

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO PIMENTA ESCOBAR

**LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO: EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO E A
COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS E TOXINAS LIPOFÍLICAS EM *Prorocentrum cf. lima***

PONTAL DO PARANÁ

2018

BRUNO PIMENTA ESCOBAR

**LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO: EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO E A
COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS E TOXINAS LIPOFÍLICAS EM *Prorocentrum cf. lima*.**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel, Curso de Graduação em Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. **Luiz Laurenno Mafra Júnior**

PONTAL DO PARANÁ

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Elda Lopes Lira – CRB 9/1295

Escobar, Bruno Pimenta.

E174I Limitação por nitrogênio: efeitos sobre o crescimento e a composição de lipídios e toxinas lipofílicas *prorocentrum cf. lima*. / Bruno Pimenta Escobar. – Pontal do Paraná, 2018.

33 f.: il.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior.

Monografia (Graduação) – Curso de Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Dinoflagelados. 2. Ácido ocadaico. 3. Estresse nutricional. 4. Nitrogênio inorgânico dissolvido. Título. II. Mafra Junior, Luiz Laureno. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.2

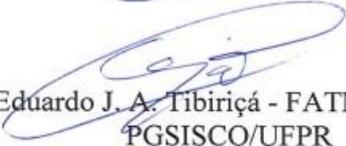
TERMO DE APROVAÇÃO

Bruno Pimenta Escobar

“LIMITAÇÃO POR NITROGÊNIO: EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO E A COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS E TOXINAS LIPOFÍLICAS EM PROROCENTRUM LIMA”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella - CEM/UFPR


MSc. Carlos Eduardo J. A. Tibiriçá - FATMA (SC) - Doutorando
PGSISCO/UFPR


Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior
Presidente

Pontal do Paraná, 29 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas e instituições que fizeram este trabalho possível: O laboratório do Núcleo de Produção e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS–UFPR) e seus integrantes, o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura (localizado em Santa Catarina) e seus integrantes, Carlos Eduardo pelo isolamento, manutenção dos cultivos de *Proocentrum* e auxílio durante os experimentos e a Gisele por sua paciência e auxílio, ao meu orientador Luiz Mafra, a todos integrantes do Laboratório de Microalgas (LAMIC) pelo suporte e paciência durante esses 5 anos de convívio, a minha família, aos meus amigos, a minha gata e a minha namorada, por me suportarem, auxiliarem e dedicarem seus tempos a mim.

RESUMO

Microalgas tóxicas podem afetar negativamente o ambiente marinho e os consumidores de pescados contaminados. Assim, o entendimento da fisiologia e dos processos relacionados à produção de toxinas em determinadas espécies de microalgas é de fundamental importância para se prever ou até evitar futuros incidentes. A intoxicação diarreica por consumo de mariscos (DSP) é uma das contaminações mais comuns geradas por toxinas de microalgas, ocorrendo em todas as partes do mundo inclusive no Brasil. Em seres humanos, é causada pelo consumo de mariscos contaminados pelo ácido ocadaico (AO) e seus derivados, as dinofisistoxinas (DTX), toxinas lipossolúveis produzidas por microalgas do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum*. Considerando que, sob situações de estresse, algumas algas mudam seu metabolismo, podendo favorecer a produção de lipídeos e outros metabólitos em detrimento à divisão celular, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da limitação por nitrogênio (N) sobre a produção de lipídeos e sua relação com a produção de toxinas na alga *Prorocentrum* cf. *lima*. Para tanto, cultivos da microalga tóxica e de uma espécie congênere não-tóxica, *Prorocentrum mexicanum*, foram estabelecidos em laboratório e amostras foram retiradas após cerca de 34 dias em cultivo semi-estático (adição de nutrientes no início e reforço após 16 dias) para a análise da densidade celular e do perfil e abundância de lipídeos e toxinas lipofílicas, em situação de suficiência (controle) ou deficiência de N (sem adição ou com adição de 1/10 da concentração controle de N). Ao longo do tempo em cultivo, foi possível notar as influências do estresse nutricional sobre as curvas de crescimento, a biomassa final obtida, o teor lipídico e a produção de toxinas entre os diferentes tratamentos e espécies. A deficiência de N reduziu o crescimento das algas *P. cf. lima* e *P. mexicanum*, que atingiram abundâncias máximas de 35 e 17 $\times 10^6$ células.L⁻¹, respectivamente, para os cultivos controles, mas somente 19 e 15 $\times 10^6$ células.L⁻¹ nos cultivos com 1/10 de N. Para a espécie não tóxica, a redução de nitrogênio reduziu drasticamente o peso seco médio das células de 29 para 8 ng.célula⁻¹, assim como o peso de lipídeos (1,1 para 0,4 ng.célula⁻¹) ao final do experimento. Por outro lado, para *P. cf. lima*, o peso celular teve um aumento (12,7 para 20 ng.célula⁻¹) enquanto o peso de lipídeos diminuiu (2 para 1,1 ng.célula⁻¹) mediante redução na oferta de N. Para esta última espécie, o conteúdo celular de toxinas variou bastante ao longo do tempo em cultivo, aparentemente numa relação inversa à taxa de divisão celular. No início da fase exponencial, a quota celular média de AO foi maior nos cultivos limitados em nitrogênio, mas os valores foram aumentando à medida que as taxas de divisão celular diminuíram (máximo de 13,5 pg.célula⁻¹ na fase estacionária do cultivo controle), provavelmente em resposta a uma menor disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo ao longo do tempo. Assim como a concentração de AO, o peso celular foi maior para os cultivos sob estresse, sugerindo a possibilidade de haver uma correlação entre produção de AO e de precursores lipídicos. Contudo, quando o estresse se torna muito intenso, como durante a fase estacionária do cultivo sem adição de N, tanto a abundância quanto a concentração de AO diminuem.

Palavras-chave: Dinoflagelados. Ácido ocadaico. Estresse nutricional. Nitrogênio inorgânico dissolvido

ABSTRACT

Toxic microalgae can affect adversely the marine environment and consumers of contaminated seafood. Thus, understanding the physiology and processes related to the production of toxins in certain species of microalgae is of fundamental importance to predict or even avoid future incidents. Diarrheic shellfish poisoning (DSP) is one of the most common microalgae-related food intoxications, occurring in all parts of the world including Brazil. In humans, is caused by the ingestion of shellfish contaminated by okadaic acid (OA) and its derivatives, dinophysistoxins (DTX) – liposoluble toxins produced by microalgae of the genus *Dinophysis* and *Prorocentrum*. Considering that some algae change their metabolism under stress conditions, favoring the production of lipids and other metabolites in detriment to cell division, the objective of this work is to evaluate the effects of nitrogen (N) limitation on the production of lipids and its relationship with the production of toxins in the alga *Prorocentrum cf. lima*. For this, cultures of the toxic microalgae and the non-toxic congener *Prorocentrum mexicanum* were established in the laboratory. Samples were taken after about 34 days in semi-static culture (addition of nutrients at the beginning and re-addition after 16 days) for cell counting and determination of the profile and abundance of lipids and lipophilic toxins, under a situation of sufficiency (control) or N deficiency (with no N addition or addition of 1/10 of the control N concentration). It was possible to notice the influence of nutritional stress on the growth curves, the final biomass obtained, the lipid content and the production of toxins among different treatments and species over time. Nitrogen deficiency reduced growth of both *P. cf. lima* and *P. mexicanum*, which reached maximum abundances of 35 and 17 × 10⁶ cells.L⁻¹, respectively, for the control cultures, but only 19 and 15 × 10⁶ cells.L⁻¹ in the cultures receiving 1/10 N. For the non-toxic species, reduced-N conditions reduced the mean dry weight of the cells from 29 to 8 ng.cell⁻¹, as well as the lipid weight (1.1 to 0.4 ng.cell⁻¹) at the end of experiment. On the other hand, for *P. cf. lima*, cell weight increased (12.7 to 20 ng.cell⁻¹) despite of a decrease in lipid content (2 to 1.1 ng.cell⁻¹) when N supply was reduced. For the latter species, the intracellular toxin contents varied greatly over time in culture, apparently in an inverse relationship with the rate of cell division. At the beginning of the exponential phase, mean OA cell quota was higher in the nitrogen-limited cultures, but values increased as cell division rates decreased (maximum 13.5 pg.cell⁻¹ at stationary stage of the control culture), probably in response to decreased availability of nutrients in the culture medium over time. Similar to OA concentration, cell weight was also higher for cultures under N-stress, suggesting the possibility of a correlation between OA production and the synthesis of lipid precursors. However, when N-stress became too intense, such as during the stationary phase of the culture with no N-addition, both cell abundance and OA concentration decreased.

Key words: Dinoflagellates. Okadaic acid. Nutritional stress. Dissolved inorganic nitrogen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1 MICROALGAS E TOXICIDADE.....	08
2.2 STRESS, PRODUÇÃO DE TOXINAS E SEUS EFEITOS.....	09
2.3 METABOLISMO LIPÍDICO E DE ÁCIDO OCADAICO EM MICROALGAS.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 MONTAGEM DOS CULTIVOS E TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	14
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS LIPOFÍLICAS.....	17
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 CRESCIMENTO CELULAR DOS CULTIVOS.....	22
4.2 TEOR LIPÍDICO.....	25
4.3 COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE TOXINAS.....	27
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	29
6 REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

Dentre os problemas relacionados à saúde pública nas regiões costeiras, as florações de microalgas tóxicas e os seus efeitos sob a fauna e flora são considerados alguns dos mais críticos e comuns. Para tal, certos parâmetros devem ser alcançados, como a disponibilidade de nutrientes, que deve ser alta o suficiente para permitir que o metabolismo da microalga se mantenha concentrado na divisão celular, até atingir algum parâmetro limitante a divisão, alguns exemplos seriam a temperatura, turbidez, luminosidade, e principalmente a limitação de nutrientes (HALLEGRAEFF et al., 1995). Devido a isso, é de vital importância entender os mecanismos de crescimento das microalgas, bem como os fatores que afetam a produção de toxinas por estas, podendo assim prever futuros episódios de florações tóxicas e/ou diminuir seus efeitos prejudiciais associados.

O dinoflagelado *Prorocentrum lima* pode ser considerado uma das microalgas tóxicas mais comuns no ambiente marinho, sendo encontrada em todas as partes do globo (GUIRY; GUIRY, 2018). Esta espécie produz toxinas que se acumulam em organismos marinhos, sobretudo moluscos bivalves, e causam o envenenamento diarreico por consumo de mariscos (DSP: Diarrheic Shellfish Poisoning) em consumidores humanos de pescados contaminados. Os sintomas mais comuns desta intoxicação incluem diarreia, náusea, vômito e dores abdominais, decorrentes da ação das toxinas lipofílicas ácido ocadaico (AO) e seus congêneres, as dinofisistoxinas (DTX-1, DTX-2, DTX-3) e as formas hidrossolúveis DTX-4 e DTX-5, que podem ser facilmente metabolizadas para um estado lipossolúvel novamente. Estes compostos podem se acumular facilmente nos tecidos adiposos dos bivalves assim que as algas são filtradas e ingeridas (EGMOND; VAN APELDOORN; SPEIJERS, 2004; GLIBERT; BURKHOLDER; KANA, 2012).

Em vários estudos realizados com o complexo das espécies *Prorocentrum lima*, a produção de toxinas aumenta em situações onde algum fator ou mecanismo provoque uma diminuição na taxa de crescimento da microalga, incluindo a limitação no crescimento por baixa disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento e à divisão celular (CAMACHO; RODRÍGUEZ; MIRÓN, 2007; GLIBERT; BURKHOLDER; KANA, 2012; SPARROW et al., 2017).

Em algumas espécies de microalgas, é possível aumentar o conteúdo lipídico ao se limitar o fornecimento de alguns nutrientes (principalmente o nitrogênio), tal mecanismo está provavelmente ligado a uma estratégia de acúmulo de energia pela microalga em um

período de stress, representando assim um mecanismo de defesa para suportar a adversidade, o que acaba desacelerando ou até inibindo a divisão celular (HU; SOMMERFELD; JARVIS, 2008). Esse conhecimento é amplamente usado em aplicações biotecnológicas que visem o aumento do conteúdo lipídico em microalgas, como a produção de biodiesel, de ração animal ou suplementos para humanos (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; ZHUANG et al., 2018).

Considerando que em situações de estresse por limitação de nutrientes ocorre uma alteração no metabolismo das células, o objetivo deste trabalho é analisar o crescimento e a produção de lipídeos e toxinas pela microalga *Prorocentrum* cf. *lima* em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de nitrogênio, comparando com uma espécie não-tóxica (*Prorocentrum mexicanum*). A principal hipótese que se busca testar nesta investigação é a de que há uma relação direta entre a síntese de toxinas diarreicas como AO e DTX-1 e a produção de lipídeos ligada à limitação nutricional na alga *Prorocentrum* cf. *lima*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROALGAS E TOXICIDADE

Sendo responsáveis por sustentar cerca de 70% da biomassa global por meio da produção primária (WIESSNER; SCHNEPF; STARR, 1995), as microalgas compõem um grande e diverso grupo de microrganismos (variando desde células eucarióticas até cianobactérias procarióticas), gerando metade de toda a atividade fotossintética no mundo (HUNTER-CEVERA; BELT, 1996). Esta atividade é possível graças a grande variabilidade genética, com vários milhões de espécies registradas em literatura (NORTON; MELKONIAN; ANDERSEN, 1996) e distribuídas na maioria dos ambientes conhecidos (KIM, 2015).

Dentro do ambiente marinho, as microalgas são alimentos essenciais para organismos suspensívoros, como moluscos bivalves (ostras, mexilhões, berbigões, vieiras), assim como para estágios larvais de crustáceos e peixes de interesse comercial. Considerando este papel fundamental na teia alimentar dos oceanos, tudo que afetar as microalgas terá consequências ao longo da cadeia trófica. Deste modo, é interessante para os seres que se alimentam de microalgas e para operações de aquicultura e a indústria pesqueira que ocorram os “*blooms*” de microalgas, eventos em que estes microrganismos podem atingir milhões de células por litro. Porém, apesar do aporte benéfico de matéria orgânica para os organismos consumidores, há situações em que estes *blooms* podem ser danosos, não apenas aos interesses econômicos da região afetada como também para o ambiente em si e à saúde humana. Isto ocorre devido a vários motivos, tais como a diminuição na concentração de oxigênio dissolvido, atenuação da entrada de luz, produção e liberação de grandes quantidades de muco e de compostos tóxicos, estes últimos produzidos por cerca de 80 espécies dentre as 5000 espécies marinhas). Segundo o trabalho realizado por Lassus et al. (2016), ocorrem em escala global, e a cada ano, mais de 50.000 casos de intoxicação humana através do consumo de peixes e mariscos, podendo causar danos econômicos consideráveis. Somente um tipo de toxinas (toxina paralisante de mariscos ou paralytic shellfish poisoning, PSP) pode causar cerca de 300 casos fatais por ano (LASSUS et al., 2016).

O envenenamento diarreico por consumo de mariscos (DSP: Diarrhetic Shellfish Poisoning), é uma das mais comuns intoxicações alimentares não bacteriogênicas associadas ao consumo de pescados em nível global, e a intoxicação causada por toxinas de microalgas com maior potencial de ocorrência no Brasil (PROENÇA; MAFRA, 2005).

Esta intoxicação é provocada pelo ácido ocadaico (AO) e moléculas relacionadas, as dinofisistoxinas (DTX), compostos lipofílicos produzidos por dinoflagelados do gênero *Dinophysis* e *Prorocentrum*. De característica química lipossolúvel, estas toxinas são bioacumuladas nos tecidos adiposos de organismos marinhos, sobretudo em moluscos bivalves (GLIBERT; BURKHOLDER; KANA, 2012). Diversas regiões sofrem prejuízos com florações das microalgas causadoras de DSP. Por exemplo, entre 1976 e 1982 foram reportados 1,300 casos de DSP no Japão, mais de 5,000 casos em 1981 na Espanha, e cerca de 3,300 casos em 1983 na França (HALLEGRAEFF et al., 1995), e segundo a revisão feita por Lassus et al., em 2016, de 1986 até 2009, ocorreram casos de blooms apenas do complexo de espécies *P. lima*, em mais de 10 países localizados nas Américas, Europa e Oceania. Apesar da intoxicação aguda não ter causado nenhum caso letal, a exposição crônica ao AO pode levar ao surgimento de tumores estomacais em longo prazo (FUJIKI et al., 1988; HALLEGRAEFF et al., 1995).

Apesar de a maioria das algas produtoras de toxinas diarreicas pertencerem ao gênero *Dinophysis*, algumas espécies de *Prorocentrum* também produzem toxinas diarreicas, como *Prorocentrum lima*, *P. concavum*, *P. texanum*, *P. rathymum* e vários outros (LASSUS, et al., 2016). A espécie *Prorocentrum lima* pode ser encontrada em oceanos temperados e tropicais (FAUST; GULLEDGE, 2002), tendo sido registrada em vários pontos ao longo da costa do Brasil (NASCIMENTO; SALGUEIRO; MENEZES, 2016).

P. lima é uma alga bêntica e epífita, mas que apresenta características ticoplanctônicas (algas ocasionalmente carregadas no plâncton); quando cultivada ela rapidamente se adere ao frasco de cultura facilitada pelo muco que produz e raramente nada livremente (FAUST; GULLEDGE, 2002). Em seu ambiente natural, ela é encontrada habitando principalmente espaços neríticos em estuários, mais precisamente na areia, ou ligada a macroalgas, associadas a recifes de corais, detritos flutuantes ou bênticos (FAUST; GULLEDGE, 2002).

2.2 STRESS, PRODUÇÃO DE TOXINAS E SEUS EFEITOS

Apesar de não se compreender ao certo todos os fatores e mecanismos que levam à produção de toxinas (ou pelo menos ao seu aumento) nas algas potencialmente tóxicas, é sugerido que algumas situações específicas de estresse levem a uma maior produção de toxinas, incluindo fatores físicos (temperatura, agitação, luminosidade), químicos (falta ou excesso de nutrientes ou compostos químicos, pH) e biológicos (predação,

competição, superpopulação). Desta forma, situações de estresse são capazes de transformar determinadas espécies de microalgas em um perigo potencial (CAMACHO; RODRÍGUEZ; MIRÓN, 2007; SPARROW et al., 2017).

Dentre as algas causadoras de DSP, mais especificamente as do gênero *Prorocentrum*, várias observações e estudos têm sido feitos para se determinar o que leva à produção de toxinas, bem como o que provoca o aumento na sua produção. Uma pesquisa feita por Tingmo Hu et al. (2017), demonstrou que a alga *P. lima* produz os compostos tóxicos DTX-1 e ácido ocadaico pelo mesmo procedimento celular. Outros compostos (como o DTX-5 e DTX-4) servem como precursores inativos, que ficam armazenados até que situações críticas de stress ou de lise celular ativem o mecanismo que os transformam em ácido ocadaico ou em DTX-1. Entretanto, ainda não se conhece exatamente quais situações estressantes podem ocasionar uma maior produção de toxinas em *P. lima*, que levaria a uma maior contaminação de seus consumidores.

Glibert et al. (2012) fizeram uma compilação de trabalhos e seus respectivos bancos de dados sobre as relações entre as algas do gênero *Prorocentrum* e outros parâmetros os quais interferem no metabolismo, crescimento e divisão da célula, sendo um deles a disponibilidade de nutrientes e ecofisiologia, onde se percebeu que a produção de toxinas pelo complexo *P. lima* (complexo de algas do gênero *Prorocentrum* as quais possuem características muito similares a *P. lima*) é proporcionalmente relacionada à limitação de nutrientes, algo que foi verificado por vários autores sendo os trabalhos de Varkitzi (2010) e Vanucci (2010) os mais recentes, onde foi observado em ambos que a limitação de nitrogênio, de fósforo ou ambos juntos causam um aumento na produção de toxinas em relação ao controle.

2.3 METABOLISMO LIPÍDICO E DE ÁCIDO OCADAICO EM MICROALGAS

As algas possuem vias biossintéticas de ácidos graxos e lipídeos semelhantes às de plantas terrestres, ou seja, envolvendo diferentes compartimentos das células: cloroplastos, citosol e retículo endoplasmático. Considerando alguns dos principais tipos de lipídeos, seja no âmbito econômico, nutricional ou metabólico, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI ou PUFA em inglês) e os triacilgliceróis (TAG) são os mais comuns, logo os mais estudados e observados durante o entendimento dos metabolismos lipídicos das algas (VILLANOVA, 2016).

Os AGPI são ácidos graxos que possuem um alto número de átomos de carbono (acima de 16 átomos), exibindo duas ou mais ligações duplas. Basicamente, eles são

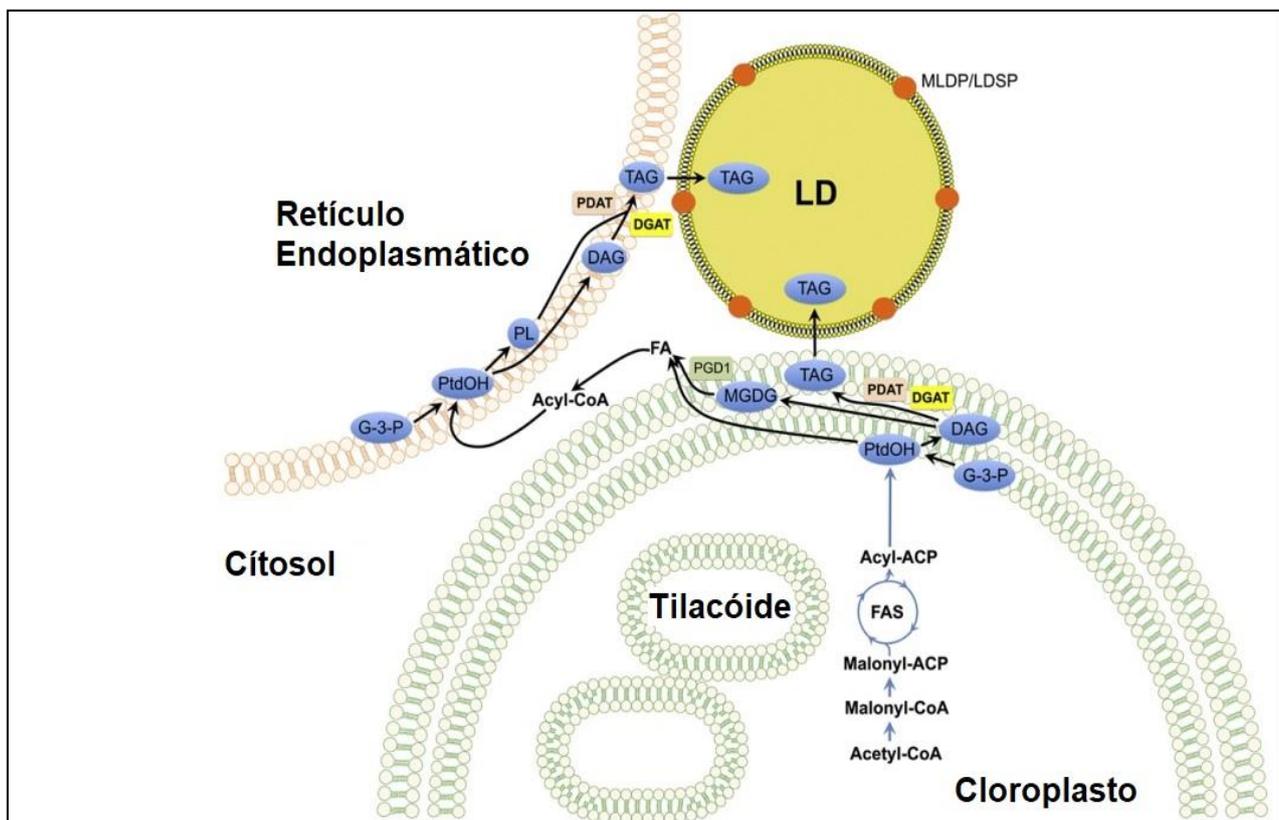
formados a partir da conversão do acetilcoenzima A (ou acetil CoA) (formado durante a fotossíntese) em melanil-CoA dentro do cloroplasto, gerando com isso cadeias de 16 e 18 átomos de carbono (Figura 1). As cadeias carbônicas são aumentadas quando necessário ao passar pelo retículo endoplasmático, sendo estendidas pelas elongases de ácidos graxos citoplasmáticos (Figura 1). Toda a síntese de AGPI é completada quando uma série de enzimas dessaturases introduzem as duplas ligações (VILLANOVA, 2016).

Os TAGs, também conhecidos como óleos, são ésteres de glicerol e ácidos graxos, cuja biossíntese em organismos fototróficos ocorre através de uma via principal, a chamada de via de Kennedy (Kennedy pathway). A via de Kennedy envolve a esterificação de grupos acilas para glicerol-3-fosfato através de enzimas contidas no retículo endoplasmático, chamadas de aciltransferases, levando à formação de ácido fosfatídico. Este último é desfosforilado por uma fosfatase para formar diacilglicerol (DAG), que por fim são transformadas em TAG pela enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (ZIENKIEWICZ *et al.*, 2016) (Figura 1). Uma outra possível forma é com o DAG sendo produzido pela degradação de glicofosfolipídeos através de fosfolipases, fazendo uma reciclagem de lipídeos de membranas já existentes (VILLANOVA, 2016) (Figura 1). Uma última forma de se produzir TAG seria através da incorporação direta de ácidos graxos em fosfatidilcolina, a qual é convertido para TAG pela ação de um fosfolipídeo, o diacilglicerol aciltransferase (BATES; BROWSE, 2012) (Figura 1).

Assim como os lipídeos, a síntese de toxinas produzidas pelos dinoflagelados também se inicia no cloroplasto, a partir do melanil-CoA através da sintetase de policetídeos (PKS). Este é um procedimento similar ao desempenhado pelas enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos, considerando que as PKS também têm participação na síntese de ácidos graxos (WEISSMAN, 2009) (Figura 2). Dentre os diferentes tipos de PKS, os que são responsáveis pela síntese de ácido ocadaico e DTXs são os PKS I e PKS II, bem como uma variação do PKS I chamado de sintetases de peptídeo não ribossômico (NRPS), segundo Macpherson *et al.* (2002) e Lee *et al.* (2016). O glicolato e o acetato, produzidos nas fotorrespirações e no ciclo do glioxilato, seriam as matérias brutas para a síntese das toxinas diarreicas. Assim, o glicerol remanescente da glicerofosfato provém uma fonte de carbono adicional para aumentar a toxicidade celular através do aumento no teor de glicolato e acetato. Dentro dos cloroplastos, o composto conhecido como DTX-5b é produzido por um PKS/NRPS híbrido e se transforma em DTX-5a através da deleção de um único carbono. O grupo amida da glicina presente na DTX-5a pode ser removido pelo PKS/NRPS e se transformar em DTX-4. Como tanto a DTX-4 como a DTX-5 não inibem as funções das proteínas fosfatases 2A, esses precursores das

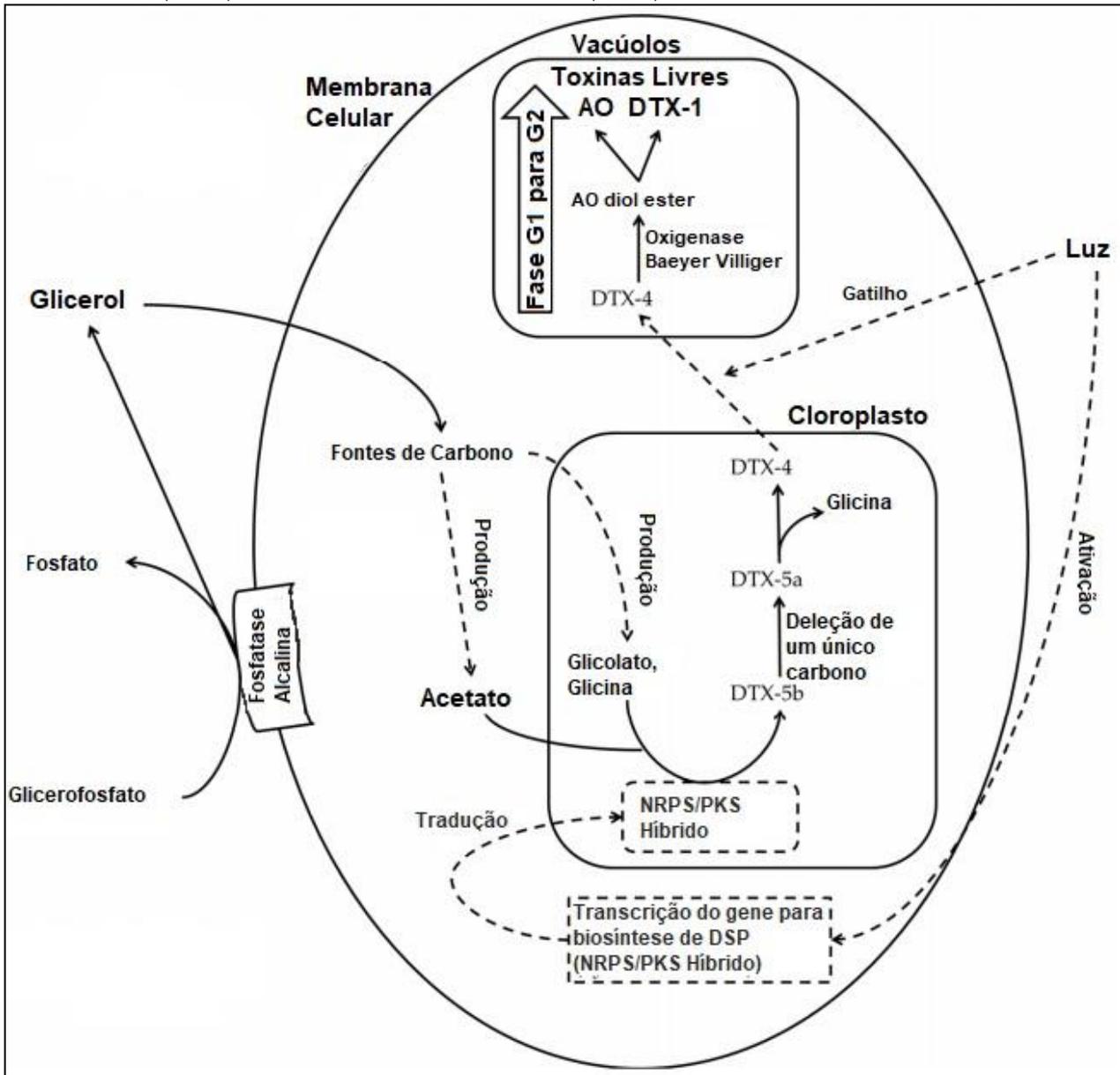
toxinas diarreicas podem ser sintetizados dentro do cloroplasto. Então a DTX-4, que é hidrossolúvel, é transportada para o vacúolo onde será enzimaticamente convertida em ácido ocadaico – diol ester, que então pode se transformar em ácido ocadaico ou DTX-1. Este processo pode ocorrer mesmo em diferentes situações de estresse nutricional (disponibilidade de nitrogênio e fósforo) e sob temperaturas extremas (LEE *et al.*, 2016).

FIGURA 1: ESQUEMA SIMPLIFICANDO O METABOLISMO DE TAG E ÁCIDOS GRAXOS EM MICROALGAS. VIAS DE SÍNTESE DE TAG PROPOSTAS PARA CÉLULAS DE MICROALGAS. **ABREVIATURAS:** **ACP**, PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ACILO; **COA**, COENZIMA A; **DAG**, DIACILGLICEROL; **DGAT**, ACILCOA: DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASE, **FA**, ÁCIDO GORDO; **FAS**, ÁCIDO GRAXO SINTASE, **G-3-P**, GLICEROL-3-FOSFATO; **LD**, GOTÍCULA LIPÍDICA; **MLDP / LDSP**, GOTÍCULA PRINCIPAL DA PROTEÍNA / PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS; **PDAT**, FOSFOLIPIO: DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASE; **PGD1**, PROTEÍNA 1 DE DEGRADAÇÃO GALACTOLIPÍDICA PLÁSTICA; **PTDOH**, ÁCIDO FOSFÁTICO; **PL**, FOSFOLIPIOS, **TAG**, TRIACILGLICEROL.



FONTE: ZIENKIEWICZ *et al.*, 2016.

FIGURA 2: ESQUEMA SIMPLIFICANDO O METABOLISMO DE ÁCIDO OCADAICO(AO) EM MICROALGAS. **ABREVIATURAS:** DTX, DINOFIGISTOXINAS; NRPS, SINTETASES DE PEPTÍDEO NÃO RIBOSSÔMICO; PKS, SINTETASE DE POLICETÍDEOS; DSP, ENVENENAMENTO DIARREICO.



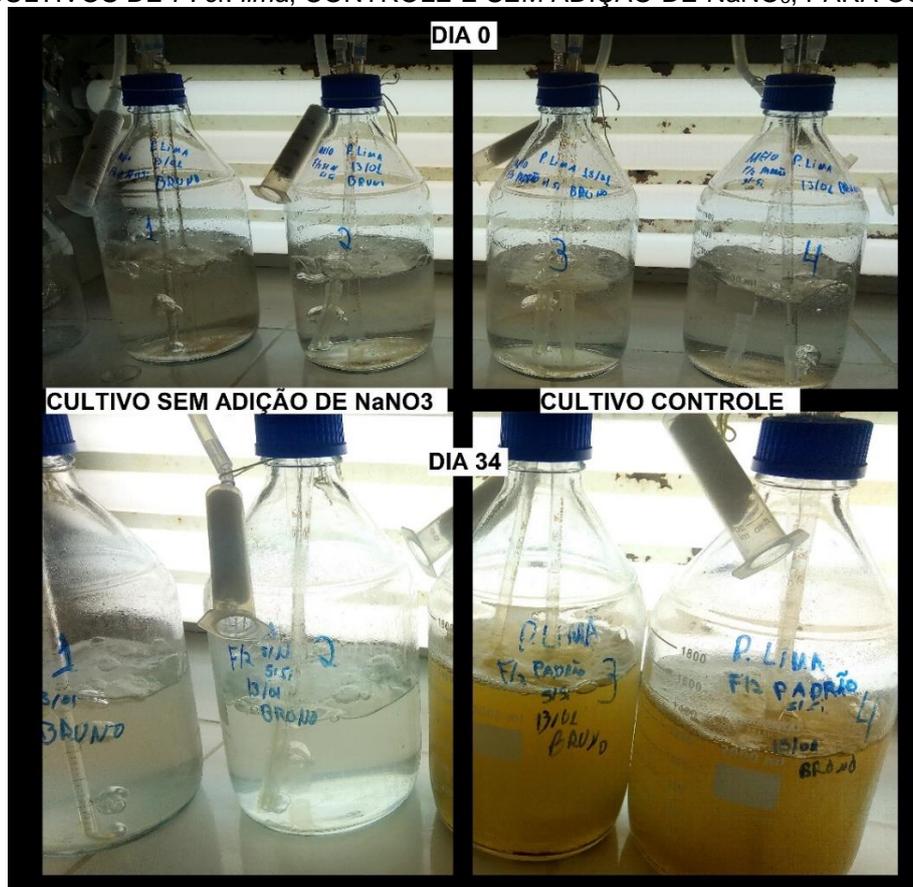
FONTE: LEE *et al.*, 2016.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MONTAGEM DOS CULTIVOS E TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a realização deste trabalho, foram selecionadas duas espécies de microalgas para serem cultivadas e comparadas, a espécie *Prorocentrum cf. lima* e a *Prorocentrum mexicanum*, sendo a função da segunda é de servir como um comparativo não tóxico para o experimento (respectivamente cepas LM46 e LM38 do Laboratório de Microalgas do Centro de Estudos do Mar). Ao total, foi realizado um experimento com três tipos de tratamento (em duplicatas), com cerca de 50 mL de inóculo inicial para cada cultivo (sendo que alguns cultivos não ocorreram simultaneamente). Com a alga *P. cf. lima*, um tratamento foi com cultivos controle composto pelo meio padrão de cultura f/2 com água do mar filtrada (GUILLARD, 1975) (Figura 3), onde se adicionou 0,88 mol/L de NaNO_3 , outro tratamento onde não foi adicionado nitrato de sódio (NaNO_3) (Figura 3) e um último tratamento com adição de 1/10 da concentração de NaNO_3 do meio f/2 (Figura 4). Já para a alga *P. mexicanum* foram feitos dois tratamentos (também em duplicata) com cultivos controle (Figura 5) e aqueles com adição de 1/10 NaNO_3 (Figura 6).

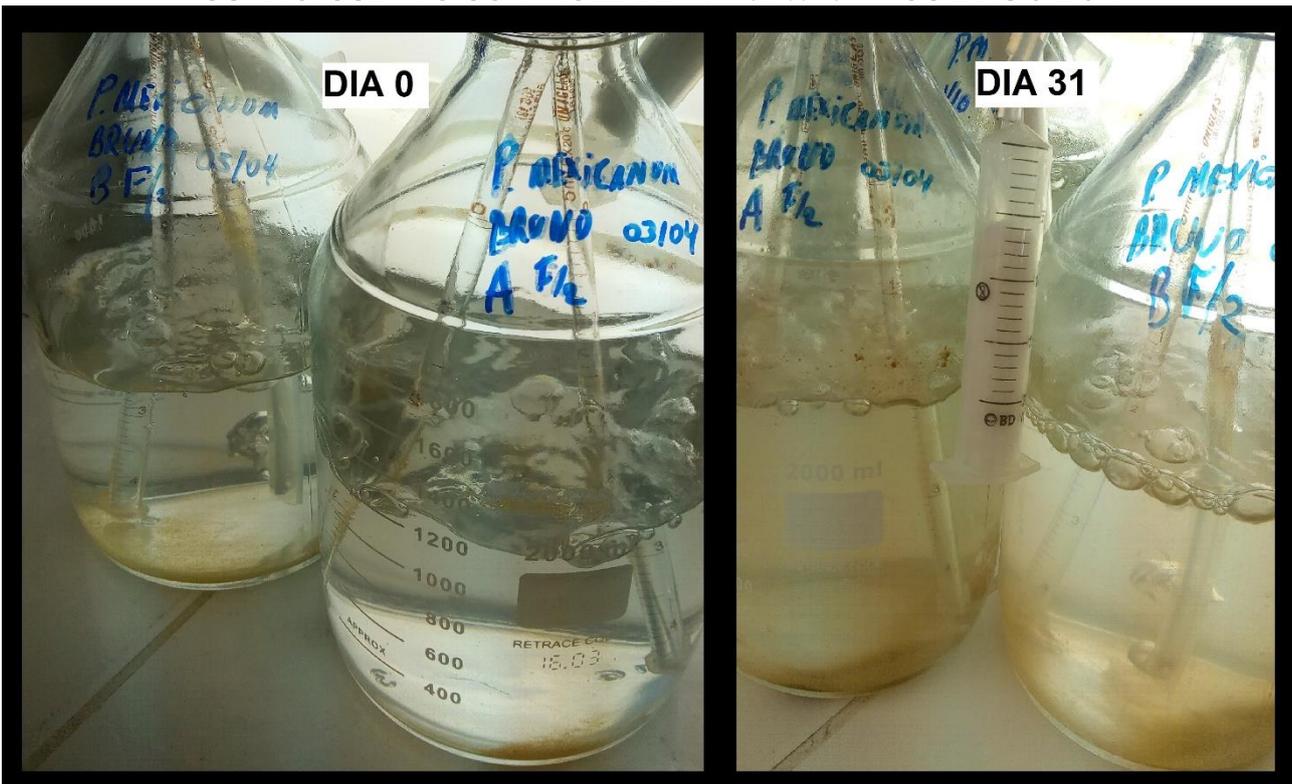
FIGURA 3: CULTIVOS DE *P. cf. lima*, CONTROLE E SEM ADIÇÃO DE NaNO_3 , PARA OS DIAS 0 E 34.



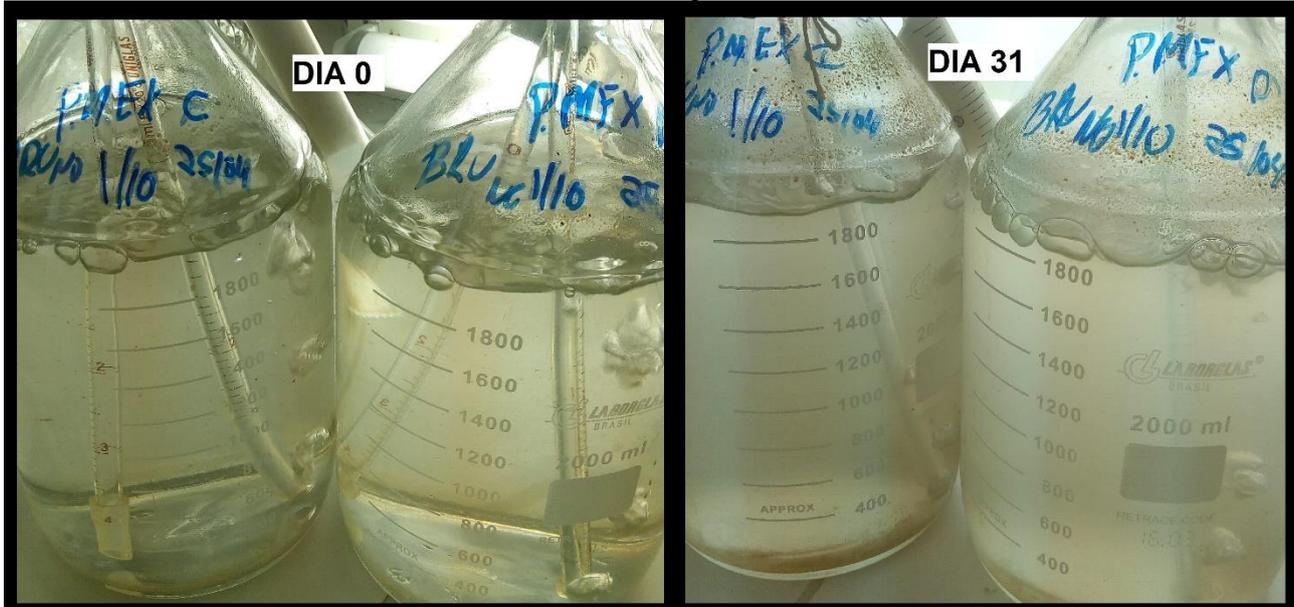
FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 4: CULTIVO DE *P. cf. lima* COM ADIÇÃO DE 1/10 DE NaNO_3 NOS DIAS 0 E 31.

FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 5: CULTIVO CONTROLE DE *P. mexicanum* NOS DIAS 0 E 31.

FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 6: CULTIVO DE *P. mexicanum* COM ADIÇÃO DE 1/10 DE NaNO₃ NOS DIAS 0 E 31.

FONTE: O AUTOR, 2018.

Todos os cultivos começaram com 1200 mL de meio padrão f/2 Guillard (GUILLARD, 1975) sem adição de sílica, já que se tratava de um cultivo de dinoflagelados. A única exceção foi para os cultivos de *P. mexicanum* com limitação de nitrogênio (1/10), o qual foi iniciado com 2100 mL de meio, para garantir que a produção de biomassa para este caso fosse suficiente para as análises futuras. Os cultivos tiveram uma duração de 31 dias (exceto os cultivos de *P. cf. lima* controle e sem adição de NaNO₃ os quais duraram 34 dias), sendo que, ao atingir o dia 16, foi adicionado um volume adicional de meio de cultura correspondente a cada tratamento (cerca de 1 L para todos os tratamentos, exceto o *P. mexicanum* com 1/10 de NaNO₃ onde se adicionou 500 mL pelo fato de ter iniciado com mais meio).

De cada unidade experimental, foi feita uma curva de crescimento através da coleta de amostras (5 mL) a cada 3 dias de cultivo e posterior cálculo da densidade (abundância) celular por meio de contagem microscópica. As amostras eram contadas em microscópio (Olympus, modelo BX41) com um aumento de 10x, utilizando uma câmera de contagem (Sedgewick Rafter, modelo S50) (Figura 7), a metodologia foi a de contar até um valor próximo de 400 células e com isso estimar o valor para o resto da câmera (a qual suporta 1 mL de amostra). Os valores de abundância ao longo do tempo serviram para se determinar as taxas de crescimento exponencial (μ) utilizando fórmula específica (Eq. 1).

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu \times \Delta t \quad (\text{Eq. 1})$$

onde N_t e N_0 são os valores de densidade celular no final e início do intervalo de tempo considerado, respectivamente, Δt o intervalo de tempo em dias, e μ é a taxa de crescimento exponencial (em d^{-1}), que posteriormente serviu para calcular o tempo de duplicação das células ($\ln(2) \div \mu$), em dias.

FIGURA 7: PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM MICROALGAL.



FONTE: O AUTOR, 2018.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS LIPOFÍLICAS

A cada intervalo de cerca de 7 dias, foram coletadas amostras adicionais, com o volume amostrado variando conforme a densidade celular do dia coletado, por volta de 10mL até 100mL. As amostras foram concentradas por filtração (sendo os filtros utilizados da marca Whatman de 2.4 cm de diâmetro, com poros de 1,5 μm e modelo 934-AH) a vácuo (Quimis modelo Q-355B de potência 840W) (Figura 8) para posteriormente analisar a composição e concentração das toxinas lipofílicas. Os filtros foram extraídos com 4 mL de metanol 99,9% (grau HPLC e marca Sigma-Aldrich modelo Lichrosolv) seguido por uma exposição ao disruptor de células ultrassônico (Cole Parmer CPX130; 130W; EUA) por um período de 2 minutos, usando 80% de amplitude e pulsos de 3 s com intervalos de

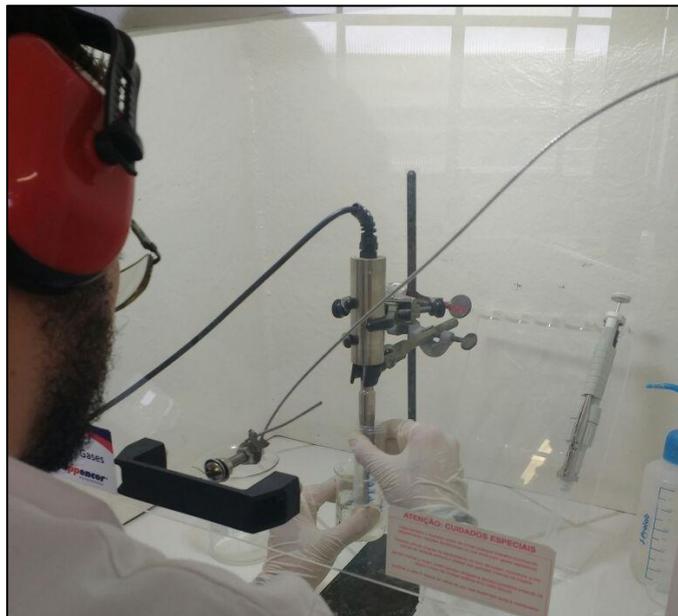
1 s (Figura 9). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 20 minutos e recolhidas em frascos de vidro específicos (vials) para a leitura em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a um espectrômetro de massas do tipo tandem (HPLC-MS/MS).

FIGURA 8: SISTEMA PARA CONCENTRAÇÃO DE MICROALGAS POR FILTRAÇÃO.



FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 9: QUEBRA DAS PAREDES CELULARES POR UM DESRUPTOR ULTRASSÔNICO.



FONTE: O AUTOR, 2018.

Os próximos procedimentos foram realizados dentro do sistema de HPLC-MS/MS, iniciando-se pela separação das toxinas que ocorreu em um cromatógrafo Agilent 1260 através de uma coluna da marca Poroshell (150 x 2,1 mm; com a partícula possuindo um diâmetro de 2,7 μm ; modelo EC-C18) a 20°C. As fases móveis eram compostas de (A) 100% água e (B) 95% acetonitrila + 5% água, ambas com 2 mM formato de amônio + 50 mM de ácido fórmico. O gradiente de eluição (0,3 ml min⁻¹) foi aplicado da seguinte forma:

80:20% (A:B) por 8 minutos, aumentando para 100% B, e mantido por 3,5 minutos antes de retornar à condição inicial até o final da análise (13 minutos no total). As toxinas lipofílicas foram detectadas em um espectrômetro de massa triplo quadruplo AbSciex QTRAP3200, com os parâmetros otimizados segunda a tabela 1 para as toxinas ácido ocadaico e DTX-1. Além destas, o método (EU-RL-MB, 2015) permite se detectar a presença de outras formas de toxinas diarreicas (DTX-2, DTX-3) e toxinas lipofílicas não diarreicas, como pectenotoxinas, azaspirácidos e suas variáveis, não encontradas nestas cepas de *Prorocentrum* spp. investigadas. Formas livres das toxinas diarreicas descritas foram rastreadas após a injeção de 10 a 15 μL do extrato. As concentrações de ácido ocadaico foram calculadas a partir de uma curva de calibração gerada a partir de diluições sequenciais do padrão analítico (3, 14, 56 e 223 ng mL^{-1}).

TABELA 1 – CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA MS/MS USADO PARA DETERMINAR TOXINAS LIPOFÍLICAS.

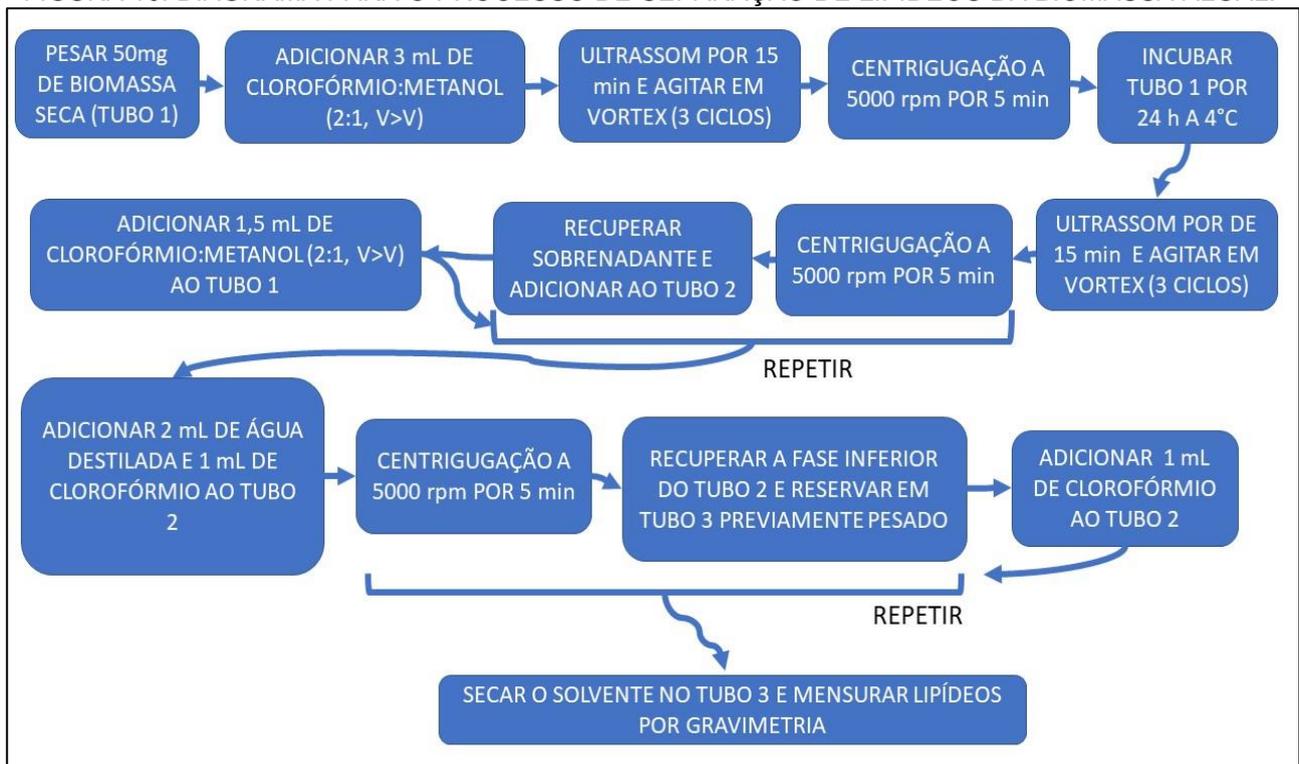
Toxina	ESI	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	mseg	DP (v)	EP (v)	CEP (v)	CE (v)	CXP (v)
AO	NEG	803.5	255	29	-129	-10	-40.1	-82	-2
AO	NEG	803.5	113	29	-129	-10	-41.5	-64	-2
DTX-1	NEG	817.5	255	36	-129	-10	-41.5	-62	-2
DTX-1	NEG	817.5	113	36	-120	-10	-51.7	-82	-2
		Curtain Gas (CUR)	Collision Gas (CAD)	Voltagem (IS)	Temperatura (TEM)	Gas 1 (GS1)	Gas 2 (GS2)		
		25 psi	Médio	4500 v	500 °C	40 psi	40 psi		

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS

Previamente à quantificação de lipídeos, quando os cultivos atingiram cerca de 31 dias de crescimento, as microalgas foram separadas da água por meio de decantação (Figura 11 A). De cada unidade experimental (exceto a que correspondeu a não adicionar NaNO_3 pois este gerou uma baixa biomassa para a quantificação) o concentrado de células foi seco em uma estufa a 55°C por 24 ou 48 horas, dependendo da umidade contida na amostra (Figura 11 B), sendo posteriormente pesado (Figura 11 C) e armazenado para a análise (Figura 11 D). Por fim, as análises lipídicas foram realizadas utilizando a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), utilizando de centrifugação e solventes para extrair os lipídeos. Inicialmente, pesou-se cerca de 50 mg de biomassa seca, misturando em seguida a 3 mL de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1, v:v),

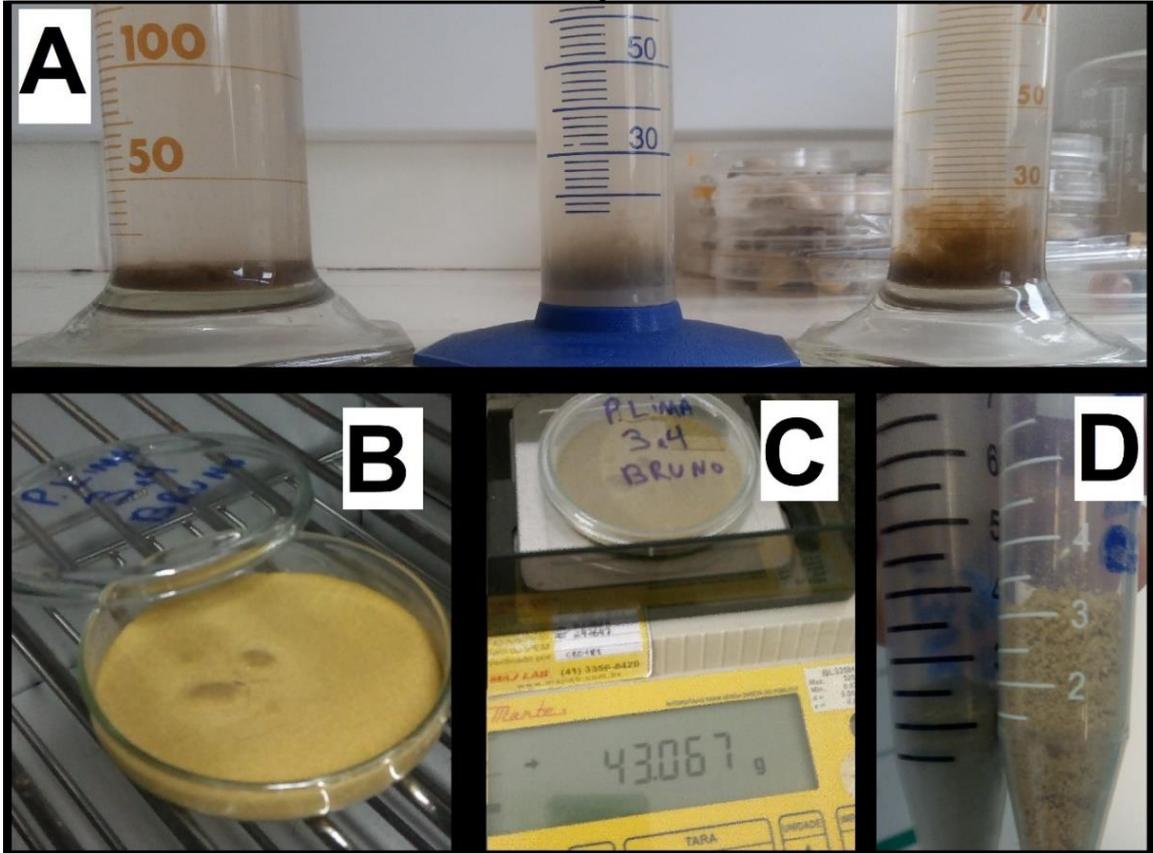
seguido de tratamento por ultrassom (de marca Schuster, modelo L200 e potência de 150 W) em três ciclos de 15 minutos cada e então uma centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos, a 5°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (Figura 12) foi recuperado utilizando uma pipeta, e armazenado. Então, adiciona-se 1,5 mL da mesma mistura clorofórmio:metanol no tubo em que foi retirado o sobrenadante, repete-se o processo de extração no ultrassom e centrifugação, sendo a nova fração do sobrenadante recuperada. O material sobrenadante retirado é então misturado com 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio, e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Finalizando, centrifuga-se usando os mesmos parâmetros anteriores, e é recolhida a fração inferior, adiciona-se 1 mL de clorofórmio novamente ao tubo em que a fração inferior foi retirada, é feita uma última centrifugação e recupera-se a fase inferior novamente, que é finalmente armazenada em um recipiente previamente pesado. O frasco é então levado para uma capela de exaustão para secar e posteriormente pesar para determinar o teor de lipídeos por método gravimétrico (Figura 10).

FIGURA 10: DIAGRAMA PARA O PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE LIPÍDEOS DA BIOMASSA ALGAL.



FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 11: PROCESSO DE COCENTRAÇÃO DE SECAGEM DE MICROALGAS.



FONTE: O AUTOR, 2018.

FIGURA 12: PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE LIPÍDEOS DA BIOMASSA ALGAL.



FONTE: O AUTOR, 2018.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

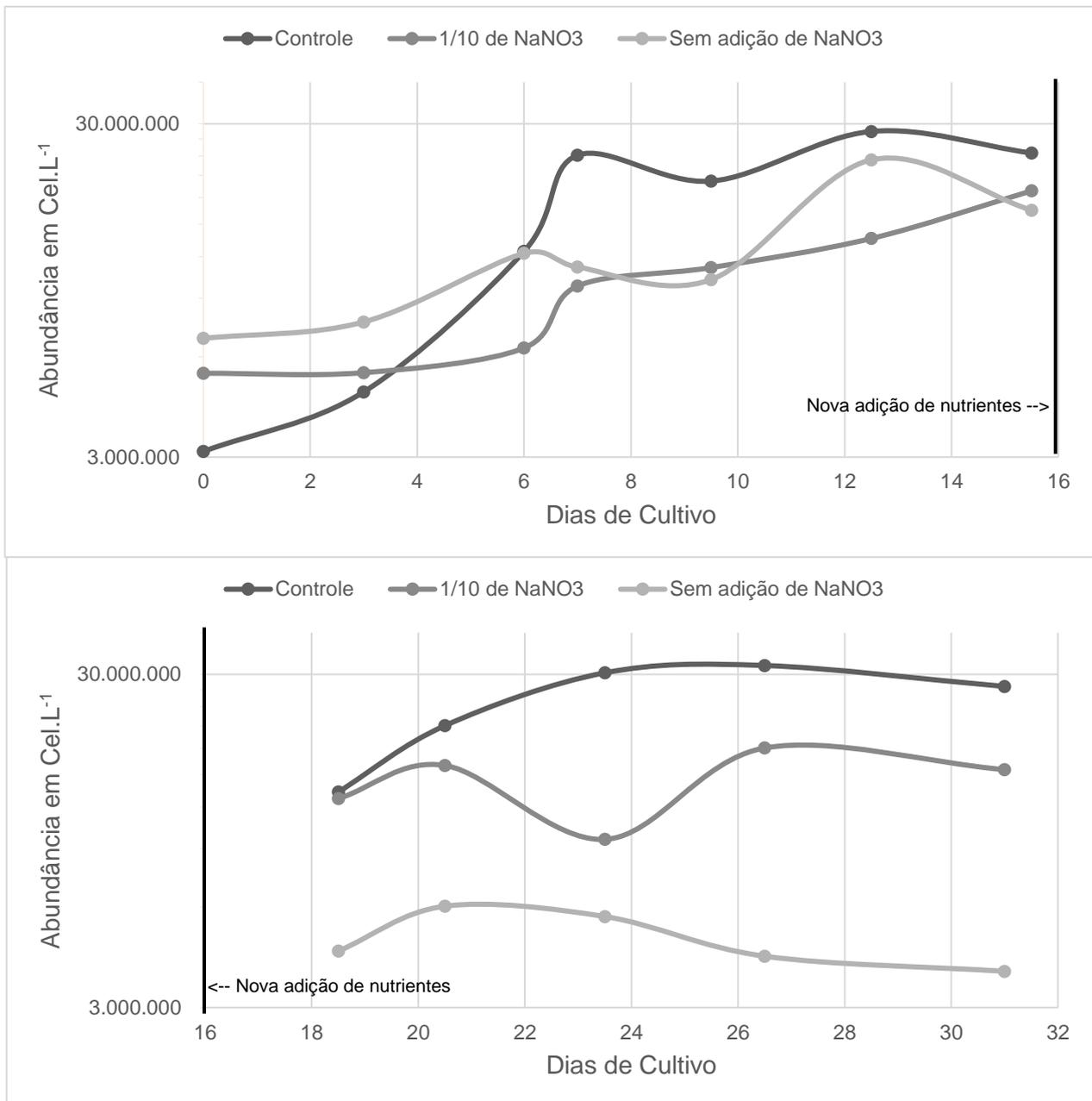
4.1 CRESCIMENTO CELULAR NOS CULTIVOS (ABUNDÂNCIA)

Os ritmos de crescimento (Fig. 13 e 14) e as máximas abundâncias alcançadas (Tabela 2) em cada unidade experimental foram afetados pela disponibilidade de nitrogênio nos meios de cultivo, tanto para *P. cf. lima* (Fig. 13), quanto para *P. mexicanum* (Fig. 14). Outros autores alcançaram resultados semelhantes em trabalhos que testaram a limitação do crescimento celular por estresse nutricional, seja em *Prorocentrum lima* (VANUCCI et al., 2010; VARKITZI; PAGOU; GRANÉLI, 2010) ou em outras espécies de microalgas (PASARIBU; LI; KUO, 2014, ZHUANG et al., 2018; WENG; PASARIBU; LIN, 2014; CAI; DUAN; ZHU, 2013; SCIANDRA; AMARA, 1994), ou ainda mediante outros parâmetros geradores de estresse, tais como temperatura e luminosidade (PASARIBU; LI; KUO, 2014; HUANG et al., 2015; SPARROW et al., 2017; CAMACHO; RODRÍGUEZ; MIRÓN, 2007).

Para *P. cf. lima*, foi notável a diferença entre o crescimento celular nos diferentes tratamentos. O cultivo que passou pelo tratamento controle alcançou um valor máximo de 35×10^6 cel.L⁻¹ por volta do dia 13, sendo os maiores valores medidos no dia 13 e no período entre o dia 23 e o dia 31. Estes valores podem ser considerados como o esperado para cultivos controle de *P. lima*, como se percebe na comparação com os resultados de outros trabalhos como o de Nascimento et al. (2016) (máx. 60×10^6 cel.L⁻¹), o de Varkitzi et al. (2010) (20×10^6 cel.L⁻¹) e o de Vanucci et al. (2010) (35×10^6 cel.L⁻¹), que utilizaram os respectivos tipos de meio de cultura: L2 (versão modificada de Guillard, 1995), f/2 modificado e f/2. Tal diferença provavelmente se deva à presença de aeração e renovação parcial do meio nos cultivos (método semi-estático) realizados no presente estudo. Já nossos cultivos sem adição de NaNO₃ tiveram seu ápice entre os dias 12 e 13, obtendo o maior valor de densidade celular no dia 13 ($30 \pm 17 \times 10^6$ Cel.L⁻¹). Por fim, o período em que o cultivo com adição de 1/10 da concentração controle de NaNO₃ obteve um maior número de células foi no dia 15 e entre os dias 21 e 27 (com valor máximo de $19 \pm 3 \times 10^6$ Cel.L⁻¹) e no dia final (31º) de cultivo. Com base nos valores máximos, podemos propor que a fase exponencial dos tratamentos terminou por volta do dia 15 e a partir desse dia se iniciou a fase estacionária, sendo estas observações próximas àquelas citadas pelos autores anteriores. É interessante notar que após a adição do meio de cultura no dia 16, uma nova fase de crescimento é gerada, porém não tão intensa quanto a do começo do cultivo, o que nos leva a crer que outros fatores estão limitando o

crescimento além dos nutrientes, como compostos acumulados no meio, luz ou temperatura. O estresse causado pela falta de nitrogênio, desta forma, provocou uma notável diferença entre o rendimento dos cultivos, com o tratamento controle rendendo números de células maiores por meio de taxas de divisão celular mais elevadas.

FIGURA 13: GRÁFICOS DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS DE *P. lima*.

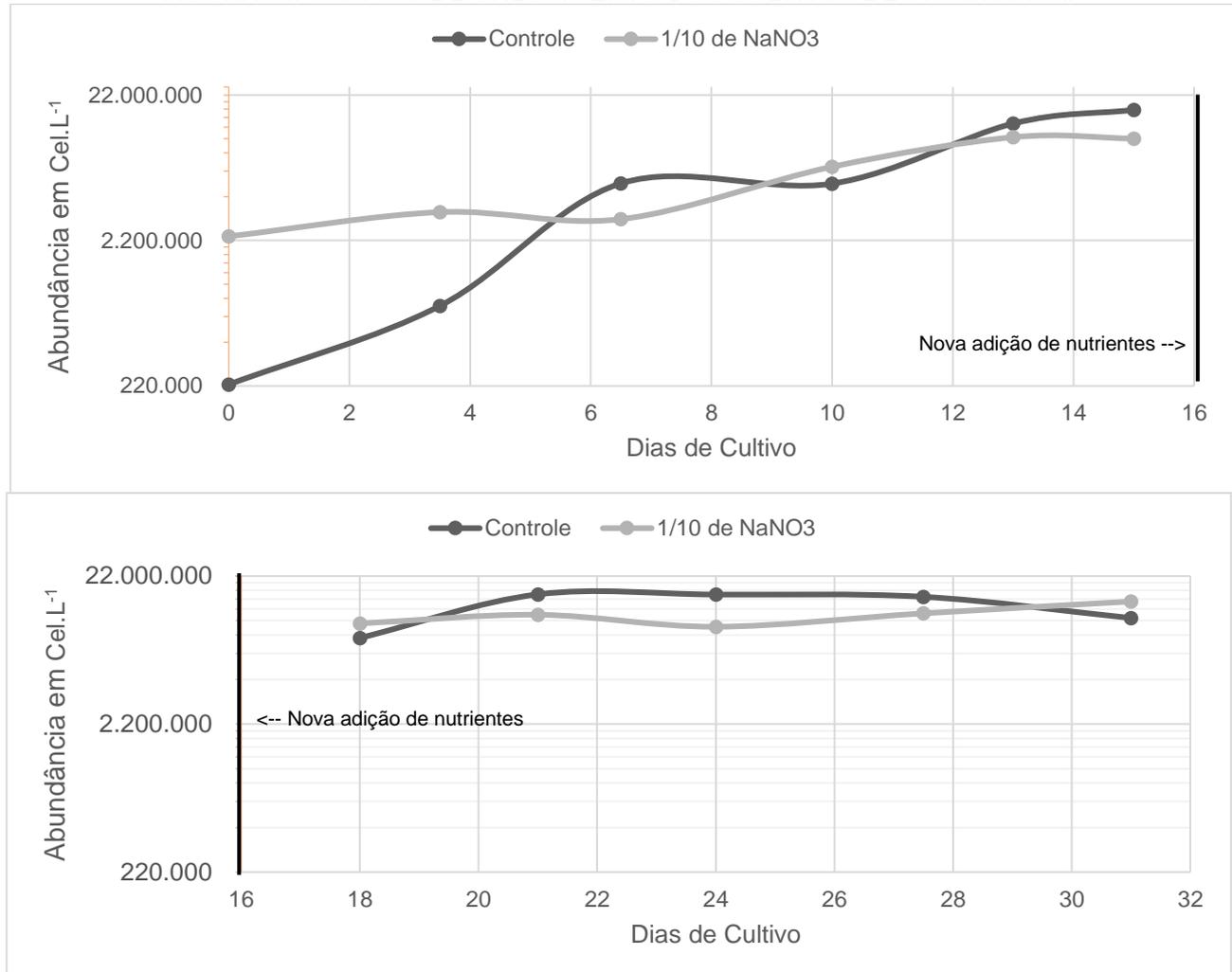


FONTE: O AUTOR, 2018.

Com os cultivos de *P. mexicanum*, não foi possível se observar uma nítida diferença entre as curvas de crescimento nos diferentes tratamentos, provavelmente devido ao crescimento lento observado no tratamento controle durante o dia 0 até o dia 6. Ainda assim, no cultivo controle registrou-se um maior número de indivíduos entre os dias

13 e 15 e entre 21 e 28 (máximo de $17 \pm 3 \times 10^6$ cel.L⁻¹ no dia 15), em relação ao cultivo sob estresse de nitrogênio (1/10 da concentração controle), onde a maior abundância média foi observada no dia 21 e ao final do cultivo a partir do dia 27 ($15 \pm 3 \times 10^6$ cel.L⁻¹ no dia 31) (Tabela 2).

FIGURA 14: GRÁFICO DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS DE *P. mexicanum*.



FONTE: O AUTOR, 2018.

TABELA 2: MÁXIMAS DENSIDADES CELULARES MÉDIAS ATINGIDAS EM TODOS OS CULTIVOS

Microalga	Cultivo	Dia de cultivo	Max. den. Cel. (Cel.L ⁻¹)
<i>P. lima</i>	Controle	29	136.290.000
	1/10 de NaNO ₃	27	37.698.375
	Sem adição de NaNO ₃	13	29.850.000
<i>P. mexicanum</i>	Controle	21	22.898.077
	1/10 de NaNO ₃	31	15.170.000

As taxas de crescimento exponencial (μ) e os tempos de duplicação para cada cultivo (Tabelas 3 e 4) demonstraram que os cultivos com quantidades suficientes de N (controle) apresentaram taxas relativamente elevadas de divisão celular (com valores similares ao registrados em Nascimento et al. 2016). Por outro lado, nos cultivos sob estresse nutricional, as taxas máximas de crescimento exponencial foram menores valores de μ entre 0,22 e 0,23, sendo inferiores àquelas medidas por Vanucci e Varkitzi (2010). Nos tratamentos sob estresse (i.e. limitação) de nitrogênio, o tempo de divisão celular foi mais longo. Durante este período em que as células não se dividem, por outro lado, pode haver um armazenamento/acúmulo do material de reserva sintetizado (carboidratos e/ou lipídeos). Tal mecanismo, que pode conferir certa resistência aos efeitos negativos do estresse, pode ser percebido no estudo de Vanucci et al. (2010). Naquele estudo, células sob estresse nutricional possuíam um volume celular maior do que no tratamento controle, que por sua vez fornecia nutrientes suficientes para manter taxas mais rápidas de divisão celular, resultando em células menores e, provavelmente, com menor teor de material de reserva, como visto no presente estudo mais adiante.

TABELA 3: CRESCIMENTO EXPONENCIAL E TEMPO DE DUPLICAÇÃO CALCULADOS PARA OS CULTIVOS DE *P. cf. lima*.

Cultivo <i>P. cf. lima</i>	Δt	μ	Tempo de duplicação
Controle	(0 - 7 Dias)	0,29	2,4
	(16 - 23 Dias)	0,11	6,2
1/10 de NaNO ₃	(0 - 7 Dias)	0,08	8,1
	(18 - 24 Dias)	0	-
Sem adição de NaNO ₃	(0 - 7 Dias)	0,07	9,8
	(16 - 23 Dias)	0,08	8,4

TABELA 4: CRESCIMENTO EXPONENCIAL E TEMPO DE DUPLICAÇÃO PARA *P. MEXICANUM*.

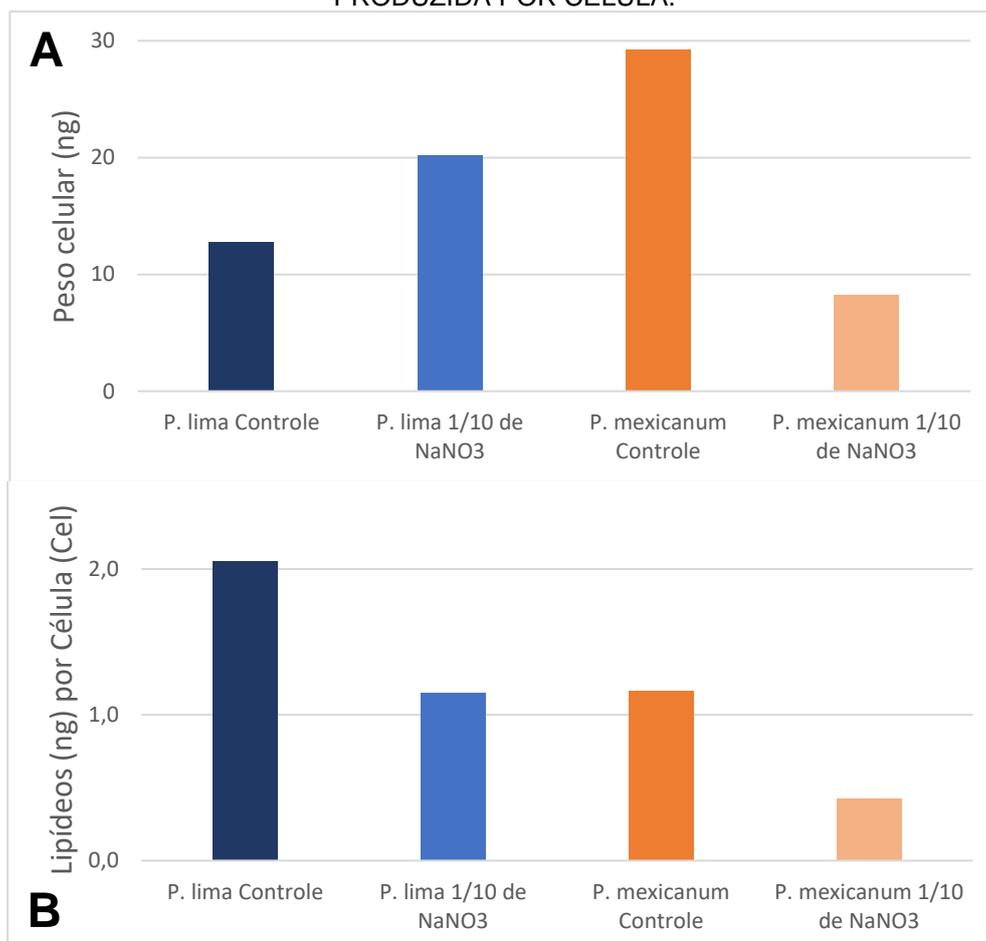
Cultivo <i>P. mexicanum</i>	Δt	μ	Tempo de duplicação
Controle	(0 - 7 Dias)	0,45	1,5
	(18 - 24 Dias)	0,11	6,2
1/10 de NaNO ₃	(0 - 7 Dias)	0,24	2,8
	(18 - 24 Dias)	0	-

4.2 TEOR LIPÍDICO

Para *P. cf. lima*, as células sob limitação de N (adição de 1/10 da concentração controle) atingiram um maior peso médio ($\sim 20 \text{ ng.célula}^{-1}$) em relação ao tratamento controle ($\sim 12,7 \text{ ng.célula}^{-1}$) (FIGURA 15A) e acumularam um conteúdo significativamente

menor de lipídeos por célula ($\sim 1,15$ vs. ~ 2 ng.célula $^{-1}$) ao final do experimento (Figura 15B). Isso sugere que a limitação no crescimento por deficiência em nitrogênio é um fator determinante para o metabolismo celular e a composição nutricional da microalga *P. cf. lima*, algo observado em outros trabalhos com diferentes espécies de microalgas (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013; WENG; PASARIBU; LIN, 2014). Já para o *P. mexicanum*, o cultivo controle foi o que obteve os maiores valores para o peso celular (~ 29 ng. célula $^{-1}$ para o cultivo controle e 8 ng. célula $^{-1}$ para cultivo sob estresse) e para os lipídeos por célula (1,1 ng célula $^{-1}$ para o cultivo controle e 0,4 ng. célula $^{-1}$ para cultivo sob estresse), apesar de ambos cultivos terem aproximadamente o mesmo número de células no final do experimento. A falta de nitrogênio e o fato de a cepa usada para o cultivo sob estresse ser proveniente do último dia do cultivo controle podem ser as responsáveis por tal discrepância nos valores.

FIGURA 15: (A) PESO DE CADA MICROALGA PARA CADA CULTIVO E (B) QUANTIDADE DE LIPÍDEOS PRODUZIDA POR CÉLULA.



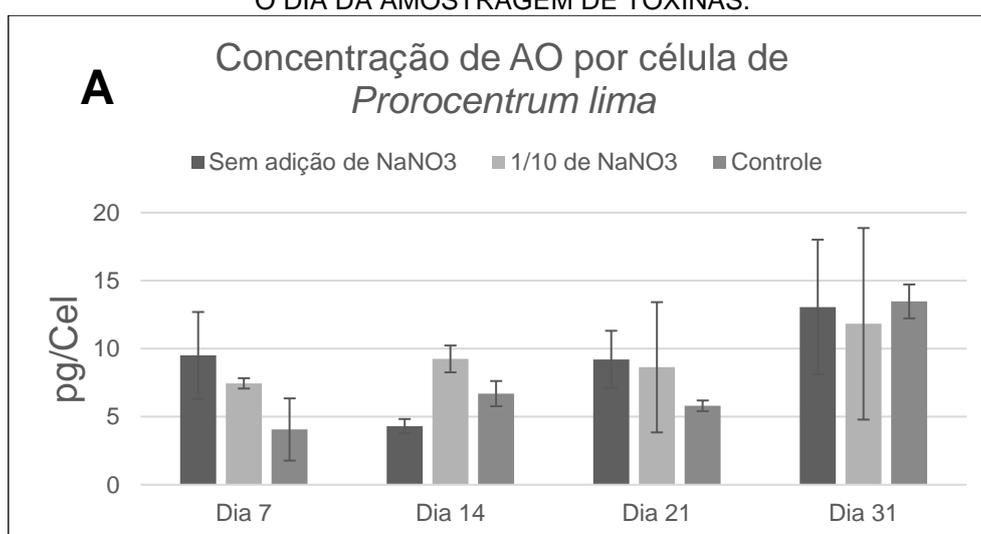
FONTE: O AUTOR, 2018.

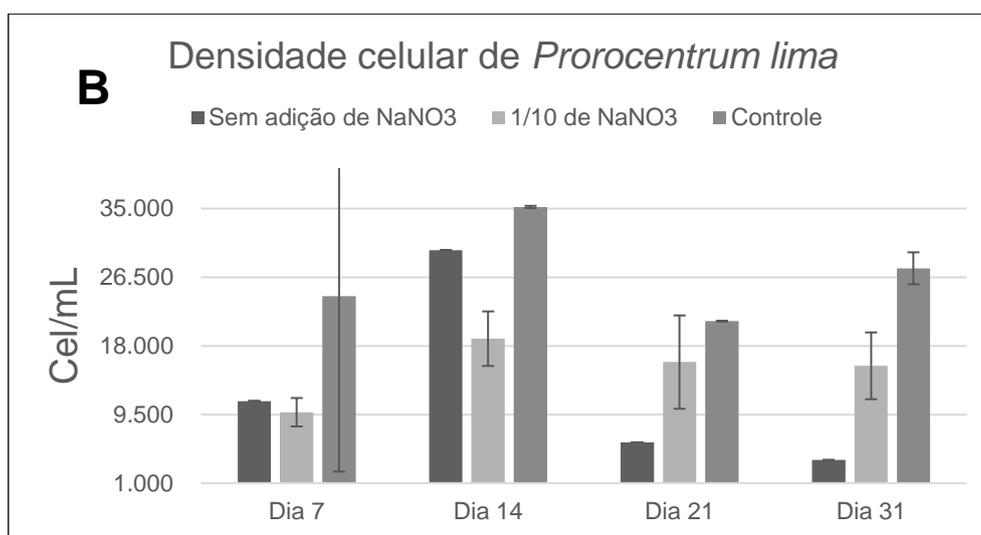
4.3 COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE TOXINAS

Durante o período de crescimento de *P. cf. lima* no presente estudo, pareceu haver situações que levaram ao acúmulo de maiores quantidades de AO. Nos últimos dias de todos os cultivos, as células alcançaram os maiores valores de toxinas em todos os tratamentos. As maiores concentrações foram medidas no controle, 1/10 de NaNO₃ e sem adição de NaNO₃ respectivamente: 13.5 pg.célula⁻¹, 12 pg. célula⁻¹ e 13 pg. célula⁻¹ (Figura 16A). Estes valores são relativamente altos quando comparados com os trabalhos de Vanucci e Varkitzi (2010), com valores de 6,5 pg.célula⁻¹ medidos no controle e por volta de 5 a 12 pg. célula⁻¹ nos cultivos sob estresse.

Assim, por reduzir a taxa de divisão celular, o estresse gerado pela limitação de nutrientes induziu um aumento no peso celular médio para a espécie *P. lima*, que esteve aparentemente relacionado a uma maior retenção de lipídeos (Figura 15B) e de toxinas (Figura 16A). As células de *P. cf. lima* acumularam maiores concentrações celulares de AO em momentos em que a taxa de divisão celular foi desacelerada, atingido os valores máximos (~13 pg.célula⁻¹) ao final do experimento, quando grande parte dos nutrientes havia provavelmente sido consumida. Adicionalmente, a relação direta entre os conteúdos celulares de lipídeos e AO pode ser explicado pelo fato de que os componentes e mecanismos responsáveis pela produção lipídica nas microalgas estão correlacionados com aqueles ligados à produção de toxinas lipofílicas (WEISSMAN, 2009).

FIGURA 16: (A) CONCENTRAÇÃO DE AO POR CÉLULA DE *P. lima* E (B) DENSIDADE CELULAR PARA O DIA DA AMOSTRAGEM DE TOXINAS.





FONTE: O AUTOR, 2018.

Outro padrão observado, causado aparentemente pelo estresse nutricional que as algas sofreram, foi um aumento relativo no teor de toxinas quando houve uma limitação mais acentuada de nutrientes ao longo do cultivo, mesmo no tratamento controle. As microalgas passaram a acumular uma maior concentração de AO conforme os nutrientes disponíveis diminuam, lembrando que no dia 16 uma quantidade extra de meio de cultivo foi adicionado em todos os tratamentos. Percebeu-se, assim, oscilações importantes na concentração de AO: menores valores coincidindo com momentos de abundância em N (dia 7 e dia 21 para o tratamento controle) ou quando o estresse nutricional era muito elevado (dia 14 para o tratamento sem adição de NaNO₃); valores medianos correspondendo a períodos de provável decréscimo nas concentrações de (dias 7 e 21 para 1/10 de NaNO₃ e dia 14 para o controle); e por fim valores maiores coincidindo com as situações de máximo estresse nutricional, em conjunto com um metabolismo favorável à retenção de compostos nas células (divisão celular lenta) e, possivelmente, à síntese de AO a partir de precursores lipídicos (dias 7 e 21 para o tratamento sem adição de NaNO₃ e dia 14 para o tratamento com adição de 1/10 de NaNO₃).

Ao comparar os valores de densidade e concentração de AO, os presentes resultados corroboram o que é proposto por Glibert et al. (2012), que sugere que tudo o que eleve o estresse, ou que pelo menos afete o metabolismo voltado à divisão celular, leva a um aumento na concentração de compostos. Sendo assim, quanto mais tempo as microalgas passam sem nutrientes, maiores concentrações de toxinas são acumuladas até se atingir um ponto crítico onde a síntese de toxinas diminui por falta de moléculas precursoras.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a mudança no metabolismo celular de *Prorocentrum* spp. está diretamente relacionada com o estresse causado pela limitação de nitrogênio. Em princípio, parece haver um nível de limitação nutricional sob o qual o metabolismo da microalga altera sua função basal de dedicar os nutrientes para a divisão celular e passa a acumular lipídeos e outros compostos como toxinas (como por exemplo, o cultivo com apenas 1/10 de adição de NaNO_3). Neste momento, a produção e o acúmulo de compostos tóxicos são uma consequência principalmente da diminuição nas taxas de divisão celular. A partir deste ponto crítico, contudo, um estresse nutricional mais intenso pode acabar limitando a produção de qualquer composto essencial levando a uma diminuição na síntese de toxinas (tal como no tratamento sem nenhuma adição de NaNO_3).

Para confirmar ainda mais a hipótese desenvolvida acima, seria ideal obter e analisar amostras de toxinas e de lipídeos mais frequentemente, talvez a cada 3 dias ao longo da curva de crescimento. Desta forma, seria possível se comparar lado a lado, a produção de cada substância, em conjunto com outros metabólicos também (como carboidratos e proteínas), o que forneceria uma visão mais abrangente da cadeia metabólica responsável pela canalização dos nutrientes e funções celulares afetadas por uma situação de estresse nutricional. Outra abordagem que poderia ser trabalhada num estudo futuro seria a comparação entre diversos tipos de estresse, como a falta de um ou mais nutrientes, incluindo o CO_2 , além de pH e fatores físicos diversos, tais como turbulência, temperatura, intensidade luminosa, fotoperíodo, e espaço disponível para o crescimento.

6. REFERÊNCIAS

BATES, P. D.; BROWSE, J. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. , v. 3, n. July, p. 1–11, 2012.

CAI, Z.; DUAN, S.; ZHU, H. Compensatory growth of the bloom-forming dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* induced by nitrogen stress. **Oceanologia**, v. 55, n. 1, p. 269–276, 2013. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5697/oc.55-1.269>>..

CAMACHO, F. G.; RODRÍGUEZ, J. G.; MIRÓN, A. S.; et al. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 176–194, 2007.

CAMACHO, F.G.; GALLARDO RODRÍGUEZ, J. J.; SÁNCHEZ MIRÓN, A.; Determination of shear stress thresholds in toxic dinoflagellates cultured in shaken flasks. Implications in bioprocess engineering. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1506–1515, 2007.

EGMOND H. P.; VAN APELDOORN M. E.; SPEIJERS G. J. A. Marine Biotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004.

FAUST, M. A.; GULLEDGE R. A. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. **Contributions from the United States national herbarium**, v. 42, p. 1-144. 2002.

FUJIKI, H.; SUGANUMA M.; SUGURI H.; YOSHIZAWA S.; TAKAGI K.; UDA N.; WAKAMATSU K.; YAMADA K.; MURATA M.; YASUMOTO T; SUGIMURA T. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 79: 1089–1093. 1988.

GLIBERT, P. M.; BURKHOLDER, J. A. M.; KANA, T. M. Recent insights about relationships between nutrient availability, forms, and stoichiometry, and the distribution, ecophysiology, and food web effects of pelagic and benthic *Prorocentrum* species. **Harmful Algae**, v. 14, p. 231–259, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.023>>.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.I.; CHANLEY, M.H. (Eds). **Culture of marine invertebrates**. Plenum, New York, 1975, p. 29–59.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algabase.org>. Acesso em 22 fev 2018.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON D. M.; CEMBELLA A. D.; ENEVOLDSEN H. O. Manual on Harmful Marine Microalgae. Unesco. 1995. Rev 2003.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

HU, T.; LEBLANC, P.; BURTON, I. W.; et al. Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: Self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins. **Harmful Algae**, v. 63, p. 85–93, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.012>> .

HUANG, X.; HUANG, B.; CHEN, J.; LIU, X. Cellular responses of the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu to phosphate limitation and chronological ageing. **Journal of Plankton Research**, v. 38, n. 1, p. 83–93, 2015.

HUNTER-CEVERA, J.C.; BELT, A. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. San Diego. Elsevier. 1996.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v. 6, n. 9, p. 4607–4638, 2013.

KIM S.K. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. Academic Press. 2015.

LASSUS, P.; CHOMÉRAT, N.; HESS, P.; NÉZAN, E. **Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean**. ISSHA, IOC, UNESCO. 2016.

LEE, T. C.; FONG, F. L.; HO, K.; LEE, F. W. The Mechanism of Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxin Production in *Prorocentrum* spp .: Physiological and Molecular Perspectives. , 2016.

MACPHERSON, R.G.; BURTON, W. I.; WALTER, A.j.; et al. NRC Publications Archive Archives des publications du CNRC. Studies of the biosynthesis of DTX-5a and DTX-5b by the Dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: regiospecificity of the putative Baeyer – Villigerase and insertion of a single Amino Acid in a Polyketide chain Studies of the Biosynthesis of DTX-5a and DTX-5b by the Putative Baeyer - Villigerase and Insertion of a Single Amino Acid in a Polyketide Chain. , 2002.

NASCIMENTO, S. M.; SALGUEIRO, F.; MENEZES, M.; et al. *Prorocentrum lima* from the South Atlantic: Morphological, molecular and toxicological characterization. **Harmful Algae**, v. 57, p. 39–48, 2016.

NORTON, T.A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R.A. Algal biodiversity. Phycologia. 1996.

PASARIBU, B.; LI, Y. S.; KUO, P. C.; et al. The effect of temperature and nitrogen deprivation on cell morphology and physiology of *Symbiodinium*. **Oceanologia**, v. 58, n. 4, p. 272–278, 2016.

PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. JR. Ficotoxinas na costa brasileira. **Série Livros do Museu Nacional**, v. 10, p. 57-77, 2005.

SCIANDRA, A.; AMARA, R. Effects of nitrogen limitation on growth and nitrite excretion rates of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 105, n. 3, p. 301, 1994.

SPARROW, L.; MOMIGLIANO, P.; RUSS, G. R.; HEIMANN, K. Effects of temperature, salinity and composition of the dinoflagellate assemblage on the growth of *Gambierdiscus carpenteri* isolated from the Great Barrier Reef. **Harmful Algae**, v. 65, p. 52–60, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.006>>. .

UNION, E.; BIOTOXINS, F. O. R. M. EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY EU-Harmonised Standard Operating Procedure (EURLMB) for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS / MS. , p. 1–31, 2011.

VANUCCI, S.; GUERRINI, F.; MILANDRI, A.; PISTOCCHI, R. Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Harmful Algae**, v. 9, n. 6, p. 590–599, 2010.

VARKITZI, I.; PAGOU, K.; GRANÉLI, E.; et al. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. **Harmful Algae**, v. 9, n. 3, p. 304–311, 2010.

VILLANOVA, V. Identification of the mechanism of mixotrophy in *Phaeodactylum tricorutum* To cite this version : HAL Id : tel-01685787 Identification du mécanisme de la mixotrophie chez *Phaeodactylum tricorutum*. , 2018.

WEISSMAN, K. J.; PKS, T. I. I. I. Introduction to Polyketide Biosynthesis. , v. 459, n. 9, p. 3–16, 2009.

WENG, L. C.; PASARIBU, B.; LIN, I. P.; et al. Nitrogen deprivation induces lipid droplet accumulation and alters fatty acid metabolism in symbiotic dinoflagellates isolated from *Aiptasia pulchella*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5777, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4105741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WIESSNER, W.; SCHNEPF, E.; STARR, R.C. *Algae, Environment and Human Affairs*. Bristol. Biopress Ltd. 1995.

W.J.DYER, E. G. BLIGH. AND. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 21, p. 911–917, 1959.

ZHUANG, L. L.; AZIMI, Y.; YU, D.; WU, Y. H.; HU, H. Y. Effects of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 in suspended-solid phase photobioreactors (ssPBR). *Biomass and Bioenergy*, v. 109, n. December 2017, p. 47–53, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.12.017>>. .

ZIENKIEWICZ, K.; DU, Z.; MA, W.; VOLLHEYDE, K.; BENNING, C. Biochimica et Biophysica Acta Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular , cellular and physiological insights ☆. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1861, n. 9, p. 1269–1281, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.008>>. .