

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANI ENRRIQUE CORADASSI BUFF

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS APLICADAS PARA PRODUÇÃO
MASSIVA DA MICROALGA *Ostreopsis cf. ovata* EM FOTOBIORREATOR

PONTAL DO PARANÁ

2023

GIOVANI ENRRIQUE CORADASSI BUFF

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS APLICADAS PARA PRODUÇÃO
MASSIVA DA MICROALGA *Ostreopsis cf. ovata* EM FOTOBIORREATOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito à obtenção do título de grau bacharel ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Laurenno Mafra Junior

PONTAL DO PARANÁ

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DO CENTRO DE ESTUDOS DO MAR

Buff, Giovani Enrrique Coradassi
B863d Desenvolvimento de metodologias aplicadas para produção massiva da microalga *Ostreopsis cf. ovata* em fotobiorreator / Giovani Enrrique Coradassi Buff. – Pontal do Paraná, 2023.

1 arquivo [57 f.] : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Campus Pontal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, Curso de Engenharia de Aquicultura.

1. Microalga. 2. Biomassa. 3. Metodologia. I. Squella, Francisco José Lagreze. II. Mafra Junior, Luiz Laureno. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD – 579.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
Avenida Deputado Anibal Khury, 2033, - Bairro Balneário Pontal do Sul, Pontal do
Paraná/PR, CEP 83255-976
Telefone: 4135118600 - <http://www.ufpr.br/>
Despacho nº 14/2023/UFPR/R/PP/EA

Processo nº 23075.061642/2022-21

TERMO DE APROVAÇÃO

Giovani Enrrique Coradassi Buff

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS APLICADAS PARA
PRODUÇÃO MASSIVA DA MICROALGA *Ostreopsis cf. ovata* EM
FOTOBIORREATOR*

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores

Comissão avaliadora

Dr. Francisco José Lagreze Squella
Orientador e presidente

Dr. Luiz Laurenno Mafra Junior
Coorientador

Dra. Silvia Pedroso Melegari
Membro examinadora

Dra. Simone Suhnel
Membro examinadora

Pontal do Paraná, 06/12/23



Documento assinado eletronicamente por **FRANCISCO JOSE LAGREZE SQUELLA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/12/2023, às 15:53, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/12/2023, às 18:46, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Simone Suhnel, Usuário Externo**, em 11/12/2023, às 09:52, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/12/2023, às 12:13, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6234142** e o código CRC **46956872**.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido com apoio de vários componentes e não teria sido concluído sem a cooperação de cada esforço obtido. A realização do estudo, sem dúvidas foi um grande desafio, mas com dedicação e determinação finalizo mais uma etapa com reconhecimento por todos:

Em primeiro lugar, a Deus que me proporcionou vivenciar cada experiência como um aprendizado único, me abrindo oportunidades de desenvolvimento para poder concluir com êxito, mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, que me apoiam em todos meus desejos e minhas decisões, sempre contribuindo com muito amor, carinho, motivação, apoio e incentivo a todos os momentos de esforços e conquistas.

A Ivana, minha namorada e companheira de todos os momentos, me auxiliando com amor, disponibilidade e muita paciência nas correções e nas conversas do projeto. Obrigado pela força inesgotável que me oferece todos os dias para desenvolver minhas conquistas.

Ao laboratório LEMAqui e LAMIC por me disponibilizar espaço para atender todas as demandas da pesquisa.

Ao professor coorientador Dr. Luiz L. Mafra. Obrigado pelos ensinamentos, pelas ajudas, por disponibilizar atenção, correção e esclarecimentos em todo o percurso deste estudo.

Ao professor orientador Dr. Francisco Lagreze, por imensa paciência, atenção, cuidado e dedicação com os trabalhos realizados, até mesmo nas suas horas vagas, bem como todo o conhecimento transmitido em toda a graduação. Sem seu interesse a concretização deste trabalho não teria sido possível. Muito obrigado!

Aos parceiros Dr. Rodrigo Hoff e o doutorando Cristian Kleemann nos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelas análises de compostos químicos das coletas.

A discente do Curso de Oceanografia – UFPR, Mariana Matiazzi da Silva por disponibilizar os resultados da pesquisa de TCC com dados de toxicidade aguda da microalga estudada, para que pudéssemos dar continuidade na escolha das cepas estudadas.

Enfim, ao Campus de Pontal do Paraná – Centro de Estudos do Mar e todos os envolvidos que me possibilitaram agregar as mais diversas áreas de conhecimento e aprendizado, me especializando profissionalmente e socialmente em todos os momentos.

RESUMO

A atividade aquícola busca por atender as formas de produção inovadoras, nas quais soluções técnicas possibilitem a obtenção eficiente, econômica e sustentável de biomassa algal. Algumas microalgas produzem diversos compostos químicos com elevado interesse e valor econômico agregado, incluindo as biotoxinas e outros compostos bioativos. O uso de sistemas de alta produtividade em pequenos espaços como biorreatores, se torna fundamental para a produção massiva de biotoxinas para fins comerciais, como aplicações farmacológicas, medicinais e a produção de padrões analíticos. Considerando que o dinoflagelado bêntico *Ostreopsis cf. ovata*, produz elevados teores de ovatoxinas – potentes neurotoxinas análogas à palitoxina, torna-se relevante desenvolver um pacote tecnológico de produção e processamento de toxinas. Este trabalho consiste em um estudo técnico avaliando metodologias de sistemas de cultivo em diferentes escalas laboratoriais visando à produção *indoor* de biomassa de *O. cf. ovata* para fins comerciais. Para isso foi realizado durante 30 dias, um experimento de identificação de melhor cepa em cultivo com vidrarias e meio f/4, avaliando o potencial de crescimento e tóxico para serem aplicados em produção de maior volume. Com os resultados obtidos, foi utilizado um sistema de fotobiorreator em bolsas de 30L e vidrarias em incubadora, com temporizadores e válvulas solenoides para avaliar a influência da aeração e a produção de biotoxinas. A análise com sistema de cromatografia líquida identificou oito componentes na toxina extraída, sendo OVTX-a e OVTX-b as mais abundantes. As concentrações totais de toxina estimadas não foram proporcionais a densidade celular alcançada, mas, tiveram maior potencial tóxico e volume cultivado no experimento com aeração em oito dias de cultivo, as médias dos tratamentos variaram entre 214,89 e 412,30 (pg.mL⁻¹).10³ cultivado.

Palavras chave: Algicultura; Biomassa; Fotobiorreator; Ficotoxinas.

ABSTRACT

The aquaculture activity seeks to meet innovative forms of production, in which technical solutions enable the efficient, economical and sustainable obtaining of algal biomass. Some microalgae produce several chemical compounds with high interest and added economic value, including biotoxins and other bioactive compounds. The use of high productivity systems in small spaces, such as bioreactors, becomes fundamental for the massive production of biotoxins for commercial purposes, such as pharmacological and medicinal applications and the production of analytical standards. Whereas the benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*, produces high levels of ovatoxins – potent neurotoxins analogous to palytoxin, it is important to develop a technological package for the production and processing of toxins. This work consists of a technical study evaluating cultivation system methodologies at different laboratory scales aiming at the indoor production of *O. cf. ovata* for commercial purposes. To this end, an experiment was carried out to identify the best strain in cultivation with glassware and f/4 medium, evaluating the growth and toxic potential for application in larger volume production. With the results obtained, a photobioreactor system was developed in 30L bags and glassware in an incubator, with timers and solenoid valves to evaluate the influence of aeration and the production of biotoxins. Analysis with a liquid chromatography system identified eight components in the extracted toxin, with OVTX-a and OVTX-b being the most abundant. The estimated total toxin concentrations were not proportional to the cell density achieved, but had a greater toxic potential and volume cultivated in the experiment with aeration in eight days of cultivation, the treatment averages varied between 214.89 and 412.30 (pg.mL⁻¹)10³ cultivated.

Keywords: Algiculture; Biomass; Photobioreactor; Phycotoxins;.

SUMÁRIO

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. METODOLOGIA	14
3.1 EXPERIMENTO 1: Estático sem aeração	14
3.1.1 Análise quantitativa	15
3.1.2 Análise de toxinas	16
3.2 EXPERIMENTO 2: Cultivo em fotobiorreator	17
3.2.1 Escolha da cepa	17
3.2.2 Adaptação ao cultivo com aeração e inoculação das bolsas	18
3.2.3 Caracterização do método de filtragem do conteúdo cultivado	23
3.3 EXPERIMENTO 3: Estático com aeração	24
3.3.1 Análise quantitativa e de toxinas.....	25
3.4 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 EXPERIMENTO 1: Estático sem aeração.....	27
4.2 EXPERIMENTO 2: Cultivo em fotobiorreator.....	33
4.2.1 Caracterização do método de filtragem do conteúdo cultivado	37
4.3 EXPERIMENTO 3: Estático com aeração.....	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	48
6. REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE A – TABELAS COM NÍVEIS DE TOXINA INTRACELULARES ENCONTRADOS NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS 1 E 3.....	53

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são seres unicelulares capazes de realizar fotossíntese, estão presentes em diversos ambientes naturais aquáticos e úmidos. São utilizadas por décadas como matéria prima nas indústrias alimentícias, de produtos químicos, bioprodutos e até mesmo na indústria farmacêutica. (BRASIL; GARCIA, 2016 apud SILVA, 2022 p.16) Os cultivos comerciais de microalgas podem fazer a diferença na sociedade e na indústria, como uma alternativa sustentável integrando diferentes cadeias produtivas. (SILVA et.al 2019, pois apresentam uma diversidade de aplicações tecnológicas e econômicas para a sociedade, bem como seu uso na aquicultura, indústria de alimentos, cosméticos e principalmente para o setor farmacêutico.

As aplicações tornam-se motivadoras quando observamos as relações de produção, assim como velocidade e densidade do crescimento e ao perfil químico das espécies. Portanto, a seleção de condições que promovem o aproveitamento da biomassa algácea é fundamental para sua utilização econômica (DERNER, 2006).

Muitas espécies de microalgas possuem alto potencial para cultivo e produção em grande escala. Entretanto, a determinação de espécies produtivas, relaciona diversas características, bem como a taxa de crescimento e a composição química. Essas características são afetadas por fatores como o meio de cultura, a idade do cultivo, a intensidade luminosa, a temperatura, a salinidade do meio e o fotoperíodo (BROWN et al., 1997). Nesse sentido, sabe-se que existe uma demanda por pesquisas prospectivas de fisiologia e composição química de microalgas para identificar espécies úteis a aplicações comerciais.

A microalga *Ostreopsis cf. ovata* (família Ostreopsidaceae) é uma espécie de dinoflagelado, de habitat epibêntico, comumente associado a algas vermelhas e marrons e em rochas, areia, conchas de mexilhões e invertebrados bentônicos (GUERRINI, 2010, FUKUYO, 1981, TOTTI et al., 2007).

As abundâncias massivas da espécie podem ser encontradas em áreas costeiras rasas, apenas com alguns metros de profundidade, normalmente próximo a

linha da costa. (PFANNKUCHEN et. al., 2012), e áreas bem iluminadas e com baixo hidrodinamismo (GUERRINI, 2010).

O aumento da temperatura em águas oligotróficas favorece o crescimento das microalgas e que se tornam dominantes em temperaturas acima de 25°C (MORTON; NORRIS; BOMBE R, 1992). Essas temperaturas são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no verão, mas, a *O. cf. ovata* pode ser encontrada em regiões temperadas, assim como na costa brasileira, que vem sendo vista a décadas (PARSONS et. al., 2012).

As florações destes dinoflagelados têm representado um fenômeno global recorrente nas últimas décadas. Quando a abundância de determinadas espécies pode aumentar abruptamente, formam florações (FAUST; GULLEDGE, 2002). O fenômeno pode se tornar visualmente perceptível por meio do acúmulo de células e mucilagem sobre os substratos, ou ainda causar descoloração da água, chamadas de marés vermelhas, que acontece quando grandes quantidades de células se desprendem e se mantêm em suspensão na coluna d'água (PARSONS et. al., 2012).

Muitas espécies de dinoflagelados bênticos que formam florações são capazes de produzir compostos, sobretudo neurotoxinas, com potencial extremamente tóxico (FAUST; GULLEDGE, 2002). *O cf. ovata*, tem sido responsável por florações que afetam a saúde humana e animal em todo o mundo (FAIMALI, 2012). Este dinoflagelado produz toxinas semelhantes às palitoxinas (BRISSARD, et al, 2014), incluindo diversos tipos de ovatoxinas, que podem intoxicar o homem por inalação ou ingestão de frutos do mar contaminados. No entanto, existe uma grande variabilidade no perfil de toxinas entre espécies, cepas e localizações geográficas.

Apesar dos estudos, demonstrarem preocupação e estudarem os efeitos causados pelo dinoflagelado tóxico, tanto na saúde dos humanos, como seus impactos à fauna marinha (ANNE-SOPHIE et. al., 2019), o gênero pode ser tratado como uma fonte de palitoxina (PLTX) e seus análogos, fonte importante e rentável para a aquicultura. Quando se trata de produzi-la, buscamos pela usabilidade desta. No estudo de Assunção et. al (2017), menciona que os compostos tem uma função diretamente nas células dos mamíferos por meio da inibição enzima transmembrana, fator essencial para manter a homeostase de íons dos tecidos além de outras ações

farmacológicas secundárias (hemólise, modulação de neurotransmissores, ativação de sinalizadores pró-inflamatórias, etc.). Neste sentido percebemos a importância da produção de biomassa para o desenvolvimento de padrão analítico, até mesmo um material de referência purificado para uso em análises dessa toxina em pescados contaminados.

O potencial tóxico da espécie *O. cf. ovata*, isoladas na costa brasileira tem sido foco de poucos estudos analíticos recentes. Um dos compostos extraídos tem semelhança com a ostreocina D, nas coletas de *O. cf. ovata* do Rio de Janeiro como descreve Riobó *et al.* (2006) e Tibiriçá *et al.* (2010) que detectaram também OVTX-A em *O. cf. ovata* isolado no estado de Santa Catarina.

Segundo Faust e Gullede (2002), quando as espécies tóxicas atingem elevadas abundâncias celulares, a assimilação da toxina na cadeia trófica pode ser muito rápida. Os organismos consumidores podem acumular níveis elevados de toxinas, representando riscos para os organismos marinhos e para a saúde humana, e podendo gerar imensos prejuízos econômicos.

Em contrapartida, a busca crescente por moléculas bioativas nos últimos anos torna esta espécie igualmente interessante do ponto de vista econômico. Uma vasta diversidade e complexidade desses compostos tem revelado características biológicas promissoras, com amplo potencial terapêutico, farmacêutico (ASSUNÇÃO *et. al.* 2017). Devido as estruturas funcionais contidas nas moléculas, os biocompostos podem ser utilizados na medicina humana e veterinária, com potenciais na aplicação antitumoral, anti-infecciosa, analgésica, anticolesterol, entre outros. Além disso, moléculas estruturais como ácidos graxos, pigmentos e polissacarídeos podem ser utilizadas como suplementos nutricionais por seus benefícios extras à saúde humana (ASSUNÇÃO *et. al.* 2017).

O dinoflagelado bentônico *Ostreopsis* sp. está amplamente distribuído em toda a parte do mundo e está associada principalmente durante a alta proliferação de biomassa e toxicidade. Para descrever a dinâmica da replicação destas microalgas é desejável um método de cultivo confiável e rápido, com alto rendimento (GALLARDO RODRÍGUES, *et. al.* 2010). O aprimoramento das técnicas de cultivo possibilita

desenvolver pacotes tecnológicos para replicar o método a fim da produção (ASSUNÇÃO *et. al* 2017).

Para se determinar a composição (perfil) e as concentrações de toxinas nas microalgas de interesse, pode ser aplicada uma técnica de caracterização analítica da palitoxina, uma metodologia eficaz para identificar e analisar as moléculas de toxina através da combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). Essa prática possibilita separar os componentes dissolvidos, identificando suas massas atômicas e padrão de fragmentação molecular característicos, para se identificar com precisão e quantificar com exatidão a sua presença nas amostras (CIMINIELLO *et al.*, 2006, CIMINIELLO *et al.*, 2008 Apud GUERRINI, 2010).

Para produzir quantidades razoáveis de toxinas a partir de elevadas densidades de células é necessário desenvolver sistemas de cultivos massivos eficientes. Contudo, a sensibilidade das células pode limitar o crescimento, dependendo do sistema de produção.

Apesar das grandes dificuldades para caracterizar os cultivos desta espécie, para se desenvolver a capacidade de produção de biomassa destas microalgas em sistema fechado e seguro, é necessário se realizar estudos aprofundados para determinar a taxa de crescimento relacionado com suas exigências nutricionais e ambientais, bem como aprimorar suas limitações de modo a fomentar o processamento de informações de um pacote tecnológico (ASSUNÇÃO *et. al.* 2017).

Lourenço (2006), afirma que estimar a abundância dos cultivos de microalgas, coletando informações de densidade, etc., pode facilitar a consideração de parâmetros auxiliares, tais como a avaliação da morfologia celular, biomassa, entre outros. Estes fatores auxiliam no processo de detecção dos diferentes estágios de desenvolvimento das células.

A maioria das publicações sobre o cultivo de dinoflagelados bênticos faz uso de volumes limitados de culturas em frascos e garrafas, em escala laboratorial. Os métodos para manter as culturas de *O. cf. ovata* com crescimento exponencial são mais lentos e sensíveis, quando comparados com outras espécies (NASCIMENTO, 2012). Num sistema de fotobiorreator também é possível se determinar as condições de desenvolvimento das células, caracterizando as concentrações de nutrientes

oferecidos, temperatura do ambiente, por ser um cultivo *indoor*, além de controlar fotoperíodo, pH e outros fatores (DERNER et al., 2006). Silva (2022), realça que a compreensão dos parâmetros e o monitoramento das condições do cultivo podem favorecer a aplicação de métodos para promover o crescimento e melhorar a produtividade das microalgas. Para isso, os procedimentos convencionais de engenharia e projeto aplicado sob os biorreatores necessitam ser aprimorados, de modo a acrescentar conhecimento, considerando a sensibilidade ao cisalhamento de células dinoflagelados (ASSUNÇÃO, 2017). Para o cultivo de microalgas, é possível alcançar uma maior produtividade com estruturas de bolsas em suspensão, com uso de aeração. Contudo, isso ainda não foi testado para dinoflagelados bênticos marinhos.

Diante deste cenário, é necessário aprofundar os estudos sobre metodologias de cultivo para o desenvolvimento de biomassa da *O. cf. ovata* em cultivos de alta densidade de células, que possibilitem explorar o potencial de produção de toxina em grande escala. O presente estudo pretende melhorar as técnicas de cultivo e produção utilizando fotobiorreatores, fornecendo possibilidades de maiores aplicações biotecnológicas voltadas para a microalga *O. cf. ovata*, produtora de biotoxinas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver técnicas e ferramentas para o cultivo massivo da microalga *O cf. ovata*, visando a otimização da produção de biomassa e de biotoxinas para fins comerciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as curvas de crescimento de *O cf. ovata* em diferentes cepas de produção em laboratório;
- Caracterizar o potencial produtivo e de produção de toxinas de diferentes cepas da espécie de interesse;
- Desenvolver e otimizar o sistema de produção massivo de biomassa para o gênero *Ostreopsis* em fotobiorreator de bolsas suspensas;
- Avaliar o papel da aeração no crescimento e produção de toxinas de *O cf. ovata*;
- Desenvolver o procedimento de coleta de biomassa garantindo reter as células da espécie em uniformidade para a extração de toxinas.

3. METODOLOGIA

Foram realizadas as coletas de amostras de *O. cf. ovata* no arquipélago da Ilha dos Currais – PR em março de 2023, por meio de projetos de pesquisas do Laboratório de LAMIC. Com as cepas repicadas das amostras, o presente estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Microalgas (LAMIC) e no Laboratório de Engenharia e Malacocultura (LEMAqui) do Centro de Estudos do Mar da UFPR. Foram realizados experimentos de crescimento da microalga *O. cf. ovata* e produção de toxinas em diferentes escalas de cultivo, na presença ou ausência de aeração, conforme descritos a seguir.

3.1 EXPERIMENTO 1: Estático sem aeração

Esta pesquisa foi realizada nas dependências do laboratório LAMIC, através dos experimentos de cultivo de cepas em ambiente estático em frascos de vidro do tipo Erlenmeyer de 500 mL, com ausência de aeração.

Foram testadas três cepas (cultivos monoclonais) diferentes, sendo preparados erlenmeyers em triplicata para cada cepa. Cada recipiente recebeu 100 mL de inóculo para iniciar o experimento, adicionados a 400 mL de água marinha filtrada (0,22 µm) e autoclavada, com 29 ppm de salinidade e adição de nutrientes numa concentração de 50% do meio de cultivo f/2 (aqui denominado meio “f/4”), (Guillard e Ryther, 1962). Todos os utensílios, vidrarias, água marinha e nutrientes utilizados foram autoclavados em pressão de 1 atm por 40 minutos, garantindo a utilização de materiais livres de contaminantes.

Com a utilização de uma câmara incubadora BOD (figura 1), os frascos contendo as três cepas de *Ostreopsis cf. ovata* em triplicata, foram identificadas e nomeadas para melhor organização no local de estudo e nas cepas do laboratório: LM-200 (D4), LM-201 (D8) e LM-202 (E6), ficaram mantidos por 30 dias. A incubadora, que possibilita manter o controle do ambiente, teve a temperatura ajustada a 25 °C e um fotoperíodo de 12/12h, com 4 lâmpadas fluorescentes 18W (970 lm) e irradiância média de 111,91 µmol fótons m² s⁻¹, aferida com Light Meter – LI-COR (LI-250A),

oferecendo parâmetros mais próximos possíveis do ideal para esta espécie no habitat natural.



Figura 1: Cultivo estático em câmara incubadora. Estágio inicial (Dia 0).

3.1.1 Análise quantitativa

A cada 48 horas, foram coletados, após homogeneização, 2 mL de amostra de cada recipiente e submetidos à análise quantitativa por meio de contagem em microscópio ótico. A concentração celular (células/mL) foi determinada através da multiplicação do número de células existentes em 250 quadriculas por 1^3 microlitros, em seguida a divisão pelo número de quadriculas analisadas (250).

Para que a coleta de dados seja o mais uniforme possível, as amostras seguiram o mesmo regime de homogeneização, com aplicação de 0,025 mL de solução de lugol, a uma concentração final de 2,5%. A fixação da amostra facilitou o processo de contagem em câmara Sedgewick-Rafter Cell S50 de 1 mL, com divisões (*quadrats*) de 1 μ l.

Estes fatores auxiliaram na determinação e escolha da cepa que foi testada na etapa seguinte da pesquisa, o cultivo em sistema de fotobiorreator, sistema onde os

microrganismos fototróficos utilizam a radiação solar (fonte de luz), para realizar a fotossíntese e se desenvolver em forma de crescimento de biomassa.

3.1.2 Análise de toxinas

Durante os 30 dias de estudo foram feitas duas coletas totalizando 300 mL de cada frasco para filtração, sendo 150 mL no oitavo dia e 150 mL no vigésimo segundo dias (Os dias de coletas foram pré-determinados para que coletássemos no início e ao fim da fase de crescimento exponencial). O material foi filtrado e foi utilizado para extração e análise das moléculas de toxinas possivelmente contidas nas células de *O. cf. ovata*.

Com auxílio de um equipamento de filtração a vácuo (figura 2), foram filtradas as duas amostras de 150 mL de cada erlenmeyer em filtro de microfibra de vidro (Whatman, 47 mm de diâmetro, 0,8 µm de porosidade), em seguida, embalados em papel alumínio para melhor armazenamento e congelamento. Na sequência, as amostras foram condicionadas em tubos de centrífuga tipo Falcon (15 mL) juntamente com um 5 mL de metanol (MeOH) a uma concentração de 75%, onde foram trituradas em um equipamento homogeneizador ultrassônico e centrifugadas durante 5 minutos a uma rotação de 4000 rpm.



Figura 2: Processo de filtração a vácuo em filtro de fibra de vidro.

Os líquidos sobrenadantes retirados das amostras centrifugadas foram filtrados em filtro de seringa (PTFE, 0,22 µm de porosidade), e mantidas congeladas em um vial de vidro de 1,5 mL até o momento da análise das toxinas intracelulares.

As amostras coletadas e preparadas no laboratório LAMIC, situado no CPP-CEM, foram analisadas para detecção e identificação dos compostos e levadas para quantificação dos compostos em parceria com os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com uso de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) Agilent 1260 acoplado a um detector de espectrometria de massas do tipo tandem (MS/MS) Sciex Qtrap 3200, foi possível separar os compostos químicos da solução, possibilitando a identificação e quantificação dos componentes de interesse na amostra. O método utilizado foi adaptado de Brissard et al. (2014), onde todos os compostos (ovatoxinas e derivados da palitoxina) foram quantificados usando um padrão analítico de palitoxina, um processo de análise intracelular submetida ao HPLC. O processo, possibilita gerar a concentração de toxina encontrada por célula de *O. cf. ovata* cultivada.

3.2 EXPERIMENTO 2: Cultivo em fotobiorreator

3.2.1 Escolha da cepa

Utilizando as três cepas (D4, D8 e E6), com utensílios e materiais autoclavados, foi preparado um frasco para cada cepa contendo 100 mL de inóculo e 300 mL de água marinha enriquecida com meio f/4. Os erlenmeyers ficaram armazenados em câmara de incubação a fotoperíodo de 12/12h e temperatura média programada de 25°C por 7 dias para serem repicadas.

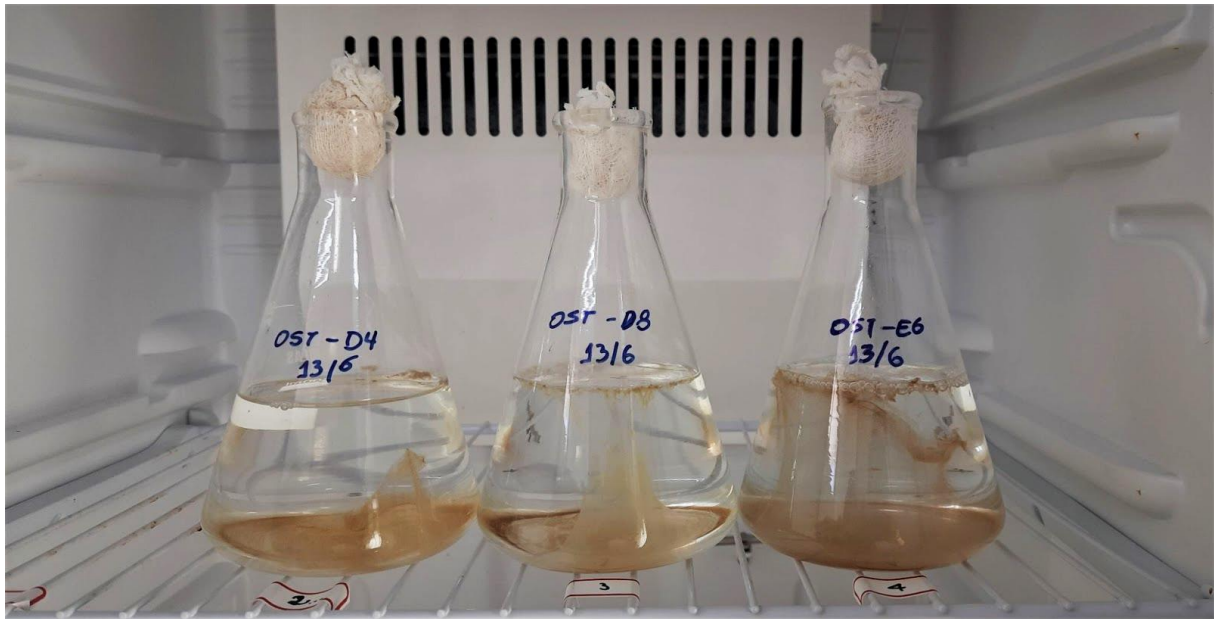


Figura 3: Cepas com 7 dias de crescimento, prontas para o repique.

Após a inoculação de novos frascos, com uma triplicata de cada cepa, foi inoculado 130 mL de cepa para cada 270 mL de água salina enriquecida com meio f/4, seguindo com mais uma semana de aclimação e desenvolvimento das células.

Com um microscópio ótico, realizamos a análise visual buscando identificar a cepa com maior quantidade de células grandes e uniformes, ou seja, maior abundância celular (crescimento mais rápido). O potencial tóxico das cepas foi avaliado preliminarmente no experimento anterior e com resultados do Trabalho de Conclusão de Curso da discente Mariana Matiazzi da Silva, do curso de Oceanografia, onde mediu através de bioensaios de toxicidade aguda com *Artemia* sp., também foi levado em conta para a escolha. A cepa considerada a de melhor desenvolvimento e potencial tóxico foi então, selecionada para os experimentos no sistema de fotobiorreator com bolsas suspensas.

3.2.2 Adaptação ao cultivo com aeração e inoculação das bolsas

No laboratório LEMAqui, a temperatura da sala de cultivo foi programada a 22°C e fotoperíodo de 12/12h, fornecida por 3 lâmpadas tubulares frias fluorescentes de 32W (2700 lm). Com a cepa escolhida foi inoculada em 6 garrafas de vidro com capacidade de 2 litros cada. Cada garrafa foi fechada com uma “rolha” de três vias, para permitir a entrada de ar filtrado e a saída de ar, está acoplada a um filtro de

carvão ativado, um método proposto para verificar uma possível coleta de toxina no aerossol liberado na saída de ar do cultivo (fig. 4).

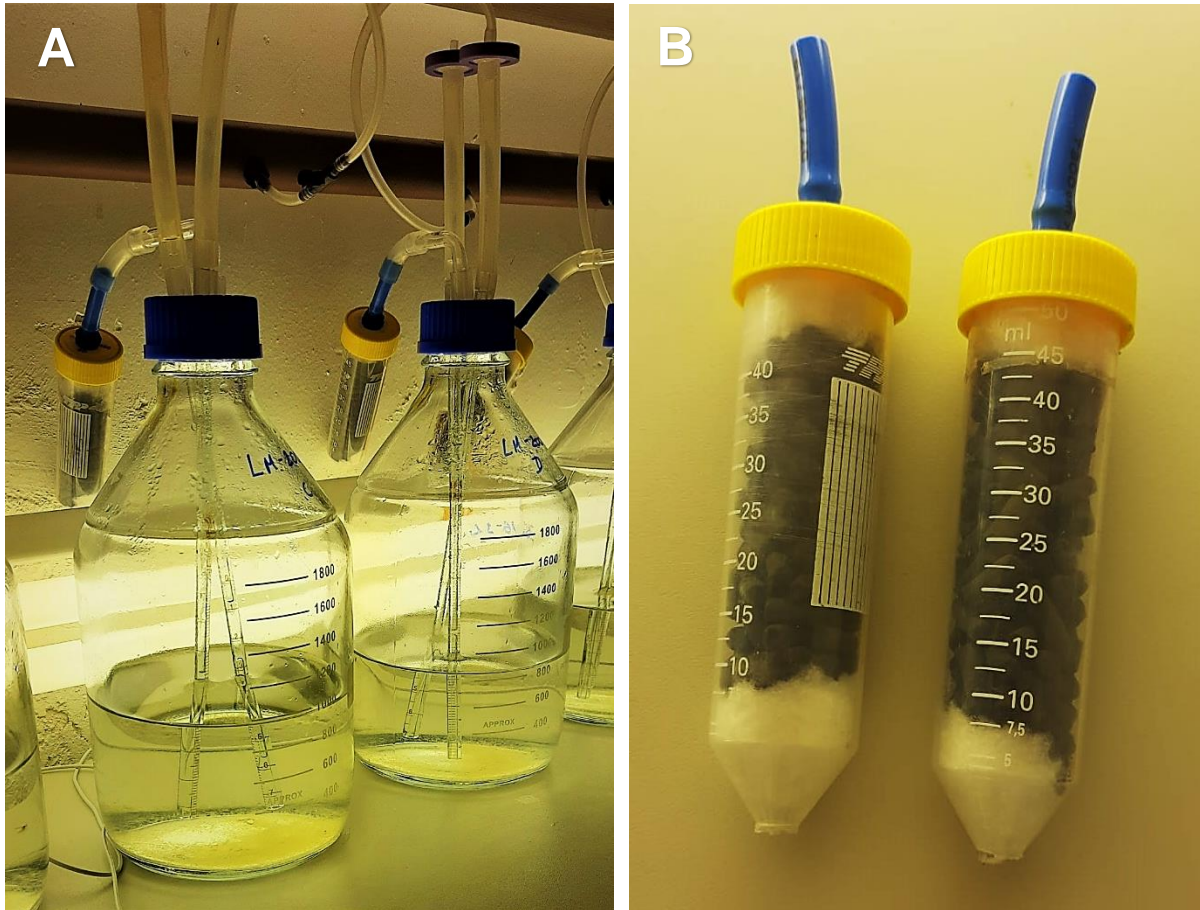


Figura 4: A) Garrafas de cultivo com entrada de aeração e saída para filtro. B) Filtro de saída de ar com carvão ativado.

Cada garrafa recebeu 200mL de inóculo da cepa escolhida e 800 mL de água marinha beneficiadas com meio f/4. Após uma semana de cultivo para ambientação das algas às garrafas e um provável aumento de biomassa, foi adicionado mais 1 L de água marinha com nutrientes, completando então, 2 L de cultivo com salinidade de 29 ppm. Durante os 15 dias seguintes, a aeração foi programada com o uso de um timer temporizador analógico, com 12 pulsos de 15 minutos a cada 2 h, totalizando 3 h de aeração diária. A cada 48 h foram coletadas as amostras para aferição do pH, salinidade e temperatura do ambiente. Para o acompanhamento do crescimento do cultivo, foram realizadas as contagens de densidade de células com Câmara de

Sedgewick-Rafter após fixadas em iodo lugol a 2,5% de concentração, depois foram determinadas de acordo com a fórmula (1) no item 3.1.1 deste estudo.

Com o inóculo produzido nas garrafas, foi adicionado 1L em cada bolsa, juntamente com 4L de água marinha filtrada enriquecida com nutrientes (meio f/4). Dentro de 10 dias, os volumes foram elevados gradativamente a 9, 17 e 30L em cada bolsa, com o acréscimo de mais meio de cultivo (f/4) conforme quantidade de água adicionada.

O crescimento e a produção de toxinas foram avaliados sob quatro tratamentos com diferentes períodos de aeração, sendo um estático (sem aeração) e três tratamentos com períodos crescentes de aeração diária, controlada por registro (fig.5). Utilizamos temporizadores analógicos para os tratamentos com aeração, com respectivos períodos de 1, 3 ou 6h de aeração diária, sendo eles distribuídos ao longo do dia em pulsos de 15min, distribuídos a cada 6, 2 ou 1h, respectivamente. Cada bolsa recebeu duas entradas de aeração com filtros de 0,2 μ m, mangueiras de 5mm e pipetas cortadas nas pontas, instaladas em lados opostos a 5cm do fundo da bolsa, mantendo uma região estática, junto ao fundo. Também tiveram fotoperíodo de 12/12h, com a instalação de 24 lâmpadas tubulares de Led 18W (2035 lm).



Figura 5: A) Fotobiorreator com bolsas de polipropileno suspensas. B) Sistema hidráulico com válvulas solenoides e registros para controle de aeração. C) Temporizadores utilizados para controlar o período de entrada de aeração nos cultivos.

O projeto hidráulico para distribuição de aeração foi desenvolvido para que cada tratamento receba ar de forma individualizada. Com isso, utilizamos válvulas solenoides de 40 L/h para cessar ou liberar aeração para as bolsas de acordo com o

período e quantidade programada. Um fluxograma do sistema de aeração adotado, foi esboçado para uma exibição simplificada da metodologia.

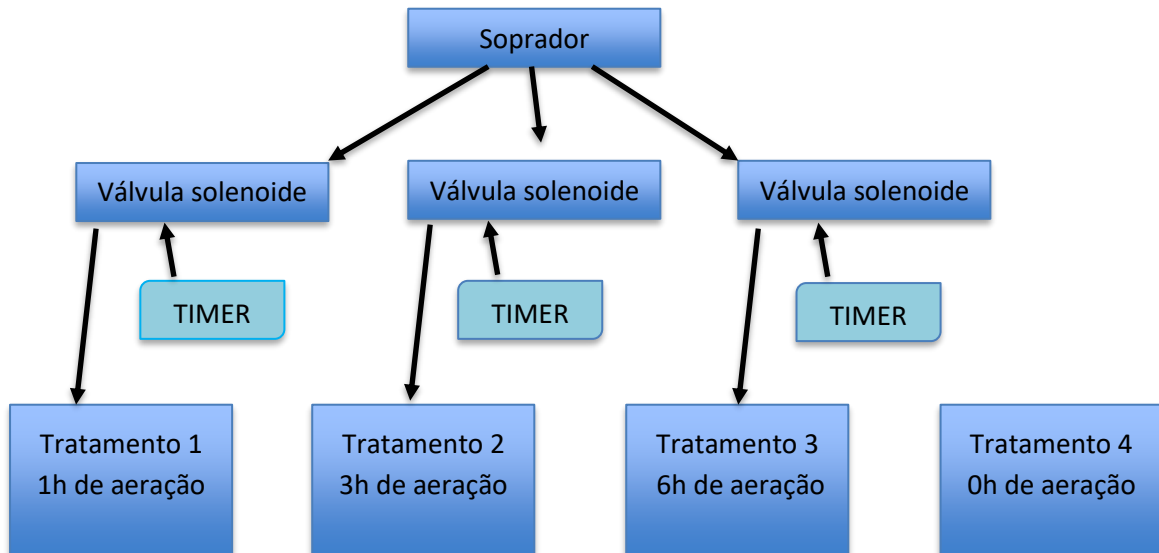


Figura 6: Fluxograma simplificado de instalação do sistema de aeração do experimento 2 e 3. (Experimento 2, n=3 e experimento3, n=4)

Além da entrada de ar, que foi aferida com fluxômetro, a cada 48 horas foram coletadas amostras de todas as bolsas para análise de pH, salinidade, densidade de células (fixadas em lugol 2,5%) (determinadas através da fórmula (1), descrita no item 3.1.1 deste estudo), temperatura ambiente, além dos dados de temperatura obtidos através de um equipamento submerso em uma das bolsas, o Tidbit, equipamento de 3x4cm com função de registrar os dados de temperatura da água, fornecendo resolução de 12 bits e precisão de $\pm 0,2$ °C.

3.2.3 Caracterização do método de filtragem do conteúdo cultivado.

Para definir o método de filtragem, desenvolvemos um estudo paralelo para verificar o tamanho de malha específica para peneirar as células da microalga *O. cf. ovata* e coletar uma biomassa uniforme. Assim, três béqueres plásticos tiveram seus fundos cortados, aos quais foram coladas malhas de nylon de 35 μm , 20 μm e 10 μm para o teste de peneiragem. Por último, ficou um béquer íntegro para coletar o líquido que passou pelas peneiras (Figura 7).



Figura 7: Método proposto para peneiragem e separação de células.

Com 100 mL de amostra inseridos no sistema de peneiramento, foi avaliado a coleta de possíveis células retidas em cada uma das peneiras. A partir de cada béquer com as diferentes malhas, o material foi retirado por lavagem com água filtrada, e filtrado em um equipamento de filtração a vácuo, retendo todo o material em filtros de microfibras de vidro (Whatman) devidamente pesados em balança digital analítica para avaliação da biomassa produzida. O procedimento foi repetido com três amostras de 100 mL (triplicata) para cálculo da biomassa média retida em cada malha. Após 48 horas de secagem a 60°C na estufa, os filtros estavam prontos para serem pesados

novamente para verificação do peso seco obtido a partir do material retido em cada malha.

3.3 EXPERIMENTO 3: Estático com aeração

Este estudo foi embasado no experimento 1 deste trabalho, portanto, também foi realizado no laboratório LAMIC com o experimento de cultivo de cepas em vidrarias de 500 mL, a fim de verificar a influência da aeração no cultivo.

Foi separada uma cepa nomeada como LM-203 e testadas em quatro diferentes tratamentos de aeração, sendo preparados erlenmeyers em quadruplicata. Cada recipiente recebeu 65 mL de inóculo e 335 mL de água marinha filtrada (0,22 μm) e autoclavada. O cultivo com 29 ppm de salinidade, foi enriquecida com 50% do meio de cultivo f/2, assim como nos outros experimentos, os nutrientes foram denominados “f/4”, (Guillard e Ryther, 1962). Todos os utensílios, vidrarias e materiais utilizados foram autoclavados em 1 atm. por 40 min, garantido ausência de contaminantes.

Com uma câmara incubadora BOD os frascos foram distribuídos aleatoriamente e ficaram mantidos por 30 dias. A incubadora com temperatura ajustada a 25 °C e um fotoperíodo de 12/12 h, fornecida por 4 lâmpadas tubulares de Led 9W (900 lm) com irradiância média de 92,12 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{ s}^{-1}$, aferido com o Light Meter – LI-COR (LI-250A), conforme figura 8.

Cada tratamento do estudo recebeu uma quantidade de aeração diferente, sendo um est\u00e1tico sem aera\u00e7\u00e3o e o restante com inser\u00e7\u00e3o de 1, 3 e 6 h di\u00e1rias, atrav\u00e9s de pulsos de 15 min, respectivamente em intervalos por igual, sendo eles per\u00edodos chamados de 6h, 3h, 1h e 0h, todos controlados por temporizadores anal\u00f3gicos, conforme representado na figura 6. Para isso, a incubadora foi adaptada e instalada um soprador de Big Air, modelo A.420, com capacidade de 4,5 L.min⁻¹, fornecendo ar constantemente para dentro da c\u00e2mara e para que cada tratamento pudesse receber aera\u00e7\u00e3o filtrada de forma individual, foi instalado um sistema hidr\u00e1ulico com 3 v\u00e1lvulas solenoides simples de 40 L.h⁻¹ e mangueiras de 5 mm conectadas a pipetas graduadas de 1 mL para entrada de ar, conforme demonstramos na figura 6, o fluxograma simplificado.

Cada vidraria foi vedada com parafilm M, recebendo também, uma pipeta cortada e adaptada em formato de “L” conectada a um filtro, desenvolvido com tubo tipo Falcon, contendo carvão ativado, conforme figura 4-B, garantindo uma possível coleta do aerossol liberado pela inserção de ar no cultivo.

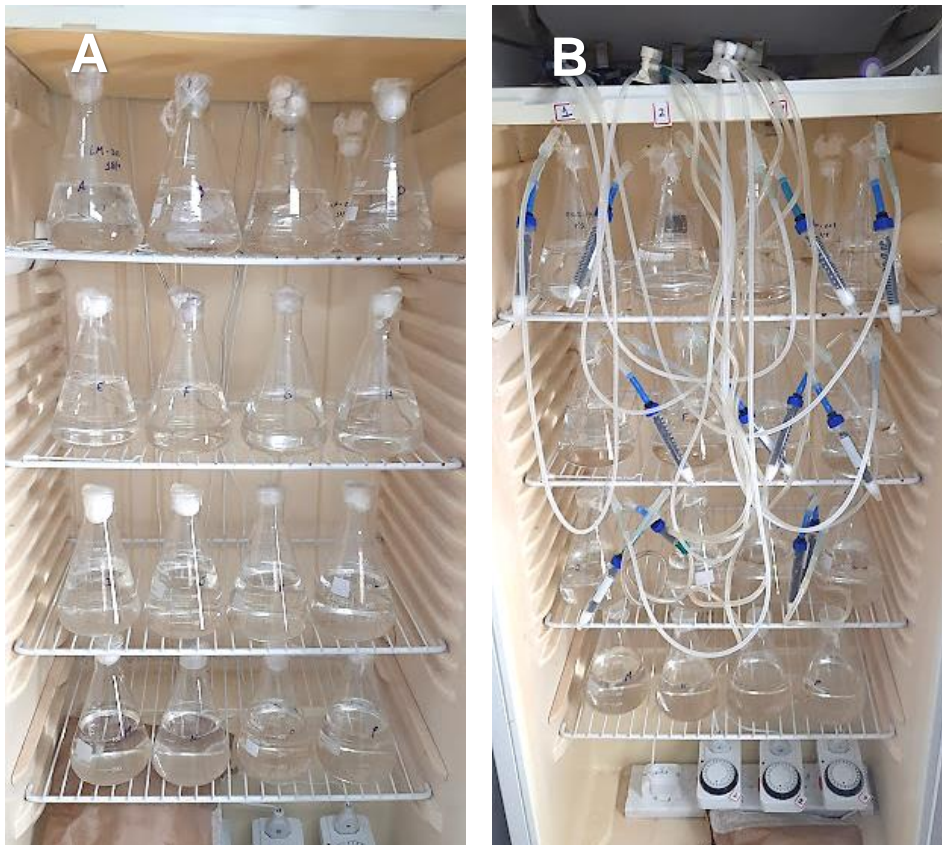


Figura 8: Cultivo estático com aeração em câmara incubadora. A) Estágio de aclimação, sem aeração. B) Dia 0, com entrada de ar e saída com filtros de carvão ativado.

3.3.1 Análise quantitativa e de toxinas.

As análises deste experimento foram praticamente idênticas ao experimento 1 deste trabalho, podendo ser conferidas no item 3.1.1 e 3.1.2 deste. A única alteração foi a análise quantitativa realizada a cada 72 h. Mas, também foram coletadas, fixadas em lugol e submetidas a contagem através do microscópio ótico.

Quanto o preparo de amostras para análise de toxina, também seguiu a mesma metodologia utilizada no experimento 1, duas coletas de 150 mL, uma no oitavo e outra no vigésimo segundo dia de cultivo, porém nesta etapa do estudo foram

coletados dos 18 recipientes analisados, referente aos quatro tratamentos. As amostras foram filtradas e utilizadas para extração e análise das moléculas de toxinas contidas nas células de *O. cf. ovata*.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos nos 30 dias dos experimentos 1 e 3, foram submetidos e analisados graficamente através de planilhas eletrônicas para comparação da melhor curva de crescimento, quantidade de células mais bem desenvolvidas e qualidade da cepa, segundo resultado das médias e seus desvios padrão.

Para analisar se houve diferenças na abundância celular e produção de toxina intracelular no oitavo e vigésimo segundo dia de cultivo, foram aferidos com análise de variância bi-fatorial, utilizando o software Rstudio. Sempre que foi observada diferença significativa para o efeito principal ($p < 0,05$) também foi realizado o teste de comparação pareada de Tukey

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1: Estático sem aeração

A tendência temporal da *O. cf. ovata*, durante o período de estudo (30 dias) obteve as seguintes abundâncias médias distribuídas nos gráficos da figura 9. Estas, remetem entre os dias 0 e 2, exatamente o período de adaptação das células no meio de cultivo, na sequência, as velocidades de crescimento se tornam máximas no período de crescimento, entre os dias 4 e 20 do experimento. No dia 8 e 22 (supostos dias de início e final da fase exponencial), temos as coletas de 150mL para análise de toxina, fica visível nos valores médios uma queda na quantidade de células encontradas por mL, já partindo para o período estacionário.

O experimento contou com pequenas cristas e vales na curva de crescimento (figura 9), este permaneceu durante todo o estudo e que pode ter relação com a utilização de nutrientes, a duplicação e a morte de células, resultando numa pequena variação. Muitas das análises visuais foram encontrados fragmentos de células mortas, bem como não foram submetidas as contagens as possíveis células significativamente pequenas em relação a maioria. Estes que podem ter crescido ou morrido gerando as variações. Como demonstra na figura 9, em toda a curva, a cada 4 dias há um pequeno pico ou uma queda no crescimento.

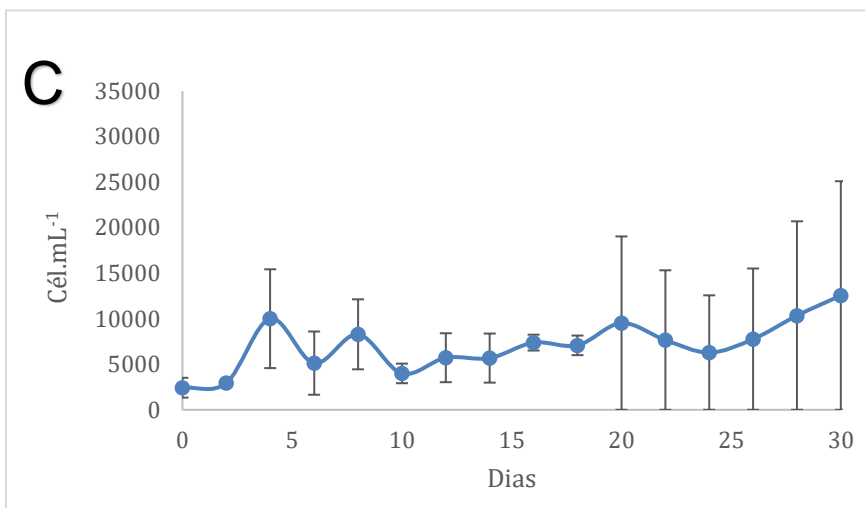
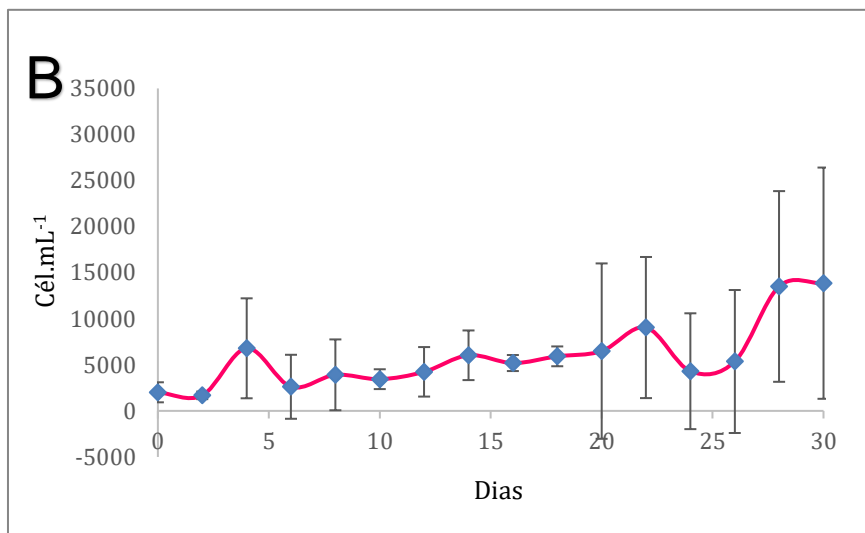
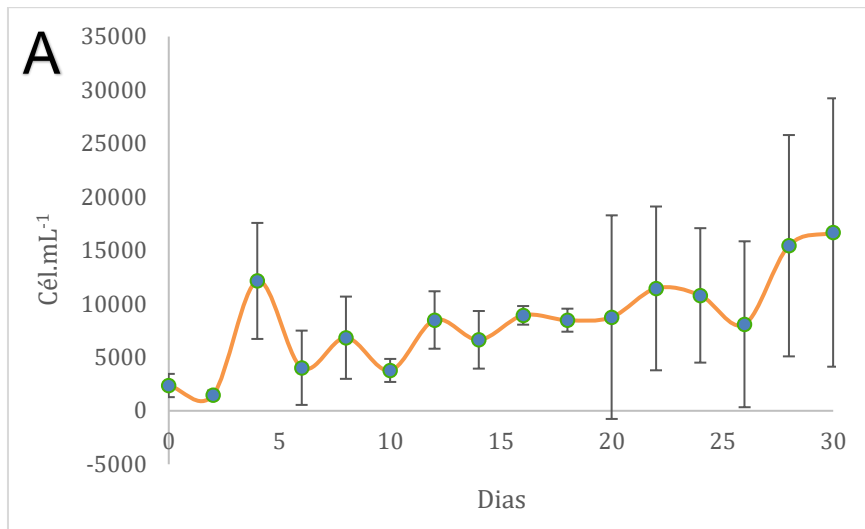


Figura 9: Abundância média dos tratamentos sem aeração e suas respectivas variações amostradas. A) Média de crescimento da cepa D4, B) Média de crescimento da cepa D8 e C) Média de crescimento da cepa E6.

Ainda assim, seria importante levar em consideração algumas características naturais da espécie que interferem no desenvolvimento de biomassa e na análise de microscopia óptica. Durante o cultivo vimos a formação de mucilagem e biofilme, uma forma de substrato com coloração avermelhada que dispõe a fácil aderência das células, conforme a figura 10. Esta característica dificulta a dissociação do aglomerado no momento da contagem de células, mesmo homogeneizando o conteúdo do frasco ainda antes da coleta. Este fato deve ser considerado, pois a contagem foi realizada através de 250 quadriculas e poderia diminuir os erros realizando uma varredura da placa Sedgewick Rafter por completo.

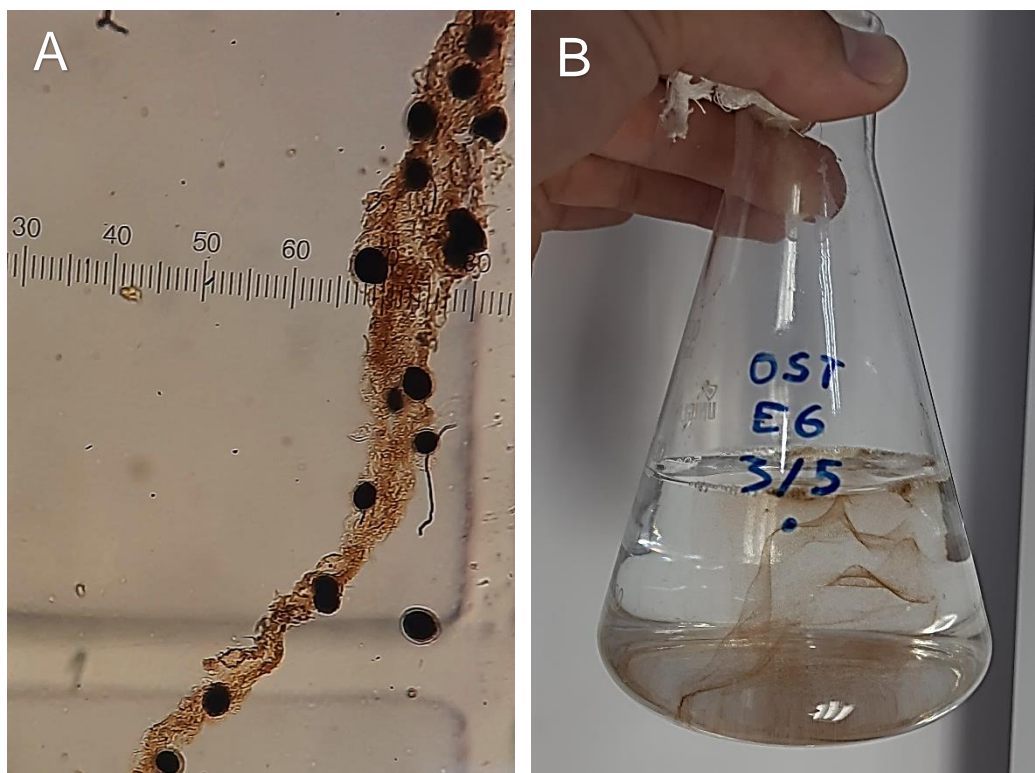


Figura 10: Biofilme desenvolvido pela *O. cf. ovata*. A) Imagem capturada do microscópio óptico em 100x de aumento; B) Demonstração do biofilme desenvolvido, possível visualização a olho nu.

Verificando essas variações na curva, a partir do dia 12 realizamos também uma “lavagem” no fundo do frasco, utilizando uma pipeta de 10mL e forçando a movimentação do líquido no fundo, onde se cria um biofilme e despreendendo as células deste, assim podemos verificar ainda na figura 9, uma leve melhora no

equilíbrio nas variações dos valores da curva, que pode ter sido relacionada a técnica adotada.

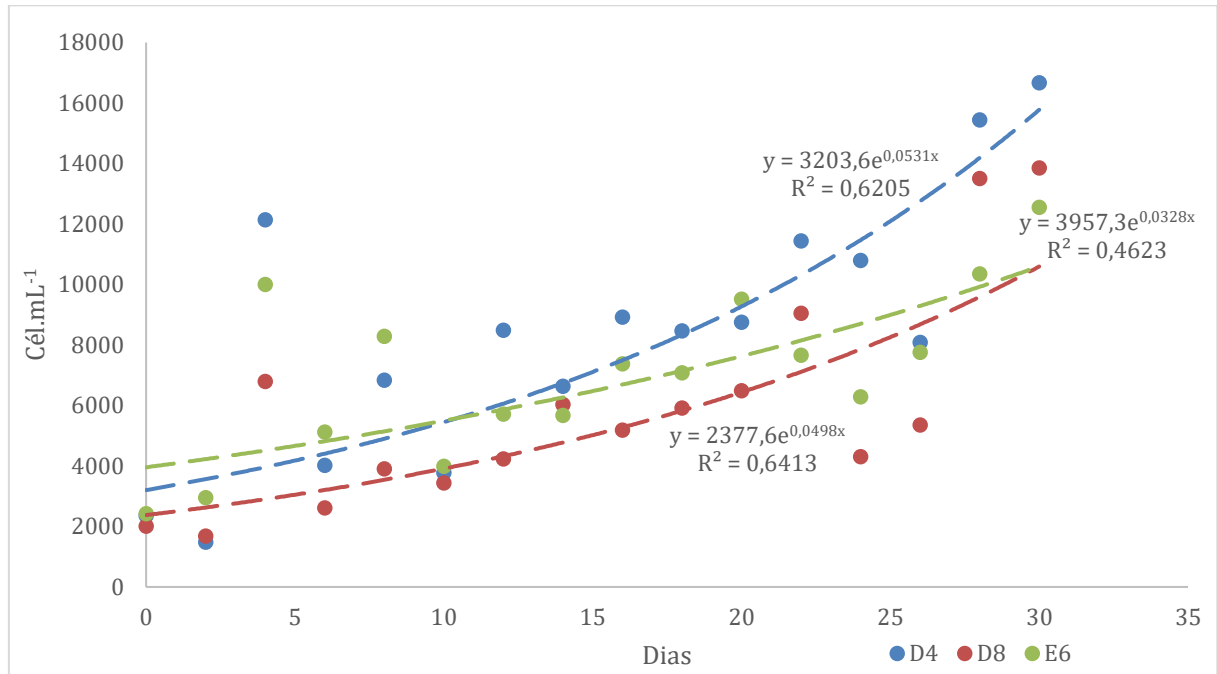


Gráfico 1: Tendência do crescimento dos clones dos tratamentos sem aeração. D4, D8 e E6 são as três cepas analisadas.

Comparando a fase de crescimento exponencial, de acordo com dados de média de abundância celular, é possível observar que o tratamento com clones identificados por D4 (LM – 200) cresceram mais rápido e com maiores densidades em relação aos outros dois, segundo as análises de médias aritméticas. Já para a análise de Tukey, não houve diferenças significativas. Mesmo assim, a abundância celular média partiu de 2365 cél.mL⁻¹ iniciais, para níveis entre 10793 e 16674 cél.mL⁻¹ no vigésimo quarto à trigésimo dia de cultivo. Logo em seguida, temos as cepas de E6 (LM – 202), que em relação as outras cepas, apresentaram células uniformes, grandes, porém com crescimento lento e com número máximo de densidade celular abaixo do tratamento D4, chegando ao final da fase exponencial com níveis entre 6286 e 12551 cél.mL⁻¹, assim como acontece com D8 (LM- 201), que obteve rápido crescimento, mas com densidade celular menor que D4 e E6, é possível analisar estas variações na figura 8.

As análises de toxinas deste experimento, demonstraram nos dois momentos de coleta a presença da produção de toxina, um total de oito componentes na toxina de *O. cf. ovata*: 42-OH-PLTX (42-hidroxipalitotoxina), HomoPLTX (homopalitotoxina), OVTX-A (Ovatoxina-A), OVTX-B (Ovatoxina-B), OVTX-C (Ovatoxina-C), OVTX-D (Ovatoxina-D), OVTX-E (Ovatoxina-E) e PLTX (palitoxina) nas seguintes proporções. Na tabela 1, o composto 42-OH-PLTX nas amostras de D8 e E6, não foram possíveis serem identificadas quando processadas no equipamento.

Tabela 1: Porcentagem média dos componentes encontrados na toxina de *O. cf ovata* coletadas no **oitavo** dia de cultivo do experimento sem aeração. 42-OH-PLTX (42-hidroxipalitotoxina), HomoPLTX (homopalitotoxina), OVTX-A (Ovatoxina-A), OVTX-B (Ovatoxina-B), OVTX-C (Ovatoxina-C), OVTX-D (Ovatoxina-D), OVTX-E (Ovatoxina-E) e PLTX (palitoxina). D4, D8 e E6, são as cepas estudadas.

Componente	Dia 8 (D4)	Dia 8 (D8)	Dia 8 (E6)
42-OH-PLTX	0,21%	-	-
HomoPLTX	3,70%	4,42%	3,96%
OVTX-A	34,89%	30,18%	33,31%
OVTX-B	22,12%	19,57%	21,84%
OVTX-C	12,43%	15,23%	13,07%
OVTX-D	23,72%	26,60%	24,82%
OVTX-E	2,00%	1,98%	1,78%
PLTX	0,92%	2,02%	1,23%

Tabela 2: Porcentagem média dos componentes encontrados na toxina de *O. cf ovata* coletadas no **vigésimo segundo** dia de cultivo do experimento sem aeração. 42-OH-PLTX (42-hidroxipalitotoxina), HomoPLTX (homopalitotoxina), OVTX-A (Ovatoxina-A), OVTX-B (Ovatoxina-B), OVTX-C (Ovatoxina-C), OVTX-D (Ovatoxina-D), OVTX-E (Ovatoxina-E) e PLTX (palitoxina). D4, D8 e E6, são as cepas estudadas.

Componente	Dia 22 (D4)	Dia 22 (D8)	Dia 22 (E6)
42-OH-PLTX	0,16%	0,16%	0,20%
HomoPLTX	3,47%	3,21%	3,27%
OVTX-A	37,74%	39,31%	38,23%
OVTX-B	23,14%	24,81%	24,78%
OVTX-C	10,94%	10,54%	10,65%
OVTX-D	21,68%	19,00%	20,06%
OVTX-E	2,13%	2,29%	2,00%
PLTX	0,74%	0,68%	0,80%

Podemos verificar nas tabelas deste experimento, que obtivemos proporções semelhantes nas duas coletas analisadas. Na análise química obtivemos o componente OVTX-A e OVTX-B em maiores concentrações em ambas as cepas e ambos os dias de coleta do cultivo e OVTX-D ainda na primeira análise de coletas do dia 8.

Com o processamento dos dados médios, obtivemos os resultados em pg.cél^{-1} (gráfico 2), plotadas de acordo com a concentração média dos tratamentos com as cepas estudadas. Com os resultados médios, a coleta do vigésimo segundo dia neste experimento, obteve maior quantidade de toxina, levando em consideração somente os resultados de concentração totais dos compostos. Nos testes de variância ANOVA bifatorial, não mostram diferenças significativas ($p > 0,05$) para D8 e D4, portanto as amostras são homogêneas. Somente em E6 obteve diferenças significativas, sendo que a concentração do dia 22 maior que no tempo 8, as médias são: dia 8 ($14,57 \pm 5,73 \text{pg.cél}^{-1}$) e dia 22 ($54,56 \pm 25,17 \text{pg.cél}^{-1}$).

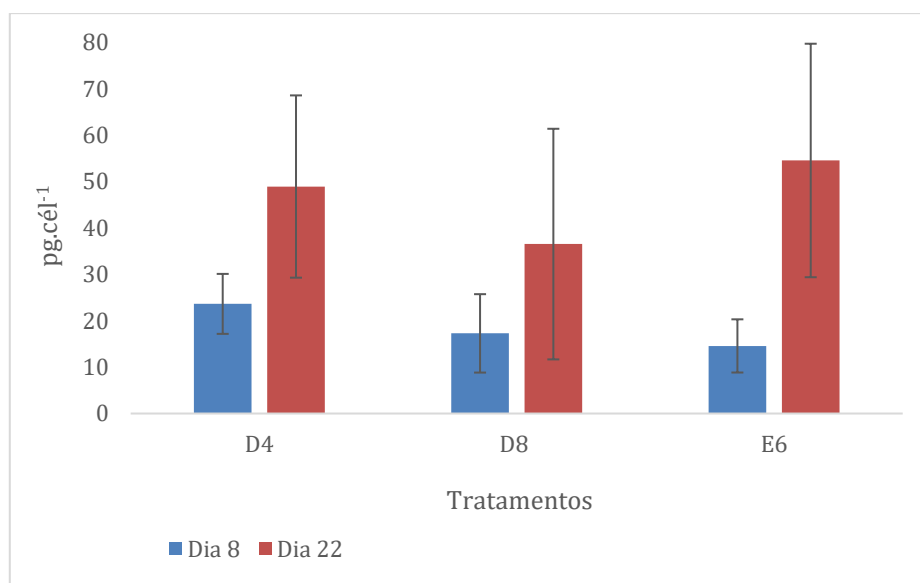


Gráfico 2: Concentração média do somatório de toxina gerada por tratamento do experimento estático. D4, D8 e E6, são as cepas estudadas.

Para complementar os dados de concentração média de toxina encontrada nas cepas, podemos analisar a relação de concentração de toxina média ao volume médio cultivado (tabela 3). Temos os seguintes resultados médios obtidos nas vidrarias cultivadas na tabela a seguir:

Tabela 3: Somatório dos níveis de toxina por mL cultivadas. Dados referentes as coletas do dia 8 e 22, do experimento estático sem aeração. D4, D8 e E6 são as cepas estudadas e estão representadas em $(\text{pg.mL}^{-1}) \cdot 10^3$

Cepa	Dia 8 $(\text{pg.mL}^{-1}) \cdot 10^3$	Dia 22 $(\text{pg.mL}^{-1}) \cdot 10^3$
D4	$156,66 \pm 23,74$	$291,78 \pm 230,15$
D8	$15,48 \pm 1,37$	$138,37 \pm 12,74$
E6	$106,15 \pm 5,53$	$109,93 \pm 40,99$

4.2 EXPERIMENTO 2: Cultivo em fotobiorreator

A cepa selecionada com maior toxicidade, maior quantidade de células e com maiores dimensões foi a cepa “D4”, nomeada como LM – 200 (Figura 11). A cepa estava apta a receber maiores volumes de água e meio de cultivo, pois visualmente, possuía maior quantidade de células e tamanhos relativamente maiores, em comparação com as outras cepas testadas (D8 e E6). Presume-se que, por haver características quantitativas superiores entre os clones, possivelmente teria maior quantidade de toxina. Está subjeção foi verificada e afirmada através do estudo de toxicidade medida em bioensaios com *Artemia* sp. citado no item 3.2.1, deste trabalho.

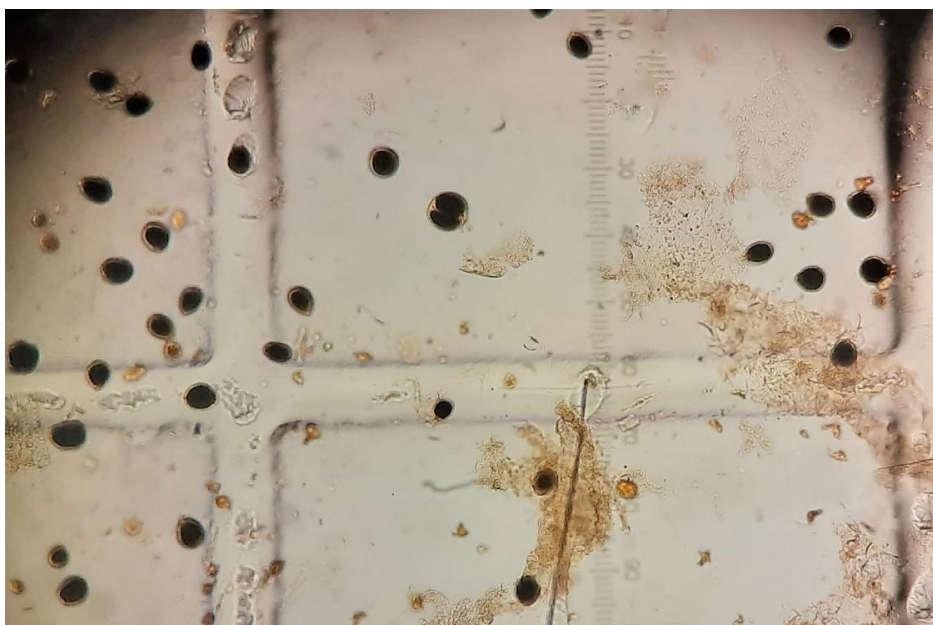


Figura 11: Análise de células com 100x de aumento em Câmara Sedgewick-Rafter Cell. Cepa LM - 200, escolhida para desenvolver em maiores volumes de cultivo. Barra de escala = 100 μm .

Depois de inoculada nas garrafas com capacidade 2 L e ofertada a aeração com 3 h diárias, percebemos que alimentamos o sistema com muita inserção de ar, gerando turbulência (fig. 12) e consequentemente matando as células da microalga. As análises quantitativas obtiveram valores de densidade celular entre 200 – 1.800 cél.mL⁻¹ em 10 dias de cultivo, enquanto comparados com o experimento 1, nesta mesma fase, já se passavam de 10.000 cél.mL⁻¹. Esta etapa do experimento, demonstrou que as células não se replicaram, afetando negativamente o crescimento com grande quantidade de inserção de ar, necessitando um fluxo de ar menor e ponteiras com orifícios menores, semelhantes a uma ponta de uma pipeta de 1 mL, por exemplo, favorecendo a incorporação de bolhas de ar menores, com mais superfície de contato e menor turbulência.



Figura 12: Sistema de cultivo em garrafas com capacidade de 2000 ml e com inserção de aeração forçada.

A etapa do desenvolvimento da biomassa nas vidrarias de 2 L, foram refeitas utilizando a segunda melhor cepa desenvolvida no experimento 1, a LM-202 (E6), que também obtivemos resultados satisfatórios de densidade celular e bom tempo de desenvolvimento, conforme analisado e descrito no item 4.1 deste trabalho. Desta vez, com aeração equilibrada e com menor proporção, a fim de não causar turbulência no corpo d'água, o cultivo se manteve em crescimento uniforme e em 14 dias de cultivo foram transferidas para o sistema de fotobiorreator, demonstrando bons resultados de crescimento sendo possíveis replicá-los nas bolsas.

As bolsas suspensas receberam porções de água marinha dentro dos primeiros 10 dias após repique, chegando ao suporte máximo. No sétimo dia de cultivo verificamos anormalidades nas colorações das bolsas e “manchas” esverdeadas se prendendo nas paredes, conforme demonstra a figura 12-A, a seguir, bem como verificamos um aumento repentino nos valores de pH medidos, chegando muito próximos a 10 na escala (9,5 a 9,8). Indicativo de alteração na qualidade de água por conta da alta replicação da alga contaminante.

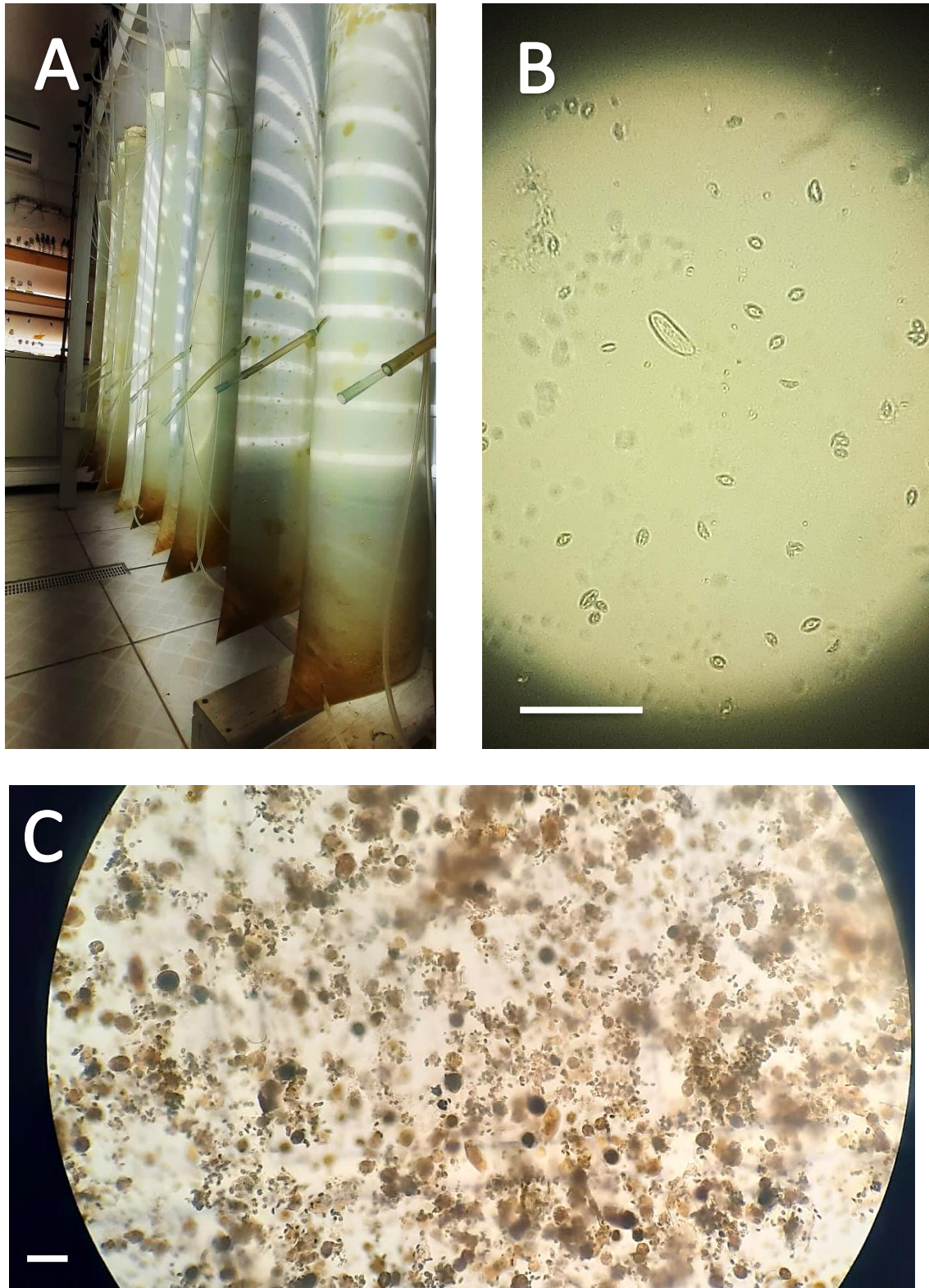


Figura 13: Contaminação obtida no experimento de desenvolvimento de biomassa no fotobiorreator: A) Bolsas de cultivo infestadas. B) Células de diatomáceas bênticas encontradas. C) Amostra com *O. cf. ovata* e contaminação com diatomácea não identificada. Barras de escala = 40 μ m

Podemos afirmar que a tecnologia do sistema supriu o objetivo nesse experimento, é possível verificar a coloração no fundo das bolsas plásticas, o biofilme desenvolvido pela *O. cf. ovata*, porém através de análise visual e fisiológica, tivemos uma contaminação de uma diatomácea bêntica (Figura 12-B), onde não nos possibilitou chegar ao resultado e tempo final do experimento. Processar os dados de extração, quantificação de toxina e de biomassa gerados neste período com a contaminação, geraria resultados inexatos e imprecisos quanto a densidade celular de *O. cf. ovata*, sabendo que ainda não temos conhecimento específico para separar apenas as células de interesse em 360 L totais, portanto, não foi realizado o processamento estatístico.

Este experimento se encerrou com 8 dias de cultivo e a contaminação possivelmente competiu com o espaço, utilizando dos nutrientes adicionados no meio de cultivo (f/4), fazendo que as células de interesse, não se desenvolvessem de acordo com as expectativas. No momento, não reiniciamos o experimento, mas, esse estudo pode ser refeito tomando cuidados cautelosos para que não haja uma nova contaminação, utilizando sempre material autoclavado e água marinha tratada e filtrada.

Para um experimento ideal, é importante que as bolsas de cultivo do fotobiorreator se mantenham em análise por pelo menos 30 dias, a fim de garantir tempo suficiente para que o dinoflagelado atinja pleno desenvolvimento em cultivo. Após este período, deve ser coletado todo o material e processado a fim de coletar apenas as células de *O. cf. ovata*.

4.2.1 Caracterização do método de filtração do conteúdo cultivado.

Mesmo com o empecilho da contaminação encontrada ao decorrer do experimento, foram testadas e realizadas as filtrações das células em peneiras pré-determinadas por este experimento paralelo, possibilitando verificar a eficácia da forma de coleta de células como proposto nos objetivos deste estudo.

Com o processamento dos dados e cálculos aritméticos em base da triplicata, foi possível estimar a porcentagem de retenção de células em cada um dos filtros e quais obtiveram maior biomassa seca, levando em consideração a fração depositada em cada peneira, observamos no gráfico a seguir que, a peneira de 35 μ m reteve a maior quantidade de células de *Ostreopsis cf. ovata*, nas filtragens B e C. Em A, é suposto que não houve crescimento satisfatório da cepa amostral, não desenvolvendo biomassa significativas para ficar retida nas peneiras.

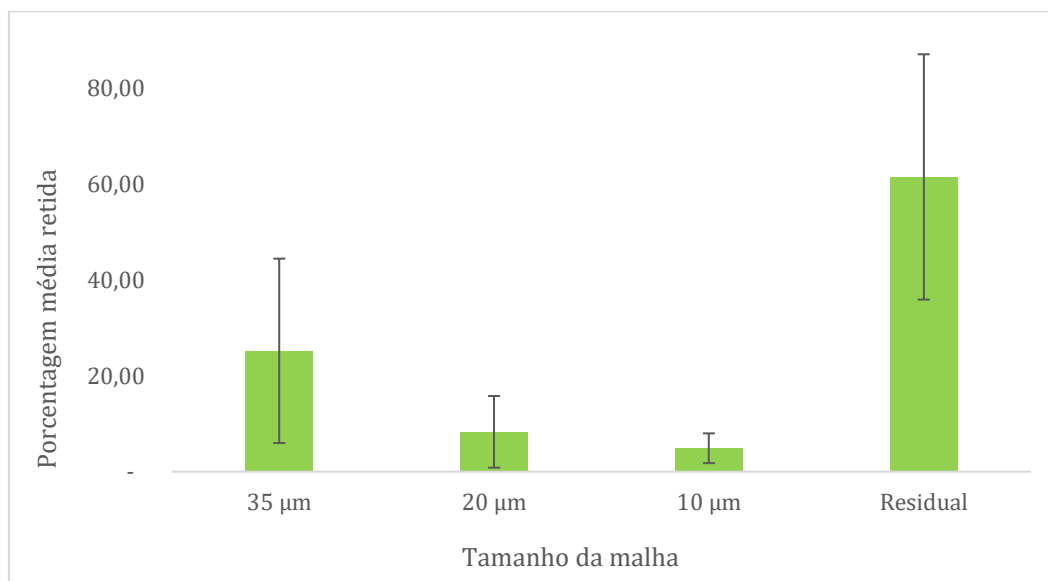


Gráfico 3: Média das porcentagens de massa retidas nas peneiras.

Através da análise visual e auxílio de um microscópio óptico podemos afirmar que a porcentagem de células retidas em 35 μ m, coletou apenas células grandes, que possivelmente são mais fáceis de serem separadas, uma vez em que as impurezas escoam da peneira de malha com maiores orifícios em comparação com as demais utilizadas. Mas, ainda necessita-se aprimorar a forma de filtragem para reter também as células de menores dimensões e que podem sim conter um potencial tóxico desejado, tomando cuidado para não as romper.

O material não filtrado, dito como “residual” no gráfico, pode estar relacionado com impurezas e outros materiais orgânicos não desejáveis. Possivelmente, pode ter concentrado células menores que 10 μ m (menor malha utilizada), biofilme, células mortas, entre outras impurezas. Foi o maior número encontrado neste experimento, ainda resta a hipótese de melhorar a forma de selecionar o material restante menor que 10 μ m. Para a extração de toxinas e garantir qualidade da amostra, foi importante

reter somente as células de *O. cf. ovata*, portanto consideramos o material abaixo de 20µm como impróprio para a finalidade deste estudo.

4.3 EXPERIMENTO 3: Estático com aeração

As curvas de crescimento com as médias das densidades celulares e os dias de amostragem da *O. cf. ovata* com os tratamentos de aeração (0, 1, 3 e 6h) estão representados na figura 14.

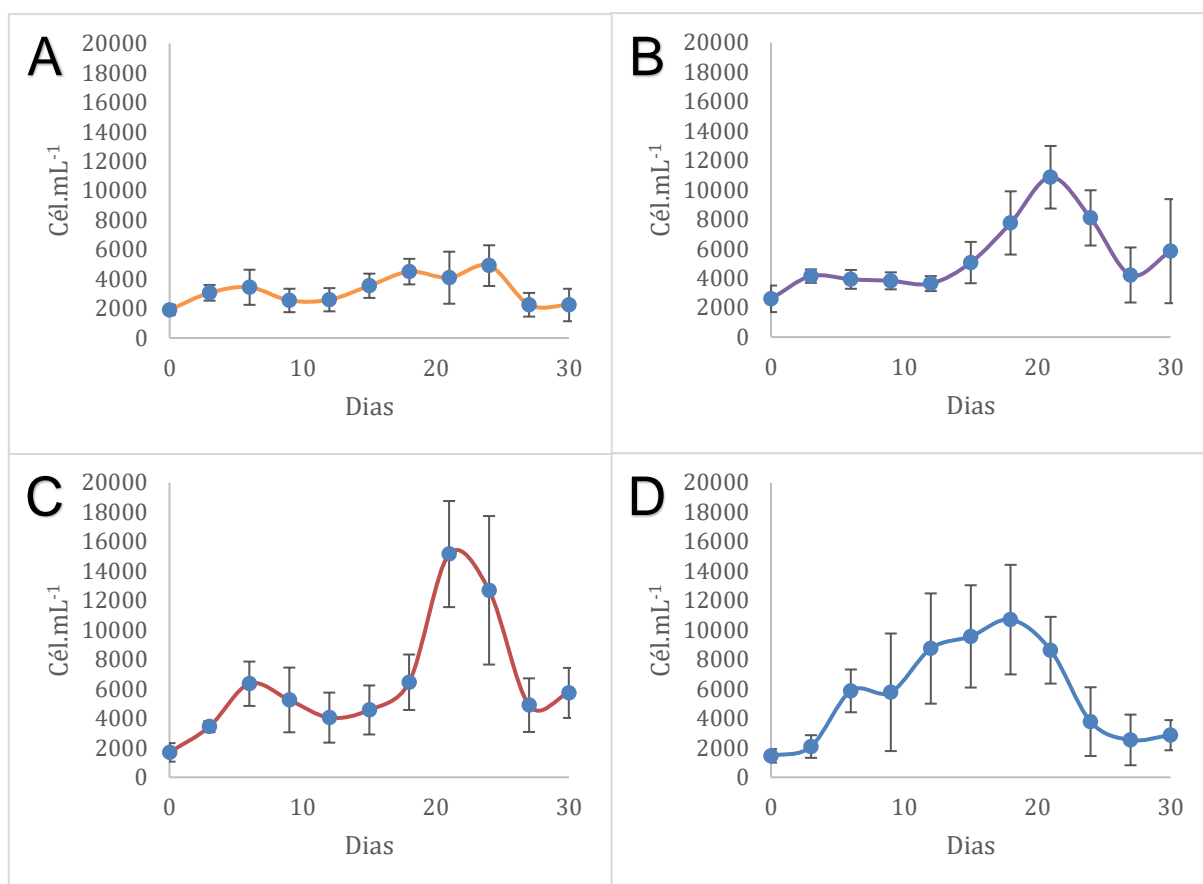


Figura 14: Abundância média dos tratamentos com aeração e suas respectivas variações amostradas. A) Tratamento com 0 horas de aeração (0h), B) Tratamento com 1 hora de aeração (1h), C) Tratamento com 3 horas de aeração (3h), D) Tratamento com 6 horas de aeração (6h).

Foi encontrado correspondência significativa entre os resultados obtidos na quantificação de abundância das células, entre os tratamentos 1h e 3h. A tendência de crescimento foi evidente, pois obtiveram bom rendimento em comparação com os

dados do tratamento com 0h, onde a curva mostra que o tratamento referido se desenvolveu muito lentamente durante os 30 dias de cultivo.

O período de adaptação de zero até o terceiro dia, foram muito bem definidos para os quatro tratamentos. Já o crescimento (período exponencial) variou amplamente entre as microalgas. Para o tratamento com 0h, 1h e 3h levaram até o décimo oitavo dia para ter níveis significativos da fase de crescimento, enquanto o tratamento 6h, apresentou maior velocidade de crescimento, elevando a densidade celular em mais de 7x (de $1455 \pm 458,22$ e $10702 \pm 3720,73$ cél.mL⁻¹), no mesmo período de tempo. O pico de crescimento de ambos se deu entre o decimo oitavo dia e vigésimo quarto dia, seguindo para a fase de morte, muito bem definidos. Na análise estatística quando não se considera o tempo, o tratamento 0h não tem diferenças significativas com os outros tratamentos. Mas com a interação do fator aeração, no dia 22, o tratamento 0h tem diferenças significativas entre 1h e 6h, sendo igual a 3h, sendo ele um fator dependente para o rápido crescimento.

O tratamento 6h respondeu muito bem com as quatro fases (adaptação, crescimento, estacionaria e morte), deixando claro sua trajetória, porém não alcançou os melhores números médios de abundância celular do experimento. Já o tratamento 3h, obteve os maiores valores de abundância celular, passando pela marca média de 15154 cél.mL⁻¹ ($\pm 3601,194$ cél.mL⁻¹), porém não obteve as fases bem definidas, crescendo de forma brusca entre os dias 18 e 21. A análise de variância comprovou que houve diferenças significativas entre os dados dos dias 8 e 22, correspondendo aos valores de médias.

Verificamos a diferença entre o desenvolvimento das cepas (LM-203) com períodos de entrada de ar e o tratamento sem aeração (0h). Verificamos que a aeração facilita e agiliza o crescimento, porém em níveis controlados, sem excesso por muitas horas seguidas. Mas, de forma intermitente, o resultado médio de densidade celular das cepas com 6 horas de aeração nos mostra que obteve ótima replicação de células com média de $10702,75$ cél.mL⁻¹ no pico máximo ($\pm 3720,733$ cél.mL⁻¹). Num período relativamente menor em comparação com os outros tratamentos (figura 14), sua fase exponencial ficou muito bem determinada entre os dias 3 e 18, com fase de estacionária e morte na sequência. Na análise estatística entre as amostras do dia 8 e 22, não houve diferenças nos tratamentos de 0h e 3h,

nos tratamentos de 1h e 6h o P-valor < 0,05, podendo confirmarmos que concedem os valores de média encontrados e representados (figura 14), média de 10852,5 cel.mL⁻¹ para 1h ($\pm 2125,23$ cél.mL⁻¹) e 8625 cél.mL⁻¹ para 6h ($\pm 2266,14$ cél.mL⁻¹).

A análise de toxinas realizadas através de técnicas analíticas, representaram semelhança entre os perfis das toxinas geradas nos quatro tratamentos com aeração, assim como no experimento 1 deste trabalho, também foi de OVTX A e B como maiores quantidades de análogos da PLTX, sendo as mais abundantes na toxicidade da cepa LM-203, em ambos os dia de coleta.

Tabela 4: Porcentagem média dos componentes encontrados na toxina de *O. cf ovata* coletadas no **oitavo** dia de cultivo do experimento com aeração. 42-OH-PLTX (42-hidroxipalitotoxina), HomoPLTX (homopalitotoxina), OVTX-A (Ovatoxina-A), OVTX-B (Ovatoxina-B), OVTX-C (Ovatoxina-C), OVTX-D (Ovatoxina-D), OVTX-E (Ovatoxina-E) e PLTX (palitoxina). 0h, 1h, 3h e 6h representam os quatro tratamentos analisados e a quantidade de horas de aeração.

Componente	Dia 8 (3h)	Dia 8 (6h)	Dia 8 (1h)	Dia 8 (0h)
42-OH-PLTX	0,07%	0,15%	0,14%	0,04%
HomoPLTX	2,75%	3,02%	2,78%	2,35%
OVTX-A	42,88%	40,53%	42,57%	45,02%
OVTX-B	27,67%	26,42%	27,69%	29,06%
OVTX-C	8,34%	9,24%	8,35%	7,40%
OVTX-D	15,60%	18,06%	15,84%	13,42%
OVTX-E	2,30%	2,12%	2,20%	2,35%
PLTX	0,40%	0,45%	0,43%	0,36%

Tabela 5: Porcentagem média dos componentes encontrados na toxina de *O. cf ovata* coletadas no **vigésimo segundo** dia de cultivo do experimento com aeração. 42-OH-PLTX (42-hidroxipalitotoxina), HomoPLTX (homopalitotoxina), OVTX-A (Ovatoxina-A), OVTX-B (Ovatoxina-B), OVTX-C (Ovatoxina-C), OVTX-D (Ovatoxina-D), OVTX-E (Ovatoxina-E) e PLTX (palitoxina). 0h, 1h, 3h e 6h representam os quatro tratamentos analisados e a quantidade de horas de aeração.

Componente	Dia 22 (3h)	Dia 22 (6h)	Dia 22 (1h)	Dia 22 (0h)
42-OH-PLTX	0,16%	0,11%	0,15%	0,16%
HomoPLTX	3,15%	2,87%	3,12%	2,96%
OVTX-A	38,38%	40,51%	39,31%	40,57%
OVTX-B	26,89%	27,72%	27,19%	27,43%
OVTX-C	10,14%	9,13%	9,81%	9,25%
OVTX-D	18,54%	16,81%	17,77%	17,03%
OVTX-E	2,25%	2,37%	2,20%	2,12%
PLTX	0,50%	0,48%	0,45%	0,47%

As concentrações médias de toxina processadas em $(\text{pg.cél})^{-1}.\text{mL}^{-1}$ são representadas no gráfico a seguir. Cada barra do gráfico, mostra os dados médios e suas variações de acordo com números de contagem celular através de microscopia óptica.

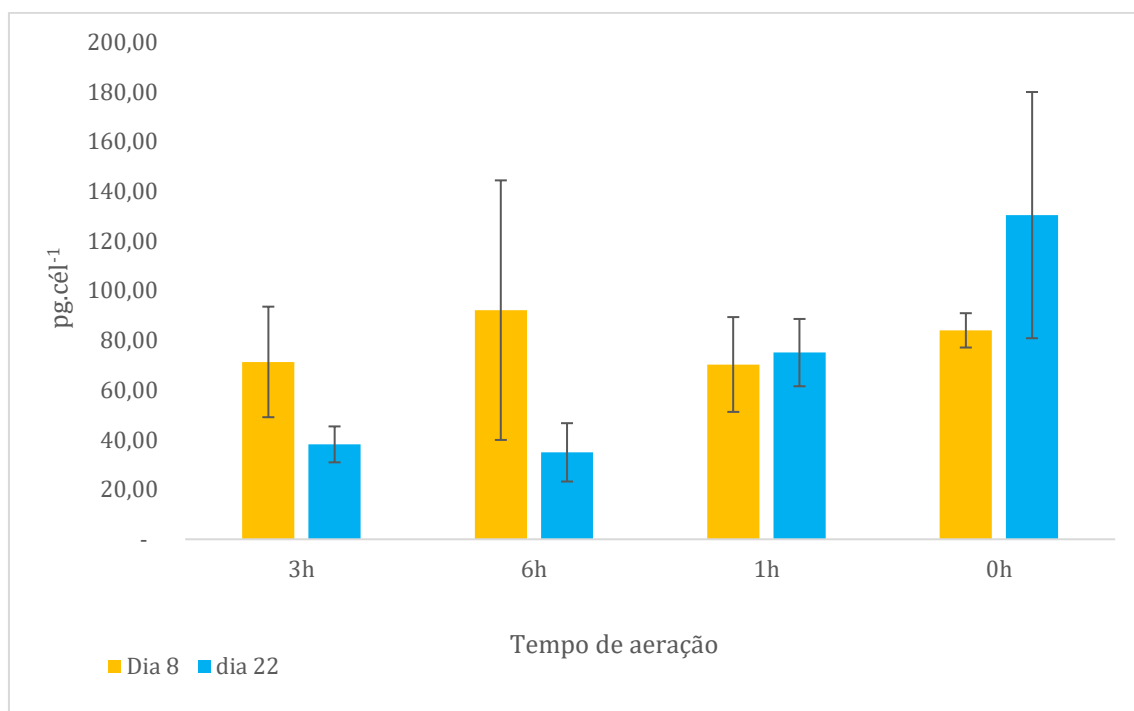


Gráfico 4: Somatório da concentração média de toxina por tratamento do experimento com aeração (pg.cél^{-1}). 0h, 1h, 3h e 6h representam a coleta do dia 8 e do dia 22 dos quatro tratamentos analisados e a quantidade de horas de aeração.

Analisando o gráfico 4, e tomando em base apenas a média da quantidade de toxina encontrada, vemos que neste experimento obtivemos melhores índices de toxina no início da fase exponencial dos tratamentos (dia 8), no processamento de dados, verificamos valores do P-valor $> 0,05$, indicando que não há diferenças entre os tratamentos nos dias 8 e 22 de coleta, se analisarmos os grupos de tempo. Nos dados de médias do dia 8, o teste estatístico mostra o tratamento com resultados homogêneos (P-valor $> 0,05$) não tendo diferenças significativas entre os tratamentos. Na coleta do dia 22, o tratamento 0h sendo o mais abundante em picograma de toxina por célula, afirmando diferença significativa, prevalecendo os valores do gráfico 4, sendo que a média do dia 8 ($84,06 \pm 6,90$) foi menor que os resultados da coleta do dia 22 ($130,42 \pm 49,53$). Já para 1h, 3h e 6h, não houve diferenças.

Tabelamos as quantidades de toxinas encontradas em cada frasco de cultivo em relação ao volume de meio cultivado, sabendo que os dados foram estatisticamente processados de acordo com a densidade de células por mL. E na mesma linha de análise do gráfico 4, podemos observar as maiores quantidades de toxina por mililitro encontrada no dia 8, foi no tratamento de 6 horas de aeração. Enquanto no dia 22, tivemos valores de médias semelhantes para os tratamentos de 3h e 0h e alta quantidade de toxina por volume no tratamento com 1h, se compararmos com os outros tratamentos.

Tabela 6: Somatório dos Níveis de toxina por mL cultivadas. Dados referentes as coletas do dia 8 e 22, do experimento estático com aeração. 0h, 1h, 3h e 6h representam os quatro tratamentos analisados e a quantidade de horas de aeração. Os valores estão representados em $(\text{pg.mL}^{-1}).10^3$.

Cepa	Dia 8 $(\text{pg.mL}^{-1}).10^3$.	Dia 22 $(\text{pg.mL}^{-1}).10^3$.
3H	344,25 ± 75,12	568,99 ± 127,44
6H	412,83 ± 187,41	282,30 ± 45,14
1H	261,30 ± 31,56	795,58 ± 86,06
0H	214,89 ± 72,86	479,69 ± 69,60

Nos experimentos, avaliamos o potencial tecnológico para melhor adaptação da espécie, a fim de atingir o melhor pico de crescimento, avaliando diferentes clones nas mesmas características de cultivo, avaliando a influência da intensidade de aeração nos cultivos e avaliando a possibilidade de produção em maiores escalas.

Para o experimento 1, os dados de densidade celular foram plotados a partir da coleta de amostras, a cada 48h. Cada curva apresentada nos resultados deste estudo, representa a densidade celular média de um clone testado, crescidas em triplicata LM-200 (D4), LM-201 (D8) e LM-202 (E6), porém pela característica de uma microalga bêntica, o desenvolvimento das células é pouco mais lento comparando com microalgas de superfície, como espécies não bentônicas (WONG & KWOK, 2005). O período de 30 dias do estudo não foi suficiente para observarmos todas as fases do cultivo, portanto, tornou-se complexo a identificação das fases de crescimento da microalga, mas tivemos os melhores resultados para o crescimento da cepa D4 seguido por E6. Analisando o potencial tóxico das cepas, também tivemos alta concentração de toxina cultivada nas cepas D4, sendo os compostos mais abundantes a OVTX-A e OVTX-B.

No experimento 3, com o tratamento sem aeração, tivemos densidade celular razoáveis e menor, se compararmos com os recipientes com inserção de ar, portanto confirmamos que a aeração é um fator limitante, assim como também descreve o estudo de Camacho (2011). A microalga demonstrou melhor adaptação com a presença de ar em 6h de aeração, onde as microbolhas favorecem a movimentação da água do cultivo também favorecendo a não deixar as células de *O. cf. ovata* sedimentarem, mantendo-as em suspensão. Assim o ambiente torna-se homogêneo e todas as células tomam as mesmas condições de cultivo, facilitando o desenvolvimento por igual, bem como também resultou no estudo de Santos (2014). Porém, no ponto de vista econômico o tratamento com 1 hora de aeração também favoreceu ótimos resultados de desenvolvimento das cepas, com menor tempo de coleta e menor tempo de aeração (menor custo de energia), por isso, torna-se um método de aplicação recomendável.

O tratamento 6h também representou um ótimo crescimento, rápido e com boa quantidade celular, representando muito bem as fases de crescimento. O tratamento com 3 horas de aeração também toma destaque com ótimo resultando de abundância

celular. Nos quatro tratamentos tivemos a OVTX-A e OVTX-B também como os compostos mais abundantes, porém, o momento da coleta pode ter influenciado na análise de quantidade de toxina por volume. Possivelmente poderíamos ter uma conclusão concreta do tratamento que mais produziu toxina se as coletas fossem realizadas antes do pico para a fase estacionária. Em contra partida, o experimento 3 foi possível observar detalhadamente as fases do crescimento nos 30 dias de experimento, ainda fica a hipótese de termos obtido alta proliferação celular e faltado nutrientes no meio de cultivo, tornando assim o pico de crescimento, bem como pode ter acontecido com o tratamento 6h. Seria válido recomendar, refazer o experimento por mais tempo de estudo e também comparar um clone com diferentes quantidades de nutrientes, visto que neste, utilizamos o meio f/4, visto que outros estudos realizaram a aplicação de f/2, como descrito também no estudo de Pezzolesi *et. al.* (2014).

Esse destaque, possivelmente pode estar relacionado por conta de o tratamento alcançar rapidamente o maior pico da exponencial, se analisarmos em conjunto com a figura 14, vemos que a coleta foi realizada ao meio da fase, enquanto as outras ainda não haviam se desenvolvido da mesma forma. Portanto, no dia 22, podemos verificar que a coleta foi realizada já na fase de estacionária, fase onde parte das células já estão obtendo mortalidade, possivelmente não coletamos a maior taxa de toxina no momento realizado, exceto no tratamento 0h, que ainda estava na sua fase exponencial até dia 24, momento ideal que sugerimos neste. A quantidade de toxina poderia trazer resultados melhores, com maiores quantidades de toxina, caso fossem coletadas antes do pico de crescimento de cada tratamento.

Comparando os experimentos estáticos, vemos que o experimento 1 com cepas sem aeração, obtiveram abundância celular maiores do que o experimento 3. Mesmo afirmando que a aeração desenvolveu o crescimento de forma rápida, já que ambos foram mantidos por 30 dias, mas ainda resta a hipótese de como obtivemos maiores níveis de toxina no experimento 3. Os resultados obtidos não foram diretamente proporcionais, pois, podem ter sofrido com a diferença de intensidade luminosa oferecida em cada um dos experimentos, já que cada experimento foi realizado em incubadoras diferentes e com intensidade luminosa diferentes (YAMAGUCHI *et. al.*, 2014). Como a microalga tem um habitat bentônico, pode ter se desenvolvido melhor,

produzindo mais toxina, na incubadora com menor fluxo luminoso. Para que seja verificado a hipótese encontrada neste estudo, este, sugere uma nova pesquisa com variação deste parâmetro.

Verificamos que as células da espécie não obtiveram um bom crescimento quando colocadas uma grande quantidade de aeração, alguns autores mencionarem a possibilidade de baixo crescimento e desenvolvimento no ambiente em regiões com movimentação da água (ASSUNÇÃO *et. al.* 2017). Então, verificamos uma grande mortalidade e quebra das células quando submetidas a grande turbulência como no experimento inicializado com o crescimento em garrafas de 2 L. Assim aplicamos a técnica de temporização da aeração, formando movimentações nos pulsos de ar (15 minutos cada), sem afetar as células a ponto de danificá-las.

Também seria importante manter um monitoramento de parâmetros de qualidade de água poderia ser um dos fatores a serem desenvolvidos com mais atenção e controle (SCALCO *et. al.* 2012). No experimento 3, controlamos temperatura (25°C) e a inserção de ar. Ainda assim, monitorar o parâmetro de pH, evitar índices altos que possam inibir o crescimento algal, contribuindo com a determinação da curva de crescimento nos cultivos em vidrarias e até mesmo identificar uma contaminação nos cultivos, como presenciamos no estudo com fotobiorreator em bolsas suspensas (experimento 2).

Os resultados de crescimento dos experimentos e a produção de toxinas, provavelmente está relacionado com a maior eficiência na absorção de nutrientes por células menores, devido à maior razão superfície-volume destas (LAVÍN & LOURENÇO, 2005), bem como a diferenças em atividade de enzimas associadas ao metabolismo de nutrientes (LOURENÇO, 2006), gerando altos e baixos na curva de crescimento.

É importante mencionar que foram encontrados registros de matérias com dimensões muito menores que a célula da *O. cf. ovata*, que não contabilizadas, mas possivelmente utilizavam dos mesmos nutrientes distribuídos no ambiente de cultivo. Neste sentido, quando verificamos os resultados da análise de peneiramento, o material não filtrado, dito como “residual” no gráfico, pode estar relacionado com impurezas e outros materiais orgânicos não desejáveis. Possivelmente, pode ter

concentrado células menores que 10 μ m (menor malha utilizada), biofilme, células mortas, entre outras impurezas. Mas ainda são hipóteses encontradas no decorrer deste estudo.

Para um experimento ideal, poderia ser refeito a metodologia de análise de peneiramento e realizado a contagem de células a fim de verificar a abundância em cada uma das peneiras retidas. Esta foi uma análise faltante neste estudo e que poderia identificar possíveis células indesejadas, biomassa do cultivo e uma melhor seleção de tamanho de células desejadas a se coletar.

Apesar de alguns estudos morfológicos de *O. cf. Ovata* descreverem encontrar células grandes de 29,8 à 61,4 μ m de comprimento e 21,1 e 45,2 μ m de largura, como descrito por Nascimento et al. (2020), é necessário considerar que houve publicações com células menores. Segundo o trabalho desenvolvido por Magro (2021), avaliou diferentes cepas e coletadas no litoral brasileiro, dimensionando o tamanho das células cultivadas nas vidrarias quando se aproximaram da fase estacionária de crescimento (aproximadamente 15 dias após inóculo) e confirmou a variabilidade das dimensões se sobrepondo entre tamanhos mínimos e máximos. As dimensões médias seguiram entre 36,5 e 46,9 μ m de comprimento e 26,6 e 36,4 μ m de largura, podendo encontrar valores de até 10,34 μ m com células ainda menores, numa mesma amostra.

Esta análise demonstra que a o experimento realizado para peneiramento de células necessita ter maior eficácia para conter as células de menores tamanhos, tomando cautela para reter somente os microrganismos desejáveis, justificando a utilização de peneiras com malha de 20 μ m neste estudo, onde coletamos apenas as células grandes e filtrando-as das impurezas contidas ao meio.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho atingiu os objetivos do projeto, pois contribuiu com a descrição de aspectos metodológicos para produção de biomassa de *Ostreopsis cf. ovata* em ambiente fechado, agregando fatores importantes e necessários para desenvolver e descrever a tecnologia proposta para produção de microalgas *O. cf. ovata* em maiores quantidades. Os experimentos demonstraram, de forma ampla, que a inserção de aeração em 6h intermitentes, torna o crescimento da microalga com mais eficácia, proporcionando rápido crescimento e gerando alto potencial tóxico, podendo ser replicadas em sistema de produção de maiores volumes, como o modelo proposto e utilizado com bolsas de cultivo em fotobiorreator, gerando maior quantidade de biomassa e biotoxinas importantes comercialmente, já que a análise química da toxina se mostrou com grande produtividade por volume cultivado.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Visto que, os estudos de produção de biomassa desta espécie ainda não foram desenvolvidos, o trabalho torna-se uma importante fundamentação para novas pesquisas, uma vez em que os testes e hipóteses foram descritas na metodologia deste, podem ser repetidas e incrementadas cuidadosamente para obter bons resultados, não alcançando os mesmos empecilhos encontrados, tornando as informações tecnológicas elaboradas mais eficientes na cadeia produtiva desta microalga.

Para trabalhos futuros, utilizar a aeração nas fases iniciais de desenvolvimento da cepa, ainda em recipientes de baixo volume de meio, agiliza o crescimento e a produção de quantidade de biomassa celular, mas levando em consideração a ausência de ar e movimentação no período de adaptação das células em novo meio, quando submetidas a replicação.

6. REFERÊNCIAS

- ANNE-SOPHIE, P. et al. **Effects of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* on survival, feeding and reproduction of a phytal harpacticoid copepod.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 516, p. 103–113, jul. 2019.
- ASSUNÇÃO, J.; GUEDES, A.; MALCATA, F. **Biotechnological and Pharmacological Applications of Biotoxins and Other Bioactive Molecules from Dinoflagellates.** Marine Drugs, v. 15, n. 12, p. 393, 20 dez. 2017.
- BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. **Microalgas: alternativas promissoras para a indústria.** Agroenergia Rev, v. 10, p. 6-11, 2016.
- BRISSARD, C.; HERRENKNECHT, C.; SÉCHET, V.; HERVÉ, F.; PISAPIA, F.; HARCOUET, J.; LÉMÉE, R.; CHOMÉRAT, N.; HESS, P.; AMZIL, Z. **Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification.** Mar. Drugs 2014 , 12 , 2851–2876.
- BROWN, M.R. et al. **Nutritional properties of microalgae for mariculture.** Aquaculture, v.151, p.315-331, 1997. Disponível em: Acesso em: 29 jul. 2023. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3.
- CAMACHO, F. García et al. **Aumento de escala do fotobiorreator para uma microalga dinoflagelada sensível ao cisalhamento.** Bioquímica de Processos , v. 46, n. 4, pág. 936-944, 2011.
- CIMINIELLO, Patrizia et al. O surto de Gênova em 2005. **Determinação de suposta palitotoxina em *Ostreopsis ovata* mediterrânea por um novo método de espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida.** Química Analítica , v. 78, n. 17, pág. 6153-6159, 2006.
- CIMINIELLO, P. et al. **Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak.** Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v. 19, n. 1, p. 111–120, 1 jan. 2008.
- DERNER, Roberta Bianchini et al. **Microalgas, produtos e aplicações.** Ciência Rural, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

FAIMALI, M.; GIUSSANI, V.; PRAÇA, V.; GARAVENTA, F.; CORRÀ, C.; ASNAGHI, V.; PRIVITERA, D.; GALLUS, L.; CATTANEO-VIETTI, R.; MANGIALAJO, L.; et. al. **Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms.** Mar. Environ. Res. 2012 , 76 , 97–107

FAUST, M. A.; GULLEDGE, R. **Identifying Harmful Marine Dinoflagellates.** Journal of Applied Phycology v. 42, n. 1, p.1–144, 2002. Disponível em: DOI: 10.1023/b:japh.0000019147.40273.1b. Acesso em: 20 ago. 2023.

FUKUYO, Y. **Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs.** Nippon Suisan Gakkaishi, v. 47, n. 8, p. 967–978, 1981.

GALLARDO RODRÍGUEZ, J. J. et al. **Culture of dinoflagellates in a fed-batch and continuous stirred-tank photobioreactors: Growth, oxidative stress and toxin production.** Process Biochemistry, v. 45, n. 5, p. 660–666, maio 2010.

GUERRINI, F. et al. **Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas.** Toxicon, v. 55, n. 2-3, p. 211–220, fev. 2010.

GUILLARD, R. L & RYTHER, J. H (1962). **Estudos sobre diatomáceas do plâncton marinho I. *Cyclotella nana* Hustedt e *Detonula confervacea* (Cleve) Gran..** Canadian Journal of Microbiology 8: 229-239.

LAVÍN, P.L.; LOURENÇO, S.O. **An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures.** Brazilian Journal of Oceanography, v.53, n1/2, p.55-67, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1679-87592005000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 02 nov. 2023. doi: 10.1590/S1679-87592005000100006.

LOURENÇO, Sergio O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006.

MAGRO, L. C. **Potencial tóxico entre diferentes cepas do dinoflagelado *Ostreopsis cf. ovata*.** acervodigital.ufpr.br, 2021. Acesso em: 01 nov. 2023.

MORTON, S. L.; NORRIS, D. R.; BOMBER, J. W. **Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 157, n. 1, p. 79–90, 1992.. Disponível em: DOI: 10.1016/0022-0981(92)90076- M. Acesso em: 17 ago. 2023.

NASCIMENTO, S. M. et al. **Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil.** Harmful Algae, v. 13, p. 1–9, jan. 2012.

NASCIMENTO S.M, NEVES R. A. F, DE'CARLI G. A. L, BORSATO G. T, SILVA R. A. F. D, MELO G. A, MORAIS A. M, COCKELL T. C, FRAGA S, MENEZES-SALGUEIRO A. D, MAFRA L. L JR, HESS P, SALGUEIRO F. ***Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae) Molecular Phylogeny, Morphology, and Detection of Ovatoxins in Strains and Field Samples from Brazil.** Toxins (Basel). 2020 Jan 22;12(2):70. doi: 10.3390/toxins12020070. PMID: 31979144; PMCID: PMC7076807. Acesso em: 01 nov. 2023.

PARSONS, M. L.; ALIGIZAKI K.; BOTTEIN M. D.; FRAGA S.; MORTON S. L., PENNA A.; RHODES L. ***Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology.** Harmful Algae, v. 14, p. 107–129, 2012. Disponível em: DOI: 10.1016/j.hal.2011.10.017. Acesso em: 17 ago. 2023.

PEZZOLESI, L. et al. **Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*.** Harmful Algae, v. 36, p. 1–10, jun. 2014.

PFANNKUCHEN, M.; GODRIJAN, J.; PFANNKUCHEN, D. M.; IVEŠA, L.; KRUŽIĆ, P.; CIMINIELLO, P.; DELL'AVERSANO, C.; IACOVO, E. D.; FATTORUSSO, E.; FORINO, M.; TARTAGLIONE, L.; GODRIJAN, M. (2012). **Toxin-Producing *Ostreopsis cf. ovata* are Likely to Bloom Undetected along Coastal Areas.** Environmental science & technology. 46. 5574-82. 10.1021/es300189h.

RIOBÓ, P., PAZ, B., FRANCO, J.M., 2006. **Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection.** Anal. Chim. Acta 566 (2), 217–223.

SANTOS, D. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella sp.*** Universidade de São Paulo escola de engenharia de lorena-eel/usp. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MEQ14043.pdf>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

SCALCO, Eleonora et al. **Respostas de crescimento e toxicidade da *Ostreopsis Mediterrânea cf. ovata* às condições sazonais de irradiância e temperatura.** Algas nocivas , v. 17, p. 25-34, 2012.

SILVA, A. C. M.; SANTOS, A. C.; ANJOS, S. S. N.; ROSADO, T. B.; CANÇADO, L. J. **Biofertilizantes de microalgas: Desafios para uma produção competitiva e sustentável.** VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, Santa Catarina, p. 457, 2019. Disponível em: LETICIA-SEG-Biofertilizantes-de-microalgas.pdf (embrapa.br). Acesso em: 19 ago. 2023

SILVA, K. G. **Avaliação da taxa de crescimento de microalgas *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* cultivadas em fotobiorreator com diferentes fontes de iluminação.** 78 f. Monografia de graduação (Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2022.

TIBIRIÇÁ, C.E.J., PROENÇA, L.A.O., SCHRAMM, M.A., 2010. **Investigação da ocorrência de dinoflagelados epífitos em duas enseadas na região centro-norte de Santa Catarina.** In: XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, Paraty, p. 313

TOTTI, C. et al. **Bloom occurrence of *Ostreopsis ovata* along the Conero Riviera (NW Adriatic Sea).** Harmful algae news, v. 33, p. 12-13, 2007.

WONG, J.T.Y.; KWOK, Alvin C.M. **Proliferation of dinoflagellates: blooming or bleaching.** Bioessays, v. 27, n. 7, p. 730-740, 2005.

YAMAGUCHI, Haruo et al. **Avaliação dos efeitos da intensidade luminosa no crescimento do dinoflagelado bentônico *Ostreopsis sp. 1* usando um sistema de cultura de fotoirradiação recentemente desenvolvido e um novo método analítico de regressão.** Algas Nocivas , v. 39, p. 48-54, 2014.

APÊNDICE A – TABELAS COM NÍVEIS DE TOXINA INTRACELULARES ENCONTRADOS NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DOS EXPERIMENTOS 1 E 3.

Tabela 7: Níveis dos compostos de toxina intracelular das amostras do oitavo dia do experimento 1. ((pg.cél⁻¹).mL⁻¹)

Dia 8	D4			D8			E6		
42-OH-PLTX	0,054617	0,044235	0,051076	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HomoPLTX	0,782781	1,155451	0,684895	0,641862	0,470006	1,181061	0,685209	0,333988	0,710642
OVTX-A	7,820179	10,63387	6,29276	4,319407	3,086278	8,240758	6,252572	2,49074	5,823592
OVTX-B	4,868126	6,829343	3,989544	2,880429	1,946205	5,318636	4,063666	1,691054	3,796509
OVTX-C	2,792495	3,733145	2,292204	2,186073	1,630115	4,080606	2,374759	1,135717	2,207207
OVTX-D	5,133667	7,460635	4,227481	4,137042	2,819429	6,831818	4,132583	2,002777	4,717455
OVTX-E	0,436565	0,625636	0,358825	0,298393	0,203704	0,526364	0,319829	0,179594	0,277815
PLTX	0,19162	0,260383	0,198936	0,291224	0,225501	0,528182	0,202197	0,123903	0,210642
Concentração total	22,08005	30,7427	18,09572	14,75443	10,38124	26,70742	18,03081	7,957773	17,74386
Média por tratamento	23,63948872			17,28103073			14,57748353		
Desvio	6,466094723			8,451264416			5,73463224		

Tabela 8: Níveis dos compostos de toxina intracelular das amostras do vigésimo segundo dia do experimento 1. ((pg.cél⁻¹).mL⁻¹)

Dia 22	D4			D8			E6		
42-OH-PLTX	0,107059	0,048545	0,08089	0,04827	0,027225	0,100059	0,15999	0,117892	0,05273
HomoPLTX	2,318737	0,942173	1,835274	0,843185	0,725622	1,954492	2,464709	1,893219	0,999633
OVTX-A	25,09188	10,15963	20,16399	8,509887	7,531371	27,03788	31,55186	19,64069	11,38154
OVTX-B	15,19161	6,426188	12,35857	5,506073	4,871891	16,813	21,29975	11,92974	7,328973
OVTX-C	7,1181	3,07046	5,874063	2,903496	2,420647	6,227541	7,954016	6,268423	3,21304
OVTX-D	14,25998	6,095783	11,47795	5,373058	4,370232	11,07671	14,46104	12,26319	6,112958
OVTX-E	1,441242	0,525599	1,159806	0,492973	0,450995	1,567139	1,757731	0,901062	0,616544
PLTX	0,489437	0,19989	0,394578	0,20452	0,141985	0,399941	0,571737	0,535458	0,204197
Concentração total	66,01805	27,46827	53,34511	23,88146	20,53997	65,17677	80,22083	53,54967	29,90962
Média por tratamento	48,94380979			36,53273392			54,56004116		
Desvio	19,64815387			24,8626654			25,17082152		

Tabela 9: Níveis dos compostos de toxina intracelular das amostras do oitavo dia do experimento 3. ((pg.cél⁻¹).mL⁻¹)

DIA 8	3H			6H				1H				0H				
42-OH-PLTX	nd	0,13	0,06	0,14	0,14	0,17	0,04	0,21	0,08	0,09	0,11	0,12	nd	nd	0,13	nd
HomoPLTX	1,88	2,40	1,24	2,34	2,15	3,49	0,76	4,75	1,55	1,55	1,55	3,17	1,93	1,99	2,07	1,90
OVTX-A	31,38	39,22	16,09	35,70	34,88	44,62	11,17	58,80	24,78	27,51	28,10	39,35	34,38	41,78	35,35	39,85
OVTX-B	20,54	24,39	10,33	23,73	21,30	29,52	7,27	39,34	16,08	18,21	17,55	26,05	22,77	27,03	22,79	25,14
OVTX-C	5,48	7,20	3,94	7,16	6,75	9,81	2,22	15,28	4,80	4,79	4,59	9,33	5,90	6,94	6,57	5,48
OVTX-D	10,25	13,49	7,25	13,52	13,55	19,87	4,52	28,68	8,77	8,85	8,81	18,12	10,45	12,89	11,63	10,15
OVTX-E	1,67	2,22	0,90	1,76	1,84	2,28	0,62	3,08	1,38	1,34	1,40	2,07	1,62	2,33	1,75	2,20
PLTX	0,30	0,36	0,16	0,33	0,37	0,49	0,10	0,71	0,20	0,21	0,26	0,52	0,24	0,30	0,33	0,35
Concentração total	71,51	89,40	39,98	84,68	80,98	110,23	26,69	150,84	57,66	62,56	62,35	98,73	77,30	93,25	80,62	85,07
Média por tratamento	71,39			92,19				70,33				84,06				
Desvio	22,27			52,22				19,07				6,90				

Tabela 10: Níveis dos compostos de toxina intracelular das amostras do vigésimo segundo dia do experimento 3. ((pg.cél-1).mL-1)

DIA 22	3H				6H				1H				0H			
42-OH-PLTX	0,07	0,05	0,06	0,07	nd	0,06	0,06	0,03	0,10	0,07	0,13	0,14	0,31	0,21	0,13	0,19
HomoPLTX	1,28	0,92	1,16	1,45	1,07	1,37	1,02	0,57	2,05	1,80	2,74	2,80	6,00	3,74	2,32	3,36
OVTX-A	14,67	11,22	14,75	17,98	14,07	19,41	15,22	7,98	31,07	21,96	31,00	34,06	79,85	54,88	33,70	43,22
OVTX-B	10,32	7,69	10,10	12,95	9,60	13,10	10,62	5,46	21,94	15,05	21,57	23,12	54,06	36,31	22,81	29,93
OVTX-C	3,95	3,02	3,95	4,56	3,13	4,57	3,35	1,72	6,63	5,62	8,23	9,00	18,28	11,57	7,61	10,81
OVTX-D	7,36	5,54	6,82	8,59	6,01	8,31	5,79	3,40	11,46	10,36	15,03	16,54	34,82	20,39	13,50	20,13
OVTX-E	0,87	0,65	0,83	1,09	0,72	1,19	0,94	0,46	1,71	1,25	1,69	1,95	4,37	2,60	1,86	2,25
PLTX	0,19	0,14	0,20	0,23	0,15	0,24	0,18	0,10	0,32	0,25	0,39	0,40	0,89	0,67	0,35	0,57
Concentração total	38,71	29,23	37,87	46,92	34,76	48,24	37,18	19,73	75,27	56,36	80,78	88,01	198,57	130,38	82,29	110,45
Média por tratamento	38,18				34,98				75,11				130,42			
Desvio	7,23				11,74				13,54				49,53			