas dos 4 meios não apresentaram diferença significativa por ANOVA One-way. As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente no intervalo do dia 1 ao 8, também não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGU, na qual o valor de $p < 0,05$, assim como na comparação individual do meio BGU com BGK e BGCON, na qual também houve diferença significativa em ambas as comparações com $p < 0,05$ 41
- Figura 5** Crescimento de *C. Sorokiniana* a partir de dados de contagem de células. As barras de erro representam o desvio padrão. Não houve diferença significativa na comparação entre os meios utilizando ANOVA One-way ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente nos dias 3 e 7, também não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGK, na qual o valor de $p < 0,05$ 42
- Figura 6** Valores de biomassa seca de *C. Sorokiniana* em mg. As barras de erro representam o desvio padrão. Houve diferença significativa na comparação entre os meios utilizando ANOVA One-way ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGK, na qual o valor de $p < 0,05$ 43
- Figura 7** Gráficos gerados no MetaboAnalyst mostrando diferenças significativas entre 4 compostos diferentes comparados nos 4 meios. 47
- Figura 8** Estrutura química do composto nº 7: Benzo[g][1]benzotiopirano[4,3-b]índole (Tabela 3). Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70057>. 48

Figura 9 Estrutura química do composto nº 28: Benzofurane-5-Carboxamide, 2,3-dihydro-N-phenyl (Tabela 3).

Fonte:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8200476>..... 49

Figura 10 Gráficos gerados no MetaboAnalyst mostrando diferenças significativas de abundância entre 2 compostos identificados na comparação entre o meio BG11 (controle) e o meio BGK..... 51

Lista de tabelas

- Tabela 1** Lista com as formulações dos quatro meios que serão testados para o crescimento e secreção de metabólitos. 33
- Tabela 2** Características importantes identificadas na comparação dos quatro meios diferentes por ANOVA one-way e análise post-hoc usando HSD de Tukey. A coluna 2 mostra o nome de cada um desses compostos, a coluna 3 mostra os valores de p do teste, a coluna 4 mostra os valores de FDR e a coluna 5 mostra as comparações feitas a partir do HSD de Tukey. Ex: Para o composto nº 7 houve diferença significativa entre BGU comparado a BG11, BGCON e BGK. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 1. 46
- Tabela 3** Compostos significativos identificados pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11. A coluna 2 mostra o nome de cada um dos compostos que foram identificados, a coluna 3 mostra o valor de p do teste para cada um dos compostos e a coluna 4 os valores de FDR. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 2..... 50
- Tabela 4** Amostras significativas identificadas pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11 após a limpeza das amostras. A coluna 2 mostra o nome de cada um desses compostos (apenas os que foram identificados). A coluna 3 mostra os valores de p do teste e a coluna 4 mostra os valores de FDR. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 3..... 52
- Tabela 5** Perfil de metabólitos que foram identificados do meio BG11 (controle), utilizando a biblioteca NIST. Na coluna 2 estão os nomes dos compostos e na coluna 3 o tempo de retenção referente a cada um deles. Em destaque (cor laranja) está o Ácido linolênico (ômega-3). Os compostos identificados na análise das amostras apenas com meio de cultivo (Branco) foram retirados da lista. 54
- Tabela 6** Perfil de metabólitos que foram identificados do meio BGK utilizando a biblioteca NIST. Na coluna 2 estão os nomes dos compostos e na coluna 3 o tempo de retenção referente a cada um deles. Os compostos identificados na análise das amostras apenas com meio de cultivo (Branco) foram retirados da lista. 55

Material suplementar

Tabela suplementar 1 Características importantes identificadas na comparação dos quatro meios diferentes por ANOVA one-way e análise post-hoc usando HSD de Tukey. A coluna 2 mostra o número de identificação de cada um desses compostos, que é uma combinação do número de Scan onde está localizado o respectivo pico de cada íon, em laranja. o nome de cada um dos compostos que foram identificados, a coluna 3 mostra os valores de p do teste, a coluna 4 mostra os valores de FDR e a coluna 5 mostra as comparações feitas a partir do HSD de Tukey. Ex: Para o composto nº 7 houve diferença significativa entre BGU comparado a BG11, BGCON e BGK. 79

Tabela suplementar 2 Compostos significativos identificados pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11. A coluna 2 mostra o nome de cada um dos compostos, que é uma combinação do número de Scan onde está localizado o pico do respectivo Íon. A coluna 3 mostra os valores de p do teste para cada um dos compostos e a coluna 4 mostra os valores de FDR..... 80

Tabela suplementar 3 Amostras significativas identificadas pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11 após a limpeza das amostras. A coluna 2 mostra o número de identificação de cada um desses compostos, que é uma combinação do código de processamento derivado do alinhamento (Centrotype) com o número de Scan onde está localizado seu respectivo pico. A coluna 3 mostra os valores de p do teste e a coluna 4 mostra os valores de FDR..... 81

Tabela suplementar 4 Classes de compostos e seus respectivos métodos analíticos de separação/identificação. Adaptado de Medeiros & Simoneit (2007). 85

1. Introdução

Microalgas são encontradas especialmente no ambiente marinho, no solo e em água doce, sendo encarregadas ao menos por 60% da produção primária do planeta Terra (HENRY, 2004). Não há valor taxonômico no termo “microalga” devido a enorme variabilidade que há entre esses organismos, que podem ser (incluindo as cianobactérias) unicelulares ou multicelulares bem como autotróficos ou heterotróficos (LIU; POHNERT; WEI, 2016). As autotróficas são organismos fotossintéticos, sendo assim, utilizam a energia solar, dióxido de carbono e nutrientes inorgânicos para fabricar carboidratos, proteínas, lipídios, entre outros compostos importantes. Em contrapartida, as heterotróficas são capazes de crescer sem a presença de luz, utilizando como fonte exógena de carbono apenas substratos orgânicos comuns, como glicose ou glicerol (LIU et al., 2016).

A crescente atenção ao estudo de microrganismos como as microalgas, ocorre devido à influência desses organismos em diferentes cadeias tróficas e ao seu grande potencial biotecnológico, em função da perspectiva de aplicação comercial de produtos específicos em diversas áreas (DERNER et al., 2006; GROBBELAAR, 2004). Sob determinadas condições, é possível obter biomassa com elevada densidade celular, contendo frações abundantes de compostos de alto valor, como pigmentos, ácidos graxos, vitaminas, proteínas e polissacarídeos (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A produção de compostos baseada em biomassa de microalgas tem sido vastamente aplicada desde a indústria de alimentos a produtos químicos de elevado valor da indústria farmacêutica, como por exemplo, fármacos com atividades anti-inflamatória, anti-infecciosa e anticâncer (PIGNOLET et al., 2013; PULZ; GROSS, 2004; ROMANO et al., 2017). Há também aplicações na indústria de cosméticos, como por exemplo os polissacarídeos de cianobactérias e oligopeptídeos de extratos de *Chlorella* sp. (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; RAJA; HEMAISWARYA; RENGASAMY, 2007). Além disso, também há interesse na produção de biocombustíveis utilizando microalgas oleaginosas para suprir a demanda mundial por energias renováveis (DOAN; SIVALOGANATHAN; OBBARD, 2011). Nessa perspectiva, têm-se cultivado microalgas com o objetivo de produzir biomassa para obter compostos naturais com alto valor comercial. Apesar da popularidade do cultivo comercial de microalgas ter aumentado, somente a biomassa é processada para obtenção desses produtos (LIU; POHNERT; WEI, 2016).

Enquanto isso, grandes volumes de meio derivados do cultivo desses organismos, permanecem inexplorados após a retirada da biomassa das culturas (LIU; POHNERT; WEI, 2016), ainda que se tenha conhecimento de que há uma série de microalgas que podem liberar numerosos metabólitos extracelulares (BERRY, 2008; DE JESUS RAPOSO; DE MORAIS; DE MORAIS, 2013).

Os metabólitos extracelulares secretados por microalgas detêm um importante papel ecológico, uma vez que as microalgas marinhas secretam uma porção de substâncias orgânicas dissolvidas, que são utilizadas como fontes de energia por organismos heterótrofos em interações simbióticas entre algas e bactérias, por exemplo (NALEWAJKO; LEE; FAY, 1980). Tais interações ocorrem entre microalgas e outros microrganismos e alguns desses compostos alelopáticos de microalgas podem ter aplicações biotecnológicas como bioherbicidas ou agentes de biocontrole (GANTAR et al., 2008). Ademais, existem possibilidades promissoras de aplicações na indústria farmacêutica de alguns polissacarídeos extracelulares que possuem bioatividades como atividade antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (DE PHILIPPIS; COLICA; MICHELETTI, 2011). Sendo assim, os metabólitos extracelulares de microalgas possuem perspectiva de aplicação comercial em diversas áreas como, alimentos, cosméticos e indústria farmacêutica (LIU; POHNERT; WEI, 2016).

A literatura dispõe de investigações focadas na identificação de metabólitos extracelulares produzidos por determinadas espécies sob determinadas condições, como Exopolissacarídeos (grupo de importantes biopolímeros de alto peso molecular), exoenzimas como fosfatases alcalinas e proteases, fenoloxidasas, ácidos orgânicos, ácidos graxos e produtos alelopáticos como os alcalóides. No entanto, as vias biossintéticas de tais compostos são desconhecidas até então. Além disso, os mecanismos de transporte encarregados da secreção desses metabólitos também permanecem inexplorados (LIU; POHNERT; WEI, 2016).

Dentre as diversas estratégias para otimizar a produção de compostos, há muito interesse na seleção e caracterização de espécies mais promissoras e no aprimoramento de condições de cultivo (RIBEIRO et al., 2020; VIGEOLAS et al., 2012). Alguns estudos demonstraram que a microalga *Chlorella sorokiniana* é capaz de se adaptar a condições artificiais (STEFANO et al., 2014). Essa espécie faz parte do filo Chlorophyta e pode crescer de forma autotrófica, heterotrófica e mixotrófica, bem como em diferentes fontes de nitrogênio e carbono (BOHUTSKYI et al., 2016; DE-BASHAN et al., 2008;

RAMANNA et al., 2014). Ademais, estudos mostram que esta espécie é altamente capaz de produzir metabólitos extracelulares como açúcares, proteínas e obter um rendimento elevado de óleos em condições distintas de cultivo (NAABB, 2014).

Com o objetivo de otimizar as condições de cultivo, diversas fontes de macronutrientes são investigadas. Um dos macronutrientes de maior importância para a cultura de microalgas é o nitrogênio, em virtude de ser indispensável para síntese proteica, ácidos nucleicos e pigmentos. Dentre os compostos que podem ser utilizados como fonte de nitrogênio para meios de cultura de microalgas, estão os sais de nitrato, a ureia e amônia (ARUMUGAM et al., 2013). Os sais de nitrato, usualmente são a única ou principal fonte de nitrogênio de meios de cultura sintéticos como o BG11, que é comumente utilizado em pesquisas com *Chlorella*. O nitrato é assimilado pelo transportador NRT2 (CHARRIER et al., 2015) e então é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase. Posteriormente é transportado para o cloroplasto e então reduzido a amônio por meio da enzima nitrito redutase. Então o amônio é associado aos aminoácidos por meio do ciclo GS-GOGAT (CASPI et al., 2016).

Além dos sais de nitrato, a ureia também foi descrita como uma fonte de nitrogênio importante para a cultura de microalgas. A molécula de ureia é composta por uma porcentagem maior de nitrogênio do que outras fontes, possui um baixo custo e tem apresentado eficiência na nutrição de plantas (ARUMUGAM et al., 2013). Para ser metabolizada por microalgas, a ureia é conduzida para a célula pelo transportador DUR3 (PINTON; TOMASI; ZANIN, 2016) e hidrolisada pelas enzimas ureia carboxilase e alofanato hidrolase. Então, ocorre a liberação de moléculas de amônio (NH_4^+) e uma molécula de dióxido de carbono (CO_2) em um processo que demanda ATP, Mg^{2+} e K^+ (CASPI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2020). Rosa et al. (2023) relataram que ocorre geração de HCO_3^- pelo metabolismo da ureia em *C. reinhardtii* e que esse composto pode ser utilizado como fonte de C para fotossíntese em condições de cultivo mixotróficas dessa espécie. Sendo assim, está associado a maior produção celular e de biomassa.

Para aprimorar e redirecionar a produção de biomassa e compostos de interesse, a quantidade e a fonte molecular de nitrogênio utilizadas podem ser alteradas. Quando esse macronutriente é fornecido adequadamente, o resultado tende a ser uma ampliação da produção de biomassa e de compostos, enquanto procedimentos que envolvem limitação de nitrogênio afetam de forma negativa a maquinaria fotossintética e consequentemente o crescimento (LI et al., 2016). Existem estudos com o uso de fontes

de nitrogênio testadas separadamente, além de testes com fontes misturadas, como amônio e nitrato ou ureia e nitrato (LIN; LIN, 2011; SOARES et al., 2018). Um estudo realizado por Xu et al. (2001) demonstrou que a microalga marinha *Ellipsoidion sp* teve um crescimento mais acelerado com amônio como fonte de nitrogênio em comparação com o nitrato durante a fase pré-logarítmica e que a alga cresce pouco com ureia como única fonte de nitrogênio. Além disso, mostrou que o meio contendo amônio obteve um rendimento maior de lipídios, porém a taxa máxima de crescimento ocorreu em meio contendo nitrato de sódio. Ademais, um estudo mais recente realizado por Yodsuwan et al. (2017) constatou que uma espécie de diatomácea marinha (*Phaeodactylum tricornutum*) apresentou um maior percentual de lipídios em condições de cultivo com menores concentrações de nitrogênio em comparação com concentrações mais altas. Ribeiro et al. (2020) demonstraram que *C. sorokiniana* cultivada em meio BGU apresentou teor de proteína, açúcar solúvel e carotenoides relativamente superior aquelas cultivadas usando meio BG11. Contudo, ainda não foi realizado um estudo do impacto do cultivo de *C. sorokiniana* em uma mistura de três fontes de nitrogênio, incluindo dois sais de nitrato e ureia combinados na produção de compostos extracelulares.

Uma das técnicas utilizadas para aprimorar a produção de compostos de interesse é a geração de mutantes de microalgas que apresentam maior rendimento em comparação com as cepas selvagens (LIU; POHNERT; WEI, 2016; VIGEOLAS et al., 2012). Experimentos realizados por de Jaeger et al. (2014) com radiação UV, mostraram mutantes promissores da microalga verde oleaginosa *Scenedesmus obliquus* que foram selecionados utilizando coloração com vapor de iodo e aumentaram a produtividade de ácido graxo total (TFA) em até 41% sem mudanças consideráveis na produção de biomassa. Um estudo também utilizando tratamento UV, porém em cianobactérias (*Chlorogloeopsis fritschii*), realizado por Kultschar et al. (2019) avaliou as modificações nos níveis de metabólitos intra e extracelulares de baixo peso molecular e mostrou que houve uma redução considerável nos metabólitos intracelulares que estão relacionados ao metabolismo de carbono e nitrogênio. Além disso, outro estudo, dessa vez utilizando técnicas de mutagênese induzida por feixe de elétrons (KIM et al., 2014b) na microalga *Arthrospira platensis*, revelou dois mutantes que detinham níveis aumentados de produção de lipídios em comparação com a cepa selvagem da microalga, também sem mudanças substanciais no seu desenvolvimento. Tal secreção de compostos que ocorre durante o crescimento de microrganismos, é frequentemente correlacionada com mudanças no pH

do meio, seja em função do pka dos compostos liberados ou do mecanismo de transporte (VEYEL et al., 2014).

Em vista disso, esse estudo foi realizado para avaliar o efeito de diferentes combinações de fontes de nitrogênio no crescimento e na liberação de compostos extracelulares no meio de cultivo de *Chlorella sorokiniana*, além da indução de mutagênese em culturas de *C. sorokiniana* utilizando irradiação UV, para então identificar e isolar mutantes mais promissores em relação ao crescimento e produção de compostos de interesse utilizando um indicador de pH para a triagem.

2. Hipóteses

- 1) Se culturas da microalga da espécie *C. sorokiniana* forem submetidas a diferentes combinações de fontes de nitrogênio seu crescimento vai ser alterado, além de haver a liberação ou acúmulo de compostos extracelulares.
- 2) Se culturas da microalga da espécie *C. sorokiniana* forem expostas a irradiação UV será possível identificar e isolar mutantes que apresentem alterações no crescimento e produção de compostos extracelulares.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da alteração de fatores físico-químicos (disponibilidade de nutrientes e irradiação UV) sobre o potencial biotecnológico de *Chlorella sorokiniana*.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito de diferentes combinações de fontes de nitrogênio no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*.
- 2) Analisar o perfil de compostos extracelulares nos diferentes meios de cultivo de *C. sorokiniana* utilizados neste trabalho.
- 3) Expor as culturas de *C. sorokiniana* à irradiação UV para induzir mutagênese, para então identificar e isolar mutantes mais promissores em relação ao crescimento e produção de compostos de interesse.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares que pertencem a um grupo polifilético de microrganismos eucariotos fotossintetizantes, que têm a clorofila como pigmento fotossintético primordial para produção de energia. Entretanto, existem microrganismos procariotos fotossintetizantes que também são comumente incluídos nesta classificação: as cianobactérias (GONG; JIANG, 2011; LARKUM et al., 2012; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; SUPARMANIAM et al., 2019).

As microalgas têm potencial para proliferação rápida, em virtude de seu sistema reprodutivo e de crescimento celular simples. Esses microrganismos são capazes de sobreviver a longo prazo em diferentes condições ambientais (BRENNAN; OWENDE, 2010; TAN et al., 2018), desde ambientes de água doce e salgada, fontes termais ou gelo. Devido a essa aptidão de habitar sistemas ecológicos diversos e por sua susceptibilidade a modificações genéticas, são apontadas como uma das formas de vida mais antigas e o organismo vivo mais produtivo da Terra (RAJKUMAR; SOBRI TAKRIFF, 2016).

As algas podem ser classificadas de acordo com características singulares, como aspectos estruturais, composição da membrana, moléculas que armazenam energia e as cores dos pigmentos (DEBIAGI et al., 2017). Contudo, há limitações, pois ainda não existem detalhes suficientes para viabilizar uma classificação taxonômica permanente de algas (SUPARMANIAM et al., 2019). No momento presente, as microalgas largamente utilizadas podem ser classificadas em quatro grupos principais: *Cyanophyceae* (algas verde-azuladas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (englobando as diatomáceas) e *Chrysophyceae* (abrangendo algas douradas) e o gênero *Chlorella* é um dos que possui o maior destaque comercial e industrial (RAJKUMAR; YAAKOB; TAKRIFF, 2014).

4.2 Chlorophyta (Algas verdes)

As microalgas verdes fazem parte do filo Chlorophyta, cujos integrantes são espécies de algas unicelulares ou multicelulares, coloniais, filamentosas ou parenquimatosas, que possuem parede celular celulósica e apresentam coloração verde devido às clorofilas tipo A e B. Esses organismos detêm uma pluralidade de traços morfológicos: reserva de energia em forma de amido, cloroplasto com duas membranas

e alguns membros deste filo podem até mesmo possuir flagelos (CHOUDHARY; SAVE; VAVILALA, 2018; FUČÍKOVÁ et al., 2011; GUIRY, 2012). São organismos taxonomicamente diversos e pertencem a uma linhagem antiga com cerca de 8.000 espécies descritas e ao menos 5.000 que ainda não foram caracterizadas. Além disso, podem estar presentes tanto em ambientes marinhos, quanto em água doce (BECKER; MARIN, 2009; GUIRY, 2012; HADI et al., 2016).

4.2.1 *Chlorella Sorokiniana*

O gênero *Chlorella* está incluso na família *Trebouxiophyceae* e no filo *Chlorophyta*. Existem mais de 20 espécies de *Chlorella* caracterizadas, com mais de 100 cepas descritas. Dentre as principais características desses microrganismos, estão inclusas: o tamanho das espécies, que em geral é em torno 2 a 10 µm de diâmetro, uma parede celular lisa e uma morfologia predominantemente esférica e não flagelada. (FURNAS, 1990; WU; HSEU; LIN, 2001). Atualmente, as espécies de *Chlorella* são divididas em três tipos: *C. vulgaris*, *C. lobophora* e *C. sorokiniana* (KRIENITZI et al., 2004).

Inicialmente, a subespécie *Chlorella sorokiniana* era considerada um mutante termotolerante de *Chlorella pyrenoidosa*, quando foi isolada pela primeira vez no ano de 1953 por Sorokin (KUNZ W.F., 1972; SOROKIN C., 1953). Apenas no início dos anos 1990 essa classificação taxonômica foi alterada, quando foi analisado o perfil de cloroplasto 16S rDNA e 18S rRNA, que distinguiu *C. sorokiniana* como uma espécie diferente (DSRR; HUSS, 1990; KESSLER, 1985; KESSLER E., 1992; WU; HSEU; LIN, 2001). Esta microalga é um organismo unicelular que mede cerca de 2-4,5 µm de diâmetro. Estudos mostram que esse organismo tem possibilidade de crescimento autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em uma vasta faixa de temperatura (entre 36-42°C) e em diferentes fontes de nitrogênio e carbono, sendo assim uma espécie ideal para cultivo em águas residuais (KESSLER E., 1992; BOHUTSKYI et al., 2016; DE-BASHAN et al., 2008; RAMANNA et al., 2014). Em vista disso, há possibilidade para o desenvolvimento e otimização de tecnologias eficientes de tratamento para matéria-prima residual da indústria utilizando essa microalga (LIZZUL et al., 2018; YUN; KIM; YOON, 2020; ZIGANSHINA; BULYNINA; ZIGANSHIN, 2021).

Além disso, essa espécie vem despertando atenção devido ao seu potencial para acúmulo de biomoléculas interessantes para aplicações industriais. Dependendo das

condições de cultivo, mais de 50% de sua biomassa pode ser formada por tais biomoléculas, como carboidratos e lipídeos (HUNT et al., 2010; KUMAR; DASGUPTA; DAS, 2014; LI et al., 2014; ZUORRO et al., 2019).

Ao analisar o peso seco de *C. sorokiniana*, estudos mostraram que a biomassa da espécie é composta por cerca de 40% de proteína, 30–38% de carboidrato e 18–22% de lipídios (BELKOURA; BENIDER; DAUTA, 1997; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000). Matsukawa et al. (2000) mostrou que até 0,69% do peso seco desta microalga em condições extremófilas, incluem antioxidantes como os carotenoides, que também são compostos de relevância comercial. Além disso, de acordo com Kumar et al. (2011) e Mizuno et al. (2012) a biomassa de *C. sorokiniana* pode ser utilizada para a produção de commodities a granel, especialmente a fabricação em larga escala de lipídeos para biocombustíveis.

4.3 Principais fatores para o crescimento de Microalgas

4.3.1 Curva de crescimento de microalgas

O crescimento de microalgas assim como de outros microrganismos, pode ser representado por uma curva de crescimento. Esta curva é composta, basicamente, por quatro fases de crescimento: Fase de adaptação (lag), fase log, fase estacionária e de declínio ou morte (**Figura 1**). A fase lag é a fase inicial de crescimento, na qual ocorre o período de adaptação metabólica das células ao meio de cultivo, que consiste na produção de enzimas e no início da absorção dos nutrientes presentes no meio. A fase lag também é observada quando as células são transferidas para meios de cultivo com formulações diferentes. A fase log ou exponencial diz respeito ao período em que as células estão integralmente adaptadas, portanto, a velocidade de crescimento é máxima e constante, entretanto a taxa de crescimento exponencial varia de acordo com o tempo de geração de cada organismo. Posteriormente, no decorrer da fase estacionária, ocorre a limitação de nutrientes e os produtos tóxicos se tornam mais abundantes no meio. Nesta etapa, a taxa de crescimento se iguala à taxa de morte. É nessa fase em que vários metabólitos secundários são sintetizados. Na fase de declínio ou morte, é quando ocorre a supressão irreversível da divisão celular, sendo assim, a densidade de células viáveis cai lentamente (SCHMIDELL, 2001; WOJCIECHOWSKI J., 2013).

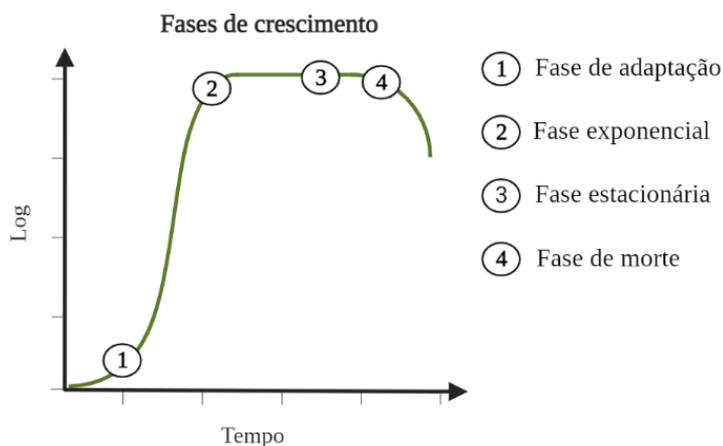


Figura 1 Gráfico representando o modelo das frases de crescimento de um microrganismo.

4.3.2 Luz

A luz é o fator mais determinante para o crescimento de organismos fotossintéticos, sendo assim sua fonte indispensável de energia (SOLETTO et al., 2005). Contudo, pode ocasionar a redução da capacidade de fotossíntese da microalga, ou seja, a foto inibição, provocando o branqueamento e morte, caso ocorra exposição a alta densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (Photosynthetic photon flux density - PPF). Essa exposição pode resultar no aumento da geração de espécies de oxigênio reativas nocivas, como H_2O_2 , deteriorando a estrutura celular (MEHLITZ, 2009; MÜ; LI; NIYOGI, 2001; SOLETTO et al., 2005). Porém, estudos mostram que a espécie *Chlorella sorokiniana* resiste a elevada intensidade luminosa, tolerando até $2100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sem apresentar sinais de fotoinibição (CUARESMA et al., 2009).

Visto que as microalgas dispõem de uma alta eficiência fotossintética, estes organismos não demandam suplementação com fontes de carbono orgânico ao longo de seu cultivo, isso justifica seu acúmulo de biomassa mais rápido e mais elevado em comparação com outros organismos fotossintéticos (CHISTI, 2007, 2010; HERRERO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2006; OTLES, 2001; RANDHIR et al., 2020; SPOLAORE et al., 2006).

De modo geral, a fonte de carbono das microalgas é o CO_2 , que é fixado através da fotossíntese, mediante a assimilação fotoautotrófica (SASI D., 2009). O carbono contribui com aproximadamente 50% da biomassa microalgal, sendo assim, apontado

como o macronutriente mais importante para seu crescimento (LOURENÇO, 2007). No entanto, algumas espécies de microrganismos fotossintéticos são capazes de combinar a fotossíntese com a assimilação heterotrófica de compostos orgânicos (Mixotrofia), dentre elas estão a microalga *Chlorella vulgaris* e a cianobactéria *Spirulina* (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

4.3.3 Temperatura

A temperatura é uma variável determinante no crescimento das microalgas. O aumento exacerbado da temperatura em um cultivo, é capaz de promover um crescimento na biomassa até certo ponto. Entretanto, também pode ser inibido em função da inativação das proteínas por choque térmico (MAHBOOB et al., 2012).

Um estudo de Chinnasamy e colaboradores (2009) mostrou que para um crescimento elevado da microalga *Chlorella vulgaris*, a temperatura ótima é 30°C. Também há relatos anteriores que o crescimento ideal para a *Chlorella sorokiniana* pode ser alcançado em temperaturas entre 35–40 °C (DE-BASHAN et al., 2008). Entretanto, um estudo mais recente mostrou que a *Chlorella sorokiniana* tem 38 °C como temperatura ideal para crescimento da biomassa (FRANCO et al., 2012). Isso mostra que a temperatura ótima para o crescimento difere entre as espécies (LEE et al., 2018; MA; LI; FU, 2020). Portanto, é importante selecionar uma espécie adequada de acordo com o objetivo do estudo.

4.3.4 Agitação

A importância da agitação para um cultivo é notável. Essa variável é responsável por assegurar uma exposição mais homogênea à luz e possibilitar uma maior disponibilidade de nutrientes, pois sob uma agitação constante ficam suspensos e assim não há cristalização. Além disso, impede que ocorra a sedimentação das microalgas, ou seja, evita a subexposição das camadas inferiores e a exposição excessiva das camadas superiores a luz e nutrientes (MONTEIRO; LUCHESE; ABSHER, 2010).

4.3.5 pH

As variações de pH alteram o estado químico de diversas substâncias essenciais para as algas, como o CO₂, fosfato, ferro e amônia, atuando, portanto, direta ou

indiretamente no metabolismo das algas juntamente com outros fatores, pois interfere na permeabilidade da membrana, na velocidade das reações enzimáticas e no transporte de íons (BECKER; MARIN, 2009; WOJCIECHOWSKI J., 2013). Além disso, o aumento do pH ocorre devido à atividade biológica das células, sendo assim um indício do crescimento microalgal (BERENGUEL et al., 2004).

4.3.6 Tipos de cultivo

As microalgas necessitam de uma fonte de energia para seu crescimento e divisão celular, assim como todas as células vivas (SUN et al., 2018). Podem ser classificadas como fotoautotróficas, heterotróficas, mixotróficas e fotoheterotróficas, conforme as fontes de energia e carbono utilizadas (HU et al., 2018). O modo de cultivo interfere no crescimento desses organismos e em sua composição bioquímica de biomassa. Deste modo, é necessário determinar previamente seu modo de cultivo para a pesquisa de microalgas (DANESHVAR et al., 2021).

4.3.6.1 Cultivo fotoautotrófico de microalgas

O cultivo fotoautotrófico consiste em uma condição de cultivo na qual a luz é utilizada como fonte de energia, enquanto o carbono inorgânico é utilizado como fonte de carbono para obtenção de energia química por meio da fotossíntese. Esse é o método mais corriqueiro e antigo no cultivo de microalgas (CHEW et al., 2018). As fontes de carbono mais frequentemente utilizadas nesse modo de cultivo são o CO₂ (dióxido de carbono) e o bicarbonato (HCO₃⁻) (KIM et al., 2014a). Sendo assim, é o modo de cultivo no qual ocorre o sequestro de CO₂. Em decorrência disso, há um interesse para o desenvolvimento de estratégias de captura e utilização de carbono (CCU) utilizando microalgas fotoautotróficas. Tais estratégias podem auxiliar na redução das emissões de gases do efeito estufa, contribuindo assim para a atenuação das mudanças climáticas. Além da produção de compostos que podem ser utilizados em produtos de alto valor agregado, como lipídios, proteínas e carboidratos, que são gerados a partir da fixação de carbono na estrutura molecular das microalgas (VENKATA SUBHASH et al., 2017). Ademais, esse modo de cultivo possui o menor risco de contaminação biológica uma vez que não há carbono orgânico em cultivos fotoautotróficos (CHEW et al., 2018). A principal limitação desse tipo de cultivo é a dependência de luz. A privação ou escassez de luz vai ocasionar uma menor produtividade, assim como o efeito de auto-

sombreamento na arranjo vertical das microalgas, pois isso dificulta a distribuição de luz em cultivos com maior densidade de células (NITSOS et al., 2020).

4.3.6.2 Cultivo heterotrófico de microalgas

O cultivo heterotrófico permite que as microalgas cresçam na ausência de luz. Nesse modo de cultivo há o consumo de carbono orgânico para obtenção de energia (LAM; LEE, 2012). Uma vez que não há dependência de luz nesse tipo de cultivo, a produtividade de biomassa é superior aos cultivos fotoautotróficos, pois não ocorre a fotoinibição (CHEW et al., 2018). Contudo, há desvantagens que precisam ser apontadas. Como o fato de que poucas espécies são capazes de crescer heterotroficamente. Além disso, essas espécies geram CO₂ no metabolismo de carbono orgânico e não conseguem consumi-lo. Sendo assim, não podem ser utilizadas com a finalidade de amenizar mudanças climáticas (HU et al., 2018). Ademais, há um alto risco de contaminação biológica com diferentes microrganismos heterotróficos, como bactérias, leveduras e fungos, que ocasiona a redução do crescimento das microalgas (HU et al., 2018).

4.3.6.3 Cultivo mixotrófico de microalgas

Microalgas capazes de crescer em condições mixotróficas utilizam carbono inorgânico e compostos orgânicos conjuntamente, pois possuem mecanismos celulares para metabolismo fotoautotrófico e heterotrófico (GROBBELAAR, 2013). Entretanto, isso não significa que organismos mixotróficos alterem estes dois modos de cultivo. A utilização simultânea de CO₂, compostos orgânicos e luz diferencia as microalgas mixotróficas das demais. Esses organismos precisam de luz para realizar fotossíntese e de substratos orgânicos para respiração aeróbica. Porém, com a ausência de luz utilizam o metabolismo heterotrófico (PEREZ-GARCIA et al., 2015). Sendo assim, as microalgas mixotróficas também contribuem para a atenuação de CO₂ por meio da fotossíntese.

Estudos mostram que a produtividade de biomassa em cultivos mixotróficos é superior à de cultivos fotoautotróficos e heterotróficos (ANANTHI et al., 2021). Um exemplo disso é a espécie *Chlorella sorokiniana*, com a qual foi obtido um peso seco máximo de biomassa 2,4 e 5,2 vezes maior que o da mesma espécie cultivada de forma heterotrófica e fotoautotrófica, nesta ordem (LI et al., 2014).

Ainda que esse modo de cultivo tenha vantagens, também demonstra algumas desvantagens: I) a utilização de substrato orgânico aumenta o custo do cultivo; II) Maior risco de contaminação biológica durante a manutenção das culturas, devido a utilização de açúcares; III) Há dependência de luz, ainda que seja reduzida em comparação a cultivos fotoautotróficos; IV) Poucas espécies são capazes de crescer nesse modo de cultivo, isto é, há pouca biodiversidade de organismos para investigação (HU et al., 2018).

4.3.6.4 Cultivo fotoheterotrófico de microalgas

Microalgas fotoheterotróficas necessitam de luz como fonte de energia e utilizam carbono orgânico como fonte de carbono (YEH; CHEN; CHANG, 2012). Esse grupo de organismos não são capazes de metabolizar o CO₂ e não conseguem crescer utilizando glicose sem a presença de luz. Entretanto, a glicose é assimilada à biomassa e não utilizada como fonte de energia. Os organismos fotoheterotróficos geram uma quantidade insignificante de CO₂ em comparação com mixotróficos e heterótrofos, uma vez que o Ciclo de Calvin não está atuante (CHOJNACKA et. al., 2003). A principal desvantagem desse modo de cultivo é o alto custo, pois as microalgas carecem de carbono orgânico e luz para crescer. Além disso, é necessário um planejamento específico de fotobiorreator para esse modo de cultivo (ANANTHI et al., 2021; CHEW et al., 2018).

4.3.7 Meios de cultivo

Meios de cultivo são soluções compostas por nutrientes primordiais para proporcionar o crescimento, saúde e manter a estabilidade das microalgas (GROBBELAAR, 2013; PROCHÁZKOVÁ et al., 2014). Os nutrientes são classificados em macronutrientes, micronutrientes e oligoelementos, conforme a quantidade essencial para um crescimento ideal (GROBBELAAR, 2013). Segundo Richmond (2003) os macronutrientes mais importantes para o cultivo de microalgas, com exceção do carbono, são o nitrogênio, fósforo e ferro. Além de alguns micronutrientes, utilizados em pequenas quantidades, sendo os principais cobalto (Co), cobre (Cu), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn). Usualmente, o nitrogênio é fornecido na forma de nitratos, amônia, sais de amônio e uréia. A ausência ou excesso de nitrogênio pode causar diversos efeitos nas culturas. Quando esse macronutriente está presente em pequena quantidade, as microalgas direcionam o fluxo de carbono da geração de proteínas para a produção de

carboidratos e lipídios, por exemplo. Já a escassez de fósforo provoca o aumento da produção de betacaroteno e astaxantina. Ademais, o excesso de ferro pode provocar estresse oxidativo nas células.

Os meios comumente utilizados para o crescimento de microalgas são os meios formulados e águas residuais (DANESHVAR et al., 2021). Os meios formulados podem ser utilizados para o cultivo de diversas espécies de microalgas ou podem ser aplicáveis apenas para um grupo distinto. Por exemplo, o meio BG11 (Blue-Green), que pode ser utilizado para o cultivo de cianobactérias, porém, também é aplicado no cultivo de microalgas como as espécies de *Chlorella* (ENAMALA et al., 2018). Além disso, existem os chamados “Meios modificados”, cuja composição é alterada aumentando ou diminuindo concentrações de meios de referência. Tais meios são utilizados para otimizar a produção de metabólitos específicos ou para a investigação de privação ou escassez de nutrientes com base em delineamentos experimentais padrão (DANESHVAR et al., 2021).

Estudos apontam que a modificação ou adição de nutrientes pode ocasionar mudanças em um meio de cultivo, conseqüentemente afetando tanto a cinética de crescimento, quanto a composição da biomassa desses organismos (CAMACHO; WIT, 2003). Por exemplo, Anand et al. (2019) utilizaram meio BG11 modificado em diferentes concentrações de NaCl, MgCl·6H₂O e CaCl·2H₂O para cultivo de *Scenedesmus vacuolatus*. O objetivo do estudo foi testar o aumento da produção de lipídios dessa microalga a partir do estresse causado pela salinidade.

4.4 Composição bioquímica das microalgas e suas aplicações Biotecnológicas

A partir dos componentes bioquímicos das algas são observadas características interessantes que podem ser aplicáveis (VO HOANG NHAT et al., 2018).

As algas não possuem estrutura de sustentação constituída por uma matriz complexa de celulose, hemicelulose e lignina, uma vez que esses organismos habitam os ecossistemas aquáticos (DEBIAGI et al., 2017; VANDAMME et al., 2012). Sendo assim, são compostas principalmente por biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (DEBIAGI et al., 2017). Estudos mostram que microalgas são fontes robustas de proteínas e lipídios, enquanto os carboidratos, geralmente são constituintes das macroalgas ou algas (CESÁRIO et al., 2018; DEBIAGI et al., 2017). No entanto, os

rendimentos de biomoléculas desses organismos dependem da espécie e de sua composição de biomassa, que em contrapartida é afetada diretamente por sua respectiva condição de crescimento e pela disponibilidade de nutrientes (DEBIAGI et al., 2017; OMETTO et al., 2018).

Os principais produtos da fotossíntese em algas marinhas e macroalgas são os carboidratos, sobretudo extracelulares, que desempenham funções de suporte e proteção (CESÁRIO et al., 2018). Em contrapartida, nas microalgas, os carboidratos estão presentes em especial em forma de celulose, que por sua vez estão presentes na parede celular e nos plastídeos em forma de amido (CESÁRIO et al., 2018; CHEN et al., 2013). Os carboidratos de microalgas podem ser uma opção plausível para produção de algumas formas de bioenergia, como o bioetanol, devido à escassez de hemicelulose e a ausência de lignina em sua composição (CHEN et al., 2013; CHIA et al., 2018). O bioetanol derivado de carboidratos de microalgas tem potencial para ser um combustível alternativo com vasta utilização, porém, ainda há limitações de matéria-prima e processos de produção (RAJKUMAR; YAAKOB; TAKRIFF, 2014; TRUNG et al., 2016). Para que a produção a nível comercial desse combustível seja possível, será necessária uma seleção de espécies adequadas de microalgas, assim como processos de cultivo otimizados (TRUNG et al., 2016). Além do bioetanol, as microalgas detêm um potencial como matéria-prima de biodiesel, devido ao alto teor lipídico desses organismos, mais especificamente, triacilglicerídeos (TAGs), que podem estar presentes na composição de biomassa de algumas espécies de microalgas (CHISTI, 2010).

Para além dessas aplicações biotecnológicas como a produção de combustíveis e produtos químicos, as microalgas também têm destaque nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, e seus pigmentos, compostos bioativos e biomassa já são consumidos mundialmente. Ademais, há relatos recentes de vários benefícios destes compostos bioativos para a saúde humana (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019; YAN et al., 2016). Um estudo com ensaios clínicos de Fallah et al. (2018) mostrou que a suplementação com *Chlorella* melhorou os níveis de colesterol total, níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e níveis de glicose no sangue em jejum. Embora as informações sobre os compostos bioativos de *Chlorella* de água doce ainda sejam escassas, seus suplementos dietéticos já estão disponíveis para comercialização mundialmente (BITO et al., 2020).

4.7 Metabolômica e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e suas aplicações

A complexidade e a ampla heterogeneidade química dos compostos obtidos na análise de metabólitos dos organismos integram um dos desafios centrais da metabolômica (FERNIE et al., 2004; KOPKA et al., 2005; OKSMAN-CALDENTY; INZÉ; OREŠIČ, 2004). A estimativa é que cerca de 4.000 - 25.000 compostos podem constituir o metaboloma de qualquer organismo (FERNIE et al., 2004; KOPKA et al., 2005; TRETHERWEY, 2004), sendo que no reino vegetal, constam cerca de 200.000 metabólitos (FIEHN, 2002; TRETHERWEY, 2004).

O método analítico mais vastamente aplicado para definir perfis de metabólitos é a Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), uma vez que possibilita uma forma efetiva de quantificar centenas de metabólitos (consultar **Tabela suplementar 4**) em uma única execução de amostra (FERNIE et al., 2004; GULLBERG et al., 2004). Além de que, há otimização e desenvolvimento frequentes de métodos de análise de dados, além dos protocolos de extração robustos que já existem (CUADROS-INOSTROZA et al., 2009). Usualmente, metabólitos de materiais biológicos são analisados utilizando técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massas (MS) ou espectroscopia de ressonância nuclear (NMR) (BAIDOO; TEIXEIRA BENITES, 2019; DUNN, 2008; OBATA; FERNIE, 2012).

O método de GC-MS já foi utilizado para perfis de metabólitos desde a década de 1970 (GOODMAN- et al., 1977; JELLUM et al., 1976). Além disso, a técnica já foi validada como uma abordagem de fenotipagem metabólica demasiadamente relevante na pesquisa de plantas (FIEHN et al., 2000; LISEC et al., 2006).

Muitos dos compostos precisam ser modificados quimicamente para o aumento da sua volatilidade e estabilidade antes das análises, por isso são aplicados métodos de derivatização (HALKET et al., 2005; LITTLE, 1999). Para perfis de metabólitos vegetais, um dos métodos de derivatização usualmente utilizado é realizado em duas etapas, englobando a oximação de grupos “ceto” com a subsequente trimetilsililação de grupos funcionais reativos (ALLWOOD et al., 2009; HALKET et al., 2005). Devido a derivatização, a GC-MS é capaz de detectar metabólitos polares menores, como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, álcoois de açúcar e poliaminas, embora a

técnica detecte preferencialmente compostos menos polares, como os hidrocarbonetos ou derivados de ácidos graxos (HALKET et al., 2005; SCHAUER et al., 2005).

A fim de evitar equívocos na identificação de compostos detectados a partir da CG-MS, deve ser analisada a combinação de tempo de retenção específico do composto e seu respectivo espectro de massa, uma vez que podem existir espectros de massa de, por exemplo, isômeros conformacionais (KOPKA, 2006; WAGNER; SEFKOW; KOPKA, 2003).

Softwares como o *MetAlign* são utilizados para processamento primário de dados brutos de cromatogramas GC-MS e possibilitam uma análise comparativa ampla de perfis de metabólitos por meio do alinhamento de valores quantitativos de picos de massa distintos nas amostras analisadas (LOMMEN, 2009). Como resultado, é obtida uma matriz de dados que pode ser submetida diretamente a análises estatísticas para a realização de comparações. No entanto, essas matrizes de dados podem ter dezenas de milhares de picos de massa detectados, ou seja, são excessivamente grandes. Embora seja possível fazer essas análises, pode haver alguns problemas de redundância das variáveis, uma vez que cada metabólito será caracterizado por diversos picos de massa diferentes. Além disso, as informações da estrutura de um metabólito, ou seja, o espectro de massa no caso de GC-MS, não são fornecidas diretamente como resultado do alinhamento, sendo assim, dificilmente seria possível realizar uma interpretação direta dos resultados experimentais. O *MSClust* é uma ferramenta que pode ser utilizada para minimizar essas complicações, uma vez que esse algoritmo é capaz de diminuir a redundância de sinal por metabólito em variáveis representativas únicas, além de reestruturar os espectros de massa originais, dessa forma, concede informações estruturais dos metabólitos, tudo isso por meio do agrupamento dos picos de massa alinhados em metabólitos reestruturados (TIKUNOV et al., 2012).

O perfil de metabólitos tem sido aplicado em diversos casos, desde a exploração dos efeitos de herbicidas em plantas até em aplicações farmacológicas, fisiologia molecular e genômica funcional, sendo assim uma técnica vantajosa para deliberar problemas biológicos, além de ser uma ótima ferramenta para compreensão dos processos celulares (BINO et al., 2004; CLAUDINO et al., 2007; FIEHN et al., 2000; LINDON et al., 2004; SAUTER; LAUER; FRITSCH, 1991; STEPHANOPOULOS; ALPER; MOXLEY, 2004).

O GC-MS é uma ferramenta que pode ser utilizada para monitoramento e rastreamento de poluentes orgânicos no meio ambiente. Como por exemplo, para identificar clorofenóis na água e no solo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), herbicidas, fenóis, pesticidas, entre outros (AMIRAV et al., 2008; BLIESNER, 2006). Além disso, também possui aplicações para análise de alimentos e bebidas, com o objetivo de identificar compostos aromáticos como ésteres e ácidos graxos e para detecção de contaminantes ou adulteração de alimentos e outros produtos como óleos essenciais, azeite, manteiga e etc. (ADAMS, 2007; ALON; AMIRAV, 2006). Essa técnica ainda é utilizada na indústria química para análise de diversos produtos petroquímicos, combustíveis e misturas de hidrocarbonetos, incluindo gasolina, diesel, biodiesel e uma série de amostras geoquímicas (GROB; BARRY, 2008). O GC-MS também é empregado para análise de solventes aromáticos, alérgenos em cosméticos, bem como fibras sintéticas e tecidos (COLE, 2013).

Ademais, a técnica também é utilizada para análise de urina de atletas em laboratórios antidoping esportivos para identificação de esteroides anabolizantes. Além de ser frequentemente utilizada em toxicologia forense para solucionar problemas relativos a amostras biológicas de suspeitos, vítimas ou falecidos, como por exemplo utilização de venenos e esteroides (CHAUHAN, 2014; STEIN; SCOTT, 1994). Ainda com objetivos voltados para a área de saúde, sua utilização também é importante para bioanálise de sangue e urina para detecção de drogas como narcóticos, anestésicos e álcool (THERMO FISHER SCIENTIFIC, (2011). Também é utilizada para detectar doenças metabólicas congênitas em recém-nascidos, bem como em indústrias farmacêuticas para pesquisa e desenvolvimento de processos e métodos, análise farmacêutica, ou seja, testes de estabilidade e perfil de impureza de medicamentos, aperfeiçoamento e desenvolvimento de formulações, além da biotecnologia farmacêutica (CHAUHAN, 2014).

A tecnologia de análise no CG-MS possibilita também análises de novos compostos e sua caracterização e identificação (ZIEGENHALS et al., 2008).

Veyel et al. (2014) apresentaram uma revisão crítica com dados experimentais acerca dos protocolos utilizados para perfis de metabólitos intracelulares em um gênero de microalgas verdes (*Chlamydomonas*), utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Além disso, Kind et al. (2012) relataram secreções lipídicas de metabólitos extracelulares de uma espécie do gênero *Chlorella* e conseguiram

observar cerca de 1000 compostos empregando técnicas de cromatografia líquida e gasosa acopladas a espectrometria de massa. No entanto, grande parte dos compostos não foram identificados, principalmente por consequência da falta de abrangência de repositórios de compostos e sua escassez em bancos de dados, assim como ocorre em diversos estudos nos quais os compostos são desconhecidos e as análises são feitas por meio de comparações de espectros de massa (ŠPÁNIK; MACHYŇÁKOVÁ, 2018).

5. Material e Métodos

5.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília – DF, Brasil.

5.2. Cepa de microalgas e condições de cultivo

A cepa da microalga *Chlorella Sorokiniana* (acesso GenBank - KM061456.1) que foi utilizada nesse trabalho foi obtida na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Brasília-DF). É uma cepa tropical que foi isolada do Cerrado e identificada por (HADI et al., 2016). Esta cepa foi conservada na Coleção de Microrganismos e Microalgas para Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa (Embrapa_LBA # 39). A cepa é mantida em Erlenmeyer em meio líquido BG11 (BOUSSIBA; VONSHAK, 1991) e condicionadas em câmara de crescimento com fotoperíodos de 16h/8h, sob temperatura fixa de 25 ° C.

Embora a cepa já estivesse isolada e sendo cultivada previamente, antes do início dos experimentos, foi realizada uma diluição seriada da cultura. Essa metodologia consiste basicamente em diluir a amostra de microalgas até obter uma amostra limpa, livre de outros microrganismos e unialgal (uma colônia isolada) da alga de interesse

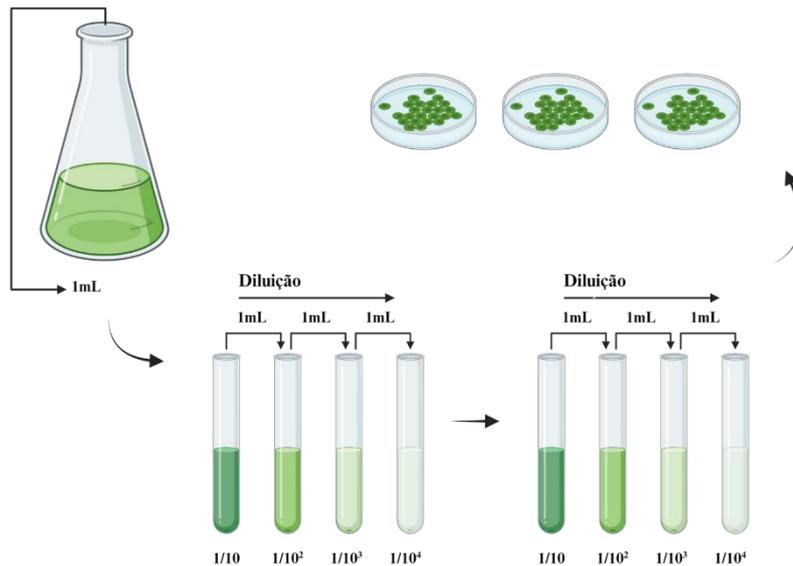


Figura 2 Metodologia de diluição seriada, utilizando a proporção 1/10, para isolar uma colônia da microalga utilizada na pesquisa.

(Figura 2). O procedimento foi executado pipetando 1 mL da cultura original em um tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultivo BG11 estéril. A partir dessa primeira diluição, pipetou-se 1 mL em outro tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultivo estéril e assim sucessivamente. Posteriormente, as amostras diluídas foram incubadas e supervisionadas durante 7 dias. Para garantir a pureza da cultura, esse processo foi realizado duas vezes consecutivas. Após esse procedimento, foram inoculados 100 μ L da amostra mais diluída em placas de petri contendo meio BG11 e ágar (1,5%) e então as placas foram incubadas e, em alguns dias, as colônias se tornaram visíveis e foi possível confirmar que não havia contaminação de outro microrganismo. Uma das colônias visíveis foi coletada e ressuspensa em meio de cultivo líquido e estéril (BG11) e a partir dessa cultura foram feitos os experimentos.

5.3 Meios de cultivo

Foram utilizados quatro formulações diferentes nos meios de cultivo líquido para testar as diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e liberação de compostos extracelulares de *Chlorella sorokiniana* (Tabela 1), foram as seguintes: I) O meio de cultivo padrão utilizado para esta espécie, Blue Green 11 (BG11), que foi utilizado como controle; II) meio similar ao BG11, porém com uma fonte de nitrogênio distinta, pois o nitrato de sódio foi substituído pela quantidade correspondente de nitrogênio na forma de Ureia, descrito como “Blue Green Urea” por (RIBEIRO et al., 2020); III) meio similar ao

BG11 porém, com a principal fonte de nitrogênio sendo o nitrato de potássio; IV) meio com uma formulação similar ao BG11, porém com três fontes de nitrogênio combinadas (ureia, nitrato de potássio e nitrato de amônio), aqui referido como BGCON, “Blue Green combination of nitrogen”, preservando a composição elementar de N, P, Mg e Ca presente no meio BG11, sendo que neste meio a quantidade de nitrogênio de cada uma das fontes (Nitrato de sódio, Nitrato de potássio, Nitrato de amônio) foi equivalente a 1/3 do total. **(Tabela 1).**

Tabela 1 Lista com as formulações dos quatro meios que serão testados para o crescimento e secreção de metabólitos.

Meios de cultivo					
Macronutrientes	Composição química	BG11 (mg /L)	BGU (mg /L)	BGK (mg/L)	BGCON (mg / L)
Nitrato de sódio	NaNO ₃	500	-	-	-
Ureia	CH ₄ N ₂ O	-	530	-	176
Fosfato de dihidrogênio potássio	KH ₂ PO ₄	0	40	40	40
Nitrato de potássio	KNO ₃	-	-	1736	595
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO ₄ · 7H ₂ O	5	75	75	75
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	36	36	36
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	-	-	-	235
Carbonato de Sódio	Na ₂ CO ₃	20	20	20	20
Micronutrientes					
Ácido dissódico etilenodiaminotetracético desidratado	EDTA Na ₂	1	1	1	1
Nitrato de cobalto (II) hexahidratado	Co (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,05	0,05	0,05	0,05
Molibdato de sódio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,39	0,39	0,39	0,39

Ácido bórico	H_3BO_3	2,86	2,86	2,86	2,86
Sulfato de cobre (III) pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08	0,08	0,08	0,08
Cloreto de manganês tetra hidratado	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81	1,81	1,81	1,81
Sulfato de zinco heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22	0,22	0,22	0,22
Citrato férrico de amônio verde	$C_6H_8FeNO_7$	6	6	6	6
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	6	6	6	6

5.4 Delineamento Experimental

5.4.1. Pré-inóculo

Inicialmente foi feita uma medição por densidade ótica (D.O) na faixa de 680nm, para constatar o estágio de crescimento que a cultura estava e então ajustar a diluição para 0,1, para realizar o pré-inóculo da cultura utilizando os três meios formulados (BGK, BGU e BGCON) e o meio controle (BG11). O pré-inóculo de todos os meios foi executado em paralelo utilizando Erlenmeyer de 250mL, com volume de meio de 125 mL para cada tratamento. O tempo de cultivo foi de 8 dias e o cultivo foi feito utilizando uma réplica apenas para cada meio. Ao longo dos 8 dias, a câmara de crescimento foi mantida a 25 °C com um fotoperíodo de 16h/8h, com intensidade luminosa de 100 μ mol fótons $m^{-2} s^{-1}$ e as culturas foram agitadas em uma mesa agitadora à 150 rpm. Após os 8 dias de cultivo todo o volume de cada Erlenmeyer foi centrifugado utilizando tubos Falcon de 50mL a 12000 g por 15 min e o sobrenadante foi descartado. A biomassa de algas foi ressuspendida em 5mL de cada um dos respectivos meios para ser utilizada no experimento de crescimento e análise dos metabólitos.

5.4.2 Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio e separação da biomassa do meio

Os experimentos com os três meios formulados e o controle foram executados em paralelo utilizando Erlenmeyer de 250mL, com volume de meio de 125mL para cada tratamento. As microalgas utilizadas para o cultivo foram as que cresceram durante o pré-

inoculo. O inóculo das microalgas nos seus respectivos meios foi feito respeitando uma proporção de diluição para garantir que todos os meios nos Erlenmeyer estivessem com o mesmo valor de densidade ótica (0,1) no início do crescimento. O tempo de cultivo foi de 8 dias e os testes foram feitos em quadruplicata para garantir que serão réplicas biológicas independentes. Ao longo dos experimentos, a câmara de crescimento foi mantida a 25 °C com um fotoperíodo de 16h/8h, com intensidade luminosa de 100µmol fótons m⁻² s⁻¹ e as culturas foram agitadas em uma mesa agitadora a 150 rpm. O crescimento foi monitorado por densidade ótica (O.D) utilizando um espectrofotômetro, durante os 8 dias de cultivo. Foram utilizados 300µL de amostra - em triplicata - de cada Erlenmeyer com os diferentes meios. As amostras foram inseridas em placas de 96 poços para a medição, que foi realizada nas faixas de 680 nm e 750 nm, respectivamente. Porém, para fins de análise foram considerados os valores 750 nm, uma vez que é o ideal para organismos fotossintéticos, para evitar a absorção de clorofila (KEMPA et al., 2009).

Além disso, também foi realizado o procedimento de contagem de células utilizando câmara de Neubauer em dois estágios do crescimento (Dia 3 e dia 6), sendo que a contagem foi feita em 4 quadrantes diferentes para cada réplica de cada meio e depois foram calculadas as médias dos valores. Para determinar a densidade celular foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ total de células} / \text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Após os 8 dias de cultivo todo o volume de cada Erlenmeyer foi centrifugado a 12000 g por 15 min utilizando tubos Falcon de 50mL e o sobrenadante de cada um deles foi coletado e filtrado para análise dos metabólitos extracelulares, utilizando filtro de seringa de Nylon (Diâmetro 25mm, poro 0,20µm) para garantir que não haveria células em suspensão.

A biomassa recuperada (o pellet) foi submersa em nitrogênio líquido e depois liofilizada (48h) para retirar a água e em seguida foi feita a pesagem dessa biomassa para calcular sua respectiva produtividade (Determinada através do peso seco da massa celular que foi obtida). O sobrenadante de todos os meios também passou pelo processo de liofilização para análise posterior utilizando cromatografia gasosa. Para isso, também

foram liofilizadas amostras somente com os meios de cultura de cada um dos tratamentos (branco), com a finalidade de distinguir ruídos que podem ser gerados no cromatograma devido a alguns compostos dos meios de cultura formulados. O material liofilizado dos meios de cultivo foi reidratado com 5mL de água Milli-Q e então, foi separado em alíquotas de 1mL em tubos eppendorf e foram adicionados 60µL de de Ribitol (0,2mg/mL) que foi utilizado para normalização das amostras. Os tubos foram armazenados a -20°C até o preparo para análise no GC-MS.

5.4.3 Preparo e análise das amostras para o GC-MS

O método utilizado para separar os compostos presentes no meio extracelular foi a cromatografia gasosa (GC), que diferencia compostos voláteis com base em seu tamanho e polaridade (VEYEL et al., 2014). O GC-MS (cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas) detecta de preferência compostos menos polares, como derivados de ácidos graxos ou hidrocarbonetos, em virtude dos adutos de massa gerados por derivatização, metabólitos polares menores, como açúcares, álcoois de açúcar, ácidos orgânicos, poliaminas e aminoácidos (VEYEL et al., 2014).

O método de cloridrato de metoxiamina e N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) (LISEC et al., 2006) foi utilizado para a derivatização das amostras para gerar o perfil de metabólitos. Foram utilizadas alíquotas de 1mL de cada réplica de cada um dos meios de cultivo (sobrenadante após a centrifugação e filtração) para as análises por GC / MS. Antes da adição do MSTFA, os tubos eppendorfs com as alíquotas foram deixados no Speed-vac por 12hr a 30°C para secar as amostras que ficaram no congelador e remover qualquer resquício de água. Depois das amostras estarem secas, foram adicionados 40 µL de cloridrato de metoxiamina (20 mg/mL em piridina) e as amostras foram incubadas num dri-block, com agitação, por 2 horas a 37°C. Em seguida, foi acrescentado 70 µL de MSTFA e as amostras foram incubadas no dri-block, com agitação, por 30 minutos a 37°C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (10 minutos em 10000g) para retirar partículas insolúveis e 100 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para tubos de vidro (*vials*) para análise no aparelho de GC-MS (*Agilent Technologies*). O GC-MS foi equipado com uma coluna HP-5MS de 30 m com 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme. Os parâmetros operacionais foram: temperatura do injetor 230 °C, injeção de 1 µL no modo *splitless*, temperatura da coluna de 70 °C por 5 minutos, programada para aumentar 5 °C

por min, até 330 °C. O gás de arraste utilizado foi o Hélio a 0,6 mL • min⁻¹. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: temperatura da linha de transferência 250°C, temperatura do quadrupolo 150°C, temperatura do detector MS 250°C. Os espectros foram coletados no modo scan entre 50 e 600 m/z. Cada amostra foi injetada duas vezes no modo *Splitless*: uma injeção com “solvent delay” longo para identificação e quantificação dos 4 meios simultaneamente (BG11, BGK, BGU e BGCON) e uma injeção com “solvente delay” curto apenas com os meios que não contém ureia (BG11 e BGK) para tentar identificar diferenças no perfil de metabólitos nos meios que não contém esse macronutriente.

5.4.3.1 Limpeza das amostras para segunda análise

Foi feita uma limpeza de 8 amostras de BG11 e BGK (4 réplicas de cada uma), para uma segunda análise de perfil de metabólitos apenas entre esses dois meios, o meio controle e o meio com resultado de maior crescimento de acordo com a quantificação de biomassa seca, respectivamente.

A limpeza dessas amostras consistiu em colocar 1mL de cada amostra em um tubo de ensaio, acidificar essas amostras utilizando ácido clorídrico (HCl) para atingir uma faixa de pH entre 1-2. Em seguida, foi adicionado 3 mL de Acetato de etila, o solvente utilizado para a limpeza das amostras, em cada um dos tubos.

Os líquidos foram misturados e posteriormente houve a partição das duas fases (aquosa e solvente). Em seguida, após a separação das fases, a superior (aproximadamente 1mL de volume) foi transferida para outro tubo utilizando uma pipeta. Depois disso, as amostras foram secas durante 150 min a 30°C utilizando o Speed-vac. Em seguida, foram ressuspendidas em 1mL de água e colocadas em micro tubos para, em seguida, passarem pelo processo de secagem novamente utilizando o Speed-vac, durante 14 horas a 30°C.

Após essa secagem, as amostras foram preparadas para análise no CG-MS como descrito no tópico anterior.

O objetivo dessa limpeza é obter picos mais simétricos e finos, além de aumentar a resolução e sensibilidade da análise através da retirada das grandes quantidades de sais presentes do meio de cultivo que permanecem na fase aquosa.

5.4.4. Identificação dos metabólitos

Os metabólitos foram identificados por comparação dos espectros de massas utilizando a biblioteca *NIST*, utilizando $\text{match} > 90\%$ e a quantificação foi feita utilizando o software *MetAlign* (LOMMEN, 2009). Após o alinhamento dos cromatogramas utilizando o software *MetAlign*, foi utilizado o algoritmo *MSClust*, com o objetivo de eliminar a redundância de sinal dos metabólitos em tabelas de picos de massa alinhados (TIKUNOV et al., 2012).

5.4.5. Análises de dados estatísticos

Cada experimento foi feito em quadruplicata, e a análise de variância (ANOVA) de uma via e o Teste-t foram utilizados para testar diferenças significativas entre os tratamentos nos experimentos.

Para proporcionar uma visão geral sobre diferenças significativas entre o perfil dos metabólitos nos diferentes meios foram utilizados: ANOVA com HSD de Tukey a *posteriori* e Test-t, ambos feitos utilizando a plataforma *MetaboAnalyst* (PANG et al., 2021).

5.4.6 Mutagênese UV

Para o experimento de mutagênese, 25mL de culturas de *C. sorokiniana* em fase exponencial de crescimento cultivadas em meio BG11, foram adicionados em triplicata em placas de Petri abertas (**Figura 3**). Após a inoculação das células, as placas foram submetidas a uma sessão mutagênica com exposição a irradiação UV (Lâmpada 254nm, 15W) por 1 minuto a 34 cm de distância (Galloway, 1990), sendo essa condição definida como uma dose letal para 50% das células (**Figura 3**). Foram utilizadas triplicatas de placas em diferentes diluições (1/10, 1/102, 1/103 e 1/104) para observar se a diluição teria influência sobre o crescimento das algas após a mutagênese.

Após a sessão mutagênica, as placas foram mantidas por 24h no escuro para reduzir os mecanismos de reparo impelidos pela luz (**Figura 3**). Posteriormente as culturas foram transferidas para placas de 96 poços com meio semissólido (1,5% p/v ágar com meio BG11) e posteriormente as placas foram cultivadas sob luz constante por 2 semanas até o desenvolvimento de colônias geneticamente iguais (VIGEOLAS et al., 2012).

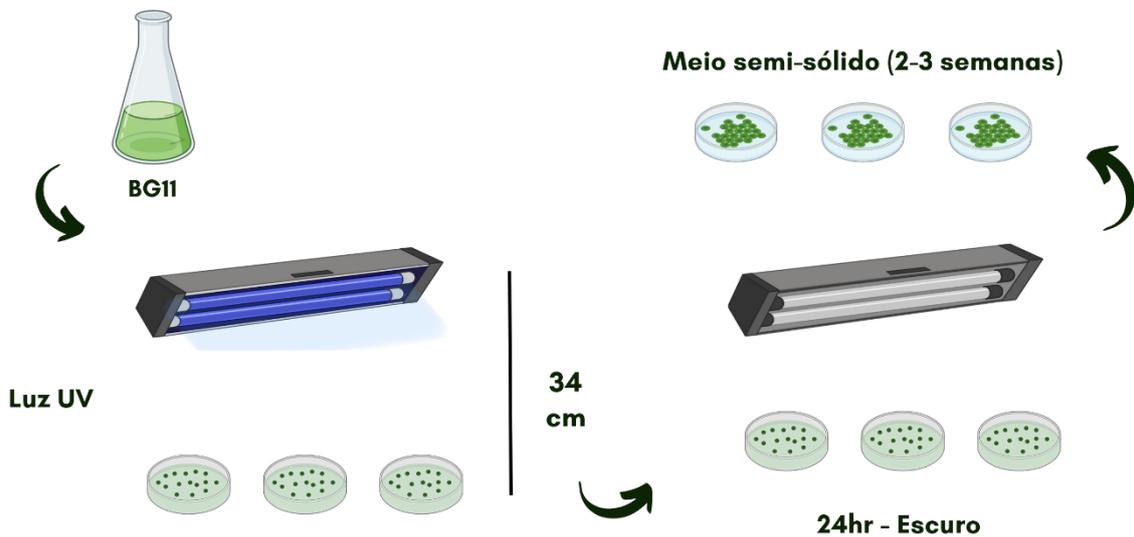


Figura 3 Ilustração representando os passos para a realização da mutagênese, baseado em Vigeolas et al. (2012)

5.4.7 Triagem dos mutantes

O método para realizar a triagem dos mutantes foi feito de acordo com Patil et al. (2016). Inicialmente as colônias foram transferidas para placas de 96 poços contendo o meio semissólido BG11 com 1.5% (p/v) ágar e 0.008% (p/v) de vermelho de fenol como indicador de pH. O crescimento foi mantido durante 1 mês sob condições padrão da sala de crescimento: 25°C, fotoperíodo de 16h/8h e com intensidade luminosa de $100\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O pH do meio foi monitorado com base na cor do indicador, ao redor das colônias que pudessem apresentar alterações em comparação com células que não foram expostas à radiação UV.

6. Resultados e Discussão

6. 1. Curvas de crescimento

Houve crescimento em todos os meios com diferentes fontes de nitrogênio (**Figura 4**) que aumentou de forma constante entre os dias 3 e 7. Pequenas barras de erro mostram que há uma boa reprodutibilidade dos resultados em todas as comparações de crescimento. A ureia (BGU) foi a fonte mais eficaz de nitrogênio para o crescimento em comparação com o meio controle no intervalo entre os dias 1 ao 8 (BG11).

Há muitos estudos que mostram que fontes de nitrogênio são essenciais para o crescimento de algas (ARUMUGAM et al., 2011; HSIEH; WU, 2009; LI et al., 2016; LIN; LIN, 2011; RIBEIRO et al., 2020). Porém, estudos mostram que altas concentrações de Nitrato de amônio se dissociam em solução em amônio e nitrato e isso pode inibir o crescimento da microalga. A hipótese é que isso pode ocorrer devido a incapacidade das células de microalgas de controlar a difusão passiva da amônia, que está em equilíbrio com o amônio, através da membrana plasmática. E quando isso ocorre em altas concentrações, os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) estarão esgotados e/ou serão desviados para que ocorra a assimilação do amônio, uma vez que não pode haver acúmulo de amônia no metabolismo vegetal, pois pode interromper a respiração celular e conseqüentemente o crescimento (CAI; PARK; LI, 2013; CHEN et al., 2011; RAMANNA et al., 2014). É possível que seja esse o motivo pelo qual os meios que contêm Nitrato e nitrato de amônio (BG11, BGK e BGCON) possibilitaram um menor crescimento em relação ao meio BGU, no qual a principal fonte de N é a Ureia. Esse resultado está de acordo com diversos estudos que mostram que a ureia pode ser uma fonte de N muito eficaz para o crescimento de microalgas (ARUMUGAM et al., 2013; LIZZUL et al., 2014).

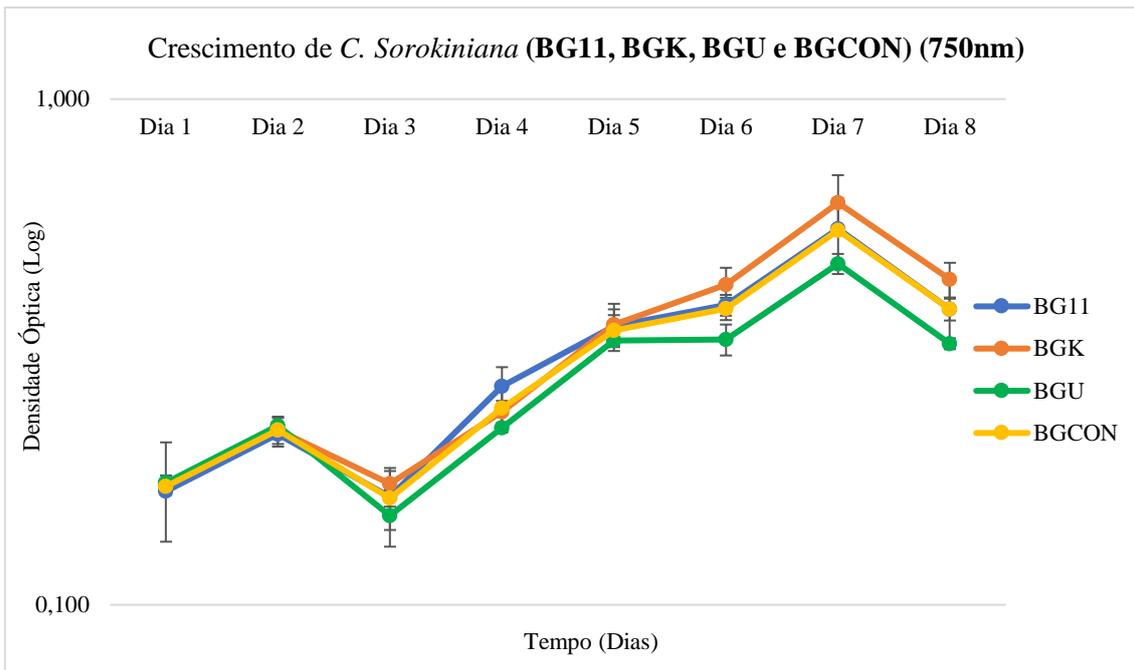


Figura 4 Curvas de crescimento de *Chlorella Sorokiniana* em escala logarítmica em diferentes meios de cultivo medido por Densidade ótica (D.O) a 750nm. Em azul, curva de crescimento de BG11 com barra de erro (Desvio padrão). Em laranja, curva de crescimento de BGK com barra de erro (Desvio padrão). Em verde, curva de crescimento de BGU com barra de erro (Desvio padrão). Em amarelo, curva de crescimento de BGCON com barra de erro (Desvio padrão). As médias comparadas dos 4 meios não apresentaram diferença significativa por ANOVA One-way. As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente no intervalo do dia 1 ao 8, também não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGU, na qual o valor de $p < 0,05$, assim como na comparação individual do meio BGU com BGK e BGCON, na qual também houve diferença significativa em ambas as comparações com $p < 0,05$.

Ao comparar as características de crescimento e rendimento de cultivo de *C. sorokiniana* em diferentes meios (águas residuais e meio BBM), Lizzul et al. (2014) constataram que essa espécie de microalga mostrou preferência por amônio como fonte de nitrogênio ao invés do nitrato e isso ocorre, pois não há reação redox necessária para assimilação de amônio e, assim sendo, demanda uma menor quantidade de energia. Em meios que contém os dois compostos, as microalgas só utilizam o nitrato como fonte de energia quando o amônio estiver totalmente consumido no meio (CAI; PARK; LI, 2013). Possivelmente, foi devido a esse fato que houve diferença significativa no crescimento das microalgas no meio BGCON em comparação ao meio que dispunha apenas da Ureia como única fonte de nitrogênio (BGU).

6.2. Contagem de células

A contagem de células foi feita utilizando uma câmara de Neubauer. Como mostra a **Figura 5**, a contagem foi feita em dois pontos do crescimento, no dia 3 e no dia 7. O objetivo da contagem foi confirmar os dados de crescimento que foram obtidos por meio de densidade óptica, uma vez que não é possível diferenciar células mortas e vivas utilizando D.O. De acordo com o resultado da contagem de células no 7º dia de cultivo, o meio BGK foi o que apresentou maior densidade celular, com mais de 430 mil células/mL e o meio BGU apresentou o menor número com pouco mais de 220 mil células/mL.

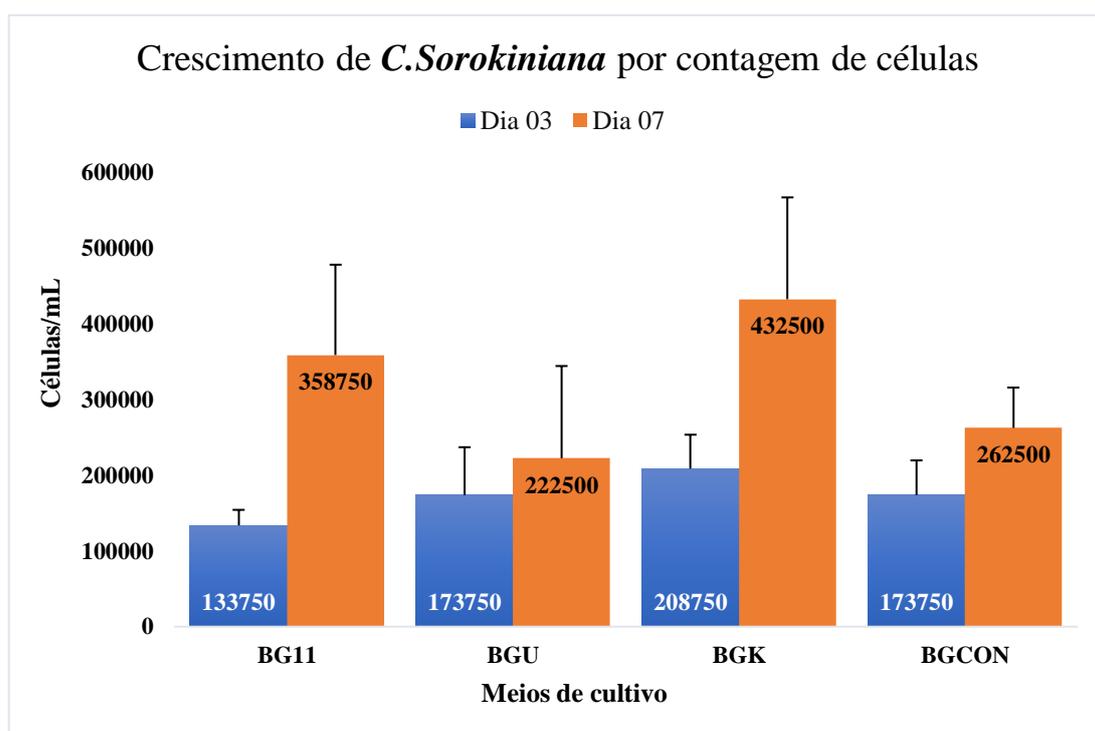


Figura 5 Crescimento de *C. Sorokiniana* a partir de dados de contagem de células. As barras azuis representam o primeiro ponto de contagem (Dia 1) e as barras laranjas representam os valores do segundo ponto de contagem (Dia 7). As barras de erro representam o desvio padrão. Não houve diferença significativa na comparação entre os meios utilizando ANOVA One-way ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente nos dias 3 e 7, também não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGK, na qual o valor de $p < 0,05$.

6.3 Quantificação de Biomassa seca

As microalgas produzem quantidades promissoras de biomassa (LIN; LIN, 2011). Sobretudo em comparação com plantas terrestres, pois retem energia solar e fixam CO₂

até vinte vezes mais e possuem maior produtividade de biomassa, uma vez que assimilam carbono inorgânico dissolvido para seu crescimento.

Na **Figura 6**, pode-se observar que a média de quantificação de biomassa seca da microalga *C. sorokiniana* para cada meio após 8 dias de cultivo foi de: 8,23 mg \pm 3,0 mg (BG11), 16,6 \pm 1,6 mg (BGK), 11,3 \pm 2,9 mg (BGU) e 12,1 \pm 2,3 mg (BGCON) em relação a quantidade de meio de cultivo, que foi de 125 ml. De forma proporcional, o rendimento em 1L de meio, considerando os 8 dias de cultivo seria aproximadamente igual a: 65,84mg.L⁻¹ (BG11), 132,8mg. L⁻¹ (BGK), 90,4mg. L⁻¹ (BGU) e 96,8mg. L⁻¹ (BGCON).

Os valores obtidos de biomassa seca nesse estudo (**Figura 6**) não estão de acordo com os dados das curvas de crescimento (**Figura 4**) pois o meio BGK foi o que apresentou a maior quantidade de biomassa seca em relação ao meio controle (BG11). Para se igualar aos dados das curvas de crescimento, o BGU deveria ter obtido um maior rendimento. Isso pode ter ocorrido devido a perda de material de BGU que houve durante a centrifugação dos meios.

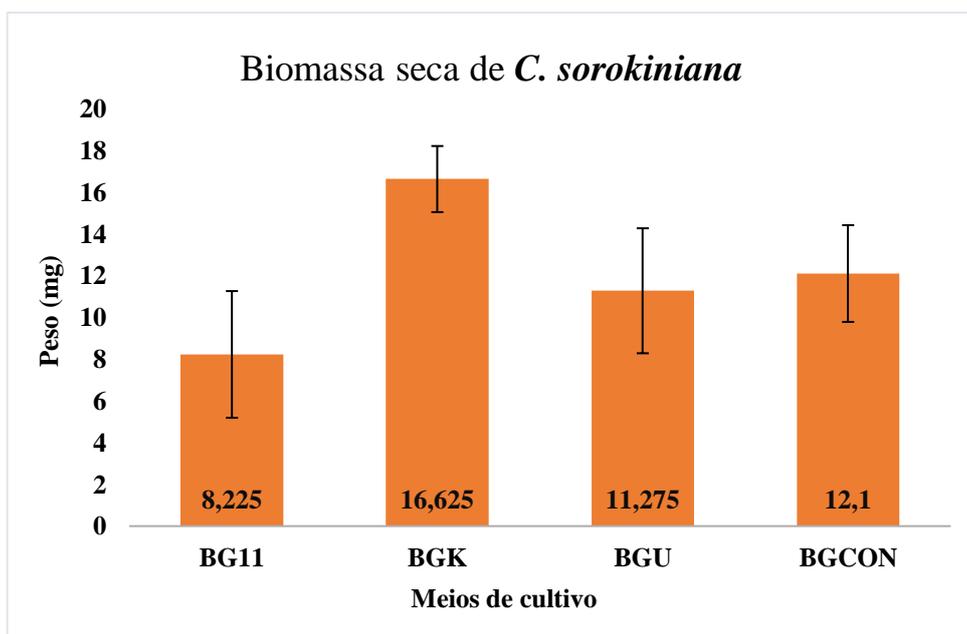


Figura 6 Valores de biomassa seca de *C. Sorokiniana* em mg. As barras de erro representam o desvio padrão. Houve diferença significativa na comparação entre os meios utilizando ANOVA One-way ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). As médias comparadas do controle (BG11) com cada um dos meios separadamente não apresentaram diferença significativa utilizando Test-T, exceto na comparação entre BG11 e BGK, na qual o valor de $p < 0,05$.

Segundo Weyer et al. (2010), o potencial teórico máximo de produção de biomassa para o gênero *Chlorella* é estimado em $196 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. No entanto, estudos mostram que os rendimentos de biomassa do cultivo em larga escala dessa microalga variam de 30 a $42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (LAURENS; LIEVE, 2017; WEYER et al., 2010).

Não foi possível obter dados de produtividade, pois o experimento foi feito em erlenmeyers com pequenos volumes. Sendo assim, não houve análise de biomassa diariamente, apenas no final do processo. No entanto, os valores de produtividade presentes na literatura variam de 12 a $68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para cepas de *C. sorokiniana* cultivadas em diferentes tipos de águas residuais e em bagaço de cana (DE LOURDES et al., 2017; MANZOOR et al., 2021; PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011).

De acordo com as curvas de crescimento, os dados de contagem de células e o peso de biomassa seca é possível inferir que todos os meios possuíam nutrientes suficientes para o crescimento das microalgas e para um rendimento satisfatório de biomassa, uma vez que os valores obtidos foram semelhantes comparados ao meio BG11 como controle, que é o meio padrão para a espécie e que proporciona um crescimento ideal.

6.4 Identificação dos metabólitos

O método utilizado para separar, identificar e comparar os compostos presentes no meio extracelular foi o GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas), que diferencia compostos voláteis com base em seu tamanho e polaridade. Existem desafios para utilizar esse método para determinar um perfil de metabólitos, por exemplo, os ápices dos picos precisam estar relativamente separados no tempo, pois apenas assim, podem ser corretamente atribuídos a metabólitos únicos; caso contrário, a coeluição de picos pode ocasionar detecção de pico falso-negativo (FIEHN, 2008). Embora os metabólitos presentes em maior quantidade sofram menos com essa contaminação espectral, os metabólitos desconhecidos ou pouco abundantes necessitam de uma separação apropriada para detecção positiva e para sua caracterização estrutural (FIEHN, 2008). Para identificar esses metabólitos são realizadas análises que já foram apontadas como muito eficientes (GOODACRE et al., 2007; SUMNER et al., 2007). A maneira mais direta é utilizar um alinhamento de índice de retenção de cromatogramas para reduzir os deslocamentos cromatográficos de forma eficiente (FIEHN; WOHLGEMUTH; SCHOLZ, 2005). Porém, neste estudo o alinhamento dos

cromatogramas foi realizado utilizando o software *Metalign*, que embora não faça o alinhamento utilizando índices de retenção, é um software adequado para cálculos de massa, modificação de formato de dados, retificação de linha de base, triagem de picos, além de possibilitar por meio do alinhamento, uma redução de dados de 100 a 1000 vezes (LOMMEN, 2009).

Após o alinhamento dos cromatogramas e o pré-processamento dos dados, o input gerado foi analisado utilizando o software *Metaboanalyst* para análises estatísticas e identificação das diferenças significativas entre as amostras.

A **Tabela 2** mostra o resultado da ANOVA seguida de um HSD de Tukey que foi feita para identificar diferenças significativas na comparação das amostras dos quatro meios diferentes, utilizando um FDR (False Discovery Rate) de 0.05 como limite. Foram utilizados dados de 13 amostras e 752 picos cromatográficos analisados (Centrotypes). No total, a análise mostrou 30 compostos com diferenças significativas. A coluna 2 (**Tabela 2**) mostra o nome de cada um dos compostos que foram identificados utilizando a biblioteca *NIST* destacados com a cor laranja (7, 10 e 28). Os outros compostos ainda não foram identificados. A coluna 3 mostra os valores de p, confirmando a significância destes compostos e embora o composto 1 seja a mais significativa, pois tem o menor valor de P, o composto não foi identificado (XU et al., 2001).

A coluna 4 (**Tabela 2**) mostra os valores de FDR (False Discovery Rate). Essa técnica foi proposta por Benjamini & Hochberg (1995) e vem sendo empregada com o objetivo de reduzir o número de conclusão de falsos positivos para manipular apenas variáveis mais promissoras em experimentos posteriores. Quanto menor o valor de FDR, mais significativas são as diferenças.

Tabela 2: Características importantes identificadas na comparação dos quatro meios diferentes por ANOVA one-way e análise post-hoc usando HSD de Tukey. A coluna 2 mostra o nome de cada um desses compostos, a coluna 3 mostra os valores de p do teste, a coluna 4 mostra os valores de FDR e a coluna 5 mostra as comparações feitas a partir do HSD de Tukey. Ex: Para o composto nº 7 houve diferença significativa entre BGU comparado a BG11, BGCON e BGK. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 1.

Nº do composto	Identificação	Valor de p	FDR	HSD de Tukey
7	[1]Benzothiopyrano[4,3-b]benzo[e]indole (C ₁₉ H ₁₁ NS)	2,16E-02	0.00023221	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
10	Ácido propanóico (Propanedioic acid, ethyl-, bis(trimethylsilyl) ester/C ₁₁ H ₂₄ O ₄ Si ₂)	6,21E-02	0.00046703	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK; BGU-BGK
28	Benzofurane-5-carboxamide, 2,3-dihydro-N-phenyl (C ₁₅ H ₁₃ NO ₂)	0.0015811	0.042463	BGC-BG11; BGU-BG11; BGU-BGK;

A **Figura 7** mostra quatro gráficos gerados a partir da análise estatística ANOVA do *MetaboAnalyst* da comparação dos 4 meios. A **Figura 7a** mostra o composto com a maior diferença significativa. A **Figura 7b** mostra a comparação relacionada ao composto nº7 da **Tabela 2**, a **Figura 7c** mostra a comparação relacionada ao composto nº 10 e a **Figura 7d** mostra a comparação relacionada ao composto nº 28. O composto nº 1 (**Figura 7a**) possui uma diferença muito notável do meio BGU em relação aos outros meios, assim como também há uma diferença significativa do meio BGU em comparação aos outros meios relativos aos compostos nº7 e nº 10 (**Figura 7b-c**). Em relação ao composto nº 28 essa diferença significativa ocorreu nos meios BGU e BGCON (**Figura 7**).

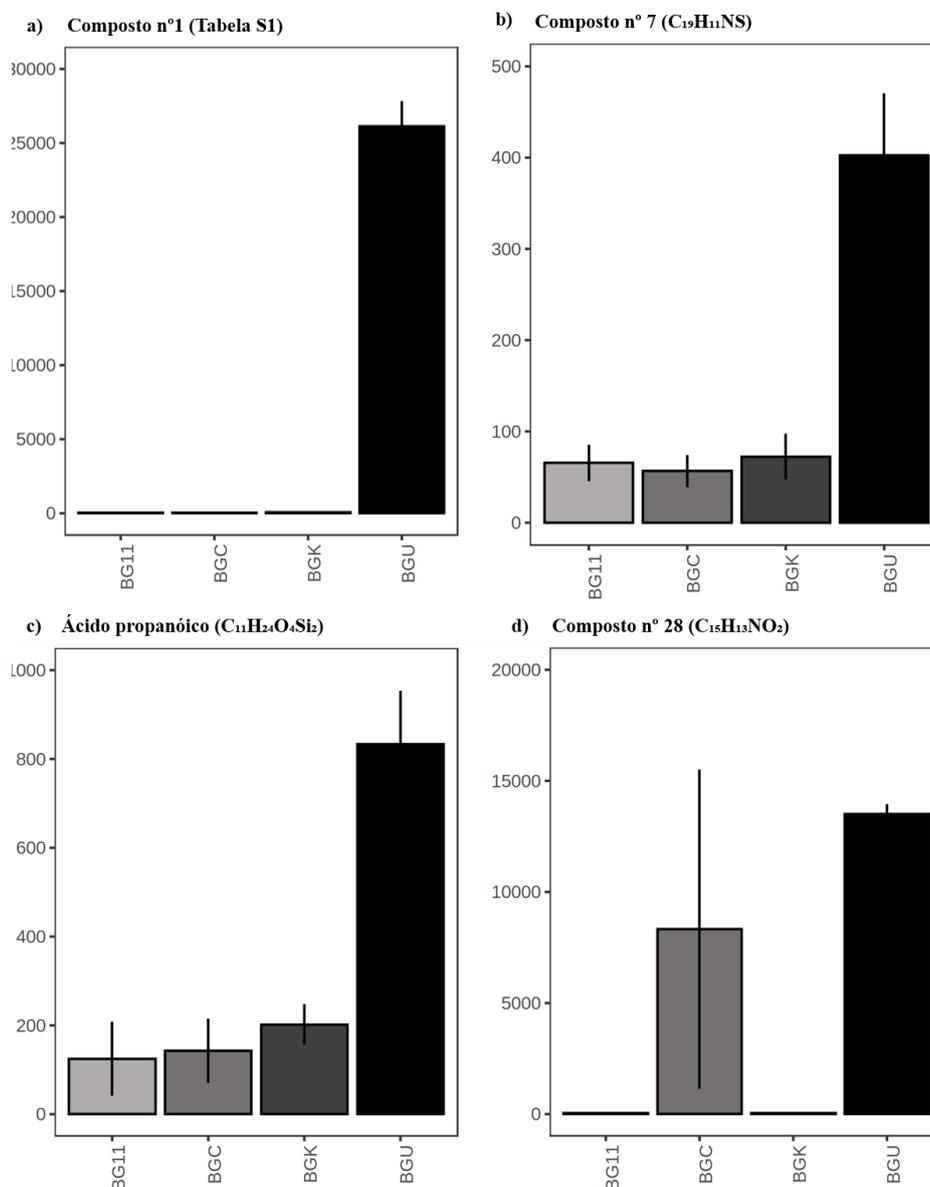


Figura 7 Gráficos gerados no MetaboAnalyst mostrando diferenças significativas entre 4 compostos diferentes comparados nos 4 meios.

O composto n° 10 já foi encontrado em estudos anteriores recentes de perfil metabólico utilizando GC-MS para análises, porém em espécies de macroalgas marinhas (CAI et al., 2021; HE ID et al., 2019).

Há relatos na literatura de que o metabólito n° 7 (**Tabela 2**) é um composto heterocíclico (**Figura 8**) que faz parte de um grupo de compostos com potente atividade anticancerígena *in vitro* (ISHIBASHI et al., 2021). Uma vasta quantidade de compostos heterocíclicos e fragmentos heterocíclicos pertencem a formulações de muitas drogas, em razão da sua versatilidade e propriedades físico-químicas singulares e consequentemente se tornaram componentes importantes para a química medicinal (CHAND et al., 2017). Também há relato de que esse composto e alguns de seus análogos foram utilizados para

testes comportamentais em ratos e revelaram que esse composto reduz a hiperatividade induzida pela anfetamina, uma propriedade que está presente em todas as drogas antipsicóticas (GÉRARD et al., 2002).

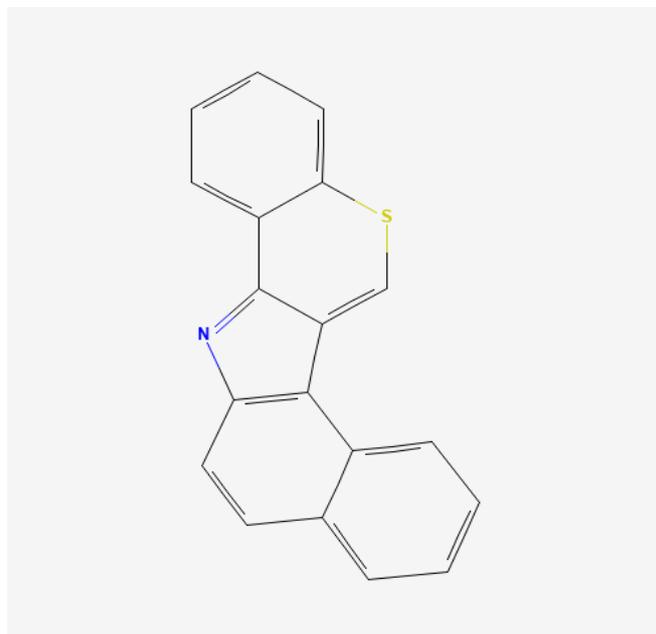


Figura 8 Estrutura química do composto nº 7: *Benzo[g][1]benzotiopirano[4,3-b]índole (Tabela 2)*. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70057>.

O metabólito nº 28 (Tabela 2) também pertence a classe de compostos heterocíclicos. Compostos que contem anéis de benzofurano (Figura 9) estão presentes em diversos fármacos (RADADIYA; SHAH, 2015). Essa estrutura química atraiu muita atenção em razão de suas atividades biológicas e o potencial uso de seus derivados para fármacos clínicos (RADADIYA; SHAH, 2015). Tais compostos estão abundantemente presentes em plantas superiores, como por exemplo nas famílias: Asteraceae, Rutaceae, Liliaceae e Cyperaceae. Sendo que o maior número desses compostos foi descoberto em Asteraceae (KHANAM; SHAMSUZZAMAN, 2015). Há relatos de diversas atividades biológicas desses compostos, incluindo: antitumoral, antibacteriana, antioxidante, antiparasitárias, antiacetilcolina e anti-inflamatórias. Além disso, recentemente, um análogo de benzofurano mostrou um potencial de atividade de agregação anti-amilóide, sendo assim, pode auxiliar em um tratamento alternativo para a doença de Alzheimer (ABDEL-MOTAAL et al., 2017; ASWATHANARAYANAPPA et al., 2013; FURSE, 2017; HIREMATHAD; CHAND; KERI, 2018; LIANG et al., 2016; THÉVENIN et al., 2013; XU et al., 2017).

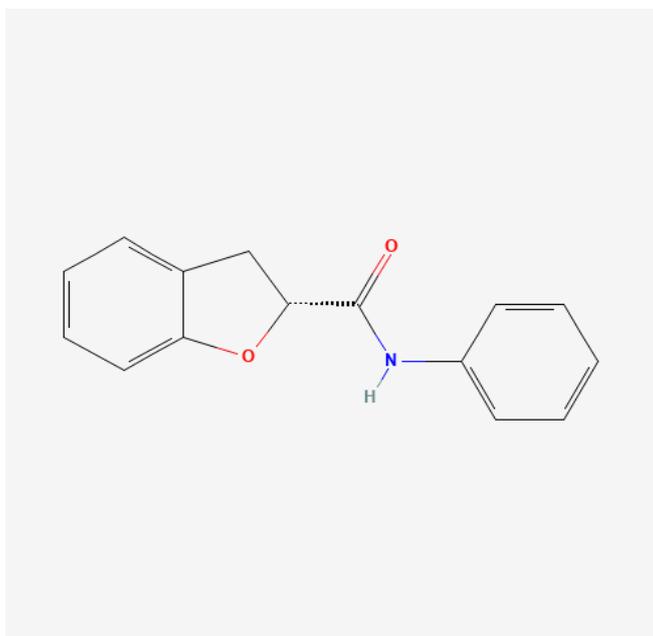


Figura 9 Estrutura química do composto nº 28: Benzofurane-5-Carboxamide, 2,3-dihydro-N-phenyl (Tabela 2).

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8200476>

A **Tabela 3** mostra o resultado do Test-t que foi feito para identificar diferenças significativas na comparação das amostras do meio BGK com o meio controle (BG11). O objetivo é comparar os compostos dos meios nos quais a Ureia não está presente como fonte de nitrogênio. Foram dados de 8 amostras e 599 compostos analisados. No total, a análise mostrou 11 compostos com diferenças significativas. A coluna 2 (**Tabela 3**) mostra cada um dos compostos que foram identificados utilizando a biblioteca *NIST* e que estão destacados com a cor laranja (nº 4, 7 e 8). Os outros compostos ainda não foram identificados.

Tabela 3 Compostos significativos identificados pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11. A coluna 2 mostra o nome de cada um dos compostos que foram identificados, a coluna 3 mostra o valor de p do teste para cada um dos compostos e a coluna 4 os valores de FDR. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 2.

Nº do composto	Identificação	Valor de p	FDR
4	2,4,5-Trifluoro-3-methoxybenzamide, N-(4-fluorophenyl) (C ₁₄ H ₉ F ₄ NO ₂)	4,08E-01	0.0061099
7	Uréia N,N'-bis(trimethylsilyl) C ₇ H ₂₀ N ₂ OSi ₂)	0.00016046	0.01373
8	Uréia N,N'-bis(trimethylsilyl) (C ₇ H ₂₀ N ₂ OSi ₂)	0.00019979	0.014959

Não há relatos na literatura sobre o composto nº 4 (**Tabela 3**) e não foi encontrada nenhuma evidência de estudos anteriores sobre produção de ureia por microalgas em meios de cultivo utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.

A **Figura 10** mostra dois gráficos gerados a partir da análise estatística Test-T realizada no *MetaboAnalyst* da comparação dos compostos dos meios BG11 e BGK (meios que não contem ureia). A **Figura 10a** mostra o composto nº 4 e a **Figura 10b** mostra a comparação relacionada ao composto nº7, ambos descritos na **Tabela 3**, e a diferença significativa que houve na abundância desses compostos nos dois meios comparados.

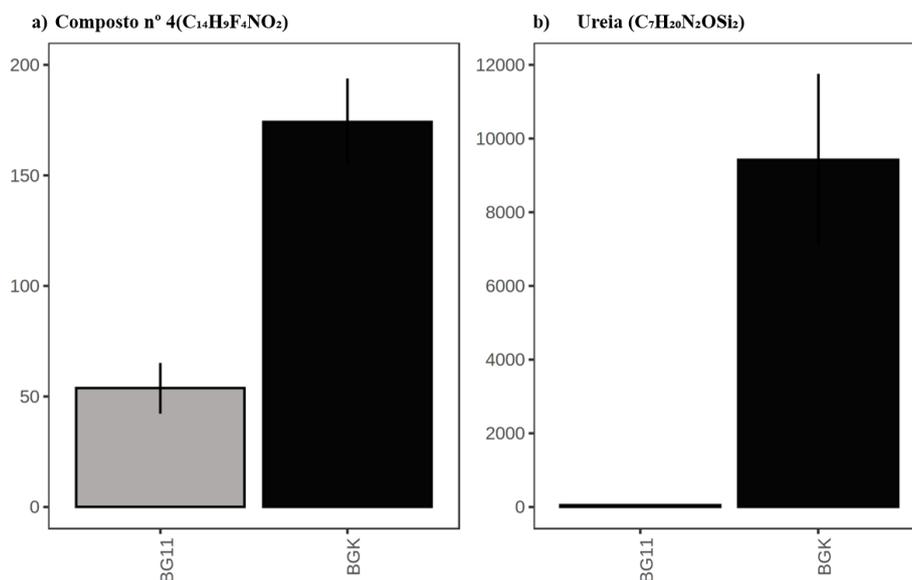


Figura 10 Gráficos gerados no MetaboAnalyst mostrando diferenças significativas de abundância entre 2 compostos identificados na comparação entre o meio BG11 (controle) e o meio BGK.

A **Tabela 4** mostra o resultado do Test-t que foi realizado para identificar diferenças significativas na comparação das amostras do meio BGK com o meio controle (BG11) após a limpeza das amostras utilizando acetato de etila. O objetivo foi comparar os compostos com diferenças significativas após a limpeza das amostras. Foram dados de 8 amostras e 486 compostos analisados. No total, a análise mostrou 108 compostos com diferenças significativas. A coluna 2 (**Tabela 4**) mostra os compostos que foram identificados utilizando a biblioteca *NIST* e que estão destacados com a cor laranja (n° 8, 25, 72). Não foi possível identificar os outros compostos.

Tabela 4 Amostras significativas identificadas pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11 após a limpeza das amostras. A coluna 2 mostra o nome de cada um desses compostos (apenas os que foram identificados). A coluna 3 mostra os valores de p do teste e a coluna 4 mostra os valores de FDR. Os compostos que não foram identificados estão na Tabela suplementar 3.

Nº do composto	Identificação	Valor de p	FDR
8	Ácido fosfórico (Silanol, trimethyl-, phosphate/C9H27O4PSi3)	0,000125	0,00688
25	Ácido octadecanóico (Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester/C27H58O4Si2)	0,001894	0,033417
72	Ácido palmítico (Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester/C19H40O2Si)	0,020848	0,12769

Dentre os nove compostos que foram identificados entre todas as análises, três deles são ácidos graxos: ácido propanoico, ácido hexadecanóico (palmítico) e ácido octadecanóico (esteárico). Muitas microalgas já são utilizadas industrialmente em virtude da sua capacidade de produzir alguns compostos, como os ácidos graxos, que podem ser utilizados no enriquecimento de rações para peixes, produção de biodiesel, além da possibilidade de serem consumidos como fonte de ácidos graxos essenciais para a saúde humana (VASCONCELOS COSTA; BRESSAN; SABARENSE, 2006).

Fatores como luz, temperatura, concentração de nitrogênio e dióxido de carbono podem influenciar a composição de ácidos graxos em microalgas (GREQUE DE MORAIS; VIEIRA COSTA, 2008).

Há estudos anteriores que mostram que o ácido palmítico pode estar presente e ser predominante nos cultivos de microalgas (DESHNIUM et al., 2000; MARIA COLLA; ELITA BERTOLIN; ALBERTO VIEIRA COSTA, 2004; OLGU ÑN et al., 2002). O ácido palmítico é encontrado em animais e plantas. Como indicado por seu nome, é encontrado em altas quantidades em óleo de palma. Este ácido graxo está presente no leite materno (20 a 30%), sendo assim uma fonte essencial de energia na alimentação infantil (GREQUE DE MORAIS; VIEIRA COSTA, 2008). Porém, geralmente é utilizado na produção de cosméticos e produtos de limpeza, uma vez que há

evidências que pode ser prejudicial para a saúde humana (VASCONCELOS COSTA; BRESSAN; SABARENSE, 2006).

O ácido propanoico (propiónico) já é utilizado para diversos fins, por exemplo, como conservante de alimentos e como agente esterificante na produção de termoplásticos. No entanto, a maior parte dessa produção é petroquímica, sendo assim, há uma crescente demanda por uma produção biológica e mais eficiente deste composto (M. GAUTIER, 2014). Uma vez que foi encontrado no meio extracelular de *C. Sorokiniana*, uma espécie de microalga que já é utilizada industrialmente, há possibilidade da sua produção utilizando esses organismos.

Ademais, estudos mostram que o ácido esteárico geralmente compõe o perfil metabólico de diversas espécies de microalgas, inclusive espécies de microalgas verdes (DUONG; THOMAS-HALL; SCHENK, 2015; WEIXIAN CHEN, 2021). Dessa forma, os resultados foram condizentes com o que já está disponível na literatura, porém para a espécie de *C. Sorokiniana*.

A **Tabela 5** e a **Tabela 6** mostram o perfil de metabólitos identificados nos meios BG11 e BGK. É possível observar que grande parte dos compostos são ácidos graxos, um fato que já é bastante citado na literatura (FERREIRA et al., 2019). Tais compostos que são secretados por microalgas usualmente são ácidos carboxílicos comuns com cadeias de hidrocarbonetos entre 4 e 36 carbonos. São comumente classificados como ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) (D’ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016). O ácido graxo saturado mais comum encontrado em microalgas é o Ácido palmítico (C16:0), porém, também são encontrados desde o ácido butanóico (C4:0) ao octanóico (C28:0) (D’ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016), sendo que ambos foram identificados no meio BG11 e no meio BGK nesse estudo. Embora o ácido oleico (C18:1), popularmente conhecido como ômega-9, seja usualmente o ácido graxo monoinsaturado mais presente na composição das microalgas, não foi identificado nesse estudo. No entanto, o ácido linolênico (C18:3), popularmente conhecido como ômega-3, foi secretado no meio BG11 por *C. sorokiniana*. Esse composto é um ácido graxo poli-insaturado e corresponde a um componente lipídico de alto valor agregado (D’ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016).

Tabela 5 Perfil de metabólitos que foram identificados do meio BG11 (controle), utilizando a biblioteca NIST. Na coluna 2 estão os nomes dos compostos e na coluna 3 o tempo de retenção referente a cada um deles. Em destaque (cor laranja) está o Ácido linolênico (ômega-3). Os compostos identificados na análise das amostras apenas com meio de cultivo (Branco) foram retirados da lista.

Meio BG11		
Nº	Nome	Tempo de retenção
1	Ácido 1,4-benzenodicarboxílico, éster bis (trimetilsilílico) (Ácido tereftálico)	30.139 min
2	1,2-etanodiamina, N,N,N',N'-tetrametil-	15.466 min
3	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil- (Dietileno Glicol)	16.831 min
4	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster bis(trimetilsilil)	27.994 min
5	Ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico, tetra-TMS	25.456 min
6	Ácido 2-butenodióico, (E)-	19.616 min
7	Ácido azelaico, éster bis(trimetilsilílico)	30.184 min
8	Ácido benzóico, 3-metoxi-4-[(trimetilsilil)oxi]-, éster trimetilsilílico	26.528 min
9	Ácido butanodióico, éster bis(trimetilsilil)	18.678 min
10	Ácido decanóico, éster trimetilsilílico	22.418 min
11	Ácido dodecanóico, éster trimetilsilílico	27.045 min
12	Ácido eicosanóico, éster trimetilsilílico	41.853 min
13	Ácido heptanodióico, éster bis(trimetilsilil)	25.944 min
14	Ácido L-treônico, éter tris(trimetilsilílico), éster trimetilsilílico	25.456 min
15	Ácido nonanóico, éster trimetilsilílico	19.897 min
16	Ácido n-Pentadecanóico, éster trimetilsilílico	33.205 min
17	Ácido octanodióico, éster bis(trimetilsilil)	28.073 min
18	Ácido octanóico, derivado de TMS	17.258 min
19	Ácido pentanodióico, 2-[(trimetilsilil)oxi]-, éster bis(trimetilsilil)	21.082 min
20	Ácido propanoico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]-, éster trimetilsilílico	19.431 min
21	Ácido propiônico, 2-(trimetilsiloxi)-, éster trimetilsilílico	11.434 min
22	Ácido tetradecanóico, éster trimetilsilílico	31.223 min
23	Ácido α -linolênico, éster trimetilsilílico	38.141 min
24	D-(-)-Tagatose, pentakis(trimetilsilil) éter, metiloxima (anti)	28.286 min
25	Glicerol, 2-O-galactopiranosido, TMS	40.589 min
26	Silanol, trimetil-, fosfato (3:1)	17.853 min
27	Trimetilsilil ((trimetilsilil)oxi)acetato	11.861 min

Tabela 6 Perfil de metabólitos que foram identificados do meio BGK utilizando a biblioteca NIST. Na coluna 2 estão os nomes dos compostos e na coluna 3 o tempo de retenção referente a cada um deles. Os compostos identificados na análise das amostras apenas com meio de cultivo (Branco) foram retirados da lista.

Meio BGK		
Nº	Nome	Tempo de retenção
1	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecano, 2,2,10,10-tetrametil- (Dietileno Glicol)	11.120 min
2	Ácido 1,4-benzenodicarboxílico, éster bis(trimetilsilílico)	30.145 min
3	Ácido 2-butenodióico, (E)-	19.610 min
4	Ácido benzóico, 3-metoxi-4-[(trimetilsilil)oxi]-, éster trimetilsilílico	26.534 min
5	Ácido benzóico, TMS	16.696 min
6	Ácido butanodióico, éster bis(trimetilsilil)	18.678 min
7	Ácido dodecanóico, éster trimetilsilílico	22.424 min
8	Ácido heptanodióico, éster bis(trimetilsilil)	25.956 min
9	Ácido L-treônico, éter tris(trimetilsilílico), éster trimetilsilílico	25.450 min
10	Ácido nonanóico, éster trimetilsilílico	19.902 min
11	Ácido octanóico, derivado de TMS	17.263 min
12	Ácido propanoico, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]-, éster trimetilsilílico	19.425 min
13	Ácido propiônico, 2-(trimetilsiloxi)-, éster trimetilsilílico	11.429 min
14	Ácido tetradecanóico, éster trimetilsilílico	31.251 min
15	D-(-)-Lixose, tetraquis(trimetilsilil)éter, metiloxima (syn)	28.281 min
16	D(+)-Sacarose, TMS	45.868 min
17	Glicerol, 2-O-galactopiranosídeo, TMS	40.589 min
18	Octacosano	32.823 min
19	Silanol, trimetil-, fosfato (3:1)	17.774 min
20	Trimetilsilil trimetilsiloxiacetato	11.861 min

O consumo de ômega-3 tem sido associado a diversas questões fisiológicas do corpo humano, sendo assim um valioso suplemento alimentar. No entanto, o organismo humano não é capaz de produzir esse ácido graxo, sendo assim, é fundamental consumir porções adequadas desse composto que usualmente estão presentes em derivados de óleo de peixe (SWANSON; BLOCK; MOUSA, 2012). Contudo, as microalgas podem atuar como uma fonte alternativa desse suplemento alimentar, sobretudo para pessoas que possuem uma dieta vegetariana ou vegana.

Apesar da maioria das microalgas que possuem alto teor de ômega-3 serem espécies marinhas, como *Schizochytrium sp.* e *Nannochloropsis sp.*, estudos já mostraram que espécies de água doce, como microalgas do gênero *Chlorella* podem ser possíveis substitutos para a produção desse composto (FERREIRA et al., 2019).

6.5 Mutagênese UV

A mutagênese foi realizada de acordo com os métodos descritos, mas apenas uma das tentativas obteve sucesso, ou seja, houve de fato modificações do número de células vivas após a exposição a luz UV. Apenas o teste com as microalgas na diluição de 10^3 mostrou o resultado esperado. Sendo assim, foi feito o inóculo dessas algas em uma placa de 96 poços em triplicata, porém não houve distinção na mudança de cor no meio entre o controle e as algas que foram submetidas ao tratamento. Caso as colônias tivessem apresentado alterações, seriam transferidas para Erlenmeyer com meio líquido de cultivo para análises posteriores de crescimento, perfil metabólico do meio extracelular e pH.

7. Considerações finais

A metabolômica pode ser utilizada para auxiliar na taxonomia e rastreamento de cepas de microalgas, além da construção de modelos metabólicos desses organismos, tudo isso utilizando GC-MS para as análises, uma vez que é um método utilizado para perfis de metabólitos há mais de 50 anos e além disso, a técnica já é bastante relevante na pesquisa com plantas.

Os resultados desse estudo mostraram que independente do meio, o perfil de crescimento da espécie foi muito parecido, assim pode-se observar como *C. Sorokiniana* é uma espécie capaz de se adaptar a condições diferentes e manter seu crescimento e produtividade. Além disso, houve a confirmação que BGK pode ser um bom meio de cultivo para essa espécie, tanto para obtenção de biomassa seca, quanto para traçar perfis metabólicos, uma vez que o maior número de compostos com diferenças significativas foi encontrado comparando o controle (BG11) com esse meio. Estudos posteriores poderão apresentar a produção em larga escala de biomassa ou de algum dos compostos identificados neste trabalho, utilizando a espécie e os meios descritos.

Futuramente, a análise do crescimento e da produção de biomassa de *C. Sorokiniana* poderá ser feita realizando a medição de nitrogênio consumido durante todo o crescimento do organismo, para que assim seja possível calcular o quanto de nitrogênio foi de fato transformado em biomassa, até mesmo verificando se há diferenças desse consumo em relação ao meio e a fonte de nitrogênio. Dessa forma, a produção de biomassa e de alguns compostos poderá ser otimizada, além disso, as vias biosintéticas de tais compostos e os mecanismos de transporte encarregados da secreção desses metabólitos também poderão ser elucidados, logo, haverá um conhecimento maior sobre os mecanismos bioquímicos utilizados por *C. Sorokiniana*.

8. Referências Bibliográficas

ABDEL-MOTAAL, M. et al. Synthesis and Evaluation of Antioxidant Activity of Some New Heterocyclic Compounds Bearing the Benzo[B]Furan Moiety. **European Scientific Journal, ESJ**, v. 13, n. 30, p. 297, 31 out. 2017.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy Mexican Cypresses View project Population genetics and evolutionary history of mountaineous plants View project**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/283650275>>.

ALLWOOD, J. W. et al. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography-electron impact-time of flight mass spectrometry (GC-EI-TOF/MS) based plant metabolomics. **Metabolomics**, v. 5, n. 4, p. 479–496, dez. 2009.

ALON, T.; AMIRAV, A. Isotope abundance analysis methods and software for improved sample identification with supersonic gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 17, p. 2579–2588, 2006.

AMIRAV, A. et al. **Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. Journal of Mass Spectrometry**, fev. 2008.

ANAND, V. et al. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? **Biomass and Bioenergy**, v. 127, 1 ago. 2019.

ANANTHI, V. et al. **A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. Fuel** Elsevier Ltd, , 15 jan. 2021.

ARUMUGAM, M. et al. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ENERGY AND ENVIRONMENT Influence of organic waste and inorganic nitrogen source on biomass productivity of Scenedesmus and Chlorococcum sp** Journal homepage: www.IJEE.IEEFoundation.org ISSN. [s.l.] Online, 2011. Disponível em: <www.IJEE.IEEFoundation.org>.

ARUMUGAM, M. et al. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 246–249, 2013.

ASWATHANARAYANAPPA, C. et al. 5-phenyl-1-benzofuran-2-yl derivatives: Synthesis, antimicrobial, and antioxidant activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 1, p. 78–87, jan. 2013.

BAIDOO, E. E. K.; TEIXEIRA BENITES, V. Mass spectrometry-based microbial metabolomics: Techniques, analysis, and applications. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 1859p. 11–69.

BARKIA, I.; SAARI, N.; MANNING, S. R. **Microalgae for high-value products towards human health and nutrition**. **Marine Drugs**MDPI AG, , 2019.

BECKER, B.; MARIN, B. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. **Annals of Botany**, v. 103, n. 7, p. 999–1004, maio 2009.

BELKOURA, M.; BENIDER, A.; DAUTA, A. Effects of temperature, light intensity and growth phase on the biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* Shihira and Krauss. **Annales de Limnologie**, v. 33, n. 1, p. 3–11, 1997.

BENJAMINI, Y. Controlling The False Discovery Rate-A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. **Article in Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Methodological**, 1995.

BERENGUEL, M. et al. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, v. 14, n. 4, p. 377–387, jun. 2004.

BERRY, J. P. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. **Marine Drugs**, v. 6, n. 2, p. 117–146, 2008.

BINO, R. J. et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 418–425, 2004.

BITO, T. et al. **Potential of chlorella as a dietary supplement to promote human health**. **Nutrients**MDPI AG, , 1 set. 2020.

BLIESNER, D. M. **Validating chromatographic methods : a practical guide**. [s.l.] Wiley, 2006.

BOHUTSKYI, P. et al. Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. **Algal Research**, v. 19, p. 278–290, 1 nov. 2016.

BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A. Astaxanthin accumulation in the green alga *haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p. 1077–1082, 1991.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. **Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, fev. 2010.

CAI, C. et al. Weakened growth, cell division, and energy metabolism, but enhanced resistance, signaling, and anabolism: responses of *Ulva prolifera* to copper elucidated by omics. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 5, p. 3449–3465, 1 out. 2021.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.

CAMACHO, A.; WIT, R. Effect of nitrogen and phosphorous additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 32, p. 261–273, 14 jul. 2003.

CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D471–D480, 2016.

CESÁRIO, M. T. et al. **Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials**. **Biotechnology Advances** Elsevier Inc., , 1 maio 2018.

CHAND, K. et al. **A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives**. **Pharmacological Reports** Elsevier B.V., , 1 abr. 2017.

- CHARRIER, A. et al. High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (Nrt2) in *Tisochrysis lutea*: Identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 154, n. 4, p. 572–590, 1 ago. 2015.
- CHAUHAN, A. GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 5, n. 6, 2014.
- CHEN, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 5 set. 2013.
- CHEN, M. et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649–1655, jan. 2011.
- CHEW, K. W. et al. **Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review**. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** Taiwan Institute of Chemical Engineers, , 1 out. 2018.
- CHIA, S. R. et al. Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 129, p. 838–852, 1 dez. 2018.
- CHINNASAMY, S. et al. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 518–532, fev. 2009.
- CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. **Biotechnology Advances**, maio 2007.
- CHISTI, Y. **Fuels from microalgae**. **Biofuels**, mar. 2010.
- CHOJNACKA, K.; . F.-J. M. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 15 dez. 2003.
- CHOUDHARY, S.; SAVE, S. N.; VAVILALA, S. L. Unravelling the inhibitory activity of *Chlamydomonas reinhardtii* sulfated polysaccharides against α -Synuclein fibrillation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

CLAUDINO, W. M. et al. **Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications.** *Journal of Clinical Oncology* American Society of Clinical Oncology, , 1 jul. 2007.

CUADROS-INOSTROZA, Á. et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v. 10, 16 dez. 2009.

CUARESMA, M. et al. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 352–359, 1 out. 2009.

D’ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. **Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 maio 2016.

DANESHVAR, E. et al. **Insights into upstream processing of microalgae: A review.** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2021.

DE JAEGER, L. et al. “Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 7, no. 1, article 69. p. 1–11, 2014.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, n. 1, p. 233–252, 2013.

DE LOURDES, F. M. M. et al. Tolerance and nutrients consumption of *Chlorella vulgaris* growing in mineral medium and real wastewater under laboratory conditions. **Open Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 394–400, 1 fev. 2017.

DE PHILIPPIS, R.; COLICA, G.; MICHELETTI, E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: Molecular basis and practical applicability of the biosorption process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 697–708, 2011.

DE-BASHAN, L. E. et al. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4980–4989, jul. 2008.

DEBIAGI, P. E. A. et al. Algae characterization and multistep pyrolysis mechanism. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 128, p. 423–436, 1 nov. 2017.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications | Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DESHNIUM, P. et al. Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 2, p. 207–213, mar. 2000.

DOAN, T. T. Y.; SIVALOGANATHAN, B.; OBBARD, J. P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2534–2544, 2011.

DSRR, R.; HUSS, V. A. R. **Characterization of nuclear DNA in 12 species of *Chlorella* (Chlorococcales, Chlorophyta) by DNA reassociation**BioSystems. [s.l: s.n.].

DUNN, W. B. **Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes**. **Physical Biology**Institute of Physics Publishing, , 8 abr. 2008.

DUONG, V. T.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and sea water locations in South East Queensland—Australia. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. MAY, p. 1–8, 19 maio 2015.

ENAMALA, M. K. et al. **Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**Elsevier Ltd, , 1 out. 2018.

FALLAH, A. A. et al. Effect of Chlorella supplementation on cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 6, p. 1892–1901, 1 dez. 2018.

FERNIE, A. R. et al. **Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com/reviews/molcellbio>.

FERREIRA, G. F. et al. **A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles**. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

FIEHN, O. et al. **Metabolite profiling for plant functional genomics** **NATURE BIOTECHNOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://biotech.nature.com>>.

FIEHN, O. **Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes** **Plant Molecular Biology**. [s.l: s.n.].

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 261–269, 1 mar. 2008.

FIEHN, O.; WOHLGEMUTH, G.; SCHOLZ, M. Setup and annotation of metabolomic experiments by integrating biological and mass spectrometric metadata. **Lecture Notes in Bioinformatics (Subseries of Lecture Notes in Computer Science)**, v. 3615, p. 224–239, 2005.

FRANCO, M. C. et al. Performance of Chlorella sorokiniana under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 693–699, ago. 2012.

FUČÍKOVÁ, K. et al. Cryptic diversity within the genus Pseudomuriella hanagata (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four barcode markers. **Nova Hedwigia**, v. 93, n. 1–2, p. 29–46, ago. 2011.

FURNAS, M. J. **In situ growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement, community and species growth rates** **Journal of Plankton Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://plankt.oxfordjournals.org/>>.

FURSE, S. **Is phosphatidylglycerol essential for terrestrial life?** **Journal of Chemical Biology** Springer Verlag, , 1 jan. 2017.

GANTAR, M. et al. Allelopathic activity among Cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 1, p. 55–64, 2008.

GÉRARD, G. et al. **Synthesis and D 2-Like Binding Affinity of New Derivatives of N-(1-Ethyl-2-pyrrolidinylmethyl.** [s.l: s.n.].

GONG, Y.; JIANG, M. **Biodiesel production with microalgae as feedstock: From strains to biodiesel.** **Biotechnology Letters**, jul. 2011.

GOODACRE, R. et al. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 231–241, set. 2007.

GOODMAN-, S. I. et al. **ORGANIC ACID PROFILES OF HUMAN TISSUE BIOPSIES BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.** [s.l: s.n.].

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, fev. 2009.

GREQUE DE MORAIS, M.; VIEIRA COSTA, J. A. **PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS CULTIVADAS COM DIÓXIDO DE CARBONO Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide.** [s.l: s.n.].

GROB, R. L.; BARRY, E. F. **MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY FOURTH EDITION.** [s.l: s.n.].

GROBBELAAR, J. U. Algal biotechnology: Real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v. 70, n. 1, p. 140–144, 2004.

GROBBELAAR, J. U. **8 Inorganic Algal Nutrition.** [s.l: s.n.].

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210–216, 2003.

GUIRY, M. D. **How many species of algae are there?** **Journal of Phycology**, out. 2012.

GULLBERG, J. et al. Design of experiments: An efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 283–295, 15 ago. 2004.

HADI, S. I. I. A. et al. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–18, 2016.

HALKET, J. M. et al. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219–243, jan. 2005.

HE ID, Y. et al. Dynamic metabolic profiles of the marine macroalga Ulva prolifera during fragmentation-induced proliferation. 2019.

HENRY, E. C. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 5, p. 1001–1002, 2004.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HIREMATHAD, A.; CHAND, K.; KERI, R. S. Development of coumarin–benzofuran hybrids as versatile multitargeted compounds for the treatment of Alzheimer’s Disease. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 2, p. 1497–1503, 1 ago. 2018.

HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921–3926, set. 2009.

HU, J. et al. **Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review.** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 1 jan. 2018.

HUNT, R. W. et al. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2400–2414, dez. 2010.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. **Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/enzmictec>.

Introducing AutoSRM MRM Simplicity for High Performance Results. . [s.l: s.n.].

ISHIBASHI, F. et al. Concise synthesis and in vitro anticancer activity of benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-ones (BBPIs), topoisomerase I inhibitors based on the marine alkaloid lamellarin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 181–191, 1 jan. 2021.

JELLUM, E. et al. Application of glass capillary-column gas chromatography-mass spectrometry to the studies of human diseases. **Journal of Chromatography A**, v. 126, n. C, p. 487–493, 3 nov. 1976.

KEMPA, S. et al. An automated GCxGC-TOF-MS protocol for batch-wise extraction and alignment of mass isotopomer matrixes from differential ¹³C-labelling experiments: A case study for photoautotrophic-mixotrophic grown *Chlamydomonas reinhardtii* cells. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 82–91, fev. 2009.

KESSLER, E. **Plant Systematics and Evaluation Upper Limits of Temperature for Growth in *Chlorella* (Chlorophyceae)** *Pl. Syst. Evol.* [s.l: s.n.].

KESSLER E., H. V. A. R. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. **J. Phycol.**, v. 28, p. 550–553, ago. 1992.

KHANAM, H.; SHAMSUZZAMAN. **Bioactive Benzofuran derivatives: A review.** *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson SAS, , 2015.

KIM, J. M. et al. A liquid crystal display with consistent moving image quality regardless of viewing angles. **Optics and Laser Technology**, v. 60, p. 34–40, ago. 2014a.

KIM, Y. H. et al. Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increased antioxidant activity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1834–1840, 2014b.

KIND, T. et al. Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 139–147, 29 jun. 2012.

KOPKA, J. et al. GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 15 abr. 2005.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 312–322, 25 jun. 2006.

KRIENITZI, L. et al. **Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)** *Phycologia*. [s.l.: s.n.].

KULTSCHAR, B. et al. Intracellular and extracellular metabolites from the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii*, pcc 6912, during 48 hours of uv-b exposure. **Metabolites**, v. 9, n. 4, 2019.

KUMAR, K. et al. **Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria**. **Bioresource Technology**, abr. 2011.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; DAS, D. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 358–366, 2014.

KUNZ W.F. Response of the alga *Chlorella sorokiniana* to 60 C° gamma radiation. **Nature**, v. 236, p. 178–179, 1972.

LAM, M. K.; LEE, K. T. **Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward**. **Biotechnology Advances**, maio 2012.

LARKUM, A. W. D. et al. **Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Trends in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2012.

LAURENS; LIEVE. **State of Technology Review-Algae Bioenergy An IEA Bioenergy Inter-Task Strategic Project.** [s.l: s.n.].

LEE, K. K. et al. Growth and photosynthesis of *Chlorella* strains from polar, temperate and tropical freshwater environments under temperature stress. **Journal of Oceanology and Limnology**, v. 36, n. 4, p. 1266–1279, 1 jul. 2018.

LI, T. et al. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204–213, 2014.

LI, T. et al. Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. **Algal Research**, v. 16, p. 481–491, 2016.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, jul. 2009.

LIANG, Z. et al. Design, synthesis and antifungal activity of novel benzofuran-triazole hybrids. **Molecules**, v. 21, n. 6, 1 jun. 2016.

LIN, Q.; LIN, J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1615–1621, 2011.

LINDON, J. C. et al. **Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. Biomarkers**, jan. 2004.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LITTLE, J. L. **Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them***Journal of Chromatography A*. [s.l.: s.n.].

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 14, n. 10, p. 1–19, 2016.

LIZZUL, A. M. et al. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 12–18, 2014.

LIZZUL, A. M. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, 1 jun. 2018.

LOMMEN, A. Metalign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3079–3086, 15 abr. 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: [s.n.].

M. GAUTIER. **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 2

MA, D.; LI, Y.; FU, H. Effect of high temperature on the balance between photosynthetic light absorption and energy utilization in *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyceae). **Journal of Oceanology and Limnology**, v. 38, n. 1, p. 186–194, 1 jan. 2020.

MAHBOOB, S. et al. High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: Production kinetics and thermodynamics. **Aquaculture International**, v. 20, n. 3, p. 455–466, jun. 2012.

MANZOOR, M. et al. Sugarcane bagasse as a novel low/no cost organic carbon source for growth of *Chlorella* sp. BR2. **Biofuels**, v. 12, n. 9, p. 1067–1073, 2021.

MARIA COLLA, L.; ELITA BERTOLIN, T.; ALBERTO VIEIRA COSTA, J. **Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and**

Nitrogen ConcentrationsZ. Naturforsch. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.znaturforsch.com>>.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, jan. 2010.

MATSUKAWA, R. et al. **Antioxidants from carbon dioxide fixing Chlorella sorokiniana** *Journal of Applied Phycology*. [s.l: s.n.].

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. **Gas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. Journal of Separation Science**, jul. 2007.

MEHLITZ, T. H. **Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors**. [s.l: s.n.].

MIZUNO, Y. et al. **Revised title: Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in Chlorella and Parachlorella species**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/2>>.

MONTEIRO, M. P.; LUCHESE, R. H.; ABSHER, T. M. Effect of Three Different Types of Culture Conditions on *Spirulina maxima* Growth. **Arch. Biol. Technol.** v. 53, n. 2, p. 369–373, 2010.

MÜ, P.; LI, X.-P.; NIYOGI, K. K. **Update on Photosynthesis Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy 1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.plantphysiol.org>.

NAABB. National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-products Final Technical Report. 2014.

NALEWAJKO, C.; LEE, K.; FAY, P. Significance of algal extracellular products to bacteria in lakes and in cultures. **Microbial Ecology**, v. 6, n. 3, p. 199–207, 1980.

NITSOS, C. et al. **Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review.** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 1 dez. 2020.

OBATA, T.; FERNIE, A. R. **The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, out. 2012.

OKSMAN-CALDENTEY, K.-M.; INZÉ, D.; OREŠIČ, M. **Connecting genes to metabolites by a systems biology approach.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403636101>.

OLGU ÖN, E. J. et al. **The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of Spirulina sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste.** [s.l: s.n.].

OMETTO, F. et al. Seasonal variation of elements composition and biomethane in brown macroalgae. **Biomass and Bioenergy**, v. 109, p. 31–38, 1 fev. 2018.

OTLES, S. **Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species Effects of Lipid Formulations in Fermented and Heat-Treated Beef and Turkey Sucuk on Protein Oxidation and Related Quality Parameters View project Mekatronik Sistemlerin PLM Entegrasyonu View project Article in Journal of AOAC International.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/11590947>>.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 35–42, jan. 2011.

PATIL, C. et al. Improved method for effective screening of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 131, p. 102–104, 2016.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics. Em: **Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 61–131.

PIGNOLET, O. et al. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 781–796, 2013.

PINTON, R.; TOMASI, N.; ZANIN, L. Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 11, n. 1, 2016.

PROCHÁZKOVÁ, G. et al. **Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae**. **Journal of Applied Phycology** Kluwer Academic Publishers, , 2014.

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

RADADIYA, A.; SHAH, A. **Bioactive benzofuran derivatives: An insight on lead developments, radioligands and advances of the last decade**. **European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson SAS, , 2015.

RAJA, R.; HEMAISWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 517–523, 2007.

RAJKUMAR, R.; SOBRI TAKRIFF, M. Prospects of Algae and their Environmental Applications in Malaysia: A Case Study. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 07, n. 01, 2016.

RAJKUMAR, R.; YAAKOB, Z.; TAKRIFF, M. S. **Algal biofuel production** **BioResources**. [s.l: s.n.].

RAMANNA, L. et al. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 127–135, 1 set. 2014.

RANDHIR, A. et al. **Microalgae: A potential sustainable commercial source of sterols**. *Algal Research* Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, n. November 2019, p. 100354, 2020.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. 2. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2003.

ROMANO, G. et al. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Marine Environmental Research**, v. 128, p. 58–69, 2017.

ROSA, R. M. et al. Urea as a source of nitrogen and carbon leads to increased photosynthesis rates in *Chlamydomonas reinhardtii* under mixotrophy. **Journal of Biotechnology**, v. 367, p. 20–30, 10 abr. 2023.

SASI D. **BIOKINETIC BEHAVIOUR OF *Chlorella vulgaris* IN A CONTINUOUSLY STIRRED BIOREACTOR AND A CIRCULATING LOOP PHOTOBIOREACTOR**. Canada: [s.n.]. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://harvest.usask.ca/bitstream/handle/10388/etd09172009091508/DivyaSasiMScThesisETD.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Acesso em: 8 jul. 2023.

SAUTER, H.; LAUER, M.; FRITSCH, H. Metabolic Profiling of Plants. p. 288–299, 7 dez. 1991.

SCHAUER, N. et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, n. 6, p. 1332–1337, 28 fev. 2005.

SCHMIDELL, W. , L. U. A. , E. , A. , B. **Engenharia Bioquímica**. 1º ed. São Paulo: [s.n.]. v. 2

SOARES, J. et al. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 35–45, 2018.

SOLETTO, D. et al. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1–4, p. 217–224, 3 jan. 2005.

SOROKIN C., M. J. A High-Temperature Strain of *Chlorella*. **Science**, v. 117, p. 330–331, 27 mar. 1953.

ŠPÁNIK, I.; MACHYŇÁKOVÁ, A. **Recent applications of gas chromatography with high-resolution mass spectrometry**. **Journal of Separation Science** Wiley-VCH Verlag, , 1 jan. 2018.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

STEFANO, C. et al. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–13, 2014.

STEIN, S. E.; SCOTT, D. R. **Optimization and Testing of Mass Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification**. [s.l: s.n.].

STEPHANOPOULOS, G.; ALPER, H.; MOXLEY, J. **Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology**. **Nature Biotechnology**, out. 2004.

SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, set. 2007.

SUN, H. et al. **High-value biomass from microalgae production platforms: Strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion**. **Biotechnology for Biofuels** BioMed Central Ltd., , 20 ago. 2018.

SUPARMANIAM, U. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109361, nov. 2019.

SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOUSA, S. A. **Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life.** *Advances in Nutrition*, jan. 2012.

TAN, X. B. et al. **Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing.** *Chinese Journal of Chemical Engineering* Chemical Industry Press, , 1 jan. 2018.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Pesticides Method Reference.** Austin, TX, USA.: [s.n.]. Disponível em: <www.thermo.com>.

THÉVENIN, M. et al. Synthesis of polysubstituted benzofuran derivatives as novel inhibitors of parasitic growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 4885–4892, 1 set. 2013.

TIKUNOV, Y. M. et al. MSClust: A tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. **Metabolomics**, v. 8, n. 4, p. 714–718, ago. 2012.

TRETHEWEY, R. N. **Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants.** *Current Opinion in Plant Biology*, abr. 2004.

TRUNG, T. S. et al. Optimization of harvesting of microalgal *Thalassiosira pseudonana* biomass using chitosan prepared from shrimp shell waste. **Asian Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 5, p. 162–174, 2016.

VANDAMME, D. et al. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 114–119, fev. 2012.

VASCONCELOS COSTA, A. G.; BRESSAN, J.; SABARENSE, C. M. Ácidos Graxos Trans: Alimentos e Efeitos na Saúde. **ALAN**, p. 12–21, mar. 2006.

VENKATA SUBHASH, G. et al. **Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds.** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 2017.

VEYEL, D. et al. Rationales and Approaches for Studying Metabolism in Eukaryotic Microalgae. **Metabolites**, v. 4, n. 2, p. 184–217, 11 abr. 2014.

VIGEOLAS, H. et al. Isolation and partial characterization of mutants with elevated lipid content in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 3–12, 2012.

VO HOANG NHAT, P. et al. **Can algae-based technologies be an affordable green process for biofuel production and wastewater remediation?** **Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 maio 2018.

WAGNER, C.; SEFKOW, M.; KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 887–900, 2003.

WEIXIAN CHEN, J. W. Y. R. H. C. C. H. Q. W. Optimized production and enrichment of α -linolenic acid by *Scenedesmus* sp. HSJ296. **Algal Research**, v. 60, dez. 2021.

WEYER, K. M. et al. Theoretical maximum algal oil production. **Bioenergy Research**, v. 3, n. 2, p. 204–213, 2010.

WOJCIECHOWSKI J., S. A. , C. K. P. , M. F. E. Isolamento e cultivo de microalgas. **Technical Report**, set. 2013.

WU, H.-L.; HSEU, R.-S.; LIN, L.-P. — **Identification of *Chlorella* spp. isolates 115** **BotBull. Acad. Sin.** [s.l: s.n.].

XU, N. et al. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 6, p. 463–469, 2001.

XU, X. LI et al. Design, synthesis, and evaluation of benzofuran derivatives as novel anti-pancreatic carcinoma agents via interfering the hypoxia environment by targeting HIF-1 α pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 137, p. 45–62, 2017.

YAN, N. et al. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 1 jun. 2016.

YEH, K. L.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. PH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 1–7, 15 maio 2012.

YODSUWAN, N.; SAWAYAMA, S.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 3, p. 190–197, 2017.

YUN, H. S.; KIM, Y. S.; YOON, H. S. Characterization of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris* fatty acid components under a wide range of light intensity and growth temperature for their use as biological resources. **Heliyon**, v. 6, n. 7, 1 jul. 2020.

ZIEGENHALS, K. et al. Fast-GC/HRMS to quantify the EU priority PAH. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 10, p. 1779–1786, jun. 2008.

ZIGANSHINA, E. E.; BULYNINA, S. S.; ZIGANSHIN, A. M. Assessment of *Chlorella sorokiniana* growth in anaerobic digester effluent. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 1 mar. 2021.

ZUORRO, A. et al. Use of cell wall degrading enzymes to improve the recovery of lipids from *Chlorella sorokiniana*. **Chemical Engineering Journal**, v. 377, 1 dez. 2019.

9. Material suplementar

9.1 Tabelas

Tabela suplementar 1 Características importantes identificadas na comparação dos quatro meios diferentes por ANOVA one-way e análise post-hoc usando HSD de Tukey. A coluna 2 mostra A coluna 2 mostra o número de identificação de cada um desses compostos, que é uma combinação do número de Scan onde está localizado o respectivo pico de cada íon, em laranja. o nome de cada um dos compostos que foram identificados, a coluna 3 mostra os valores de p do teste, a coluna 4 mostra os valores de FDR e a coluna 5 mostra as comparações feitas a partir do HSD de Tukey. Ex: Para o composto nº 7 houve diferença significativa entre BGU comparado a BG11, BGCON e BGK.

Nº do composto	Identificação (Ion-Scan)	Valor de p	FDR	HSD de Tukey
1	222_103	2,90E-07	2,18E-04	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
2	154_206	3,04E-06	1,14E-03	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
3	4493_73	5,72E-04	1,43E-01	BGC-BG11; BGK-BGC; BGU-BGC;
4	2305_232	4,35E-04	8,18E-01	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
5	3428_206	1,10E-02	0.00016543	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
6	2299_103	2,00E-02	0.00023221	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
7	[1]Benzothiopyrano[4,3-b]benzo[e]indole (C ₁₉ H ₁₁ NS)	2,16E-02	0.00023221	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
8	2278_114	4,18E-03	0.00035407	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
9	3392_262	4,24E-02	0.00035407	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
10	Ácido propanóico (Propanedioic acid, ethyl-, bis(trimethylsilyl) ester/C ₁₁ H ₂₄ O ₄ Si ₂)	6,21E-02	0.00046703	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK; BGU-BGK
11	5145_221	7,95E-01	0.004986	BGK-BG11; BGU-BG11; BGK-BGC;
12	2510_160	7,98E-01	0.004986	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
13	3610_314	8,80E-01	0.004986	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK; BGK-BGC; BGU-BGK
14	1660_281	0.00010239	0.004986	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BG11;
15	4978_361	0.0001039	0.004986	BGC-BG11; BGK-BGC; BGU-BGC;
16	2505_129	0.00010846	0.004986	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;

17	7453_352	0.00011272	0.004986	BGC-BG11; BGK-BGC; BGU-BGC;
18	2395_216	0.00025008	0.010448	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK; BGU-BGC; BGU BGK
19	4134_343	0.00031576	0.012226	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BG11; BGU-BGC;
20	2120_103	0.00032516	0.012226	BGK-BG11; BGU-BG11; BGK-BGC;
21	241_191	0.00059904	0.021451	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
22	3461_522	0.00067009	0.022905	BGK-BG11; BGK-BGC; BGU-BGK;
23	710_103	0.00088908	0.029069	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BG11;
24	3074_129	0.00099702	0.03124	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BGK;
25	1083_217	0.0012065	0.036292	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BG11;
26	227_173	0.0012673	0.036654	BGU-BG11; BGU-BGK;
27	5077_75	0.0013628	0.037957	BGU-BG11; BGU-BGC; BGU-BGK;
28	Benzofurane-5- carboxamide, 2,3-dihydro- N-phenyl (C ₁₅ H ₁₃ NO ₂)	0.0015811	0.042463	BGC-BG11; BGU-BG11; BGU-BGK;
29	1849_319	0.0018325	0.047518	BGK-BG11; BGK-BGC; BGU-BGK;
30	1297_206	0.0019397	0.048622	BGC-BG11; BGK-BG11; BGU-BG11;

Tabela suplementar 2 Compostos significativos identificados pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11. A coluna 2 mostra o nome de cada um dos compostos, que é uma combinação do número de Scan onde está localizado o pico do respectivo Íon. A coluna 3 mostra os valores de p do teste para cada um dos compostos e a coluna 4 mostra os valores de FDR.

Nº do composto	Identificação (Ion-Scan)	Valor de p	FDR
1	2082_245	5,62E-02	0.0031711
2	3997_205	1,09E-01	0.0031711
3	3902_160	1,59E-01	0.0031711
4	2,4,5-Trifluoro-3-methoxybenzamide, N-(4-fluorophenyl) (C ₁₄ H ₉ F ₄ NO ₂)	4,08E-01	0.0061099
5	3737_215	8,77E-01	0.010501
6	3741_258	0.00015082	0.01373
7	Uréia N,N'-bis(trimethylsilyl) C ₇ H ₂₀ N ₂ OSi ₂)	0.00016046	0.01373

8	Uréia N,N'-bis(trimethylsilyl) (C ₇ H ₂₀ N ₂ OSi ₂)	0.00019979	0.014959
9	3718_67	0.00045689	0.030409
10	3748_201	0.00052996	0.031745
11	1393_68	0.00079455	0.043267

Tabela suplementar 3 Amostras significativas identificadas pelo teste t, comparando o meio BGK com o BG11 após a limpeza das amostras. A coluna 2 mostra o número de identificação de cada um desses compostos, que é uma combinação do código de processamento derivado do alinhamento (Centrotipe) com o número de Scan onde está localizado seu respectivo pico. A coluna 3 mostra os valores de p do teste e a coluna 4 mostra os valores de FDR.

Nº do composto	Identificação (Centrotipe-Scan)	Valor de p	FDR
1	19296_9105	2,14E-06	0,0004718
2	18922_8844	2,14E-06	0,0004718
3	19047_8724	1,66E-05	0,0024405
4	19187_9086	0,000125	0,00688
5	18796_8540	0,000125	0,00688
6	18921_8673	0,000125	0,00688
7	13647_5395	0,000125	0,00688
8	Ácido fosfórico (Silanol, trimethyl-, phosphate/C9H27O4PSi3)	0,000125	0,00688
9	19286_9039	0,000236	0,0094695
10	18300_8965	0,000236	0,0094695
11	19150_8875	0,000236	0,0094695
12	18830_9057	0,000395	0,010257
13	18385_8972	0,000395	0,010257
14	5553_4666	0,000395	0,010257
15	11891_3430	0,000395	0,010257
16	2066_5999	0,000395	0,010257
17	6201_6518	0,000395	0,010257
18	19089_9004	0,000608	0,014898
19	10414_5187	0,000879	0,019381
20	18550_8346	0,000879	0,019381
21	18387_9070	0,001212	0,023231
22	13561_3500	0,001212	0,023231
23	13643_5333	0,001212	0,023231

24	18964_8631	0,001609	0,029563
25	Ácido octadecanóico (Octadecanoic acid, 2,3- bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester/C27H58O4Si2)	0,001894	0,033417
26	19151_8890	0,002073	0,034049
27	14866_2567	0,002085	0,034049
28	4998_5672	0,002453	0,038208
29	19173_8502	0,002604	0,038208
30	3428_4636	0,002604	0,038208
31	15855_5174	0,002686	0,038208
32	19184_9048	0,003204	0,041563
33	7353_4666	0,003204	0,041563
34	7274_2164	0,003204	0,041563
35	17023_3764	0,003873	0,0488
36	3088_1423	0,005414	0,064524
37	19007_8995	0,005414	0,064524
38	16174_6263	0,006451	0,071463
39	6061_3527	0,006583	0,071463
40	14955_4709	0,006709	0,071463
41	6075_3746	0,006709	0,071463
42	11915_3667	0,006806	0,071463
43	2300_4976	0,007218	0,073525
44	13670_5872	0,007336	0,073525
45	18761_8921	0,008215	0,078756
46	15683_3874	0,008215	0,078756
47	19368_9015	0,008701	0,081642
48	10067_7196	0,009273	0,085193
49	19161_9077	0,010335	0,086134
50	14882_2853	0,010389	0,086134
51	11327_2650	0,010885	0,086134
52	18317_7712	0,010885	0,086134
53	19123_8834	0,010885	0,086134
54	12368_5561	0,010885	0,086134
55	264_8004	0,010885	0,086134
56	9621_1358	0,010938	0,086134
57	12979_6297	0,013448	0,102

58	15760_3222	0,013458	0,102
59	7061_7114	0,013646	0,102
60	14508_4731	0,014066	0,10338
61	10245_7000	0,016428	0,11146
62	17794_9044	0,016428	0,11146
63	6507_5001	0,016428	0,11146
64	11529_5607	0,016428	0,11146
65	14568_2952	0,016428	0,11146
66	18982_9097	0,017895	0,11957
67	3725_7376	0,018182	0,11968
68	19427_6822	0,01964	0,12314
69	14366_9010	0,019825	0,12314
70	2407_239	0,019825	0,12314
71	2512_6261	0,019825	0,12314
72	Ácido palmítico (Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester/C19H40O2Si)	0,020848	0,12769
73	13627_5197	0,021136	0,12769
74	14015_7804	0,022669	0,1351
75	9651_3035	0,023429	0,13529
76	18734_9095	0,023676	0,13529
77	13278_4925	0,023676	0,13529
78	6460_4466	0,024025	0,13529
79	11905_3588	0,024235	0,13529
80	2240_131	0,02561	0,14065
81	16714_1677	0,025833	0,14065
82	19148_8806	0,026541	0,14274
83	18473_6760	0,02746	0,14417
84	12627_5083	0,02746	0,14417
85	18970_8867	0,028008	0,14531
86	18004_5182	0,028538	0,1459
87	10125_3357	0,029114	0,1459
88	14765_1940	0,029114	0,1459
89	18716_8157	0,030792	0,14922
90	17119_5315	0,030792	0,14922
91	3931_3333	0,030792	0,14922

92	7297_3060	0,032378	0,1541
93	2134_8270	0,032847	0,1541
94	18235_8980	0,032847	0,1541
95	18740_4448	0,035679	0,16534
96	4826_5873	0,035993	0,16534
97	19061_8785	0,038214	0,17109
98	13918_3866	0,038214	0,17109
99	11476_4812	0,038407	0,17109
100	5068_6573	0,039103	0,17245
101	4639_6220	0,040443	0,17659
102	11640_7700	0,041326	0,17867
103	19426_6812	0,043453	0,1836
104	16972_2039	0,044128	0,1836
105	9036_2672	0,04413	0,1836
106	5043_6214	0,04413	0,1836
107	2257_384	0,044867	0,18492
108	18974_8937	0,048886	0,19962

Tabela suplementar 4 Classes de compostos e seus respectivos métodos analíticos de separação/identificação.
Adaptado de Medeiros & Simoneit (2007).

Classe dos compostos	Métodos analíticos de detecção
Compostos lipídicos insaturados	GC, GC–MS
Açúcares/polissacarídeos	GC, GC–MS, GC–MS/MS
L-Aminoácidos/peptídeos	GC, Py-GC, GC–MS
Nucleotídeos, bases, <i>etc.</i>	Métodos específicos
Biopolímeros	Py-GC – MS, métodos específicos
Hidrocarbonetos alifáticos	GC, GC–MS, GC–IRMS
Ácidos alifáticos, Álcoois, Cetonas	GC, GC–MS, GC–IRMS
Isoprenóides	GC, GC–MS, GC–IRMS
Esteróides	GC–MS, GC–IRMS
Triterpenóides	GC–MS, GC–IRMS
Diterpenóides	GC–MS, GC–IRMS
Pigmentos	HPLC–MS, HPLC–IRMS
Biomarcadores novos e desconhecidos	GC–MS, Py-GC – MS, GC–IRMS, NMR, Raio-X
Compostos halogenados	GC–MS, GC (ECD), GC–CIMS, métodos específicos
Drogas, hormônios, suplementos	GC–MS, HPLC – MS, HRMS, métodos específicos
Plastificantes e outros produtos químicos industriais	GC–MS, métodos específicos
D/L-Aminoácidos	GC, Py-GC, GC–MS, GC–IRMS, HPLC, LC–MS
Álcoois alifáticos, ácidos, ésteres, amidas, hidrocarbonetos	GC, GC–MS, GC–IRMS
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)	GC, GC–MS, GC–IRMS

GC = cromatografia gasosa (vários detectores, geralmente FID), Py = pirólise, MS = espectrometria de massa, IRMS = espectrometria de massa de razão isotópica, HRMS = espectrometria de massa de alta resolução, HPLC = cromatografia líquida de alta pressão, ECD = detector de captura de elétrons, CI = ionização química, RMN = ressonância magnética nuclear.