



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



“ESTUDO FISIOLÓGICO DE *CHLORELLA SOROKINIANA* E *CHLOROLOBION LUNULATUM* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO EM ESCALA LABORATORIAL E AMPLIADA (200 L)”.

Leonardo de Faria

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Ana Teresa Lombardi

*** bolsista (FAPESP) – 2019/16273-2**

São Carlos - SP

2023

Leonardo de Faria

Estudo fisiológico de *Chlorella sorokiniana* e *Chlorobion lunulatum* sob diferentes condições de cultivo em escala laboratorial e ampliada (200 L).

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof.^a Dra. Ana Teresa Lombardi

São Carlos
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Leonardo de Faria, realizada em 07/07/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Prof. Dr. Pedro Antônio Rodríguez Ramos (UTLa Habana)

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello (USC)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória do meu pai, Moacir Carlos de Faria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Moacir e Juraci que em meio a tantos sacrifícios e dificuldades proporcionaram a mim a oportunidade e privilégio de cursar uma universidade pública e continuar os estudos na pós-graduação. Estendo esse agradecimento às minhas irmãs Mônica e Bruna, que são meu porto seguro e apoiam todas as minhas escolhas. Também agradeço a Daniela Alves pelo apoio e suporte no final desta jornada e Marina Justi pelo esclarecimento de dúvidas e amizade.

À Ana Lombardi, pela orientação e amizade, principalmente pela compreensão, paciência e apoio em um momento de dificuldade. Agradeço ainda por toda a dedicação e atenção, que contribuíram com o desenvolvimento do meu projeto de doutorado. Agradeço também ao professor Dr. Pedro Antonio Rodriguez Ramos, pelo suporte na análise dos custos de produção, sempre muito solícito e disponível.

Quero agradecer a todos do laboratório, em especial ao Lucas Solidade, que sempre esteve presente me auxiliando em todos os quesitos, e principalmente no acadêmico. À Jaqueline Silva por todo suporte, ajuda, disponibilidade e esclarecimentos de dúvidas, assim como ao Douglas Baracho e Lucas Cardoso. Essas pessoas, assim como a professora Ana Lombardi, me estenderam a mão em um momento difícil e tornaram possível a conclusão do meu doutorado, pois sozinho eu não teria conseguido.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88887.495799/2020-00, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2019/16273-2; 2018/07988-5, pelo apoio para realização deste projeto e a UFSCar pela infraestrutura fornecida.

A todos, muito obrigado.

Faria, Leonardo **Estudo fisiológico de *Chlorella sorokiniana* e *Chlorolobion lunulatum* sob diferentes condições de cultivo em escala laboratorial e ampliada (200 L)**. 2023. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar. São Carlos, 2023.

RESUMO

O cultivo de microalgas é uma área em ascensão que tem ganhado relevância nos últimos anos. Em escala ampliada, tal cultivo é oneroso e para viabilizá-lo, encontrar estratégias eficazes para aumentar biomoléculas e biomassa no sistema produtivo pode ser uma solução. As microalgas escolhidas para este estudo foram *Chlorella sorokiniana* e *Chlorolobion lunulatum*, duas espécies Chlorophyta que suportam condições ambientais semi-controladas. Este estudo foi dividido em 3 capítulos, tendo início com experimentos de laboratório e finalizado com ampliação de escala. Nesse caminho buscou-se um meio nutritivo de baixo custo e alto rendimento de biomassa, testou-se a manipulação bioquímica da biomassa por meio de exposição ao NaCl e, em culturas de *C. lunulatum* na escala ampliada (200 L), o metabolismo mixotrófico foi considerado para superar algumas limitações do cultivo. Finalmente, um estudo tecno-econômico do cultivo de 200 L foi realizado. Como meio nutritivo de baixo custo, testou-se solução hidropônica modificada (escala laboratorial) em substituição ao meio sintético BG11. Esses resultados mostraram que apesar de ter reduzido os custos, a solução hidropônica não suportou maior densidade celular e nem levou ao acúmulo de biomoléculas em comparação ao meio BG11. Na manipulação bioquímica tendo-se NaCl como agente indutor de modificações intracelulares, buscou-se concentrações do sal que não afetassem negativamente a taxa de crescimento, mas apenas estimulassem o acúmulo de biomoléculas (2 g L^{-1} NaCl). Esses resultados mostraram que *C. sorokiniana* produziu cerca 5 vezes mais carotenoides totais ($0,59 \text{ mg L}^{-1}$) que *C. lunulatum*, mas *C. lunulatum* ~2 vezes mais lipídios (~30% da biomassa seca). Entretanto, não houve influência do NaCl na produção de lipídios. Por fim, no cultivo de 200 L, realizado somente com *C. lunulatum*, o tratamento com acetato de sódio como fonte de carbono orgânico resultou em aumento de 32% na produção de biomassa seca ($2,7 \text{ g L}^{-1}$) em comparação ao controle. Apesar da adição de acetato de sódio ter aumentado o custo operacional em 4,8% e reduzido o custo de produção da biomassa em 21%, a quantidade de biomassa produzida precisaria ser ainda maior para um custo de produção favorável. Esta pesquisa ressalta o potencial da microalga *C. lunulatum* para aplicações biotecnológicas e destaca a importância da otimização das condições de cultivo para aumentar a produção de biomassa e de biomoléculas específicas.

Palavras-chave: microalga, lipídios, acetato de sódio, NaCl

Faria, Leonardo **Physiological study of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorolobion lunulatum* under different cultivation conditions on laboratory and large scale (200 L)**. 2023. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar. São Carlos, 2023.

ABSTRACT

The cultivation of microalgae is growing worldwide and has gained relevance in recent years. On a larger scale, such cultivation is costly and, to make it feasible, finding effective strategies to increase biomolecules and biomass in the production system can be a solution. The microalgae chosen for this study were *Chlorella sorokiniana* and *Chlorolobion lunulatum*, two Chlorophyta species that support semi-controlled environmental conditions. This study was divided into 3 chapters, starting with laboratory experiments, and ending with culture scale expansion to 200 L. On Chapter one we focused on a low-cost nutrient medium for biomass production. Chapter 2 reports on a biochemical manipulation procedure to increase biomolecules in the biomass through exposure of the Chlorophyta to NaCl and, chapter 3 focused on 200 L cultures of *C. lunulatum* in a green house, under semi-controlled conditions. For the 200 L culture, the mixotrophic metabolism was considered to overcome some limitations in biomass production. Finally, with the results of the 200 L cultures, a techno-economic study was developed. As the low-cost nutrient medium, a modified hydroponic solution was tested to replace the BG11 synthetic medium. These results showed that despite having reduced costs, the hydroponic solution did not support greater cell density and did not lead to the accumulation of biomolecules compared to the control. The biochemical manipulation with NaCl, concentrations that would not negatively affect the growth rate, but only stimulate the accumulation of biomolecules (2 g L⁻¹ NaCl) were sought. These results showed that *C. sorokiniana* produced 5 times more total carotenoids (0.59 mg L⁻¹) than *C. lunulatum*, but *C. lunulatum* ~2 times more lipids (~30% of dry biomass). However, there was no influence of NaCl on lipid production. Finally, in the 200 L cultivation, which was carried out only with *C. lunulatum*, the treatment with sodium acetate as a source of organic carbon resulted in a 32% increase in the production of dry biomass (2.7 g L⁻¹) compared to the control. Although the addition of sodium acetate increased the operating cost by 4.8% and reduced the biomass production cost of by 21% the production system, the amount of biomass produced would still need to be greater for a favorable production cost. This research highlights the potential of the microalgae *C. lunulatum* for biotechnological applications and the importance of optimizing cultivation conditions to increase the production of biomass and specific biomolecules.

Keywords: microalgae, lipids, sodium acetate, NaCl.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1- Principais características dos metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.....17

CAPÍTULO 1

Figura 1- Valores médios e desvio padrão (n=3) das taxas de crescimento máximas (d^{-1}) para cada meio testado em função dos meios de cultura mostrados na Tabela 3. O número 21 corresponde ao meio de referência – BG11.34

Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) dos repiques para aclimação da *C. sorokiniana* ao meio selecionado. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).35

Figura 3- Curva de crescimento do último do repique para aclimação de *C. sorokiniana* ao meio selecionado e em meio BG11. Símbolos: círculo fechado, meio BG11e, quadrado aberto, meio hidropônico modificado. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).35

Figura 4- Carotenoides totais ($mg L^{-1}$) em 72 horas. Símbolos da barra: preta, controle BG11 e branca, hidropônico modificado. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).36

CAPÍTULO 2.

Figura 1- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) em função das diferentes concentrações de NaCl ($g L^{-1}$). Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).48

Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) em função das diferentes concentrações de NaCl ($g L^{-1}$). Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Cada ponto representa a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).49

Figura 3- Biomassa seca ($mg L^{-1}$) em 72h m função das diferentes concentrações de NaCl ($g L^{-1}$). Símbolos: barra preta, *C. sorokiniana* e barra branca, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).50

Figura 4- Biomoléculas totais. Proteínas, carboidratos e lipídios como porcentagem de peso seco na biomassa das microalgas em 72 horas. Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).51

Figura 5- Pigmentos. Em A, clorofila *a* em $mg L^{-1}$ e em B, carotenoides totais em $mg L^{-1}$ em 72h de cultivo em função das diferentes concentrações de NaCl ($g L^{-1}$). Símbolos: círculo

fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).52

Figura 6- Atividade antioxidante nas diferentes concentrações de NaCl em 72 horas. Em A, percentual de inibição do radical DPPH e em B, teor polifenóis em mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹. Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).53

CAPÍTULO 3.

Figura 1- Representação dos reatores tipo *raceway* que estão em uso para cultivos ampliados de *Chlorobion lunulatum* (3 reatores controles e 3 reatores tratamentos). (A) reator *raceway* em teste; (B) *raceway* com cultivo de *C. lunulatum*; (C) primeiro teste de cultivo de *C. lunulatum* em 200 L, dos quais 3 reatores equivalem aos controles e 3 ao tratamento. Capacidade máxima de 500 L, volume usado 200 L; coluna de borbulhamento CO₂ 7 m.69

Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d⁻¹) de *C. lunulatum* em função da concentração de acetato de sódio. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$). Intensidade de luz: 40 μmol m⁻² s⁻¹.74

Figura 3- Condições ambientais. Em A, irradiância incidente no reator (μmol ftons m⁻² s⁻¹) em função o tempo (horas); em B, irradiância medida dentro do reator (μmol ftons m⁻² s⁻¹) em função o tempo (horas) e em C, temperatura (°C) em função do tempo (horas). Símbolos: números correspondentes ao dia de cultivo. No Quadro 1 são mostrados os dados usados nesta figura.75

Figura 4- Parâmetros de crescimento em cultivos de *C. lunulatum* em função do tempo. Em A, curva de crescimento apresentada em células mL⁻¹; em B, biomassa seca em g L⁻¹ e em C, o nutriente fosfato em mg L⁻¹. Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).77

Figura 5- Pigmentos nos cultivos de *C. lunulatum* mantida em estufa agrícola. Valores em mg L⁻¹. Em A, clorofila *a*; em B, carotenoides totais. Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).78

Figura 6- Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas rápidas de luz. Em A, curvas rápidas de luz, representadas pela rETR (μmol elétrons m⁻² s⁻¹) em função da intensidade luminosa (μmol ftons m⁻² s⁻¹). Símbolos: losango, dia 3; triangulo, dia 6 e ampulheta, dia 9; símbolos fechados, controle e abertos, acetato. Em B, alfa (μmol de elétrons m⁻² s⁻¹ [μmol de fótons m⁻² s⁻¹]⁻¹); em C, E_k em função do tempo experimental em dia; em D ETR_{max} (elétrons μmol m⁻² s⁻¹). Símbolos: círculo fechado, controle; e quadrado aberto, acetato de sódio. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).80

Figura 7- Porcentagem de biomoléculas na biomassa de *C. lunulatum* em função do tempo experimental em dias. Em A, proteínas totais; em B, carboidratos totais e, em C, lipídios totais.

Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato de sódio. Os valores representam a média e o desvio padrão (n=3); letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).
.....81

Figura 8- Atividade antioxidante em *C. lunulatum* em função do tempo experimental em dias. Em A, potencial antioxidante em porcentagem, e em B, compostos fenólicos em mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3); letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).82

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL.

- Tabela 1-** Características dos reatores abertos e fechados considerando suas vantagens e desvantagens conforme o reator.20
- Tabela 2-** Empresas produtoras de microalgas, país de produção, gênero de microalgas cultivadas, e seus principais produtos.22

CAPÍTULO 1.

- Tabela 1-** Concentração em mol L⁻¹ dos componentes da solução hidropônica comercial. 30
- Tabela 2-** Composição do meio BG11.31
- Tabela 3-** Meios nutritivos testados. Valores referem-se à concentração dos reagentes (mol L⁻¹). BG11 Micro refere-se à solução de micronutrientes usada no meio BG11. Onde se apresenta (*), significa que aquele reagente não foi adicionado ao meio.32

CAPÍTULO 3.

- Tabela 1-** Pigmentos clorofila *a* (Chl*a*) e carotenoides totais apresentados em mg por g de biomassa seca; razão clorofila *a*/clorofila *b* (Chl*b*) e razão clorofila total (ChlT)/carotenoides totais. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa (p>0,05). ChlT = Chl*a*+Chl*b*.79
- Tabela 2-** Produção de biomassa sem e com a adição de acetato e custo calculado da respectiva produção.90
- Tabela 3-** Custo de operação (%) para produção de biomassa.90
- Quadro 1-** Irradiância externa/interna medida dentro do reator em diferentes horários ao longo do dia e por 11 dias (μmol ftons m⁻² s⁻¹). O asterisco (*) significa que não foi mensurada a luz naquele horário.76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
°C	Grau Celsius
$\mu\text{ L}^{-1}$	Microlitro
μmol	Micromol
mM	Milimolar
M	Molar
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BBM	Meio Basal de Bold
BG11	Meio Blue Green
Chla	Clorofila <i>a</i>
Chlb	Clorofila <i>b</i>
ChlT	Clorofila total
Ca	Concentração de clorofila <i>a</i>
Cb	Concentração de clorofila <i>b</i>
CT	Concentração de carotenoides totais
CO ₂	Dióxido de carbono
d ⁻¹	Por dia
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DW ⁻¹	Por peso seco
E _k	Irradiância saturante
F ₀	Fluorescência inicial de adaptação ao escuro
F _M	Fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por litro
GAE	Ácido Gálico
h	Hora
L	Litro
Ln	Logaritmo natural
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
m ⁻²	Por metro quadrado

min	Mínuto
s ⁻¹	Por segundo
ETRmax	Taxa máxima de transporte de elétrons
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetros
PAM	Pulsos de amplitude modulada
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
pH	Potencial hidrogeniônico
φM	Rendimento fotossintético máximo
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
rETR	Taxa relativa de transporte de elétrons
RLC	Curva rápida de luz
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
α	Inclinação inicial da curva de saturação de luz
TCA	Ácido tricloroacético
mgEq	Miligrama equivalente
Kg	Quilograma
R\$	Reais
€	Euro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
1.2 REFERÊNCIAS	23
2. Capítulo 1 - Seleção do meio de cultura visando baixo custo e alto rendimento de biomassa.....	27
RESUMO.....	27
2.1 INTRODUÇÃO	28
2.2 OBJETIVOS	29
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.4 RESULTADOS	34
2.5 DISCUSSÃO	36
2.6 CONCLUSÃO	37
2.7 REFERÊNCIAS	37
3. Capítulo 2. Uso do NaCl na manipulação bioquímica de <i>C. sorokiniana</i> e <i>C. lunulatum</i>	41
RESUMO.....	41
3.1 INTRODUÇÃO	42
3.2 OBJETIVOS	43
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.4 RESULTADOS	48
3.5 DISCUSSÃO	53
3.6 CONCLUSÃO	58
3.7 REFERÊNCIAS	59
4. Capítulo 3 – Fisiologia de <i>C. lunulatum</i> em escala ampliada (200 L) e análise tecno-econômica do sistema produtivo.....	64
RESUMO.....	64

4.1 INTRODUÇÃO	65
4.2 OBJETIVOS	67
4.3 MATERIAS E MÉTODOS	67
4.4 RESULTADOS: FISILOGIA.....	73
4.5 DISCUSSÃO	82
4.6 ANÁLISE TECNO-ECONÔMICA	89
4.7 CONCLUSÃO	92
4.8 REFERÊNCIAS	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100

1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de microalgas tem ganhado relevância nos últimos anos devido ao grande potencial biotecnológico desses organismos, com diversas aplicações industriais. Segundo Khan et al. (2018), as microalgas são capazes de crescer em diferentes ambientes e sintetizar uma variedade de biomoléculas com valor agregado, tais como proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos e compostos bioativos. Esse potencial resulta em uma ampla gama de aplicações como na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, energética e ambiental. Para ser considerada microalga, é imprescindível ser pequeno (geralmente microscópico), unicelular (porém pode formar colônias) e colorido (devido aos pigmentos fotossintéticos e acessórios) (Olaizola, 2003). Ainda de acordo com o autor, elas ocorrem comumente em água, mas não obrigatoriamente e podem ser fotoautotróficas, mas não necessariamente.

Além de produzirem moléculas de amplo interesse, as microalgas possuem outras vantagens, como taxas de crescimento elevadas, serem uma fonte de energia renovável, e serem eficazes na fixação de CO₂ (Gong; Jiang, 2011). Apesar dessas vantagens, seu cultivo em larga escala ainda enfrenta desafios que podem inviabilizar a produção. Entre os principais desafios, pode-se citar o fornecimento adequado de nutrientes (Panahi et al., 2019), tipo de reator (Borowitzka, 1999; Ación et al., 2017), flutuações nas condições climáticas (Richmond, 1992; Hu, 2013; Borowitzka, 2016), contaminação e outros fatores que podem afetar a produtividade da biomassa. Além disso, o alto custo de produção pode ser um obstáculo na produção comercial. O custo de energia, água, nutrientes, equipamentos e outros insumos pode ser significativo e reduzir a viabilidade econômica da produção microalgal (Cruz, 2011). Assim, são necessárias estratégias para aumentar a eficiência da produção de biomassa, seja promovendo aumento de rendimento ou o uso de fontes alternativas de recursos, por exemplo, com menor custo.

O fornecimento adequado de nutrientes é fundamental para o crescimento e produtividade das microalgas (Sánchez et al., 2000; Guedes et al., 2011; Panahi et al., 2019), sendo também um componente a ser considerado no custo de produção. Nesse sentido, vários estudos têm explorado a utilização de fontes alternativas de nutrientes para a produção de microalgas (Lee, 2001; Mata et al., 2010; Gong; Jiang, 2011; Barone et al., 2019; Koley et al., 2022). Para crescer e se desenvolver, as microalgas requerem principalmente carbono,

nitrogênio, fósforo, que são os macronutrientes essenciais, assim como os micronutrientes essenciais como ferro, zinco, manganês, cobre e outros (Markou et al., 2014). O nitrogênio e o fósforo são os principais nutrientes para promover o crescimento e desenvolvimento das microalgas, além de desempenharem um papel importante na regulação das atividades metabólicas desses organismos (Yaakob et al., 2021). O nitrogênio, por exemplo, é componente das proteínas e ácidos nucleicos, que são fundamentais para o crescimento, divisão celular e desenvolvimento das algas em geral. Já o fósforo é necessário para a produção de ATP, que é a principal fonte de energia para a maioria das células, incluindo as microalgas (Markou et al., 2014).

O carbono também é um nutriente que influencia significativamente no crescimento das microalgas, por exemplo, o fornecimento de CO_2 no cultivo de microalgas estimula a produção de biomassa (Agbebi et al., 2022). Contudo, esses microrganismos também são capazes de utilizar outras fontes de carbono, além do inorgânico. Em relação à utilização de fontes de carbono as microalgas possuem três tipos de metabolismo: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, ilustrados na Figura 1.

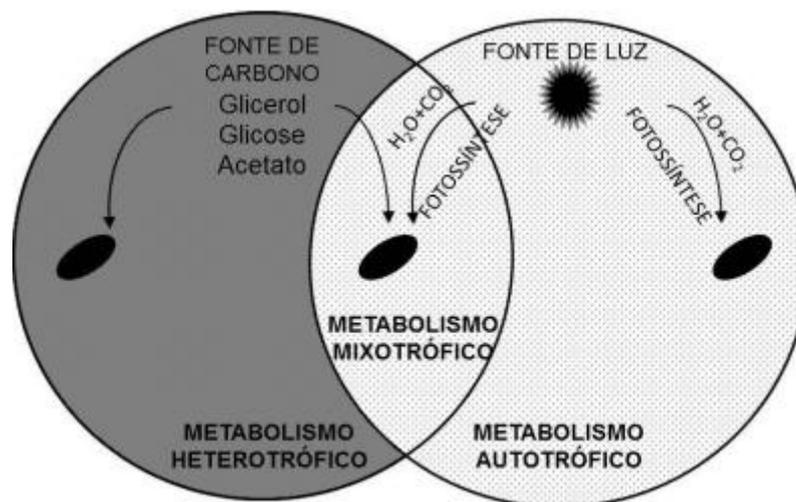


Figura 1- Principais características dos metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Fonte: Mariano et al., 2010.

No metabolismo autotrófico, a luz é a fonte de energia e o CO_2 é a fonte de carbono (inorgânico). A energia luminosa é convertida em energia química pelas reações fotossintéticas das células (Figura 1). No metabolismo heterotrófico, as células utilizam somente compostos

orgânicos como fonte de carbono e energia, portanto, não ocorre a fotossíntese (Figura 1). Já, no metabolismo mixotrófico, as microalgas realizam tanto o metabolismo autotrófico como também o heterotrófico (Figura 1). As microalgas mixotróficas apresentam vantagens interessantes em relação às autotróficas ou heterotróficas quando se trata da produção em escala ampliada. De acordo com Smith et al. (2015), as microalgas mixotróficas são capazes de crescer mais rapidamente e produzir maior quantidade de biomassa e lipídios quando comparadas às microalgas autotróficas ou heterotróficas. Isso se deve ao fato de que as microalgas mixotróficas são capazes de utilizar fontes de carbono orgânico e ainda assim realizar a fotossíntese.

Conforme apontado por Perez Garcia et al. (2011), em alguns cultivos em tanques abertos, pequenas quantidades fornecidas de modo contínuo de carbono orgânico, como acetato e glicose, podem manter maior biomassa de microalgas e prevenir o crescimento bacteriano excessivo. No entanto, adicionar grandes quantidades de substratos orgânicos pode promover o crescimento bacteriano em excesso. Um exemplo da viabilidade da adição diária de acetato no cultivo de *Graesiela* sp. em tanques abertos foi mostrado por Wen et al. (2019), com aumento na produtividade de biomassa e de lipídios.

Uma outra estratégia para viabilizar a produção em larga escala de microalgas é a aplicação de condições de estresse com o objetivo de aumentar a produção intracelular e o rendimento de biomoléculas específicas. Essas condições podem ser variadas, pois a síntese lipídica e de outras biomoléculas estão relacionadas às respostas fisiológicas a diversos fatores, como a intensidade luminosa, temperatura, salinidade e nutrientes (Lombardi; Wangersky, 1991; Griffiths et al., 2009; Gouveia et al., 2009; Campenni et al., 2012). Essa manipulação do meio de cultivo com a aplicações de condições de estresse é conhecida como biomanipulação da biomassa algal (Gong; Bassi, 2016). Estudos mostram que sob o estresse salino pode ocorrer produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio singleto (Yun et al., 2019; Ma et al., 2020; Fal et al., 2022). Esses ROS podem induzir estresse iônico, osmótico e oxidativo (Shetty et al., 2019), o que pode aumentar o conteúdo intracelular de biomoléculas como carboidratos, lipídios, carotenoides e outros compostos antioxidantes. Sabe-se que para as células o aumento de biomoléculas é uma resposta fisiológica a fim de atenuar o estresse gerado (Chokshi et al., 2017; Yun et al., 2019; Elloumi et al., 2020; Fal et al., 2022).

A adição de cloreto de sódio (NaCl) ao cultivo de microalgas pode ter efeitos consideráveis, que podem ser benéficos ou prejudiciais, dependendo da concentração utilizada e da espécie de microalga em questão. Por exemplo, Yun et al. (2019), Pancha et al. (2015) e Salama et al. (2013), em cultivos com espécies de microalgas dulciaquícolas relataram redução do crescimento conforme aumento das concentrações de NaCl nas culturas. De acordo com Minhas et al. (2016) e Shetty et al. (2019), isto pode estar relacionado ao excesso de sal, que ocasiona estresse osmótico, desacelerando a divisão celular e, conseqüentemente, a taxa de crescimento. A inibição da fotossíntese também é um efeito fisiológico do estresse salino, afetando diretamente a produção de biomassa. Por outro lado, em concentrações adequadas, a adição de NaCl pode induzir respostas adaptativas nas microalgas, como relatado por Yun et al. (2019), Pandit et al. (2017), Kirrolia et al. (2011). Nessas condições, a síntese de biomoléculas, como carboidratos, lipídios e carotenoides, aumenta, o que pode ser benéfico em termos de produção de compostos de interesse comercial. Ressalta-se que a concentração ideal de NaCl depende da espécie de microalga e das condições de cultivo. Assim, é importante selecionar cuidadosamente as concentrações utilizadas no cultivo de microalgas, a fim de otimizar a produção e minimizar os efeitos negativos sobre o metabolismo algal.

O sistema de cultivo é outro importante fator que afeta a produtividade das microalgas. Existem dois tipos principais de reatores utilizados em larga escala para o cultivo das microalgas: reatores abertos e os fechados. Cada um apresenta vantagens e desvantagens em termos de produtividade, custo e manutenção. Uma comparação entre reatores abertos e fechados é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos reatores abertos e fechados considerando suas vantagens e desvantagens conforme o reator.

Característica	Reator Aberto	Reator fechado
Riscos de contaminação	Alto	Baixo
Perdas de CO ₂	Alto	Baixo
Perdas por evaporação	Alto	Baixo
Eficiência no uso da luz	Baixo	Alto
Proporção área/volume	Baixo	Alto
Área necessária	Alta	Baixa
Controle do processo	Difícil	Fácil
Produtividade de biomassa	Baixo	Alto
Custos de investimentos	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Custos de recuperação da biomassa	Alto	Relativamente Baixo
Ampliação de escala	Fácil	Difícil

Fonte: Xu et al., 2009, adaptado.

Os reatores abertos são amplamente utilizados na produção de microalgas em larga escala (Chisti, 2007). Eles têm baixo custo de capital e operação, facilidade de escala e manutenção, e capacidade de produzir grandes volumes de biomassa (Benemann, 2013; Ación et al., 2017). Ainda, de acordo Ación et al. (2017), a produtividade das microalgas neste tipo de reator pode ser afetada pelas condições ambientais, pois são fortemente dependes do tempo/clima, há maior risco de contaminação por outras espécies, altas perdas de CO₂ e apresentam maiores requisitos de área em comparação com os sistemas fechados. Dentre os tipos de reatores abertos, o mais comum é o *raceway*, que utiliza agitação mecânica por pás para manter a cultura em movimento.

Já os reatores fechados são sistemas de cultivo fechados que permitem um controle mais preciso das condições ambientais. Além do maior controle, permitem a otimização das condições de cultivo e a possibilidade de produzir culturas de melhor qualidade. No entanto, eles são frequentemente mais caros para serem construídos e operados em comparação com os reatores abertos, além do que há aquecimento do sistema (Chisti, 2007). A maior parte dos fotobioreatores fechados para cultivo de microalgas são formados por tubos transparentes de diferentes formas, tamanhos e comprimentos, além de materiais transparentes utilizados para

permitir a entrada de luz (Pulz, 2001). A escolha do sistema de cultivo dependerá da aplicação da biomassa, da microalga em questão, dos recursos disponíveis e das condições ambientais.

Considerando as condições ambientais no cultivo de microalgas em escala ampliada, os dois principais fatores que também podem controlar a produtividade das microalgas ao ar livre são a intensidade luminosa e a temperatura (Richmond, 1992). Fora das condições ótimas, as flutuações nesses parâmetros podem afetar as condições de crescimento das microalgas e, conseqüentemente, sua produção (Ras et al., 2013); ao longo de um período de 24 horas, esses fatores mudam dinamicamente (Borowitzka, 2016).

A luz é essencial para a fotossíntese das microalgas, portanto, é fundamental controlar sua intensidade no cultivo em larga escala (Borowitzka, 2016). De acordo com o autor, a luz pode flutuar ao longo do dia e entre as estações do ano, e, além disso, fatores como a densidade e profundidade do cultivo, frequência e duração da agitação, além de outros parâmetros podem afetar a intensidade e quantidade de luz recebida no cultivo. É importante também controlar a temperatura, que deve ser mantida dentro de uma faixa ótima para cada espécie de microalga, pois ela afeta a taxa de crescimento, a produtividade e a composição da biomassa microalgal (Ras et al., 2013). A temperatura pode ser controlada por meio de tecnologias de aquecimento e resfriamento, como termostatos e climatizadores, além da escolha do local de cultivo que também exerce influência na temperatura.

Por fim, apesar do mercado crescente, ainda há obstáculos a serem superados no cultivo de microalgas em larga escala, o que faz com que a exploração comercial ainda seja limitada a poucas espécies de microalgas, conforme Tabela 2. Diante disso, além das estratégias de cultivo, há também a necessidade da descoberta de novas cepas de microalgas que produzam compostos valiosos e que sejam economicamente viáveis (Mobin et al., 2017). Assim, a prospecção de cepas na busca por características que possam conferir robustez, como ser capaz de suportar variações das condições ambientais, aliadas à otimização e controle do cultivo, ainda é um objetivo a ser alcançado.

Tabela 2- Empresas produtoras de microalgas, país de produção, gênero de microalgas cultivadas, e seus principais produtos.

Empresa	País	Microalga (gênero)	Produto
Martek/Omegatech	EUA	<i>Cryptocodinium</i>	DHA
Cyanotech	EUA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina
MERA	EUA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina
OceanNutrition	Canadá	<i>Chlorella</i>	Extrato de carboidratos; biomassa
InnovalG	França	<i>Odontella</i>	EPA
Panmol/Madau	Áustria	<i>Spirulina</i>	Biomassa; Vitamina B ₁₂
Nutrinova/Celanese	Alemanha	<i>Ulkenia</i>	DHA
AlgaTech	Israel	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina

Fonte: Derner et al., 2006.

1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As microalgas possuem biomassa rica em bioprodutos com diversas aplicações comerciais, evidenciando seu grande potencial biotecnológico. Embora a produção de microalgas apresente vantagens como a plasticidade fisiológica e rápido crescimento, ainda enfrenta desafios e obstáculos que podem inviabilizar a ampliação de escala.

Os custos de produção são um dos principais entraves para a ampliação da escala do cultivo de microalgas. O meio de cultivo pode onerar o custo de produção em escala comercial e, por esta razão, busca-se encontrar um meio que seja econômico e ao mesmo tempo proporcione alto rendimento de biomassa. Além disso, a produção de microalgas pode ser limitada pelo rendimento de biomoléculas, o que pode encarecer ainda mais a sua produção. Nesse sentido, a manipulação bioquímica com NaCl pode ser uma estratégia viável para aumentar o acúmulo intracelular de algumas biomoléculas. Se ao utilizar-se de uma concentração do sal tal que aumente a produção de biomoléculas, mas não afete a capacidade de divisão celular, a taxa de crescimento populacional será mantida e biomassa com mais biomoléculas será gerada. Isso poderá melhorar a eficiência e alcançar a desejada viabilidade de produção. Ainda neste contexto, o uso de fontes de carbono orgânico, como o acetato de sódio, no caso de microalgas mixotróficas, pode ser vantajoso para aumentar a produção de biomassa e superar algumas limitações relacionadas aos cultivos densos, como a baixa

disponibilidade de luz. Nesse caso, o acetato de sódio pode fornecer uma fonte adicional de energia para o crescimento dessas microalgas, o carbono orgânico.

Este doutorado teve como objetivo central o de estudar fisiologicamente microalgas Chlorophyceae cultivadas em escala ampliada (200 L) e propor uma estratégia de manipulação que possa contribuir com o setor biotecnológico no cultivo de microalgas. Assim, os resultados aqui apresentados irão ajudar na melhora da viabilidade da produção de microalgas em escala ampliada. Para isso, realizou-se estudo fisiológico de duas microalgas Chlorophyceae em escalas laboratorial (condições ambientais controladas) e ampliada (200 L, condições ambientais semi-controladas em estufa agrícola). Contudo, cabe destacar que ainda são necessárias mais pesquisas para os superar as limitações e tornar a produção de microalgas economicamente viável para um maior número de cepas.

1.2 REFERÊNCIAS

- ACIÉN, F.G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G.C.; SEPÖLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. Photobioreactors for the production of microalgae. **Microalgae-Based Biofuels And Bioproducts**, [S. l.], p. 1-44, 2017.
- AGBEBI, Tolulope V.; OJO, Ebenezer O.; WATSON, Ian A. Towards optimal inorganic carbon delivery to microalgae culture. **Algal Research**, [S. l.], v. 67, p. 102841, 2022.
- BARONE, PUGLISI, I.; FRAGALÀ, F.; PIERO, A. R. L.; GIUFFRIDA, F.; BAGLIERI, A. Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. **Journal of applied phycology**, v. 31, p. 465-470, 2019.
- BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [S. l.], v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Algal Physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. Em: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing. p. 601–652, 2016.
- BENEMANN, John. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 5869-5886, 2013.
- CAMPENNI', L.; NOBRE, B. P.; SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, A. C.; AIRES-BARROS, M. R.; PALAVRA, A. M. F.; GOUVEIA, L.. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 1383-1393, 2012
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHOKSHI, Kaumeel; PANCHI, Imran; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 244, p. 1376-1383, 2017.

CRUZ, R.V. A. **Estudo da utilização de microalgas e cianobactérias para a captura de dióxido de carbono e produção de matérias primas de interesse industrial**. 2011. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

ELLOUMI, Wiem; JEBALI, Ahlem; MAALEJ, Amina; CHAMKHA, Mohamed; SAYADI, Sami. Effect of Mild Salinity Stress on the Growth, Fatty Acid and Carotenoid Compositions, and Biological Activities of the Thermal Freshwater Microalgae *Scenedesmus* sp. **Biomolecules**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1515, 6 nov. 2020.

FAL, Soufiane; AASFAR, Abderahim; RABIE, Reda; *et al.* Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Heliyon**, v. 8, n. 1, p. e08811, 2022.

GONG, Yangmin; JIANG, Mulan. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1269-1284, 2011.

GOUVEIA, Luisa; OLIVEIRA, Ana Cristina. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 269-274, 4 nov. 2008

GRIFFITHS, Melinda J.; HARRISON, Susan T. L.. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal Of Applied Phycology**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.

GUEDES, Ana Catarina; AMARO, Helena M.; MALCATA, Francisco Xavier. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 625-644, 20 abr. 2011.

HU, Qiang. Environmental effects on cell composition. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**, p. 114-122, 2013.

KHAN, Muhammad Imran; SHIN, Jin Hyuk; KIM, Jong Deog. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 2018.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, N. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, n. 4, p. 28-34, 2011.

KOLEY, Shankha; SONKAR, Sashi; BAGCHI, Sourav Kumar; PATNAIK, Reeza; MALLICK, Nirupama. Development of a low-cost cultivation medium for simultaneous production of biodiesel and bio-crude from the chlorophycean microalga *Tetradismus obliquus*: a renewable energy prospective. **Journal Of Cleaner Production**, [S. l.], v. 364, p. 132658, 2022.

LEE, Yuan-Kun. [No title found]. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine ecology progress series. Oldendorf**, v. 77, n. 1, p. 39-47, 1991.

MARKOU, Giorgos; VANDAMME, Dries; MUYLAERT, Koenraad. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. **Water Research**, [S. l.], v. 65, p. 186-202, 2014.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MINHAS, Amritpreet K.; HODGSON, Peter; BARROW, Colin J.; *et al.* A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Mobin, S.; Alam, F. (2017). Some promising microalgal species for commercial applications: a review. **Energy Procedia**, 110, p.510-517.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, [S. l.], v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.

PANAHI, Yunes; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari; SAHEBKAR, Amirhossein; HEIDARI, Hamid Reza. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 182-194, 2019.

PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MAURYA, Rahulkumar; TRIVEDI, Khanjan; PATIDAR, Shailesh Kumar; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 189, p. 341-348, 2015.

PANDIT, Priti Raj; FULEKAR, Madhusudan H.; KARUNA, Mallampalli Sri Lakshmi. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science And Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 15, p. 13437-13451, 2017.

PEREZ-GARCIA, Octavio; ESCALANTE, Froylan M.e.; DE-BASHAN, Luz E.; BASHAN, Yoav. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 287–293, 2001.

RAS, Monique; STEYER, Jean-Philippe; BERNARD, Olivier. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 153–164, 2013.

SALAMA, El-Sayed; KIM, Hyun-Chul; ABOU-SHANAB, Reda A. I.; JI, Min-Kyu; OH, You-Kwan; KIM, Seong-Heon; JEON, Byong-Hun. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 827-833, 2013.

SÁNCHEZ, Sebastián; MARTÍNEZ, Mæugenia; ESPINOLA, Francisco. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 13-18, 2000.

SHETTY, Prateek; GITAU, Margaret Mukami; MARÓTI, Gergely. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1657, 2019.

SMITH, Richard T.; BANGERT, Krys; WILKINSON, Stephen J.; GILMOUR, D. James. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 82, p. 73-86, 2015.

WEN, Xiaobin; TAO, Huanping; PENG, Xinan; *et al.* Sequential phototrophic–mixotrophic cultivation of oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1 in a 1000 m² open raceway pond. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 27, 2019.

XU, Ling; WEATHERS, Pamela J.; XIONG, Xue-Rong; *et al.* Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178-189, 2009.

YAAKOB, Maizatul Azrina; MOHAMED, Radin Maya Saphira Radin; AL-GHEETHI, Adel; GOKARE, Ravishankar Aswathnarayana; AMBATI, Ranga Rao. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: an overview. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 393, 2021.

YUN, Chol-Jin; HWANG, Kum-Ok; HAN, Song-Su; RI, Hyong-Guan. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 127, p. 105277, 2019.

2. Capítulo 1 - Seleção do meio de cultura visando baixo custo e alto rendimento de biomassa.

RESUMO

A utilização de substratos alternativos de baixo custo como meio de cultivo é uma estratégia para reduzir o custo de produção de um sistema de cultivo de microalgas. No entanto, é importante considerar que a escolha do substrato deve levar em conta não apenas o seu custo, mas também sua capacidade de suportar o crescimento e a produção de biomassa das microalgas. Avaliamos como alternativa de substituição do meio sintético BG11, o uso da solução hidropônica, comumente utilizada na produção de hortaliças. Esta solução nutritiva é uma opção atrativa para o cultivo de microalgas, pois permite a redução do custo de produção, quando comparados com meios tradicionais já estabelecidos, tal qual o meio BG11. Considerando esse aspecto, foi testado, além do meio BG11, a solução hidropônica com sua composição ajustada buscando uma equivalência com meio BG11. Os resultados mostraram que, apesar de ter selecionado a modificação do meio hidropônico que resultou em maior taxa de crescimento dentre os hidropônicos, a concentração de carotenoides totais foi 2,2 vezes maior e a taxa de crescimento 1,3 vezes maior no meio BG11 do que no meio hidropônico modificado. Consequentemente, o meio BG11 suportou maior densidade celular nos cultivos. Portanto, o meio hidropônico modificado não agregou na produção de carotenoides totais e nem na densidade celular quando comparado ao meio BG11 na mesma condição de cultivo. É provável que isso tenha ocorrido devido ao valor nutritivo da solução hidropônica, incompleto às necessidades das células algais. Concluímos que o meio BG11 foi mais adequado para os estudos fisiológicos do que a solução hidropônica modificada, objetivo primário deste doutorado, independente da escala de cultivo.

Palavras-chave: hidropônico, microalga, meio sintético, carotenoides

2.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos que possuem algumas propriedades típicas de vegetais vasculares como, por exemplo, fotossíntese e exigências nutricionais simples. Simultaneamente a essas características, combinam-se de forma equilibrada atributos biotecnológicos próprios de microrganismos, como o rápido crescimento e a capacidade de acumular ou segregar metabólitos primários e secundários em sua biomassa (Guedes et al., 2011).

O grande potencial biotecnológico e importância comercial que as microalgas agregam deve-se, à sua diversidade bioquímica, plasticidade fisiológica e aplicações industriais dos produtos por elas sintetizados. Dentre a ampla gama de biomoléculas, destacam-se os polissacarídeos, lipídios poliinsaturados, pigmentos, proteínas, vitaminas, compostos bioativos e antioxidantes (Brennan et al., 2010). Com isso, são uma fonte rica de compostos de carbono, que podem ser utilizados como biocombustíveis, suplementos à saúde, produtos farmacêuticos e cosméticos, dentre outros (Das et al., 2011).

Além da produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de produzir compostos nutracêuticos (Gill et al., 1997; Tripathi et al., 1999), sendo capazes de inativar radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Podemos citar como exemplo, os carotenoides, que exercem importantes funções nas microalgas, sendo elas uma fonte natural desse composto (Guedes et al., 2011). Semelhante às funções protetoras que os carotenoides desempenham nas microalgas e vegetais vasculares, esses pigmentos fornecem um papel protetor para os seres humanos. Assim, as microalgas em geral têm potencial para servir como um *pool* natural de compostos bioquímicos associados à saúde humana (Gong et al., 2016). Entretanto, a produção de microalgas ainda enfrenta o problema de alto custo, o que muitas vezes inviabiliza a produção comercial. De acordo com Cruz (2011), os gastos com nutrientes, o custo de energia, o fornecimento de CO₂, além do custo de manutenção são predominantes. De acordo com o autor, os fatores mais importantes para o sucesso econômico consistem na redução de custos de produção, aumento do rendimento de biomassa e valor dos produtos. O meio de cultivo impacta no custo de produção das microalgas. Segundo Koley et al. (2022), os nutrientes presentes no meio de cultivo, como os sais inorgânicos, desempenham papel fundamental na produção de biomassa de alta densidade, no entanto, substituí-los seria o primeiro passo para redução de custos. É importante destacar que os sais inorgânicos usados na

preparação de vários meios de crescimento para o cultivo de microalgas são geralmente sais inorgânicos de grau analítico, o que aumenta o custo da produção da biomassa.

Uma estratégia para diminuir o custo de produção de um sistema de cultivo de microalgas é a utilização de substratos de baixo custo, como fertilizantes baratos (Lee, 2001; Mata et al., 2010; Gong et al., 2011; Barone et al., 2019). Porém, a seleção do meio de cultivo é de extrema importância para a produção de microalgas. Meio nutritivo inadequado pode afetar a taxa de crescimento e a composição bioquímica das células (Sánchez et al., 2000). O rendimento celular e a composição bioquímica dependem fortemente do meio de cultivo e do perfil nutricional de cada espécie de microalga (Panahi et al., 2019).

Assim, iniciamos o presente estudo buscando substituir o meio BG11 (alta qualidade, mas alto custo) por solução hidropônica, comumente utilizada na produção de hortaliças. Esta solução nutritiva é conhecida também como solução de Hoagland e é uma opção atrativa para o cultivo de microalgas, pois permite a redução do custo de produção quando comparados com meios tradicionais e já estabelecidos como o meio BG11. O meio BG11 (Rippka et al., 1979) suporta o crescimento da maioria das espécies algais. Com base nisso, foi realizada uma pesquisa para formular um meio de cultivo de baixo custo que não comprometesse os valores nutricionais e a densidade da biomassa microalgal.

2.2 OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivo ajustar as concentrações de nutrientes, principalmente o nitrogênio, de uma solução hidropônica comercial com base no meio BG11. Buscou-se criar um meio alternativo de baixo custo que pudesse produzir uma alta densidade celular e rendimento de carotenoides totais, sempre comparando ao meio BG11.

Objetivos Específicos

- Analisar as diferentes combinações de meio hidropônico geradas com base na taxa de crescimento e comparar com o meio BG11;
- Selecionar o meio modificado que apresentar maior taxa de crescimento e realizar a aclimação celular ao novo meio;

- Após a aclimação, avaliar o crescimento e produção de carotenoides em comparação com o meio BG11.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas

Chlorella sorokiniana (211-32) foi obtida do Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese (IBVF), da Universidade de Sevilla, Espanha. As culturas foram mantidas em meio BG11 (Rippka et al., 1979), sob condições controladas de intensidade luminosa ($260 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e temperatura ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). A intensidade luminosa foi previamente verificada por meio de curvas rápidas de luz (RLC) de acordo com o descrito em Camargo et al. (2021).

Tendo-se como referência o meio nutritivo BG11 (Tabela 2), um estudo preliminar foi conduzido ajustando-se as concentrações de nitrogênio, (Tabela 1) da solução hidropônica comercial de Hoagland e Arnon (1950), adaptada por Camargo et al. (2015). Em alguns casos os micronutrientes (KCS Mix) da solução hidropônica foram substituídos por soluções do meio de referência e bicarbonato de sódio foi adicionado como fonte de carbono em algumas combinações. Isto gerou 20 diferentes novos meios, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 1- Concentração em mol L⁻¹ dos componentes da solução hidropônica comercial.

Componentes	Concentração (mol L ⁻¹)
Rexolim M48 (Fe EddHMa) Yara	$2,3 \times 10^{-5}$
Calcinit (Nitrato de Cálcio)	$3,9 \times 10^{-3}$
Crista K (Nitrato de Potássio)	$3,96 \times 10^{-3}$
Sulfato de Magnésio	$2,82 \times 10^{-3}$
Crista MAP (Fosfato monoamônio)	$6,95 \times 10^{-4}$
KSC mix Roullier (micronutrientes)	$6,15 \times 10^{-6}$

Tabela 2- Composição do meio BG11.

Componentes	Concentração Final (mol L⁻¹)
Ácido cítrico	3,12x10 ⁻⁵
Citrato amônio férrico	3x10 ⁻⁵
NaNO ₃	1,76x10 ⁻²
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	1,75x10 ⁻⁴
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,04x10 ⁻⁴
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,45x10 ⁻⁴
Na ₂ CO ₃	1,89x10 ⁻⁴
MgNa ₂ EDTA . H ₂ O	2,79x10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	4,63x10 ⁻⁵
MnCl ₂ . 4H ₂ O	9,15x10 ⁻⁶
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	7,65x10 ⁻⁷
CuSO ₄ . 5H ₂ O	3,16x10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,61x10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	1,7x10 ⁻⁷

Fonte: Rippka et al. (1979).

A espécie *C. sorokiniana* foi considerada como modelo biológico de referência em termos de crescimento, produção de pigmentos e acúmulo de biomoléculas, devido ser este organismo amplamente estudado e relatado na literatura. Portanto, os meios modificados foram testados com *C. sorokiniana*.

Todos os inóculos são oriundos de cultura em fase exponencial de crescimento. Foram transferidas alíquotas de 300 µL dos diferentes meios hidropônicos modificados com uma concentração inicial de 10⁵ células mL⁻¹, em placas de 96 poços. As placas foram submetidas à 260 µmol fotons m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, com fotoperíodo 12 h claro:12 h escuro e temperatura de 25 ± 1 °C, por 96 horas. Foram feitas medições diárias de absorbância em 684 nm usando-se um leitor de placas (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, U.S.A.) e determinada a taxa de crescimento (d⁻¹). As placas foram cobertas com Parafilm®, com o intuito de reduzir a evaporação.

Tabela 3- Meios nutritivos testados. Valores referem-se à concentração dos reagentes (mol L^{-1}). BG11 Micro refere-se à solução de micronutrientes usada no meio BG11. Onde se apresenta (*), significa que aquele reagente não foi adicionado ao meio.

Meio	Fe EddHMa	(CaNO ₃) ₂	KNO ₃	MgSO ₄	(NH ₄)H ₂ PO ₄	KSC MIX	BG11 Micro	NaHCO ₃
1	3x10 ⁻⁵	7,47x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	*
2	3x10 ⁻⁵	7,47x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	*
3	3x10 ⁻⁵	7,47x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	1,89x10 ⁻⁴
4	3x10 ⁻⁵	7,47x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	1,89x10 ⁻⁴
5	3x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻³	6,3x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	*
6	3x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻³	6,3x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	*
7	3x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻³	6,3x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	1,89x10 ⁻⁴
8	3x10 ⁻⁵	6,3x10 ⁻³	6,3x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	1,89x10 ⁻⁴
9	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	1,14x10 ⁻²	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	*
10	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	1,14x10 ⁻²	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	1,89x10 ⁻⁴
11	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	1,14x10 ⁻²	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	*
12	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	1,14x10 ⁻²	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	1,89x10 ⁻⁴
13	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	*
14	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	1,89x10 ⁻⁴
15	3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	1,89x10 ⁻⁴
16	2,3x10 ⁻⁵	3,9x10 ⁻³	3,96x10 ⁻³	3,04x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	6,15x10 ⁻⁶	*	*
17	4,6x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻³	7,92x10 ⁻³	6,08x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁵	*	*
18	4,6x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻³	7,92x10 ⁻³	6,08x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁵	*	1,89x10 ⁻⁴
19	4,6x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻³	7,92x10 ⁻³	6,08x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	*
20	4,6x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻³	7,2x10 ⁻³	6,08x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻⁴	*	1mL	1,89x10 ⁻⁴

Selecionado o meio, *C. sorokiniana* foi aclimatada ao meio hidropônico modificado através de repiques sucessivos, em Erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de meio de cultivo e 10⁵ células mL⁻¹. Após o último repique, foi avaliada a taxa de crescimento (d⁻¹), a densidade celular, além do rendimento de carotenoides em 72 horas, tanto no meio BG11, como no hidropônico modificado, sempre nas mesmas condições experimentais. A aclimação celular

é importante pois as células carregam consigo a composição do meio de cultura, além de nutrientes presentes no meio anteriormente usado. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Parâmetros da fotossíntese e crescimento

O monitoramento das culturas foi feito diariamente através da contagem do número de células (densidade populacional) utilizando-se um citômetro de fluxo Muse Cell Analyzer (Millipore, U.S.A.), que possui como base de quantificação a fluorescência natural da clorofila *a*.

As taxas de crescimento específicas máxima foram obtidas utilizando-se os valores de células mL⁻¹ por meio de ajuste por regressão linear para a fase exponencial de crescimento, plotando-se o logaritmo natural (Ln) da densidade populacional *versus* o tempo (horas). A inclinação da reta (vezes 24 h para obtermos o resultado por dia) foi considerada como uma representação da taxa de crescimento específica para a fase exponencial.

Pigmentos na biomassa

Clorofila *a* e carotenoides totais foram determinados de acordo com Wellburn (1994), método espectrofotométrico que tem como base a extração dos pigmentos no solvente orgânico dimetilsufóxido. Após extração, a solução foi mensurada nos comprimentos de onda de 665 (A₆₆₅), 649 (A₆₄₉) e 480 (A₄₈₀) nm. A concentração dos pigmentos, dada em mg L⁻¹ de clorofila *a* (Ca), clorofila *b* (Cb) e carotenoides totais (CT) no extrato, foi calculada com base nas Equações 1, 2 e 3 apresentas a seguir.

$$Ca = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad Eq. 1$$

$$Cb = 25,06 \cdot A_{649} - 6,5 \cdot A_{665} \quad Eq. 2$$

$$CT = [(1000 \cdot A_{480}) - (1,29 \cdot Ca) - (53,78 \cdot Cb)] / 220 \quad Eq. 3$$

Análise dos resultados

Os resultados foram comparados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% para avaliar diferenças significativas entre o tratamento e o controle, usando-se o programa Minitab 17.

2.4 RESULTADOS

A Figura 1 mostra as taxas de crescimento de *C. sorokiniana* em cada meio nutritivo, inclusive no meio BG11 (número 21 no eixo X). O meio hidropônico número 8, cuja composição é descrita na Tabela 3, foi superior aos demais ($p < 0,05$) com taxa de crescimento de $1,72 \text{ d}^{-1}$, já no meio de referência (BG11) a taxa de crescimento foi de $1,25 \text{ d}^{-1}$.

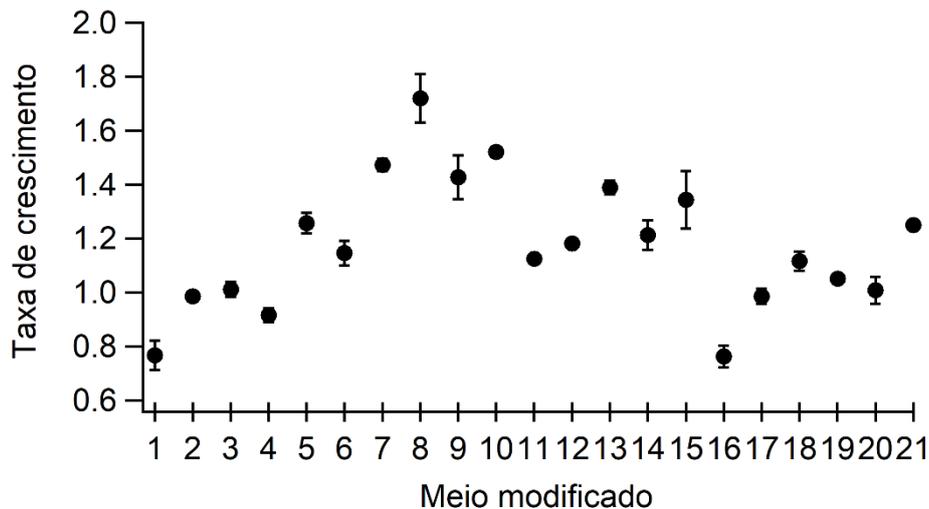


Figura 1- Valores médios e desvio padrão ($n=3$) das taxas de crescimento máximas (d^{-1}) para cada meio testado em função dos meios de cultura mostrados na Tabela 3. O número 21 corresponde ao meio de referência – BG11.

A Figura 2 mostra a taxa de crescimento máxima (d^{-1}) de repiques sucessivos com o intuito de aclimatar as células algais ao novo meio selecionado. Nota-se que há uma tendência de estabilização das taxas após os repiques. Para o meio hidropônico modificado (número 8), as taxas de crescimento foram próximas a $0,8 \text{ d}^{-1}$, com exceção do primeiro repique. Já para o meio BG11 foi próxima de $1,0 \text{ d}^{-1}$, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) ao meio hidropônico. Os testes em placas de 96 poços são uma indicação de viabilidade de cultivo nas

condições testadas, mas dado ao volume pequeno (300 μL), a ampliação foi necessária, assim como a aclimatação. Após aclimatadas, observamos que o crescimento celular foi diferente, e menor, ao observado nas placas de 96 poços.

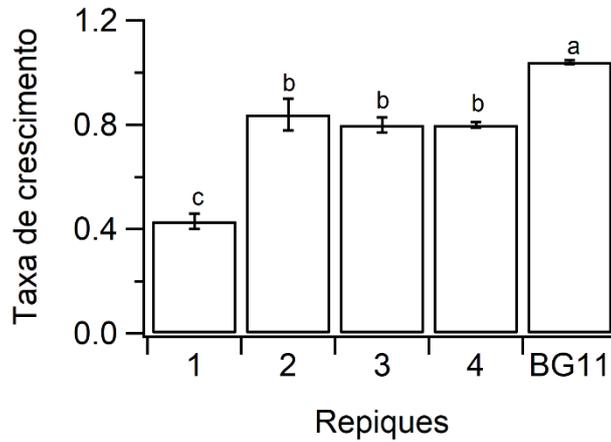


Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) dos repiques para aclimatação da *C. sorokiniana* ao meio selecionado. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

A Figura 3 mostra as curvas de crescimento do meio BG11 e do último repique de aclimatação em meio hidropônico modificado. Observa-se que o crescimento da microalga *C. sorokiniana* no meio hidropônico modificado foi menor em comparação com o meio BG11. Em 72h, o meio BG11 suportou cerca de 2,7 vezes mais células do que o meio hidropônico modificado e, em 96h, a diferença foi de aproximadamente 4 vezes mais células.

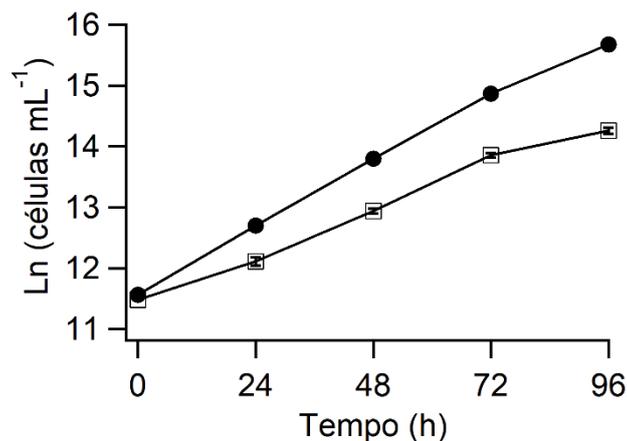


Figura 3- Curva de crescimento do último do repique para aclimatação de *C. sorokiniana* ao meio selecionado e em meio BG11. Símbolos: círculo fechado, meio BG11e, quadrado aberto, meio hidropônico modificado. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

A Figura 4 mostra a concentração de carotenoides totais. É possível notar que a concentração de carotenoides totais foi 2,2 vezes maior no meio BG11 do que no meio hidropônico modificado previamente selecionado.

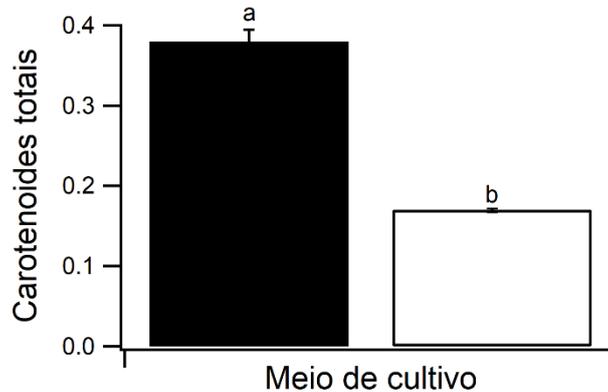


Figura 4- Carotenoides totais (mg L⁻¹) em 72 horas. Símbolos da barra: preta, controle BG11 e branca, hidropônico modificado. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

2.5 DISCUSSÃO

Com base nos nossos resultados, o meio hidropônico modificado não supriu todas as necessidades nutricionais requeridas pela microalga *C. sorokiniana*. Estudos anteriores, como o de Bertoldi et al. (2008), mostram uma densidade celular 2 vezes menor em solução hidropônica em comparação com meio sintético BBM. Os autores usaram a microalga *Chlorella vulgaris* como organismo teste. Montanhim (2013), em culturas de *Selenastrum capricornutum* obteve densidade celular e taxa de crescimento semelhantes entre os meios hidropônico e L.C. Oligo. De acordo com Candido (2015), o meio L.C. Oligo é relativamente pobre em nutrientes quando comparado ao BG11. O autor mostrou que o meio BG11 propiciou maior rendimento celular de *Chlorella vulgaris* do que o meio L.C. Oligo. Sabe-se que o crescimento e produtividade das microalgas podem ser afetados pela composição do meio de cultivo, uma vez que as microalgas possuem requisitos nutricionais específicos que devem ser atendidos para um crescimento eficiente (Panahi et al., 2019). Portanto, o efeito da composição

de diferentes meios no crescimento das microalgas pode ser espécie específico, ainda que um meio rico em nutrientes possa ser capaz de suportar muitas espécies de microalgas.

Embora haja uma quantidade significativa na literatura sobre o co-cultivo de microalgas e plantas em meio hidropônico, poucos estudos investigaram especificamente os efeitos isolados do meio hidropônico no crescimento das microalgas. Esses estudos têm se concentrado principalmente em promover a sinergia entre as plantas e microalgas para aumentar a produtividade das plantas e reduzir a carga residual de nutrientes presentes no meio hidropônico (Camargo et al., 2015; Zhang et al., 2017; Barone et al., 2019; Huo et al., 2020; Salazar et al., 2021, Žunić et al., 2022).

Além disso, é importante notar que o meio hidropônico possui em sua composição um composto férrico que apresenta coloração rosa avermelhada. Vários estudos sugerem que o crescimento de microalgas é diferente dependendo do comprimento de onda da luz (Kim et al., 2013), portanto, a cor do meio de cultivo pode influenciar a quantidade e qualidade de luz que as células receberam, o que pode ter afetado a fotossíntese e o crescimento de *C. sorokiniana* neste estudo. Por exemplo, sabe-se que a luz vermelha (600–700 nm) e a luz azul (400–500 nm) estimulam o crescimento populacional de microalgas e, portanto, suas taxas de crescimento (Chen et al., 2011; Cheirsilp; Torpee, 2012; Wang et al., 2007; Das et al., 2011; Kim et al., 2013; Baidya et al. 2021).

2.6 CONCLUSÃO

O meio hidropônico modificado foi inferior ao meio BG11 quanto à produção de carotenoides totais e da densidade celular, por isso optamos pelo meio BG11 para prosseguir com os demais experimentos deste estudo.

2.7 REFERÊNCIAS

ABALDE, Julio; CID, Ángeles; FIDALGO PAREDES, Pablo; *et al.* **Microalgas: cultivo y aplicaciones.** [S. l.]: Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións, 1995.

- BAIDYA, Arpan; AKTER, Taslima; ISLAM, Md. Rabiul; *et al.* Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. **Heliyon**, v. 7, n. 12, p. e08525, 2021.
- BARONE, PUGLISI, I.; FRAGALÀ, F.; PIERO, A. R. L.; GIUFFRIDA, F.; BAGLIERI, A. Novel bioprocess for the cultivation of microalgae in hydroponic growing system of tomato plants. **Journal of applied phycology**, v. 31, p. 465-470, 2019.
- BERTOLDI, Fabiano Cleber; SANT'ANNA, Ernani; OLIVEIRA, Jorge Luiz Barcelos. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 54-58, 2008.
- BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- CAMARGO, Eduardo Caffagni de. **Estudo da fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e fotossíntese em 30 espécies de microalgas verdes de água doce**. 2020. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.
- CANDIDO, Camila. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas : uma abordagem ecofisiológica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- CHEIRSILP, Benjamas; TORPEE, Salwa. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 110, p. 510-516, 2012.
- CHEN, Chun-Yen; YEH, Kuei-Ling; AISYAH, Rifka; LEE, Duu-Jong; CHANG, Jo-Shu. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.
- CRUZ, Rui Vogt Alves. **Estudo da utilização de microalgas e cianobactérias para a captura de dióxido de carbono e produção de matérias primas de interesse industrial**. 2011; Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- DAS, Probir; LEI, Wang; AZIZ, Siti Sarah; OBBARD, Jeffrey Philip. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 3883-3887, 2011.
- GILL, I; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends In Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 401-409, 1997.
- GONG, Mengyue; BASSI, Amarjeet. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1396-1412, 2016.
- GONG, Yangmin; JIANG, Mulan. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1269-1284, 2011.
- GUEDES, Ana Catarina; AMARO, Helena M.; MALCATA, Francisco Xavier. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 625-644, 20 abr. 2011.

- HUO, Shuhao; LIU, Junzhi; ADDY, Min; *et al.* The influence of microalgae on vegetable production and nutrient removal in greenhouse hydroponics. **Journal of Cleaner Production**, v. 243, p. 118563, 2020.
- KIM, Tae-Hyeong; LEE, Yunhee; HAN, Su-Hyun; HWANG, Sun-Jin. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 130, p. 75-80, 2013.
- KOLEY, Shankha; SONKAR, Sashi; BAGCHI, Sourav Kumar; PATNAIK, Reeza; MALLICK, Nirupama. Development of a low-cost cultivation medium for simultaneous production of biodiesel and bio-crude from the chlorophycean microalga *Tetradesmus obliquus*: a renewable energy prospective. **Journal Of Cleaner Production**, [S. l.], v. 364, p. 132658, 2022.
- LEE, Yuan-Kun. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.
- MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S.. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.
- MONTHANHIM, Graziela Cristina. **Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Bowdichia virgilioides* Kunth**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- OLAIZOLA, Miguel. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, [S. l.], v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003.
- PANAHI, Yunes; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari; SAHEBKAR, Amirhossein; HEIDARI, Hamid Reza. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 182-194, 2019.
- RIPPKA, Rosmarie *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.
- SALAZAR, João; VALEV, Dimitar; NÄKKILÄ, Juha; TYYSTJÄRVI, Esa; SIRIN, Sema; ALLAHVERDIYEVA, Yagut. Nutrient removal from hydroponic effluent by Nordic microalgae: from screening to a greenhouse photobioreactor operation. **Algal Research**, [S. l.], v. 55, p. 102247, 2021.
- SÁNCHEZ, Sebastián; MARTÍNEZ, Mæugenia; ESPINOLA, Francisco. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 13-18, 2000.
- WANG, Chih Yu; FU, Chun Chong; LIU, Yung Chuan. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 21–25, 2007.
- WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

ZHANG, Jing; WANG, Xinjie; ZHOU, Qifa. Co-cultivation of *Chlorella* spp and tomato in a hydroponic system. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 97, p. 132-138, 2017.

ŽUNIĆ, Vladimira; JAFARI, Timea Hajnal; GRABIĆ, Jasna; *et al.* Hydroponic systems: exploring the balance between co-cultivation of *Chlorella vulgaris* and Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*). **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 2, p. 903–913, 2022.

3. Capítulo 2. Uso do NaCl na manipulação bioquímica de *C. sorokiniana* e *C. lunulatum*

RESUMO

Microalgas são organismos com considerável potencial biotecnológico devido à sua capacidade de produzir biomoléculas que encontram aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Portanto, há um crescente interesse em novas microalgas e estratégias de cultivo que aumentem a produção de compostos valiosos. Neste estudo, nosso objetivo foi aumentar a produção de biomoléculas em *Chlorella sorokiniana* e *Chlorolobion lunulatum* sem afetar negativamente suas taxas de crescimento. Inicialmente, as microalgas foram expostas a uma ampla faixa de NaCl (0 - 20 g L⁻¹) e as concentrações que não influenciaram as taxas de crescimento (0 - 2 g L⁻¹) foram usadas para investigar o acúmulo de biomoléculas na biomassa. Os experimentos foram realizados sob condições controladas de laboratório e os resultados mostraram que *C. sorokiniana* exposta a 2 g L⁻¹ de NaCl produziu cerca de 5 vezes mais carotenoides totais do que *C. lunulatum* (0,11 mg L⁻¹) e ~ 70% a mais do que seu próprio controle (0,35 mg L⁻¹). No entanto, *C. lunulatum* produziu o dobro de lipídios (~ 30% da biomassa seca) em comparação com *C. sorokiniana*, mas nenhuma influência significativa do NaCl na produção dessa biomolécula, bem como em proteínas totais e carboidratos, foi detectada. O potencial antioxidante foi maior em *C. lunulatum* em comparação com *C. sorokiniana*. O conteúdo de polifenóis aumentou com o aumento da concentração de NaCl no meio em *C. lunulatum*. Esta pesquisa mostrou que um leve estresse de NaCl pode ser usado para estimular o acúmulo de biomoléculas específicas em *C. sorokiniana* e *C. lunulatum*, gerando assim uma biomassa rica em compostos. Sugerimos *C. lunulatum* como uma candidata promissora a ser explorada biotecnologicamente devido ao seu potencial antioxidante e alto conteúdo de lipídios.

Palavras-chave: carotenoides, polifenóis, biomoléculas, microalgas.

3.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos microscópicos, eucarióticos e fotoautotróficos que são predominantemente encontrados em ecossistemas aquáticos (Mobin et al., 2017). Elas têm despertado interesse devido ao seu grande potencial biotecnológico, que se deve à sua capacidade de crescer rapidamente e à diversidade bioquímica que apresentam, possibilitando a produção de diferentes biomoléculas. Essas biomoléculas e bioprodutos sintetizados pelas microalgas podem ser aplicados em diversos setores industriais, tais como farmacêutico, cosméticos e nutracêuticos (Borowitzka, 2013). Embora tenha-se um mercado crescente, poucas espécies foram até a presente data exploradas e caracterizadas para fins comerciais. Diante disso, há o crescente interesse na descoberta de novas microalgas e estratégias de cultivo que tornem a produção em maior quantidade de compostos valiosos economicamente viável (Mobin et al., 2017).

É bem evidenciado que induzir estresse em microalgas leva ao aumento de biomoléculas (Lombardi; Wangersky, 1991; Chia et al., 2013; 2015). Isso ocorre porque sua plasticidade fisiológica ativa vias metabólicas que levam a mudanças bioquímicas permitindo a adaptação a uma nova condição, um processo caracterizado como manipulação algal (Gong; Bassi, 2016). Expor microalgas a uma salinidade à qual elas não estão acostumadas pode ser usada como estratégia de manipulação. Isso se baseia na geração de problemas osmóticos (Shetty et al., 2019) e, em resposta, o organismo aumenta a síntese de biomoléculas específicas. Vários estudos relatam que o estresse salino tem o poder de aumentar a produção de lipídios e carotenoides em microalgas, e as espécies mais estudadas e comercialmente aplicadas são *Dunaliella* sp. (Cowan; Rose, 1991; Oren, 2005; Roy et al., 2021) e *Haematococcus pluvialis* (Boussiba et al., 1991; Kobayashi et al., 1997; Gao et al., 2015). Espécies de água doce, como *Chlamydomonas reinhardtii* (Fal et al., 2022), *Scenedesmus* sp. (Elloumi et al., 2020), *Chlorella vulgaris* (Yun et al., 2019) e *Acutodesmus dimorphus* (Chokshi et al., 2017), foram investigadas para o estresse salino, a fim de induzir a síntese de biomoléculas. Portanto, é uma estratégia promissora para manipular bioquimicamente microalgas e, como outras estratégias, as respostas podem ser específicas da espécie (Chia et al., 2013).

Apesar da grande diversidade de espécies presente no filo Chlorophyta, o cultivo em massa de microalgas desse grupo é ainda restrito a poucos gêneros, como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Tetraselmis* e *Haematococcus* (Mehariya et al., 2021). O foco das pesquisas atuais no gênero

Chlorella sp. com espécies como *C. vulgaris* e *C. sorokiniana* deve-se à excelente fonte de proteínas, carboidratos e lipídios, além do rápido crescimento e robustez, contribuindo positivamente com o escalonamento da produção (Belkoura et al., 1997; Illman et al., 2000; Gouveia et al., 2009; Lizzul et al., 2018).

Em um experimento de manipulação bioquímica com o micronutriente cobre como agente indutor de mudanças intracelulares, Baracho et al. (2019) mostraram que a microalga verde *Chlorolobion braunii* acumulou 4 vezes mais lipídios, sem ter tido um efeito negativo em sua taxa de crescimento. Portanto, os autores sugerem que esta espécie é promissora em termos de plasticidade fisiológica e manipulação para aumentar as biomoléculas. Até onde sabemos, não houve estudos sobre a manipulação bioquímica de *Chlorolobion lunulatum*, mas apenas sobre *C. braunii*, considerando o mesmo gênero. Combinando essa falta de informação e a importância de prospectar novas cepas de microalgas para potenciais biotecnológicos, investigamos *Chlorolobion lunulatum* e *Chlorella sorokiniana*. Enquanto *C. lunulatum* é uma cepa pouco conhecida, *C. sorokiniana* tem seu espaço no mercado e será usada aqui como organismo de referência.

Com isso, busca-se investigar a produção de biomoléculas em células de *C. lunulatum* e *C. sorokiniana*, duas microalgas verdes de água doce expostas a diferentes salinidades. Os resultados deste estudo contribuem para a literatura atual, mostrando a potencialidade de *C. lunulatum* para a produção de lipídios. Diferentemente da maioria dos dados da literatura, as concentrações de NaCl foram selecionadas de forma a não causar diminuição na taxa de crescimento, portanto, as algas foram submetidas a um estresse leve durante o crescimento exponencial.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo consistiu em desenvolver uma estratégia para aprimorar a produção e o acúmulo intracelular de biomoléculas em *C. sorokiniana* e *C. lunulatum*. Como estratégia, utilizamos o aumento da concentração salina no meio de cultura e o estímulo durante o crescimento exponencial, visando obter biomassa com maior acúmulo de biomoléculas.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl no crescimento populacional das microalgas *C. lunulatum* e *C. sorokiniana*;
- Definir faixa de concentração do NaCl que não ocasione alteração na taxa de crescimento e nem tampouco no rendimento final de biomassa;
- Determinar a concentração de proteínas totais, carboidratos totais, lipídios totais e de carotenoides totais;
- Determinar a atividade antioxidante das biomassas de *C. lunulatum* e *C. sorokiniana*.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas

A microalga *Chlorella sorokiniana* (211-32) foi obtida do Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese (IBVF, Universidad de Sevilla, Espanha) e *Chlorolobion lunulatum* (CCMA – UFSCar 500) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Inessa L. Bagatini, curadora da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. Neste estudo, a espécie *C. sorokiniana* foi considerada como modelo biológico de referência em termos de crescimento, produção de pigmentos e acúmulo de biomoléculas, devido ser este organismo amplamente estudado e relatado na literatura.

As culturas de manutenção e as experimentais foram mantidas em meio BG11 (Rippka et al., 1979) previamente autoclavado (Phoenix Luferco, Brasil) a 121 °C por 20 min. Condições controladas de intensidade luminosa ($260 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e temperatura ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) foram usadas nos experimentos laboratoriais. A intensidade luminosa ideal para as espécies foi previamente verificada por meio de curvas rápidas de luz (RLC) de acordo com o descrito em Camargo et al. (2021).

O agente usado para a manipulação bioquímica foi o cloreto de sódio (NaCl), adquirido da empresa LabSynth (Brasil). Inicialmente definiu-se a amplitude de concentrações do NaCl

que não influenciasse negativamente a taxa de crescimento das microalgas. Para esse experimento foram realizadas culturas de 50 mL com concentração de NaCl variando de 0 - 20 g L⁻¹ (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8;10; 15; 20 g L⁻¹), inoculadas com 10⁵ células mL⁻¹ de culturas em fase exponencial de crescimento. Dessas culturas, alíquotas de 300 µL (triplicatas) foram transferidas para poços em placas com 96 poços e cobertas com Parafilm® para reduzir evaporação. As placas foram incubadas por 96 h e iluminadas em sua base com intensidade luminosa de 260 µmol fotons m⁻² s⁻¹, mantidas em temperatura de 25 ± 1 °C e a absorvância (684 nm) foi determinada diariamente para acompanhar o crescimento populacional. Para isso usamos o espectrofotômetro leitor de placas (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, U.S.A.). O controle experimental constou de culturas sem adição de NaCl, pois as microalgas são oriundas de água doce. Deste experimento, sete concentrações de NaCl foram definidas (0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 e 2,00 g L⁻¹) para ambas as espécies (*C. lunulatum* e *C. sorokiniana*) para prosseguir ao experimento de manipulação bioquímica propriamente dito.

O experimento de manipulação bioquímica com as microalgas Chlorophyta *C. sorokiniana* e *C. lunulatum* teve a duração de 72 h. Os cultivos (800 mL) foram feitos em frascos de cultura de tecido com capacidade de 1 L posicionados verticalmente com iluminação lateral de 260 µmol fotons m⁻² s⁻¹ em ambiente com temperatura controlada (25 ± 1 °C). A intensidade luminosa foi medida dentro do cultivo e foi mantida constante durante todo o experimento por meio de medições diárias e reposicionamento dos frascos conforme aumento da densidade populacional da cultura. As culturas experimentais foram inoculadas com 10⁵ células mL⁻¹ oriundas de uma cultura em fase exponencial de crescimento. Como garantia de saúde celular do inóculo (Lombardi; Maldonado 2011), essa cultura teve o rendimento quântico máximo monitorado diariamente e o inóculo utilizado obteve o valor de 0,70 para *C. lunulatum* e 0,69 para *C. sorokiniana*. Os cultivos foram borbulhados com ar ambiente por meio de bombas de injeção de ar.

Parâmetros de fotossíntese e crescimento

O monitoramento das culturas foi feito diariamente através da contagem do número de células (densidade populacional) e viabilidade celular utilizando-se um citômetro do fluxo Muse Cell Analyzer (Millipore, U.S.A.), que possui como base de quantificação a fluorescência natural da clorofila *a*.

As taxas de crescimento específicas foram obtidas utilizando-se os valores de células mL⁻¹ por meio de ajuste por regressão linear para a fase exponencial de crescimento, plotando-se o logaritmo natural (Ln) da densidade populacional *versus* o tempo (horas). A inclinação da reta (vezes 24 h para obtermos o resultado por dia) foi considerada como uma representação da taxa de crescimento específica para a fase exponencial.

A biomassa seca foi mensurada em 72 h de cultivo (fase exponencial) utilizando-se uma balança micro analítica com 1 µg precisão (Mettler Toledo XPE26, Suíça). Para isso, filtros de acetato de celulose (Unifil - Brasil) foram previamente secos em estufa a 38 °C por 48 h. Esses filtros foram então usados para filtração de 10 mL de cultura. Os filtros contendo a biomassa algal foram secos em estufa a 38 °C até estabilização da massa, o que não excedia 72 h. Após secagem, os filtros foram transferidos para um dessecador até atingir temperatura ambiente e, finalmente, a massa dos filtros contendo a biomassa algal seca foi aferida. O valor de biomassa seca (mg L⁻¹) foi obtido subtraindo-se a massa do filtro previamente seco daquele contendo a biomassa algal seca.

Medidas de rendimento fotossintético quântico máximo PSII (Φ_M) foram feitas em amostras dos cultivos após aclimação no escuro por 15 minutos de acordo com a equação 1 (Lombardi; Maldonado 2011). Essas medidas foram usadas como parâmetro para avaliar o estado fisiológico das células, obtidas utilizando um fluorômetro Phyto-PAM (Heinz-Walz Effeltrich, Alemanha).

$$F_M - F_0 / F_M \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

F_M representa a fluorescência máxima e F_0 a fluorescência mínima

Biomoléculas na biomassa

A quantificação de proteínas totais foi feita por método espectrofométrico seguindo as especificações descritas em Slocombe et al. (2013), modificado. A amostra (10 mL) foi centrifugada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, EUA) por 20 min, a 20 °C, em 4400 rpm e ao *pellet* formado foi adicionado 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A modificação foi relativa à temperatura e tempo de incubação, que em nossa determinação foi

de 95 °C por 15 minutos. Isto foi necessário para conseguirmos proceder ao rompimento celular com maior eficiência.

A determinação de carboidratos totais foi feita de acordo com metodologia descrita em Albalasmeh et al. (2013), um método espectrofotométrico (Nanocolor Macherey-Nagal, Reino Unido) que é baseado na reação do ácido sulfúrico com a biomassa algal. A quantidade de amostra foi 30 mL e a solução reacional foi mensurada em 315 nm de comprimento de onda.

A determinação de lipídios totais baseou-se em método gravimétrico, onde 100 mL de cultura foi filtrado em membrana de fibra vidro (Macherey-Nagel – Alemanha), previamente muflada (400 °C por 8 h). A extração dos lipídios seguiu método proposto por Folch et al. (1957) com modificação por Parrish (1999) utilizando-se uma solução de clorofórmio:metanol (2:1). Após a extração, 400 µL do extrato foram transferidos para cadinhos de alumínio previamente muflados e com massa aferida em balança micro analítica com 1 µg de precisão (Mettler Toledo XPE26). As amostras nos cadinhos foram secas sob N₂ e conservadas em dessecador sob vácuo até estabilização da massa, o que não excedia 24 h. A quantificação dos lipídios totais foi realizada pela diferença entre as massas iniciais e finais dos cadinhos.

Clorofila *a* e carotenoides totais foram determinados de acordo com Wellburn (1994), método espectrofotométrico que tem como base a extração dos pigmentos no solvente orgânico dimetilsufóxido. Após extração, a solução foi mensurada nos comprimentos de onda de 665 (A₆₆₅), 649 (A₆₄₉) e 480 (A₄₈₀) nm. A concentração dos pigmentos, dada em mg L⁻¹ de clorofila *a* (Ca), clorofila *b* (Cb) e carotenoides totais (CT) no extrato, foi calculada com base nas Equações 2, 3 e 4 apresentas a seguir.

$$Ca = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad Eq. 2$$

$$Cb = 25,06 \cdot A_{649} - 6,5 \cdot A_{665} \quad Eq. 3$$

$$CT = [(1000 \cdot A_{480}) - (1,29 \cdot Ca) - (53,78 \cdot Cb)] / 220 \quad Eq. 4$$

As determinações da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos foram feitas em extratos etanólicos (etanol 70%) a partir de biomassa algal liofilizada. A atividade antioxidante foi determinada de acordo com metodologia descrita em Pires et al. (2017), adaptado para

microplacas de 96 poços. Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com metodologia proposta por Singleton e Rossi (1995), adaptado por Zhang (2006). Baseia-se em método espectrofotométrico e a solução foi mensurada em 750 nm de comprimento de onda.

Análise dos resultados

Os resultados foram comparados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos e controles usando-se o programa Minitab 17.

3.4 RESULTADOS

Com base no primeiro experimento, foi definida uma faixa de concentração de NaCl que não prejudicasse a taxa de crescimento e a biomassa final das microalgas. Na Figura 1, podemos observar que as taxas de crescimento (d^{-1}) diminuíram à medida que as concentrações de NaCl aumentaram acima de 2 g L^{-1} para ambas as microalgas, indicando que o estresse osmótico causado pelo excesso de sal pode ter sido a causa da diminuição na taxa de crescimento.

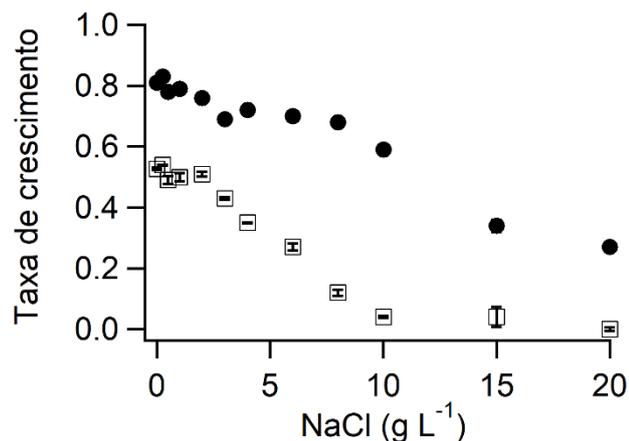


Figura 1- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) em função das diferentes concentrações de NaCl (g L^{-1}). Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

Na Figura 2 são apresentadas as taxas de crescimento (d^{-1}) obtidas para as algas durante o experimento de manipulação. *C. sorokiniana* apresentou, em geral, taxas de crescimento mais altas do que *C. lunulatum*. O controle de *C. sorokiniana* teve a maior taxa de crescimento ($1,46 d^{-1}$) entre todos os tratamentos.

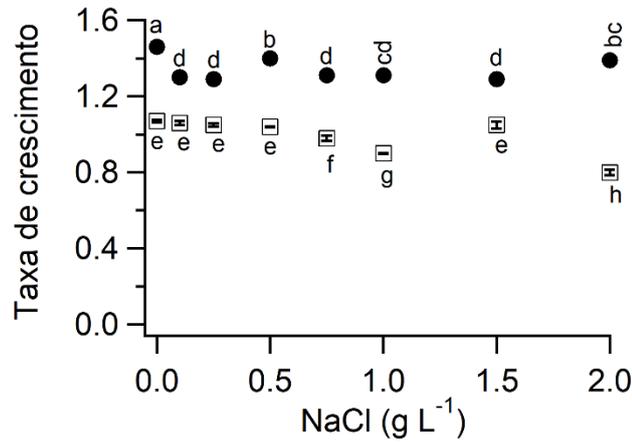


Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) em função das diferentes concentrações de NaCl ($g L^{-1}$). Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Cada ponto representa a média e desvio padrão ($n=3$), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

A Figura 3 apresenta os valores da biomassa seca, que variaram de 73 a 109 $mg L^{-1}$ para *C. sorokiniana* e de 40 a 54 $mg L^{-1}$ para *C. lunulatum*. Observamos que, apesar das variações observadas, as concentrações testadas de NaCl não impulsionaram a produção de biomassa, com as maiores biomassas para ambas as espécies sendo semelhantes aos controles respectivos ($p>0,05$).

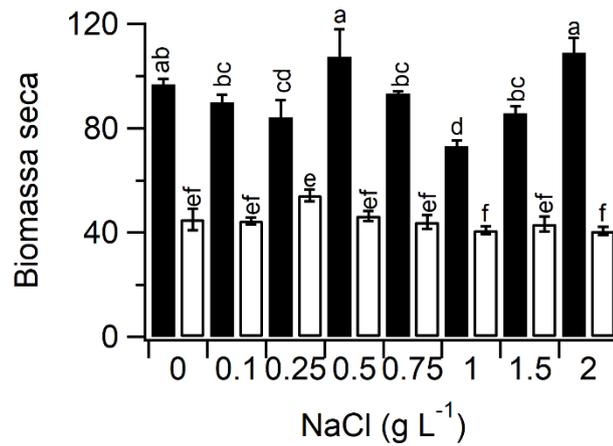


Figura 3- Biomassa seca (mg L⁻¹) em 72h m função das diferentes concentrações de NaCl (g L⁻¹). Símbolos: barra preta, *C. sorokiniana* e barra branca, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

A Figura 4 mostra a porcentagem de peso seco de proteínas (Figura 4A), carboidratos (Figura 4B) e lipídios (Figura 4C) em *C. sorokiniana* e *C. lunulatum*. Em geral, não foi observado nenhum efeito significativo do NaCl dentro de cada organismo, no entanto, foram detectadas diferenças importantes entre eles para carboidratos e lipídios. *C. lunulatum* produziu o dobro de carboidratos em comparação com *C. sorokiniana* em concentrações de NaCl de 0,5 g L⁻¹ e acima. Os lipídios foram duas vezes maiores em *C. lunulatum*, mas isso não foi um efeito do NaCl, uma vez que também estava presente no controle.

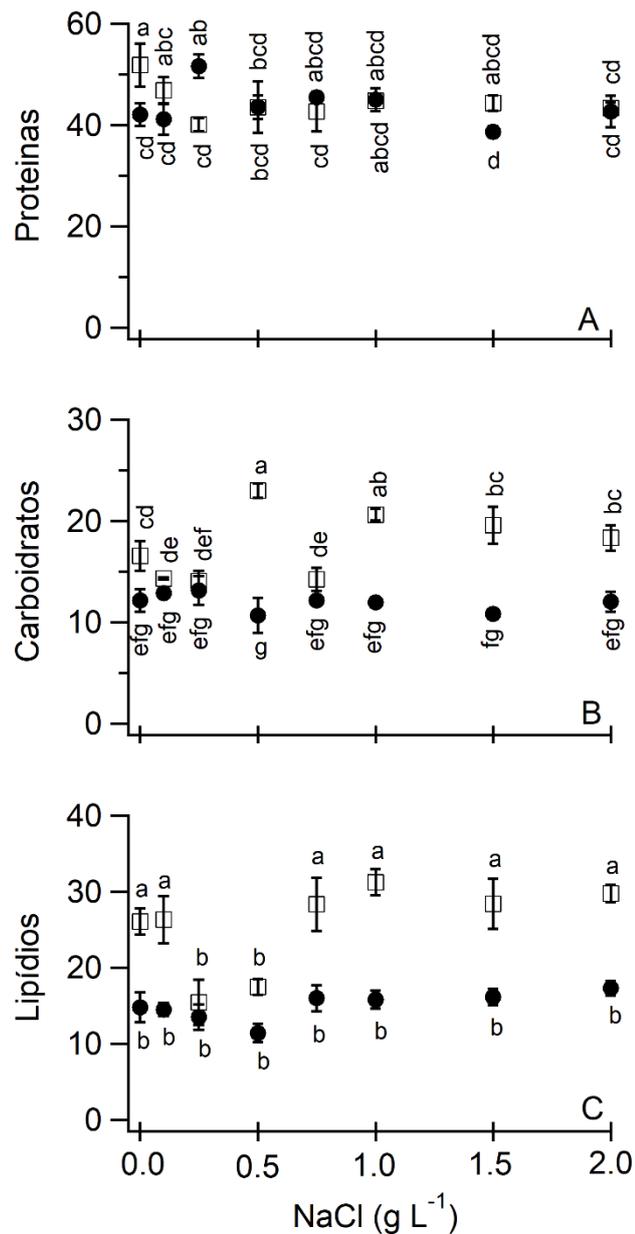


Figura 4- Biomoléculas totais. Proteínas, carboidratos e lipídios como porcentagem de peso seco na biomassa das microalgas em 72 horas. Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos em relação aos pigmentos clorofila *a* e carotenoides totais são mostrados na Figura 5 (Figura 5A conteúdo de clorofila *a*; Figura 5B carotenoides totais). Para as culturas de *C. sorokiniana*, foi detectado um aumento de 33% na clorofila *a* (2,85 mg L⁻¹) e 70% nos carotenoides totais (0,59 mg L⁻¹) a 2,0 g L⁻¹ de NaCl, mas esses pigmentos não mudaram significativamente em função do NaCl nas culturas de *C. lunulatum*. Em comparação

com *C. lunulatum*, *C. sorokiniana* produziu 2 vezes mais clorofila *a*, mas a 2 g L⁻¹ de NaCl, *C. sorokiniana* produziu 3,3 vezes mais clorofila *a* do que *C. lunulatum*.

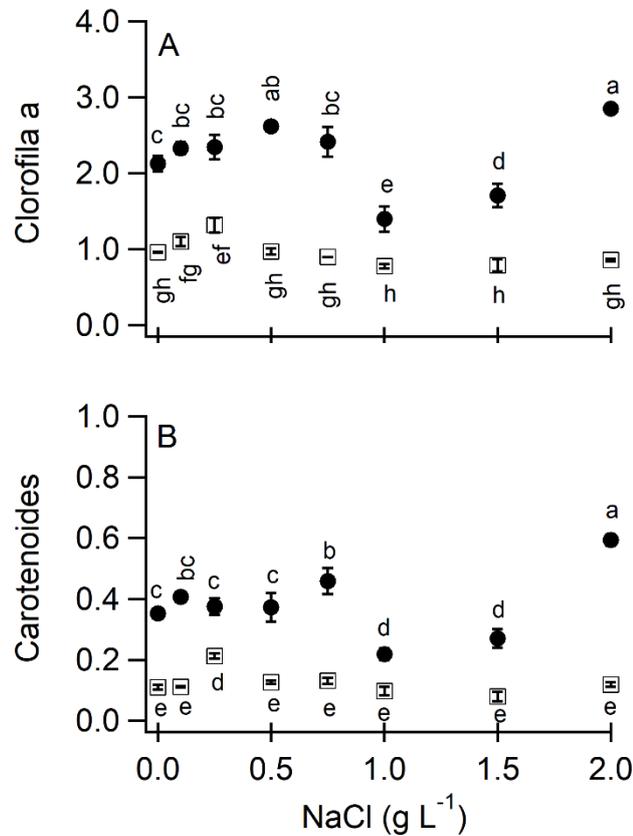


Figura 5- Pigmentos. Em A, clorofila *a* em mg L⁻¹ e em B, carotenoides totais em mg L⁻¹ em 72h de cultivo em função das diferentes concentrações de NaCl (g L⁻¹). Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

A Figura 6 mostra os resultados do potencial antioxidante (Figura 6A) e do teor de polifenóis (Figura 6B) para as duas microalgas em diferentes concentrações de NaCl. A exposição ao NaCl não contribuiu para aumentar o potencial antioxidante da biomassa de *C. sorokiniana*, que flutuou em torno de aproximadamente 15%, sem diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Por outro lado, *C. lunulatum* apresentou um potencial antioxidante 46% maior em 0,5 g L⁻¹ de NaCl em comparação com o controle. Além disso, *C. lunulatum* apresentou um potencial antioxidante cerca de duas vezes maior do que *C. sorokiniana*, mesmo considerando os controles. O conteúdo de polifenóis aumentou gradativamente com o aumento na concentração de NaCl no meio para *C. lunulatum*, porém o mesmo não ocorreu para a *C. sorokiniana*.

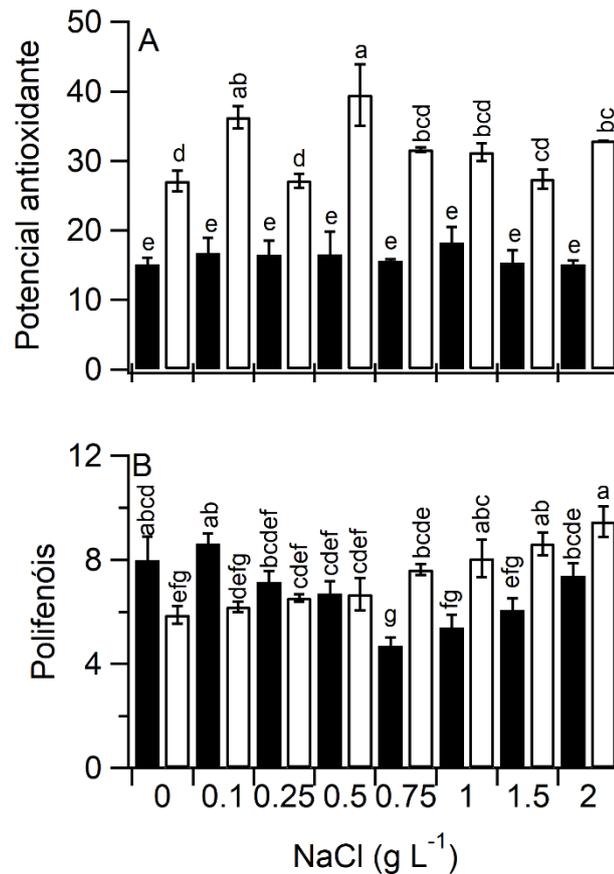


Figura 6 Atividade antioxidante nas diferentes concentrações de NaCl em 72 horas. Em A, percentual de inibição do radical DPPH e em B, teor polifenóis em mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹. Símbolos: círculo fechado, *C. sorokiniana* e quadrado aberto, *C. lunulatum*. Média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

O NaCl é comumente utilizado como agente manipulador em microalgas (Salama et al., 2013; Pancha et al., 2015; Yun et al., 2019), mas geralmente é feito em detrimento da taxa de crescimento. O estresse osmótico induzido pelo excesso de sal pode ser a causa da diminuição das taxas de crescimento em valores acima de 2 g L⁻¹ de NaCl. Minhas et al. (2016) e Shetty et al. (2019) mostraram que, além da inibição da fotossíntese, afetando diretamente a produção de biomassa, o NaCl diminui a divisão celular.

O comportamento observado para *C. sorokiniana* e *C. lunulatum* no experimento de manipulação bioquímica está de acordo com o que tem sido relatado por vários autores, que

mostram tolerância à salinidade e nenhum ou baixo efeito na taxa de crescimento no gênero *Chlorella* sp. dependendo da concentração de NaCl (Alyabyev et al., 2007; Figler et al., 2019; Shetty et al., 2019; Mohseni et al., 2021). Sabe-se que altas salinidades causam um aumento no tamanho celular atribuído ao acúmulo intracelular de grandes quantidades de glicerol ou osmólitos, mitigando parcialmente o impacto negativo da salinidade em espécies de água doce (Singh et al., 2018; Shetty et al., 2019). Em 2 g L⁻¹ de NaCl, *C. lunulatum* (este estudo) teve sua taxa de crescimento reduzida em 25% em comparação com o controle. Assim, para esta espécie, tal concentração de NaCl pode ter levado à perda do equilíbrio osmótico entre as células de microalgas e seu ambiente, o que foi refletido na taxa de divisão celular. Além disso, sabe-se que a permeabilidade da membrana celular pode ser afetada pelo aumento da salinidade, que é capaz de alterar o movimento de solutos através da membrana plasmática, além de interferir na solubilidade de CO₂ e O₂ na célula e de micronutrientes em seu ambiente (Fricke; Peters, 2002).

Nossos resultados mostraram que as concentrações de NaCl testadas não aumentaram a produção de biomassa. Yun et al. (2019) não obtiveram aumento da biomassa em *C. vulgaris* expostas ao NaCl, pelo contrário, eles obtiveram uma diminuição de 7,7% da biomassa em 45 mM de NaCl (~3 g L⁻¹) e uma diminuição de ~65% em 200 mM (~11,7 g L⁻¹). No entanto, investigando *Chlamydomonas mexicana* e *Scenedesmus obliquus* em meio BBM (experimento de 20 dias) e concentração de NaCl variando de 0 a 25 mM (~0 a 1,5 g L⁻¹), Salama et al. (2013) obtiveram aumento da biomassa seca em comparação com o controle. Eles mostraram que o controle produziu 0,5 g L⁻¹ de biomassa seca para ambas as microalgas, enquanto em 25 mM (~1,5 g L⁻¹) a acumulação de biomassa foi de 0,65 para *S. obliquus* e 0,8 g L⁻¹ para *C. mexicana*.

Também deve ser observado que, na presente pesquisa, as células permaneceram saudáveis durante todo o experimento e com máxima eficiência fotossintética do fotossistema II próxima a 0,70. Conforme descrito em Lombardi e Maldonado (2011), esse valor está relacionado a células microalgais saudáveis. Assim, com base nas taxas de crescimento e rendimento quântico máximo, consideramos que tanto *C. sorokiniana* quanto *C. lunulatum* estavam em condições saudáveis, mesmo que expostas ao NaCl.

De acordo com Kirroliya et al. (2011), sob estresse osmótico, as células microalgais usam processos fisiológicos e bioquímicos como proteção contra estresses oxidativos e outros tipos

de estresse, o que pode resultar em mudanças nos conteúdos de biomoléculas. Neste estudo a adição de sal causou pouca ou nenhuma influência no conteúdo de proteínas.

A literatura mostra que os efeitos do estresse osmótico no acúmulo de biomoléculas podem ser específicos para cada espécie. Li et al. (2018) não observaram mudanças em proteínas, carboidratos e lipídios em *Chlorella* sp. exposto a 30 g L⁻¹ de NaCl. No entanto, Liska et al. (2004) mostraram aumento no teor de proteínas em microalgas expostas ao NaCl, o que os autores relacionaram às proteínas hiper-responsivas ao sal. Mishra et al. (2008) observaram que, na concentração de 5,5 M de NaCl (~320 g L⁻¹), as proteínas totais em *Dunaliella salina* foram duas vezes maiores do que na concentração de 0,5 M de NaCl (~30 g L⁻¹). É sabido que sob efeitos do sal, pode ocorrer regulação negativa de genes envolvidos no metabolismo primário e síntese de proteínas, bem como a ativação de genes relacionados à autofagia e degradação de proteínas, como já observado em plantas vasculares e macroalgas (Dittami et al., 2011; Pancha et al. 2015). Pandit et al. (2017), observaram uma redução de proteínas nas concentrações de 0,06 a 0,4 M de NaCl (3 a 20 g L⁻¹), de 23% para 19% e de 23% para 13%, em comparação com o controle para *Chlorella vulgaris* e *Acutodesmos obliquus*, respectivamente. Em 500 e 600 mM (~25 e 30 g L⁻¹) de NaCl, Yun et al. (2019), relataram ~30% menos proteínas em *Chlorella vulgaris*; no controle o conteúdo total de proteínas foi maior que 50% da biomassa seca. Kirrolia (2011), relatou que *Scenedemus quadricauda* exibiu uma diminuição inicial no teor de proteínas totais nas concentrações de NaCl de 0,2 e 0,4 mM (0,01 e 0,02 g L⁻¹), enquanto nas concentrações acima de 6 mM (0,3 g L⁻¹) o teor de proteínas totais aumentou em ~53% em relação ao controle.

A concentração de carboidratos apresentou pouca influência pela exposição ao NaCl. De acordo com Shetty et al. (2019), essa biomolécula tende a aumentar como um mecanismo adaptativo às novas condições impostas pelo NaCl, sendo importante na regulação osmótica. Yun et al. (2019) observaram um aumento de até ~ 37% na concentração de carboidratos com a exposição de *Chlorella vulgaris* a 500 mM de NaCl (~ 30 g L⁻¹) e 600 mM (~ 35 g L⁻¹) em comparação com o controle. Exposta a 200 mM de NaCl (~ 11,7 g L⁻¹), Chokshi et al. (2017), observaram que *Acutodesmus dimorphus* acumulou 50% mais carboidratos do que o controle; nesta mesma concentração de NaCl, 40% menos biomassa seca foi detectada. Annamali et al. (2016), observaram um aumento nos carboidratos em concentrações de NaCl de 0 a 350 mM (~ 0 a 20 g L⁻¹), em *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Kirrolia et al. (2011), também detectaram um aumento nos carboidratos em *Scenedemus quadricauda* exposta a 0 -

23,5 g L⁻¹ de NaCl, e Pandit et al. (2017), detectaram quase o dobro de carboidratos em *Chlorella vulgaris* e *Acutodesmus obliquos* ao aumentar a concentração de sal no meio de cultura de 0 a 0,4 M (~ 23,5 g L⁻¹).

O estresse salino é considerado na literatura como uma estratégia para aumentar o teor de lipídios em microalgas, no entanto, nossos resultados não mostraram tal efeito. A razão para isso pode estar relacionada à quantidade de NaCl que usamos, já que nossa maior concentração foi de 2 g L⁻¹, e de acordo com os resultados de Yun et al. (2019), nenhuma diferença significativa no teor de lipídios em *Chlorella vulgaris* e *Acutodesmus obliquus* expostas a concentrações de NaCl inferiores a 60 mM (3,5 g L⁻¹) foi detectada, mas acima dessa concentração, o teor de lipídios aumentou. Outros resultados da literatura relatam aumentos nos lipídios em concentrações mais altas de NaCl. Pandit et al. (2017), mostraram que aumentando a salinidade de 0,06 (3,5 g L⁻¹) para 0,4 M (~23,5 g L⁻¹), o teor de lipídios aumentou de 31 para 49% em *Chlorella vulgaris* e de 23 para 43% em *Acutodesmus obliquus*. É digno de nota que a microalga *C. lunulatum* produziu o dobro de lipídios em relação à *C. sorokiniana*, enquanto esta última produziu cerca de 15% de lipídios em relação à biomassa seca, *C. lunulatum* produziu ~ 30% de lipídios em relação à biomassa seca. Analisando isso com informações da literatura, 30% de lipídios em relação à biomassa seca podem ser considerados altos. Em uma revisão de lipídios de microalgas, Morales et al. (2021), mostraram que entre 95 espécies, menos de 10% delas produziram 30% ou mais de lipídios em controles experimentais. Sabe-se que a produção de lipídios em microalgas está relacionada a respostas fisiológicas a fatores ambientais, como a salinidade (Yun et al., 2019), nutrientes (Lombardi; Wangersky 1991; Chia et al., 2015), metais (Chia et al., 2013) e outros. Relacionado à salinidade, Yilancioglu et al. (2014) e Chokshi et al. (2017), sugeriram que em microalgas é o estresse oxidativo causado pelo excesso de sal que pode ser responsável pelo aumento dos lipídios. É sabido que um aumento na pressão osmótica sob efeitos de salinidade pode desencadear a síntese de glicerol, que é um dos principais precursores para a formação de gotículas de lipídios nas células de microalgas (Azachi et al., 2002; Kim et al., 2016; Kakarla et al., 2018). É possível que a concentração de NaCl que usamos não tenha sido suficientemente alta para induzir um aumento nos lipídios, já que nenhum efeito do NaCl foi observado no teor de lipídios.

A literatura tem mostrado que a presença de NaCl no meio de cultura pode reduzir o conteúdo de clorofila *a* em microalgas devido a problemas osmóticos e iônicos (Moradi; Ismail 2007, Mathad 2010). Além disso, a clorofila *a* tem sido mostrada como o primeiro pigmento a

ser afetado por altas concentrações de sal, limitando a fotossíntese e reduzindo a divisão celular (Rai, 1990; Rai; Abraham, 1993; Mathad, 2010). Elloumi et al. (2020) observaram um conteúdo de clorofila *a* 5% maior em *Scenedesmus* sp. em 10 g L⁻¹ de NaCl, mas com o aumento do NaCl, o pigmento diminuiu. Yun et al. (2019) mostraram que em *Chlorella vulgaris*, o conteúdo de clorofila *a* diminuiu significativamente em concentrações acima de 45 mM de NaCl (~2,6 g L⁻¹), mas em 30 mM de NaCl (1,75 g L⁻¹), ele aumentou em 65% em comparação com o controle (5,68 mg L⁻¹). Chokshi et al. (2017), observaram uma diminuição de 4 vezes na concentração de clorofila *a* em *Acutodesmos dimorphus* exposta a 200 mM de NaCl (~11,7 g L⁻¹).

De acordo com Faraloni e Torzillo (2017) e Ren et al. (2021), os carotenoides atuam como compostos antioxidantes e seu conteúdo em microalgas é alterado pela necessidade celular, como estratégia de sobrevivência para garantir o equilíbrio entre o crescimento e a resposta ao estresse. Assim, considerando que a função principal dos carotenoides é a absorção de luz para realizar a fotossíntese e que eles são produzidos constitutivamente nas células, a *C. sorokiniana* exposta a 2 g L⁻¹ de NaCl pode ter enfrentado algum estresse oxidativo que foi eventualmente equilibrado pelo aumento de carotenoides totais. Como a intensidade da luz dentro das culturas foi mantida constante, o estresse oxidativo pode ter sensibilizado as células à luz, aumentando os carotenoides. Isso está de acordo com Elloumi et al. (2020), que mostraram um aumento dos carotenoides em *Scenedesmus* sp. em concentrações de NaCl de 0 a 60 g L⁻¹; foi 10% maior que o controle quando exposto a 10 g L⁻¹ de NaCl e menor acima dessa concentração. Da mesma forma, Yun et al. (2019), mostraram que há uma faixa ótima (e estreita) na qual os carotenoides aumentam. Os autores mostraram maior conteúdo de carotenoides em *Chlorella vulgaris* exposta a 30 mM (~1,75 g L⁻¹) de NaCl ou menos, mas conteúdo menor desse pigmento acima de 45 mM (~2,6 g L⁻¹). Para o gênero *Chlorella*, a produtividade de carotenoides obtida por Yun et al. (2019) foi de 0,116 mg L⁻¹ d⁻¹, enquanto no presente estudo para *C. sorokiniana* exposta a 2 g L⁻¹ de NaCl foi de 0,198 mg L⁻¹ d⁻¹, um aumento de 1,7 vezes em comparação aos resultados de Yun et al. (2019).

As concentrações de NaCl utilizadas, de acordo com nossos resultados, não estimularam o potencial antioxidante. Sabe-se que as condições de estresse podem levar ao acúmulo de moléculas como compostos fenólicos, flavonoides e antioxidantes como estratégia de adaptação (Hasegawa et al., 2000). Os resultados encontrados neste estudo estão em concordância com os relatados por Hemalatha et al. (2013), Saranya et al. (2014) e Safafar et al. (2015). De acordo com esses autores, percentual antioxidante pode variar de 9 a 35% para diferentes espécies de

microalgas. Como observado por Singh et al. (2014) exposição à NaCl em cianobactérias pode aumentar compostos antioxidantes. Eles mostraram um potencial antioxidante 13% maior em *Plectonema boyanum* a 320 mM de NaCl ($\sim 19 \text{ g L}^{-1}$), 10% maior em *Hapalosiphon intricatus* a 80 mM de NaCl ($\sim 4,7 \text{ g L}^{-1}$), enquanto em *Oscillatoria acuta* aumentou 7% em 160 mM ($9,35 \text{ g L}^{-1}$) de NaCl.

Poderia ser esperado que os carotenoides totais contribuíssem para o potencial antioxidante, no entanto, nem sempre é o caso. Apesar do conteúdo mais elevado de carotenoides totais a 2 g L^{-1} de NaCl em *C. sorokiniana* e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ em *C. lunulatum*, nessas concentrações de NaCl, nenhuma das espécies apresentou maior potencial antioxidante. Os carotenoides possuem atividade antioxidante, mas seu poder antioxidante não é o mesmo para todos eles, isso depende dos tipos de carotenos presentes na biomassa (Safafar et al., 2015). Singh et al. (2014) observaram que, apesar de obterem um aumento no potencial antioxidante em cianobactérias sob condições de salinidade, houve uma redução nos carotenoides totais.

Nossos resultados sugerem que *C. lunulatum* produziu polifenóis como mecanismo de defesa em resposta à presença de sal, uma vez que aumentou proporcionalmente à concentração de NaCl. É sabido que os polifenóis atuam como moléculas antioxidantes, ajudando a ajustar e eliminar os radicais livres para reduzir os efeitos negativos da presença de sal no meio (Kumar et al., 2020; Drira et al., 2021; Fal et al., 2022). Comportamento semelhante foi observado por Chokshi et al. (2017) com *Acutodesmus dimorphus* cultivado em 200 mM ($\sim 11,7 \text{ g L}^{-1}$) de NaCl e 7,8% de aumento no teor de polifenóis em comparação ao controle. Fal et al. (2022), observaram que *C. reinhardtii*, em condições de estresse salino, acumulou 51,4% mais compostos fenólicos do que o controle.

3.6 CONCLUSÃO

C. lunulatum é uma potencial candidata para a produção de lipídios sem a necessidade de manipulação. A adição de NaCl no meio de cultura aumentou a concentração de carotenoides totais em *C. sorokiniana* e de polifenóis em *C. lunulatum*. Houve pouca influência do NaCl na composição de proteínas e carboidratos para as duas microalgas, mas 2 g L^{-1} de NaCl aumentaram os carotenoides em 70% em *C. sorokiniana*. Em *C. lunulatum*, o teor de compostos

fenólicos aumentou com o aumento de NaCl no meio de cultura. O potencial antioxidante foi maior em *C. lunulatum* em comparação com *C. sorokiniana*. Além disso, *C. lunulatum* destacou-se em termos de teor de lipídios totais, produzindo cerca de duas vezes mais lipídios do que *C. sorokiniana*.

3.7 REFERÊNCIAS

ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.

ALYABYEV, A.Ju.; LOSEVA, N.L.; GORDON, L.Kh.; ANDREYEVA, I.N.; RACHIMOVA, G.G.; TRIBUNSKIH, V.I.; PONOMAREVA, A.A.; KEMP, R.B. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, [S. l.], v. 458, n. 1-2, p. 65-70., 2007.

AZACHI, Malkit; SADKA, Avi; FISHER, Morly; GOLDSHLAG, Paulina; GOKHMAN, Irena; ZAMIR, Ada. Salt Induction of Fatty Acid Elongase and Membrane Lipid Modifications in the Extreme Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 1320-1329, 2002.

BARACHO, Douglas H.; SILVA, Jaqueline C.; LOMBARDI, Ana T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. **Journal of Phycology**, v. 55, n. 6, p. 1335–1347, 2019.

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

BOUSSIBA, Sammy; VONSHAK, Avigad. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*1. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p. 1077–1082, 1991.

CHIA, Mathias Ahii; GALADIMA, Sadiya Yunusa; JAPHET, Wisdom Sohunago. Combined effect of atrazine and copper on the growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus quadricauda*. **Phycologia**, v. 54, n. 2, p. 109–117, 2015.

CHIA, Mathias Ahii; LOMBARDI, Ana Teresa; MELÃO, Maria da Graça Gama; PARRISH, Christopher C. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal Of Phycology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 1-11, 2013.

CHOKSHI, Kaumeel; PANCHI, Imran; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 244, p. 1376-1383, 2017.

COWAN, A. Keith; ROSE, Peter D. Abscisic Acid Metabolism in Salt-Stressed Cells of *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 798-803, 1991.

DITTAMI, Simon M.; GRAVOT, Antoine; RENAULT, David; GOULITQUER, Sophie; EGGERT, Anja; BOUCHEREAU, Alain; BOYEN, Catherine; TONON, Thierry. Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. **Plant, Cell & Environment**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 629-642, 2011.

DRIRA, Marwa; MOHAMED, Jamila Ben; HLIMA, Hajer Ben; HENTATI, Faiez; MICHAUD, Philippe; ABDELKAFI, Slim; FENDRI, Imen. Improvement of *Arabidopsis thaliana* salt tolerance using a polysaccharidic extract from the brown algae *Padina pavonica*. **Algal Research**, [S. l.], v. 56, p. 102324, 2021.

ELLOUMI, Wiem; JEBALI, Ahlem; MAALEJ, Amina; CHAMKHA, Mohamed; SAYADI, Sami. Effect of Mild Salinity Stress on the Growth, Fatty Acid and Carotenoid Compositions, and Biological Activities of the Thermal Freshwater Microalgae *Scenedesmus* sp. **Biomolecules**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1515, 6 nov. 2020.

FAL, Soufiane; AASFAR, Abderahim; RABIE, Reda; *et al.* Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Heliyon**, v. 8, n. 1, p. e08811, 2022.

FARALONI, Cecilia; TORZILLO, Giuseppe. **Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress**. United Kingdom: IntechOpen, 2017.

FERNÁNDEZ, F. Gabriel Acién; REIS, Alberto; WIJFFELS, René H.; BARBOSA, Maria; VERDELHO, Vitor; LLAMAS, Bernardo. The role of microalgae in the bioeconomy. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 61, p. 99-107, 2021.

FIGLER, Aida; B-BÉRES, Viktória; DOBRONOKI, Dalma; MÁRTON, Kamilla; NAGY, Sándor Alex; BÁCSI, István. Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates. **Water**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 2527, 2019.

GAO, Zhengquan; MENG, Chunxiao; CHEN, Yi Chung; *et al.* Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1853–1860, 2015.

GONG, Mengyue; BASSI, Amarjeet. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1396-1412, 2016.

HASEGAWA, Paul M.; BRESSAN, Ray A.; ZHU, Jian-Kang; BOHNERT, Hans J.. PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 463-499, 2000.

HEMALATHA, A. *et al.* Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. **Adv. Appl. Sci. Res**, v. 4, n. 5, p. 151-157, 2013.

KAKARLA, Ramesh; CHOI, Jung-Woon; YUN, Jin-Ho; *et al.* Application of high-salinity stress for enhancing the lipid productivity of *Chlorella sorokiniana* HS1 in a two-phase process. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 56–64, 2018.

KIM, Byung-Hyuk; RAMANAN, Rishiram; KANG, Zion; *et al.* *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 300–305, 2016.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, N. Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 2, n. 4, p. 28-34, 2011.

KOBAYASHI, Makio. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 322-330, 2003.

KUMAR, Sunjeet; LI, Gaojie; YANG, Jingjing; *et al.* Investigation of an Antioxidative System for Salinity Tolerance in *Oenanthe javanica*. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 940, 2020.

LI, Xuyang; YUAN, Yizhong; CHENG, Dujia; *et al.* Exploring stress tolerance mechanism of evolved freshwater strain *Chlorella* sp. S30 under 30 g/L salt. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 495–504, 2018.

LISKA, Adam J.; SHEVCHENKO, Andrej; PICK, Uri; KATZ, Adriana. Enhanced Photosynthesis and Redox Energy Production Contribute to Salinity Tolerance in *Dunaliella* as Revealed by Homology-Based Proteomics. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 136, n. 1, p. 2806-2817, 1 set. 2004.

LOMBARDI, Ana T.; MALDONADO, Maria T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, [S. L.], v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011.

LOMBARDI, AT; WANGERSKY, PJ. Influence of phosphorus and silicon on lipia class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series*, [S. L.], v. 77, n. 1987, p. 39–47, 1991.

MINHAS, Amritpreet K.; HODGSON, Peter; BARROW, Colin J.; *et al.* A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Mobin, S.; Alam, F. (2017). Some promising microalgal species for commercial applications: a review. *Energy Procedia*, 110, p.510-517.

MISHRA, Avinash; MANDOLI, Amit; JHA, Bhavanath. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1093–1101, 2008.

MOBIN, Saleh; ALAM, Firoz. Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: a review. **Energy Procedia**, [S. l.], v. 110, p. 510-517, 2017.

MOHLEJI, Sudhir C.; VERHOFF, Frank H. Sodium and potassium ions effects on phosphorus transport in algal cells. **Journal (Water Pollution Control Federation)**, p. 110-125, 1980.

MOHSENI, Arash; FAN, Linhua; RODDICK, Felicity A. Impact of microalgae species and solution salinity on algal treatment of wastewater reverse osmosis concentrate. **Chemosphere**, [S. l.], v. 285, p. 131487, 2021.

MORADI, F.; ISMAIL, A. M. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. **Annals Of Botany**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 1161-1173, 2007.

MORALES, Marjorie; AFLALO, Claude; BERNARD, Olivier. Microalgal lipids: a review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 150, p. 106108, 2021.

OREN, Aharon. A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005. **Saline Systems**, v. 1, n. 1, p. 2, 2005

PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MAURYA, Rahulkumar; TRIVEDI, Khanjan; PATIDAR, Shailesh Kumar; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 189, p. 341-348, 2015.

PANDIT, Priti Raj; FULEKAR, Madhusudan H.; KARUNA, Mallampalli Sri Lakshmi. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science And Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 15, p. 13437-13451, 2017.

PARRISH, Christopher C.. Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples. **Lipids In Freshwater Ecosystems**, [S. l.], p. 4-20, 1999.

PIRES, Janaína; TORRES, Priscila B.; SANTOS, Déborah Y. A. C. Dos; CHOW, Fungyi. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, [S. L.], p. 6, 2017.

RAI, Ashwani Kumar. Biochemical characteristics of photosynthetic response to various external salinities in halotolerant and fresh water cyanobacteria. **Fems Microbiology Letters**, [S. l.], v. 69, n. 1-2, p. 177-180, 1990.

RAI, AshwaniKumar; ABRAHAM, Gerard. Salinity tolerance and growth analysis of the cyanobacterium *Anabaena doliolum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 5, 1993.

REN, Yuanyuan; SUN, Han; DENG, Jinquan; HUANG, Junchao; CHEN, Feng. Carotenoid Production from Microalgae: biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 713, 2021.

RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROY, Uttam Kumer; NIELSEN, Birthe Vejby; MILLEDGE, John James. Antioxidant Production in *Dunaliella*. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 3959, 2021.

SAFAFAR, Hamed; VAN WAGENEN, Jonathan; MØLLER, Per; *et al.* Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.

SALAMA, El-Sayed; KIM, Hyun-Chul; ABOU-SHANAB, Reda A. I.; JI, Min-Kyu; OH, You-Kwan; KIM, Seong-Heon; JEON, Byong-Hun. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 827-833, 2013.

SARANYA, C. et al. Evaluation of antioxidant properties, total phenolic and carotenoid content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 8, p. 365-377, 2014.

SHETTY, Prateek; GITAU, Margaret Mukami; MARÓTI, Gergely. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1657, 2019.

SINGH, Dhananjaya P.; PRABHA, Ratna; MEENA, Kamlesh K.; *et al.* Induced Accumulation of Polyphenolics and Flavonoids in Cyanobacteria under Salt Stress Protects Organisms through Enhanced Antioxidant Activity. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 05, p. 726–735, 2014.

SINGH, R.; UPADHYAY, A.K.; CHANDRA, P.; SINGH, D.P.. Sodium chloride incites reactive oxygen species in green algae *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*: implication on lipid synthesis, mineral nutrients and antioxidant system. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 270, p. 489-497, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SLOCOMBE, Stephen P.; ROSS, Michael; THOMAS, Naomi; MCNEILL, Sharon; STANLEY, Michele S.. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 129, p. 51-57, 2013.

WELLBURN, Alan R.. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal Of Plant Physiology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YILANCIOGLU, Kaan; COKOL, Murat; PASTIRMACI, Inanc; *et al.* Oxidative Stress Is a Mediator for Increased Lipid Accumulation in a Newly Isolated *Dunaliella salina* Strain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91957, 2014.

YUN, Chol-Jin; HWANG, Kum-Ok; HAN, Song-Su; RI, Hyong-Guan. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 127, p. 105277, ago. 2019.

ZHANG, Qing; ZHANG, Junzeng; SHEN, Jingkai; *et al.* A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3–5, p. 445–450, 2006.

4. Capítulo 3 – Fisiologia de *C. lunulatum* em escala ampliada (200 L) e análise econômica do sistema produtivo.

RESUMO

A produção da biomassa algal em larga escala é de grande interesse devido à aplicabilidade comercial em diversos setores que vão desde a alimentação animal até a alimentação humana, além da aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e de biocombustíveis. Entretanto, um dos principais obstáculos na ampliação de escala é o alto custo de produção e baixo rendimento de biomassa. Superar esses problemas, requer encontrar microalgas robustas que possam suportar variações nas condições ambientais e, ao mesmo tempo, desenvolver estratégias para estimular a produção de biomassa. Uma abordagem promissora, nesse contexto, é o uso de uma fonte de carbono orgânico, como o acetato de sódio, que pode ser utilizado pelo metabolismo mixotrófico da microalga. Este metabolismo em *C. lunulatum* foi verificado em placas de 96 poços com a adição de diferentes concentrações de acetato de sódio (0 a 500 mg L⁻¹) e posteriormente foi utilizado na ampliação de escala de *C. lunulatum*. A adição de acetato de sódio no meio de cultivo aumentou a produção de biomassa seca (2,7 g L⁻¹), cerca de 1,3 vezes maior em comparação ao controle. Isso sugere que o uso de acetato de sódio pode ser uma estratégia eficaz para aumentar a produção de biomassa em cultivos de algumas espécies de microalgas, como *C. lunulatum*. O acetato de sódio aumentou o custo de operação em 4,8%, porém reduziu o custo de produção em 21%, mas ainda permanece alto o custo de produção de biomassa. Apesar disso, *C. lunulatum* é uma candidata promissora para ampliação de escala, já que suportou as variações nas condições ambientais e produziu lipídios em torno de 30% do seu peso seco.

Palavras-chave: carbono orgânico, microalgas, mixotrofia, lipídios

4.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas em escala comercial teve início na década de 1960, no Japão, com culturas de *Chlorella* (Borowitzka, 1999). Várias espécies têm sido exploradas comercialmente, sendo as principais dos gêneros *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* e *Hematococcus* (Becker, 2004; Derner, 2006). O interesse no cultivo de microalgas se deve ao seu potencial biotecnológico, pois apresentam atributos como rápido crescimento, plasticidade fisiológica e diversidade bioquímica. Esta diversidade é bem documentada e a biomassa algal contém principalmente proteínas, carboidratos, lipídios, além de vitaminas, antioxidantes e outros compostos (Yaakob et al., 2021). Isto possibilita a sua aplicação em diversos setores industriais, como o farmacêutico, cosmético e nutracêutico (Borowitzka, 2013). A produção comercial global de biomassa algal é estimada em cerca de 25 mil toneladas e o volume total de mercado em cerca de 50 milhões de euros (€), com expectativa de crescer 75 milhões de euros até 2025 (Fernández et al., 2021).

O aumento de escala para a produção de microalgas ocorre a partir de dois tipos de reatores, os abertos e os fechados. Os reatores abertos são mais comumente utilizados para a produção de biomassa algal, pois são mais baratos e fáceis de operar (Chisti, 2007; Benemann, 2013; Acién et al., 2017) frente aos reatores fechados que possuem aplicação comercial limitada em função do alto custo de capital e produção (Chisti, 2007). Para a maior parte dos produtos de cultivo de algas, sistemas abertos representam a única alternativa capaz de atender os requisitos econômicos e operacionais desses processos (Weissman; Goebel, 1988). Porém esse tipo de reator fica restrito a algumas algas como, por exemplo, *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*, que possuem capacidade de resistir às condições adversas de crescimento e de competir com outros microrganismos (Olaizola, 2000; Blanco et al., 2007).

Contudo, a ampliação de escala continua onerosa devido aos custos de implementação, operação e produção, além de enfrentar o baixo rendimento de biomassa. Os principais fatores que afetam a produtividade de biomassa em larga escala e ao ar livre são a luz e a temperatura, quando não há limitação nutricional e os cultivos são bem homogeneizados (Hueseman et al., 2016). As condições que as células de algas experimentam em culturas de larga escala são muito diferentes daquelas experimentadas em laboratório (Borowitzka, 2016). O controle dos parâmetros importantes ao crescimento algal como temperatura, intensidade luminosa e agitação em cultivos de laboratório é fácil, porém em escala ampliada é difícil, pois os sistemas

grandes são mais complexos, ainda mais objetivando a redução de custos (Acién et al., 2012; Norsker et al., 2011; Acién et al., 2017). Em cultivos ao ar livre as microalgas podem ser fotolimitadas, saturadas ou fotoinibidas dependendo da intensidade luminosa e isto afeta o crescimento (William; Laurens, 2010; Béchet et al., 2013; Pessi et al., 2022). De acordo com Pessi et al. (2022), a temperatura também pode influenciar na taxa de crescimento das microalgas, pois afeta as reações enzimáticas.

Devido às dificuldades de manutenção das condições de cultivo, o uso de estufas agrícolas tem se mostrado uma alternativa. A estufa permite um controle mais adequado da temperatura, das condições fisiológicas do organismo em cultura, e também da luz, permitindo minimizar a fotoinibição por meio de sombrites ou painéis fotovoltaicos (Martínez et al., 2017; Morales et al., 2019; Pessi et al., 2022). Se por um lado a luz pode ser excessiva no início do cultivo, por outro ela pode ser limitante no final dos cultivos, sendo este autotrófico. O aumento na densidade celular pode levar ao autossombreamento ao longo tempo, diminuindo a disponibilidade de luz e, conseqüentemente, limitando a produção de biomassa (Abuisi et al., 2020). Buscando superar a limitação de luz, uma alternativa às culturas autotróficas são as culturas mixotróficas. De acordo com Patel et al. (2019), o cultivo mixotrófico pode ser uma solução viável para superar os problemas econômicos associados à produção de algas, que atualmente é um grande obstáculo para sua comercialização. Sob condições mixotróficas, as microalgas podem absorver simultaneamente o carbono inorgânico (CO₂) e o carbono orgânico (como glicose, glicerol e acetato), e assim aumentar o ganho de biomassa (Patel et al., 2019). O acetato de sódio, dentre as diversas fontes de carbono orgânico, é o mais frequentemente utilizado devido ao seu baixo custo (Cheng et al., 2021).

Chlorolobion lunulatum é uma espécie de microalga Chlorophyta pouco investigada e conhecida da literatura internacional. Entretanto, em estudos prévios de prospecção de cepas com potencial para ampliação de escala no Laboratório de Biotecnologia de Algas, *C. lunulatum* mostrou-se promissora. Esta cepa é mixotrófica e compara-se à *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* quanto à taxa de crescimento, mas ultrapassa essas cepas quanto à produção de óleos. Assim, optamos por usar *C. lunulatum* para a ampliação de escala.

Este estudo teve como objetivo principal investigar a fisiologia de *C. lunulatum* em culturas de 200 L em *raceways*, avaliando-se o efeito de uma fonte de carbono orgânico, o acetato de sódio, na composição bioquímica celular e rendimento de biomassa. Com os

resultados obtidos desse cultivo, foi realizado um estudo tecno-econômico do sistema de produção algal.

4.2 OBJETIVOS

Este capítulo teve dois objetivos principais. O primeiro foi estudar a fisiologia celular de *C. lunulatum* em culturas de 200 L mantidas sob condições semi-controladas em estufa agrícola, considerando o metabolismo mixotrófico. O segundo foi, a partir desses resultados, realizar a análise tecno-econômica do processo produtivo. Deste modo, espera-se desenvolver uma estratégia efetiva que supere os desafios inerentes aos cultivos em escala ampliada e estimule a produção de biomassa.

Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade de *C. lunulatum* em utilizar acetato de sódio como fonte de carbono para a produção de biomassa em condições mixotróficas, fornecido gradualmente durante o cultivo.
- Determinar a taxa de crescimento e composição bioquímica de *C. lunulatum* sob autotrofia e mixotrofia;
- Realizar análise tecno-econômica do sistema produtivo.

4.3 MATERIAS E MÉTODOS

Culturas e Ampliação de Escala

Chlorolobion lunulatum (CCMA – UFSCar 500) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Inessa L. Bagatini, curadora da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. As culturas de manutenção e a experimental foram mantidas em meio BG11 (Rippka et al., 1979) previamente autoclavado (Phoenix Luferco, Brasil) a 121 °C por 20 min, sob condições controladas de intensidade luminosa ($260 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) e temperatura (25 ± 1 °C). A intensidade luminosa foi previamente verificada por meio da obtenção do valor da

irradiância saturante (E_k) a partir de curvas rápidas de luz (RLC) por meio da fluorescência modulada de acordo com o descrito em Camargo et al. (2021).

A ampliação de escala foi realizada em estufa agrícola (Figura 1) com condições semi-controladas de luz e temperatura. A intensidade luminosa foi medida dentro do cultivo e mantida semi-controlada durante todo o período experimental com o uso de sombrite de 30 e 50%, quando necessário. A manutenção da temperatura foi feita por meio de climatizadores de ar como mostrado na Figura 1. Os cultivos foram realizados em triplicata em reatores do tipo *raceway* com capacidade de 500 L e volume útil de 200 L (6 cm de altura), impulsionados por pás com furos para a homogeneização e aeração das culturas, além de conterem 7 metros de coluna de borbulhamento de CO_2 . A água utilizada no meio BG11 foi desinfetada com 0,8 mL L^{-1} de água sanitária comercial, que neste estudo foi a solução de hipoclorito de sódio 2,5% (160 mL de água sanitária por reator com 200 L de água). Após cerca de 12 horas em período escuro, o cloro foi neutralizado com tiosulfato de sódio na proporção molar de 1:1. Para tanto 13,33 g de tiosulfato de sódio foi dissolvido em 1 L de água e adicionado em cada um dos reatores *raceway* contendo 200 L de água. Após 1 h, a presença de resíduo de cloro foi verificada por meio de testes comerciais colorimétricos, comumente usados para a mesma verificação em água de piscinas. Na ausência do cloro, nutrientes do meio de cultura eram adicionados para dar início ao cultivo.

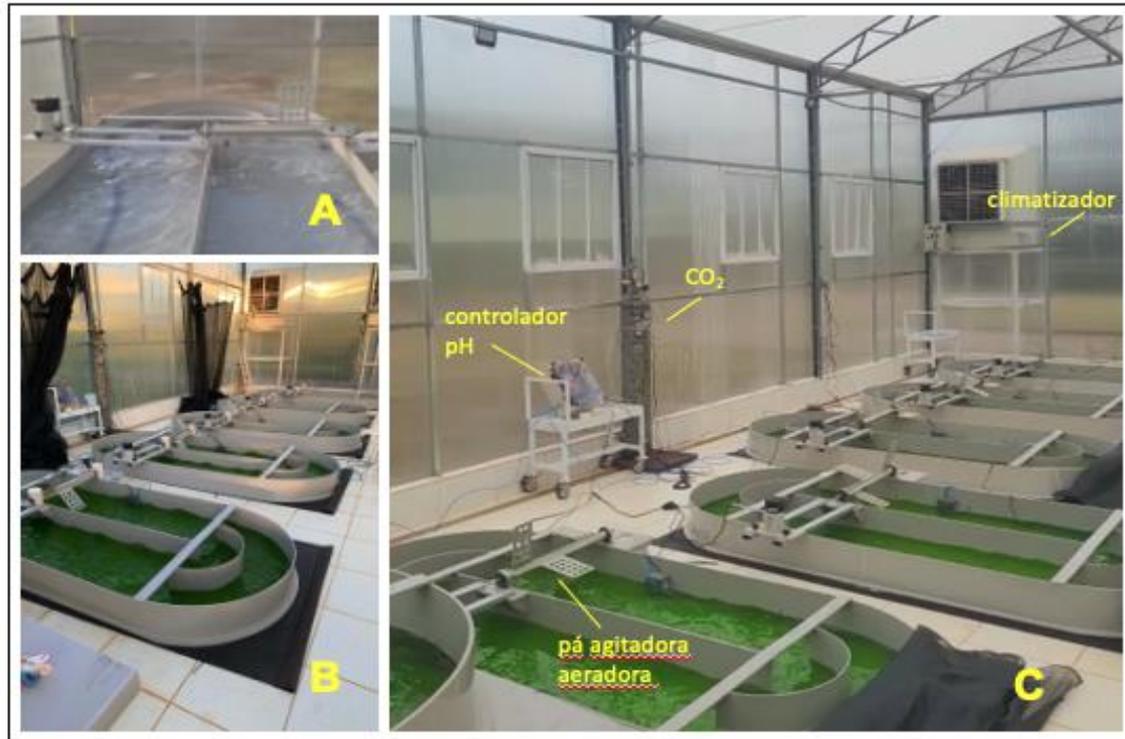


Figura 1- Representação dos reatores tipo *raceway* que estão em uso para cultivos ampliados de *Chlorolobion lunulatum* (3 reatores controles e 3 reatores tratamentos). (A) reator *raceway* em teste; (B) *raceway* com cultivo de *C. lunulatum*; (C) primeiro teste de cultivo de *C. lunulatum* em 200 L, dos quais 3 reatores equivalem aos controles e 3 ao tratamento. Capacidade máxima de 500 L, volume usado 200 L; coluna de borbulhamento CO₂ 7 m.

Os *raceways* foram inoculados com 10^5 células mL⁻¹ oriundas de uma cultura de *C. lunulatum* em fase exponencial de crescimento, previamente cultivadas e adaptadas às condições ambientais da estufa. Os cultivos foram borbulhados com CO₂, que era liberado automaticamente conforme definido por pH na amplitude de 7,2 (fechamento válvula do CO₂) – 7,5 (abertura válvula CO₂) para otimização do crescimento algal. Os cultivos nos *raceways* tiveram a duração de 11 dias.

O acetato de sódio (Neon) foi utilizado como fonte de carbono orgânico a fim de aumentar a produtividade de biomassa das culturas de 200 L. Ele foi adicionado gradualmente no cultivo a partir do 4º dia, com concentração inicial de 100 mg L⁻¹ chegando até 1 g L⁻¹ no 10º dia. As concentrações (0 a 500 mg L⁻¹) foram previamente selecionadas com base em resultados obtidos em estudo preliminar. Esse estudo foi feito em microplaca de 96 poços, com absorbância monitorada por 4 dias, em comprimento de onda 684 nm em um espectrofotômetro, leitor de placas (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, U.S.A.). Com esses valores

determinou-se a taxa de crescimento (d^{-1}). As placas foram cobertas com Parafilm®, com o intuito de reduzir a evaporação

Parâmetros da fotossíntese e crescimento

O monitoramento das culturas foi feito diariamente através da contagem do número de células (densidade populacional) utilizando-se um citômetro de fluxo Muse Cell Analyzer (Millipore, U.S.A.), que possui como base de quantificação a fluorescência natural da clorofila *a*.

As taxas de crescimento específicas máximas foram obtidas utilizando-se os valores de células mL^{-1} através de ajuste por regressão linear para a fase exponencial de crescimento, plotando-se o logaritmo natural (\ln) da densidade populacional *versus* o tempo (dias). A inclinação da reta foi considerada como uma representação da taxa de crescimento específica máxima, na fase exponencial de crescimento.

A biomassa seca foi mensurada diariamente utilizando-se uma balança micro analítica com 1 μg precisão (Mettler Toledo XPE26). Para isso, filtros de acetato de celulose (Unifil - Brasil) foram previamente secos em estufa a 38 °C por 48 h e então usados para filtrar a cultura. O volume de cultura a ser filtrado variou, pois a densidade aumentou com o tempo de cultivo. Para os dias 0, 1, 2 e 3 foi filtrado 10 mL, para os dias 4, 5, 6, 7 e 8 foram filtrados 5 mL e para os dias 9, 10 e 11 utilizou-se 3 mL. Os filtros contendo a biomassa algal foram secos em estufa a 38 °C até estabilização da massa (48-72 h). Após secagem, os filtros foram transferidos para um dessecador até atingir temperatura ambiente e, assim, a massa dos filtros contendo a biomassa algal seca foi aferida. O valor de biomassa seca ($mg L^{-1}$) foi obtido subtraindo-se a massa do filtro previamente seco daquele contendo a biomassa algal seca.

Curvas rápidas de luz (RLC) foram feitas para avaliar o estado do aparato fotossintético e possíveis adaptações ao ambiente semi-controlado da estufa. As RLC foram realizadas utilizando-se um equipamento Phyto PAM (Heinz-Walz Effeltrich, Alemanha). Essas curvas fornecem informações sobre a taxa de transferência de elétrons relativa (rETR) em resposta à variação da intensidade da luz (PAR). Elas são ajustadas matematicamente para então fornecerem informações importantes que se relacionam com a fotossíntese, ajudando em sua compreensão. Para tanto usamos o modelo proposto em Platt et al. (1980). Os parâmetros **alfa**

(α , $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$), **taxa máxima de transferência de elétrons** (ETRmax, $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e **irradiância saturante** (E_k , $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) são obtidos. O parâmetro α representa a inclinação inicial da curva, que corresponde à eficiência da captura de luz pelos fotossistemas. O valor de ETRmax é obtido no platô da curva. A irradiância saturante (E_k) é calculada como o valor de ETRmax dividido por α .

Biomoléculas na biomassa

Na biomassa algal foram quantificados o conteúdo total de proteínas, carboidratos e lipídios, além do potencial antioxidante e polifenóis. Essas determinações foram realizadas nos dias 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 11. Além disso, a quantificação dos carotenoides e clorofila *a* foi feita nos dias 3, 6, 9, 10 e 11. Os métodos utilizados são descritos a seguir.

A quantificação de proteínas totais foi feita por método espectrofométrico seguindo as especificações descritas em Slocombe et al. (2013), modificado. Para tal, amostras de 10 mL para os dias 3 e 4, 5 mL para os dias 5 e 6, e 3 mL para os dias 9, 10 e 11 foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada (Thermo Scientific, Sorvall Legend XTR, EUA) por 20 min, a 20 °C, em 4400 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Essa amostra foi incubada a 95 °C por 15 minutos, e após a reação, a solução foi mensurada em espectrofotômetro em 600 nm de comprimento de onda.

A determinação de carboidratos totais foi feita de acordo com metodologia descrita em Albalasmeh et al. (2013), um método espectrofotométrico baseado na reação do ácido sulfúrico com a biomassa algal. Para essa determinação foram coletados 20 mL de amostra para os dias 3 e 4, 10 mL para os dias 5 e 6, e 6 mL para os dias 9, 10 e 11. Após a reação, a solução foi mensurada em espectrofotômetro (Nanocolor Macherey-Nagal, Reino Unido) no comprimento de onda 315 nm.

A determinação de lipídios totais foi feita por método gravimétrico, onde 50 mL de cultura foram usados para o dia 3, 30 mL para os dias 4, 5 e 6, 20 mL para os dias 9, e 10 mL para os dias 10 e 11. As amostras foram filtradas em membrana de fibra vidro (Macherey-Nagel – Alemanha), previamente muflada (400 °C por 8 h). A extração dos lipídios seguiu método proposto por Folch et al. (1957) e Parrish (1999) com solução de clorofórmio: metanol (2:1). Após a extração, 0,4 mL do extrato foram transferidos para cadinhos de alumínio previamente

muflados e com massa aferida em balança micro analítica com 1 µg de precisão (Mettler Toledo XPE26). As amostras nos cadinhos foram secas e conservadas em dessecador sob vácuo até estabilização da massa, o que não excedia 24 h. A quantificação dos lipídios totais foi realizada pela diferença entre as massas iniciais e finais dos cadinhos.

Clorofila *a* e carotenoides totais foram determinados de acordo com Wellburn (1994), método espectrofotométrico que tem como base a extração dos pigmentos no solvente orgânico dimetilsulfóxido. Após extração, a solução foi mensurada nos comprimentos de onda de 665 (A_{665}), 649 (A_{649}) e 480 (A_{480}) nm. A concentração dos pigmentos, dada em mg L⁻¹ de clorofila *a* (Ca), clorofila *b* (Cb) e carotenoides totais (CT) no extrato, foi calculada com base nas Equações 1, 2 e 3 apresentadas a seguir.

$$Ca = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad \text{Eq. 1}$$

$$Cb = 25,06 \cdot A_{649} - 6,5 \cdot A_{665} \quad \text{Eq. 2}$$

$$CT = [(1000 \cdot A_{480}) - (1,29 \cdot Ca) - (53,78 \cdot Cb)] / 220 \quad \text{Eq. 3}$$

As determinações da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos foram feitas em extratos etanólicos (etanol 70%) a partir de biomassa algal liofilizada. A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia descrita em Pires et al. (2017), adaptado para microplacas de 96 poços. Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com metodologia proposta em Singleton e Rossi (1995), adaptado por Zhang (2006). Baseia-se em método espectrofotométrico e a solução foi mensurada em 750 nm de comprimento de onda.

Análise dos resultados de fisiologia

Os resultados foram comparados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% para avaliar diferenças significativas entre o tratamento e o controle, usando-se o programa Minitab 17.

Análise tecno-econômica do sistema produtivo

A análise tecno-econômica do processo de produção de *C. lunulatum* foi feita com o auxílio do Prof. Dr. Pedro Antonio Rodriguez Ramos. É uma análise importante para avaliar a viabilidade comercial do processo produtivo. Realizando-se essa análise, é possível identificar oportunidades de redução de custos e otimização do processo produtivo.

A análise do custo da produção de *C. lunulatum* foi realizada com base nos resultados obtidos na ampliação de escala, com e sem a adição de acetato de sódio. O custo de produção da biomassa foi calculado considerando o custo de operação e a quantidade de biomassa produzida. O custo de operação foi composto pelo custo do meio de cultura, água, energia, CO₂, manutenção, salário, depreciação, custos diretos e indiretos. Foi considerado um tempo de vida útil de 10 anos para calcular a depreciação.

4.4 RESULTADOS: FISIOLOGIA

Os resultados do estudo preliminar para verificar a existência de metabolismo mixotrófico na microalga *C. lunulatum*, sob condições controladas de laboratório e diferentes concentrações de acetato de sódio são mostrados na Figura 2. Observou-se que a taxa de crescimento aumentou com concentrações de acetato de sódio acima de 10 mg L⁻¹ e apresentou pouca variação a partir desta concentração, indicando que *C. lunulatum* pode utilizar o acetato de sódio como fonte de carbono para o seu metabolismo.

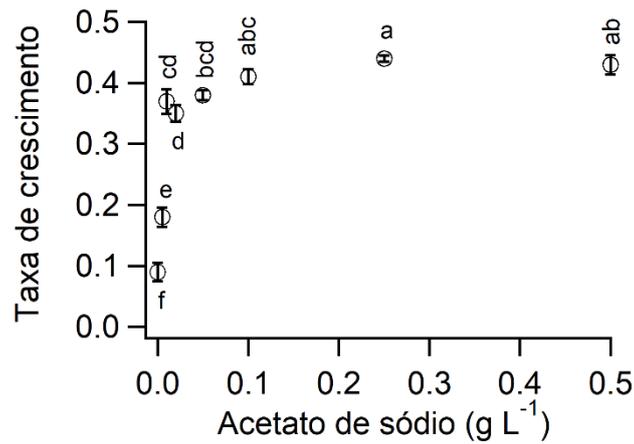


Figura 2- Taxa de crescimento máxima (d^{-1}) de *C. lunulatum* em função da concentração de acetato de sódio. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$). Intensidade de luz: $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Na Figura 3 são apresentadas as variações da intensidade luminosa dentro (Figura 3A) e fora (Figura 3B) do reator, juntamente com a temperatura (Figura 3C), ao longo do tempo. Durante os primeiros dias (dia 1 e 2) foram utilizados sombrites (30 e 50%) para controlar a intensidade luminosa, nos dias 3, 4 e 5, o tempo estava nublado, sendo que no dia 4, houve precipitação. A partir do dia 6 havia sol e o cultivo estava mais denso, acarretando menor penetração de luz no reator. Além disso, a amplitude térmica dentro da estufa ao longo do dia variou bastante, com temperatura mínima de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e máxima de $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

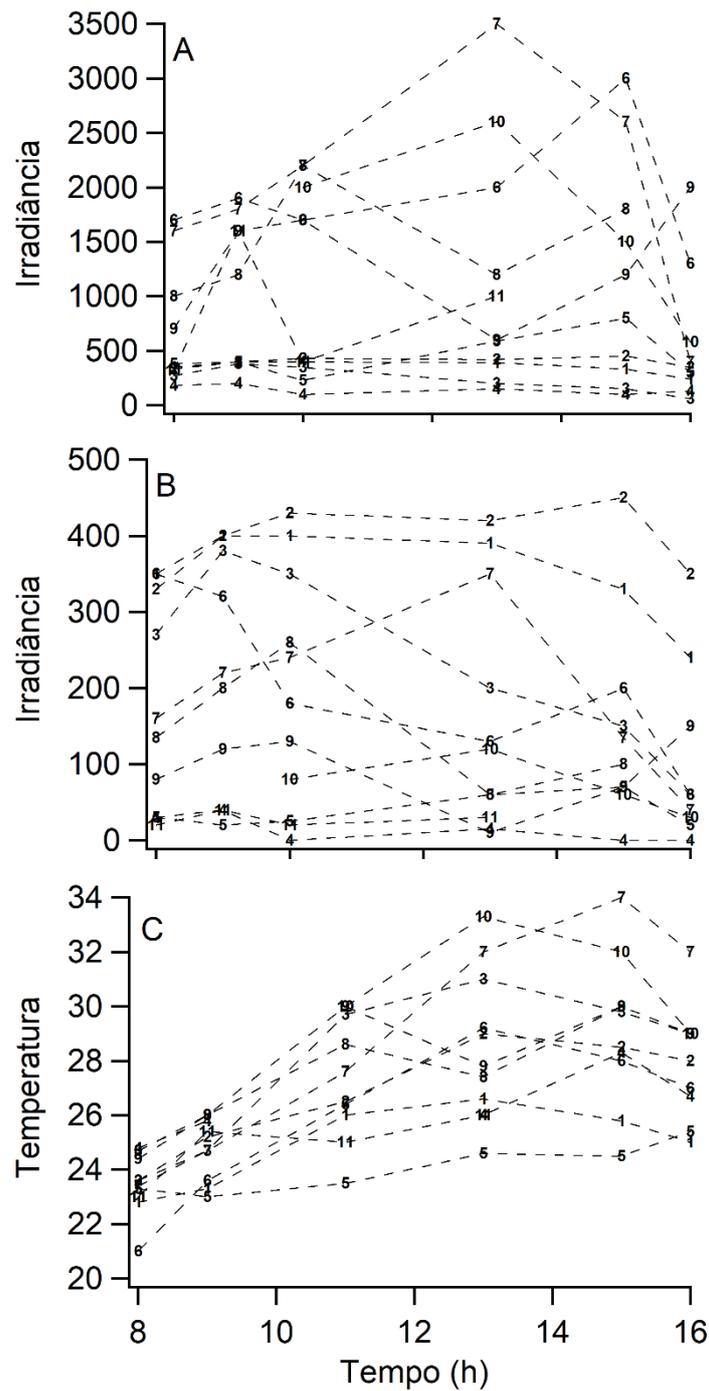


Figura 3- Condições ambientais. Em A, irradiância incidente no reator ($\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em função o tempo (horas); em B, irradiância medida dentro do reator ($\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em função o tempo (horas) e em C, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em função do tempo (horas). Símbolos: números correspondentes ao dia de cultivo. No Quadro 1 são mostrados os dados usados nesta figura.

Quadro 1- Irradiância externa/interna medida dentro do reator em diferentes horários ao longo do dia e por 11 dias ($\mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O asterisco (*) significa que não foi mensurada a luz naquele horário.

Tempo (dia)	Irradiância					
	8h	9h	11h	13h	15h	16h
0						300/300
1	350/350	400/400	400/400	390/390	330/330	240/240
2	330/330	400/400	430/430	420/420	450/450	350/350
3	270/270	380/380	350/350	200/200	150/150	60/60
4	180/180	200/300	100/100	150/150	100/100	130/130
5	380/30	400/20	230/25	590/60	800/70	300/20
6	1700/350	1900/320	1700/180	2000/130	3000/200	1300/60
7	1600/160	1800/220	2200/240	3500/350	2600/135	400/40
8	1000/135	1200/200	2200/260	1200/60	1800/100	*
9	700/80	1600/120	1700/130	600/10	1200/70	2000/150
10	*	*	2000/80	2600/120	1500/60	580/30
11	320/20	1600/40	400/20	1000/30		

A Figura 4 mostra os parâmetros de crescimento de *C. lunulatum*. A taxa de crescimento (Figura 4A) durante a fase exponencial foi $1,45 \text{ d}^{-1}$. Houve um aumento na produção de biomassa (Figura 4B) para o tratamento com adição de acetato a partir do 8º até o 11º dia, sendo estatisticamente superior aos demais ($p > 0,05$), rendendo um máximo de $2,7 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa seca. No último dia a produção de biomassa foi 1,3 vezes maior na condição com acetato em comparação com o controle. Isso indica que a adição de acetato pode ser uma estratégia para aumentar a produção de biomassa de *C. lunulatum*. Além disso, a curva de concentração de fosfato (Figura 4C) mostrou um maior consumo deste nutriente durante a fase exponencial de crescimento, e após essa fase, a concentração de fosfato foi cerca de 10 vezes menor que a sua concentração inicial, coincidindo com o início da fase estacionária.

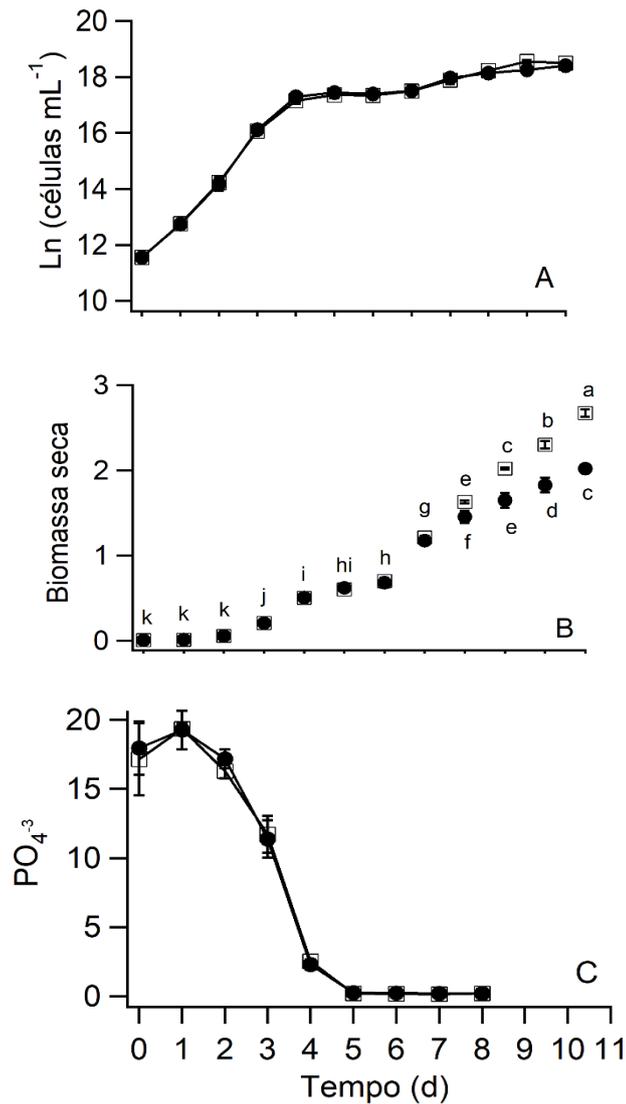


Figura 4- Parâmetros de crescimento em cultivos de *C. lunulatum* em função do tempo. Em A, curva de crescimento apresentada em células mL⁻¹; em B, biomassa seca em g L⁻¹ e em C, o nutriente fosfato em mg L⁻¹. Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

A Figura 5 mostra os pigmentos clorofila *a* e carotenoides totais nos cultivos. O conteúdo de clorofila *a* (Figura 5A) assim como o de carotenoides totais (Figura 5B) foram similares entre os tratamentos, e maiores durante a fase estacionária de crescimento, em comparação com o início da cultura e fase exponencial. Considerando a concentração de pigmentos entre os dias durante a fase estacionária, a partir do 9º dia de cultivo, não houve diferença significativa ($p>0,05$).

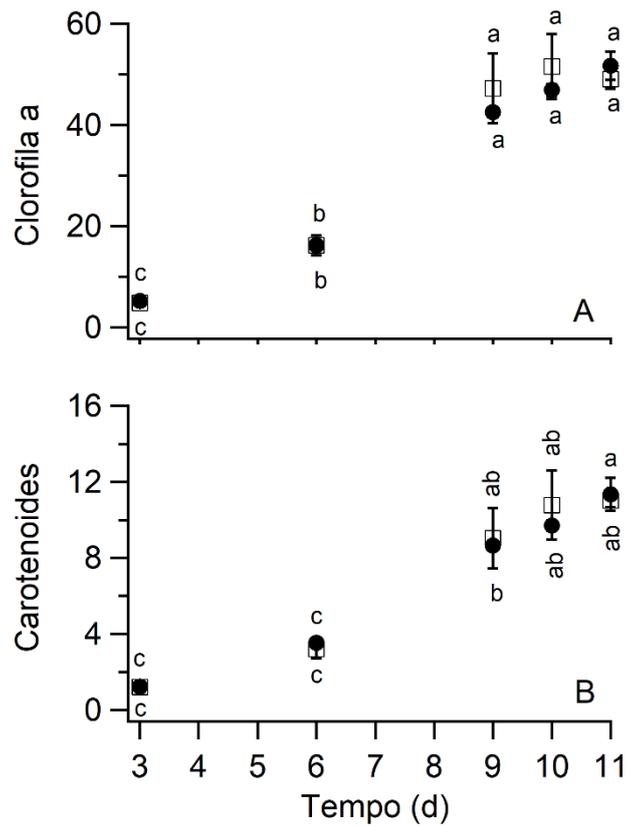


Figura 5- Pigmentos nos cultivos de *C. lunulatum* mantida em estufa agrícola. Valores em mg L⁻¹. Em A, clorofila *a*; em B, carotenoides totais. Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

Na Tabela 1, são apresentados os pigmentos em relação à biomassa (mg pigmento por g biomassa seca), juntamente com as razões entre clorofila *a* e *b* e carotenoides totais. É possível notar que esses parâmetros permaneceram relativamente constantes ao longo do tempo, mantendo-se a proporção. A exceção ocorreu no 11º dia no tratamento com de acetato de sódio, em que os valores foram menores em relação à condição controle, com uma concentração de clorofila *a* de 18,13 mg e carotenoides de 5,04 mg por grama de biomassa seca.

Tabela - Pigmentos clorofila *a* (Chla) e carotenoides totais apresentados em mg por g de biomassa seca; razão clorofila *a*/clorofila *b* (Chlb) e razão clorofila total (ChlT)/carotenoides totais. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$). ChlT = Chla+Chlb.

Tempo (d)	Clorofila <i>a</i>		Carotenoides		Chla:Chlb		ChlT:Carotenoides	
	Controle	Acetato	Controle	Acetato	Controle	Acetato	Controle	Acetato
3	25.3	23.1	5.9	5.8	1.4	1.5	7.2	6.6
	(1.3) ^a	(1.2) ^a	(0.2) ^a	(0.3) ^{ab}	(0.01) ^{ab}	(0.1) ^{ab}	(0.34) ^{cd}	(0.18) ^d
6	23.8	23.1	5.2	4.6	1.5	1.5	7.7	8.4
	(1.8) ^a	(2.0) ^{ab}	(0.7) ^{abcd}	(0.5) ^{cd}	(0.03) ^{ab}	(0.1) ^{ab}	(0.48) ^{bcd}	(0.32) ^{ab}
9	25.9	24.8	5.3	4.7	1.4	1.4	8.5	9.1
	(1.6) ^a	(0.9) ^a	(0.4) ^{abc}	(0.4) ^{bcd}	(0.07) ^b	(0.1) ^b	(0.36) ^{ab}	(0.7) ^a
10	25.8	24.1	5.3	5.0	1.5	1.6	8.1	7.9
	(1.9) ^a	(0.1) ^a	(0.4) ^{abc}	(0.2) ^{abcd}	(0.04) ^{ab}	(0.07) ^a	(0.1) ^{bc}	(0.6) ^{abc}
11	25.6	18.1	5.6	4.1	1.5	1.6	7.7	7.3
	(1.4) ^a	(0.3) ^b	(0.4) ^{abc}	(0.1) ^d	(0.02) ^{ab}	(0.11) ^a	(0.16) ^{bcd}	(0.2) ^{cd}

A Figura 6 mostra os parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas rápidas de luz (RLC). A taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, Figura 6A) aumentou gradualmente ao longo do tempo. A eficiência de absorção de luz (α , Figura 6B) foi semelhante no 3° e 6° dias, mas diminuiu no 9° dia. Por outro lado, tanto a intensidade luminosa saturante (E_k , Figura 6C) quanto a taxa de transporte de elétrons máxima (ETRmax, Figura 6D) aumentaram ao longo do tempo, alcançando os valores mais altos no 9° dia, e sendo estatisticamente superiores aos demais ($p<0,05$).

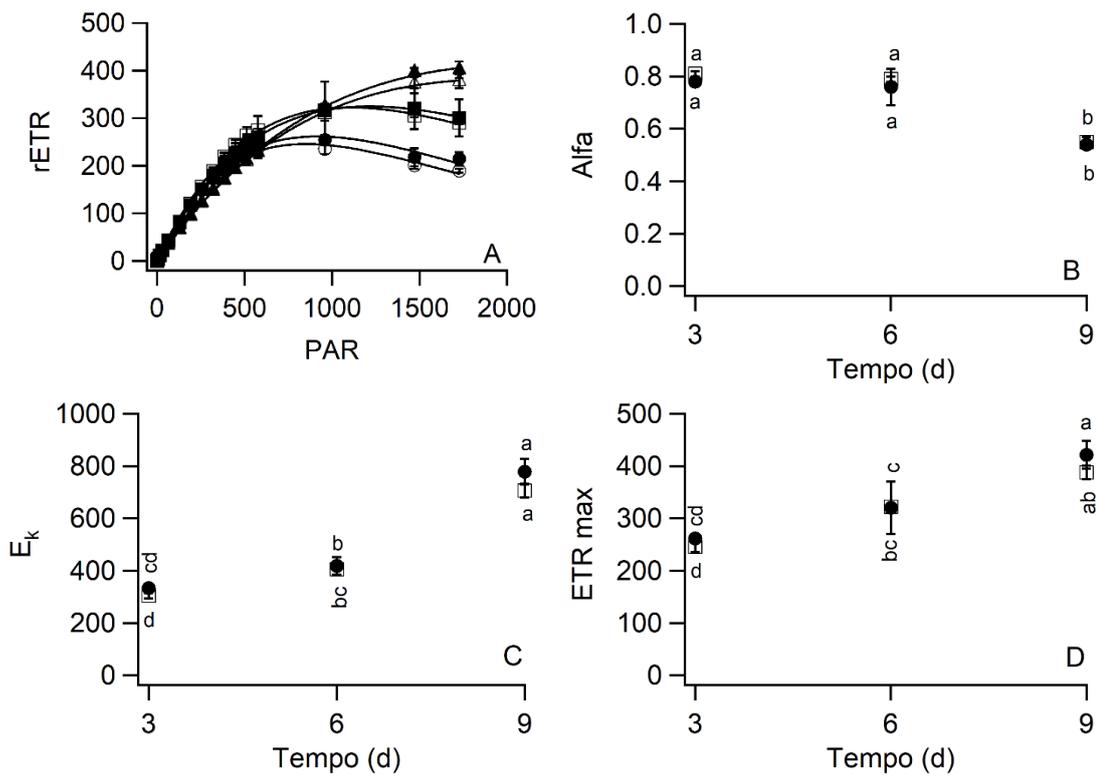


Figura 6- Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das curvas rápidas de luz. Em A, curvas rápidas de luz, representadas pela rETR ($\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em função da intensidade luminosa ($\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Símbolos: losango, dia 3; triangulo, dia 6 e ampulheta, dia 9; símbolos fechados, controle e abertos, acetato. Em B, alfa ($\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$); em C, E_k em função do tempo experimental em dia; em D ETRmax (elétrons $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Símbolos: círculo fechado, controle; e quadrado aberto, acetato de sódio. Os valores representam a média e desvio padrão ($n=3$), letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$).

A Figura 7 mostra a produção de biomoléculas. Observou-se pouca ou nenhuma influência na composição de proteínas, carboidratos e lipídios totais em exposição ao acetato de sódio em comparação ao controle. Porém, há um maior conteúdo de proteínas na biomassa (Figura 7A), durante a fase exponencial de crescimento, especificamente no 3° e 5° dias. Entretanto, o conteúdo de carboidratos (Figura 7B) e lipídios (Figura 7C) na biomassa foram relativamente constantes ao longo do tempo experimental. Para proteínas, o conteúdo variou de 24 a 53%, carboidratos de 14 a 21,5% e lipídios de 22 a 32%.

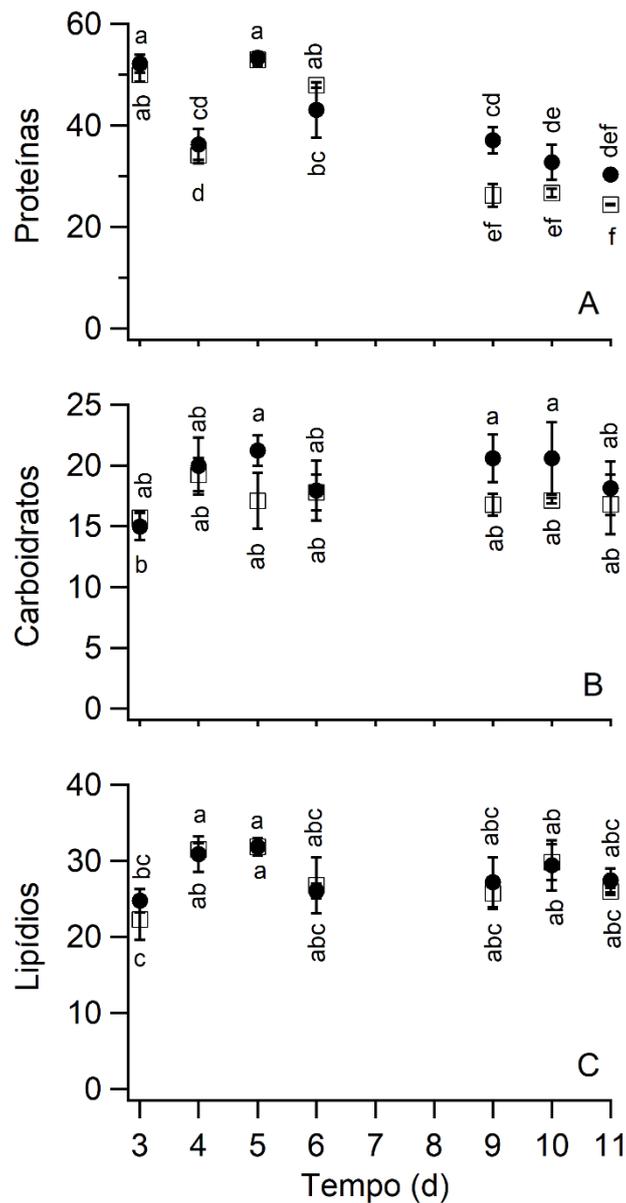


Figura 7- Porcentagem de biomoléculas na biomassa de *C. lunulatum* em função do tempo experimental em dias. Em A, proteínas totais; em B, carboidratos totais e, em C, lipídios totais. Símbolos: círculo fechado, controle; quadrado aberto, acetato de sódio. Os valores representam a média e o desvio padrão (n=3); letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

A Figura 8 mostra a atividade antioxidante da biomassa. A adição de acetato de sódio no meio não influenciou na atividade antioxidante. O potencial antioxidante (Figura 8A) aumentou ao longo do tempo, sendo maior no 11º dia na condição controle, com valor de 30%. O conteúdo de polifenóis (Figura 8B) não sofreu alteração entre as fases exponencial e estacionária, nem entre os tratamentos e nem ao longo do tempo experimental ($p > 0,05$), com valores de 7,2 a 8,4 mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹.

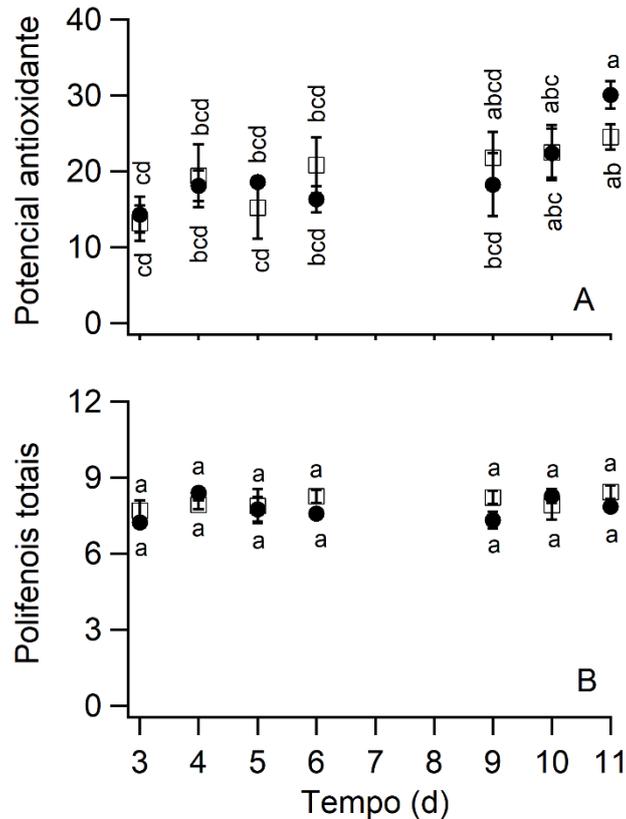


Figura 8- Atividade antioxidante em *C. lunulatum* em função do tempo experimental em dias. Em A, potencial antioxidante em porcentagem, e em B, compostos fenólicos em mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹. Os valores representam a média e desvio padrão (n=3); letras iguais indicam diferença não significativa ($p > 0,05$).

4.5 DISCUSSÃO

A habilidade da microalga *C. lunulatum* em realizar metabolismo mixotrófico foi confirmada pelas taxas de crescimento observadas em diferentes concentrações de acetato de sódio, onde a assimilação do carbono orgânico ocorreu mesmo em concentrações baixas. As algas mixotróficas têm a capacidade de realizar fotossíntese e, ao mesmo tempo, assimilar e metabolizar o carbono orgânico como fonte de energia (Smith et al., 2015). Wen et al. (2019), mostraram a viabilidade da adição de 180 mg L⁻¹ de acetato de sódio no cultivo da microalga *Graesiela sp.*, em escala laboratorial. Essa adição aumentou a produção de biomassa entre 15 a 29%. Os autores testaram várias estratégias de adição do acetato de sódio, e quando foi adicionado todos os dias durante 8 dias, o aumento de biomassa foi de 29% em comparação ao

controle. Entretanto a concentração ótima de acetato de sódio a ser utilizada pode variar de acordo com a espécie de microalga em questão. Por exemplo, Chavoshi e Shariati (2019), cultivaram *Dunaliella salina* sob condições mixotróficas com concentrações de acetato de sódio variando de 4 a 16,4 g L⁻¹, e observaram que a densidade celular foi cerca de 2 vezes maior na concentração de 8 g L⁻¹, em comparação ao cultivo autotrófico. Rai et al. (2013), observaram uma melhoria significativa no crescimento, quantidade e qualidade de lipídios em *Chlorella pyrenoidosa* quando foi adicionado 10 mg L⁻¹ de acetato de sódio, resultando em um aumento de 6 vezes na produção de biomassa e 5 vezes na produção de lipídios em comparação ao controle.

Os dois principais fatores que controlam a produtividade das microalgas ao ar livre são a intensidade luminosa e a temperatura, com uma interação clara entre eles (Richmond, 1992). Na estufa agrícola, observamos que as oscilações térmicas, comuns em ambiente sem controle, persistiu ao considerarmos a amplitude térmica. A intensidade luminosa na estufa agrícola segue o padrão do ambiente, sendo influenciada pela presença/ausência de nuvens. Sabe-se que tais flutuações podem afetar as condições de crescimento das microalgas e, conseqüentemente, sua produção (Ras et al., 2013; Borowitzka, 2016).

Apesar das oscilações a que as culturas mantidas na estufa agrícola (ambiente semi-controlado) estiveram sujeitas, *C. lunulatum* apresentou taxa de crescimento (1,45 d⁻¹), maior do que a maioria dos resultados reportados na literatura. Haneda et al. (2015) cultivaram *Chlorella sorokiniana* em condições semi-controladas, em estufa agrícola, em reator de 180 L e obtiveram taxa de crescimento de 1,10 d⁻¹. Sabe-se que as espécies do gênero *Chlorella* são robustas o suficiente para produção em escalas ampliadas, pois apresentam alta produtividade e tolerância à variação nas condições de cultivo (Wang et al., 2018). Blanco et al. (2007), cultivaram *Muriellopsis* sp. ao ar livre em lagoas abertas e obtiveram taxa de crescimento na fase exponencial de 0,16 d⁻¹. Freitas et al. (2017), cultivaram *Chlorella minutissima* em *raceway* e obtiveram taxa de crescimento de 0,41 d⁻¹. Sabemos, entretanto, que a taxa de crescimento algal é espécie-específica, apesar de poder variar conforme as condições ambientais.

As culturas apresentadas nesta pesquisa, renderam biomassa seca da ordem de 2 g L⁻¹ para a condição controle e 2,7 g L⁻¹ para o tratamento com a adição de acetato, estando dentro da média reportada na literatura, e também de acordo com a literatura está o aumento de biomassa microalgal que obtivemos mediante adição de acetato de sódio no meio de cultivo. De acordo com Goswami et al. (2022), o acetato de sódio pode ser assimilado pelo ciclo do

ácido tricarbóxico para formar citrato na mitocôndria. Estes, por sua vez, fornecem os esqueletos de carbono e energia com redução de ATP e NADH. Assim, o acetato de sódio pode ter melhorado o fluxo metabóxico do carbono no ciclo intracelular do ácido cítrico e contribuído para o aumento da produção de biomassa. Wen et al. (2019), cultivaram *Graesiella* sp. WBG-1 em *raceway* de 200 m², ao ar livre, adicionaram acetato de sódio e 180 mg L⁻¹ do produto aumentou a produção de biomassa em 1,4 vezes. Esse aumento foi similar ao encontrado neste estudo, de 1,3 vezes.

A cultura de *C. lunulatum* apresentou um comportamento padrão de sistema estanque, com as fases exponencial e estacionária. O início da fase estacionária coincidiu com a limitação de luz e de fosfato. Neste estudo, a partir do 5º dia o valor de fosfato estava abaixo deste ótimo recomendado e 10 vezes menor do que o inicial no cultivo, assim reduzindo a divisão celular. Dada à alta densidade do cultivo, a luz interna também pode ser considerada um fator limitante ao crescimento. Sabe-se que o fósforo é um nutriente essencial para o crescimento e divisão celular das microalgas (Yaakob et al., 2021) e, de acordo com Roopnarain et al. (2014), a concentração ótima de fósforo para microalgas está na faixa de 0,001 a 0,179 g L⁻¹. Entretanto, as algas podem armazenar nitrogênio e fósforo, sugerindo que a concentração ideal pode mudar dinamicamente em função do armazenamento desses nutrientes nas células (Wagner et al., 2021).

A curva rápida de luz fornece informações que se relacionam com a saturação do transporte de elétrons, bem como o desempenho fotossintético de uma cultura de microalgas (Jerez et al., 2016). Nossos resultados sugerem que as mudanças nas condições ambientais impostas ao cultivo provavelmente causaram uma fotoaclimatação nas células microalgais com alteração do α , E_k e ETR_{max} ao longo do tempo. A variação do E_k que obtivemos neste estudo pode estar relacionada com um mecanismo fisiológico de fotoaclimatação nas microalgas, o que faz com que as células algais consigam manter o equilíbrio entre a captura de energia fotossintética e a capacidade do sistema fotossintético em processar essa energia (Falkowski; Raven, 2013). Como na estufa agrícola a irradiância no ambiente externo flutua ao longo do dia e entre os dias, ocorre variação contínua no E_k , o que é associado à fotoaclimatação (Sakshaug et al., 1997).

A redução da eficiência com que a célula usou a luz, representada pelo coeficiente α da RLC no 9º dia de cultivo junto com o aumento da ETR_{max} e do E_k pode ser característico de

células adaptadas à altas irradiâncias, mas que se encontram em situação de oscilações de luz, caso do nosso cultivo. Resultado similar foi observado em *Chlorella fusca* cultivada em reatores de cascata *thin-layer* por Jerez et al. (2016). Os autores observaram que células cultivadas em uma razão superfície/volume maior apresentaram menor α , maior ETR_{max} e E_k, quando comparadas às culturas cultivadas em uma razão superfície/volume menor, portanto, essas células ficaram mais expostas a luz. Com isso, os autores sugeriram que as mudanças observadas nesses parâmetros eram uma adaptação a alta irradiância. Assim como observado neste estudo, na qual a luz incidente foi maior nos dias anteriores ao dia 9 do que nos dias anteriores ao dia 3 e 6.

Em cultivos densos é comum ocorrer o autossombreamento das células, o que pode gerar uma exposição desigual à luz (Abuisi et al., 2020). Uma mistura eficiente da cultura de microalgas é capaz de expor as células de maneira mais uniforme à luz, o que pode minimizar o efeito do autossombreamento e melhorar a produtividade fotossintética das microalgas (Masojídek et al., 2021). Portanto, uma das hipóteses que propomos para explicar a variação dos parâmetros da RLC é que com agitação, as células são expostas a uma maior irradiância intermitente, pois a luz que incidiu no cultivo foi maior do que luz que penetrou. Essa grande variação pode explicar as alterações dos parâmetros fotossintéticos observados. Devemos considerar ainda que a luz recebida não é o único fator que modula a fotossíntese e o crescimento das microalgas, a frequência do ciclo claro/escuro que cultivos densos de microalgas sofrem também afeta a fotossíntese e, conseqüentemente, o crescimento. Com isso, uma mistura eficiente do cultivo de microalgas pode aumentar tanto a atividade fotossintética quanto a produtividade (Masojídek et al., 2021).

Os resultados obtidos neste estudo mostram a robustez da microalga *C. lunulatum* frente às variações das condições climáticas e são corroborados pelas razões entre clorofila *a* e *b*. Uma razão entre clorofila *a* e *b* maior que 1 indica que haver clorofila *a* suficiente para que a fotossíntese ocorra, ou ainda, o desequilíbrio nesta razão pode indicar danos à fotossíntese (Stablein et al., 2021). Nossos resultados estão de acordo com os presentes na literatura, nos quais as razões entre clorofila *a* e *b* variam de 1,2 a 1,6 para microalgas Chlorophyta (Eggink et al., 2001; Stablein et al., 2021). Isso sugere que variações que levaram à fotoaclimação foram suficientes para manter a composição dos pigmentos fotossintéticos, fato confirmado por não ter ocorrido perda de biomassa em momento algum da cultura.

A clorofila *a* é um dos principais pigmentos responsáveis pelo processo fotossintético (Carvalho et al., 2011). Espera-se, por exemplo, que sob alta luminosidade haja uma diminuição do conteúdo de clorofila *a*, ou em baixa irradiância haja um aumento desse pigmento (Hu 2013, Sathasivam; Ki 2018). Porém, o conteúdo de clorofila *a* presente na biomassa se manteve constante desde o início até o 10º dia de cultivo, sugerindo novamente que a fotoaclimatação celular não envolveu tal pigmento.

Quanto aos pigmentos carotenoides, sabe-se que sua síntese pelas microalgas é influenciada por fatores de estresse, como temperatura, intensidade luminosa, salinidade e, portanto, dependendo das condições ambientais o acúmulo desta biomolécula poderá ocorrer (Di Lena et al., 2019). Os carotenoides são essenciais para manter a estrutura e função dos complexos fotossintéticos através da eliminação de espécies reativas de oxigênio e dissipação do excesso de energia (Demming-Adams; Adams, 2002; Del Campo et al., 2007), protegendo a clorofila *a*. Apesar de toda a variação de luz à que os cultivos foram expostos, a proporção de carotenoides na biomassa sofreu pouca variação ao longo do tempo, assim como a razão entre clorofila total (*a* e *b*) e carotenoides totais. Portanto, as oscilações nas condições observadas não causaram estresse suficiente a fim de afetar o conteúdo de clorofila *a* e carotenoides totais na biomassa, até o 10º dia.

A menor concentração de clorofila *a* no 11º dia de cultivo pode indicar uma mudança na rota metabólica com preferência no uso do carbono orgânico fornecido por meio do acetato de sódio. De acordo com a literatura, a disponibilidade de carbono orgânico pode acarretar em uma diminuição na concentração de clorofila e alterações em outros pigmentos (Ogawa; Aiba, 1981; Kobayashi et al., 1992; Van Wageningen et al., 2015). Os efeitos da presença de carbono orgânico na composição pigmentar de microalgas mixotróficas é ainda pouco entendido. Cheng et al. (2021), observaram que concentrações baixas (10 mg L⁻¹) de acetato de sódio contribuíram para um maior acúmulo de pigmentos como clorofila *a* e carotenoides totais, porém em concentrações mais altas (250 mg L⁻¹) levou a uma diminuição no conteúdo desses pigmentos em *Scenedesmus obliquus*. Ashokkumar e Rengasamy (2012) cultivaram *Botryococcus braunii* em *raceway* e o conteúdo de carotenoides totais aumentou de 0,05 mg L⁻¹ para 11,8 mg L⁻¹ até 15º dia e conteúdo de clorofila *a* também aumentou atingindo o maior valor de 14,2 mg L⁻¹ no 9º dia. Millán-Oropeza e Fernández-Linares (2017) cultivaram *Nannochloropsis oculata* em *raceway* de 200 L em estufa agrícola, e obtiveram que a maior produção de carotenoides foi de 2 mg L⁻¹ e de clorofila *a* 11,6 mg L⁻¹ durante o inverno, ou

seja, em condições de baixa intensidade luminosa. Portanto, sugerimos que *C. lunulatum* é uma espécie robusta e que as variações registradas, tanto das condições climáticas como do fornecimento do substrato orgânico na concentração usada, foram incapazes de induzir aumento ou redução em sua composição de pigmentos.

O teor de proteínas em média 50% na biomassa seca obtido na fase exponencial de crescimento nos cultivos de *C. lunulatum* está dentro do relatado na literatura para microalgas em geral. De acordo com Chacón-Lee e González (2010) e Wang et al. (2021), o teor de proteínas na biomassa de microalgas é maior do que 40%. De fato, as proteínas são um dos constituintes mais importantes em microalgas, estando presentes no material genético e necessários à replicação celular, portanto é de se esperar que estejam presentes na ordem de 40 a 60%, podendo variar conforme a cepa e condições de cultivo (Wang et al., 2021). Entretanto, Ashokkumar e Ramasamy et al. (2012) cultivaram *Brotrycoccus braunii* em *raceway* e obtiveram apenas 18% de proteínas na biomassa seca. Já, Li et al. (2020), cultivaram *Nannochloropsis oceanica* em 1000 L ao ar livre e obtiveram 53% de proteínas em relação peso seco no 12º dia, com posterior decréscimo, similar ao presente estudo, cujas culturas apresentaram redução de proteínas ao final do experimento. Nesta pesquisa, a adição de acetato de sódio não influenciou o conteúdo de proteínas totais. Apesar disso, fontes de carbono orgânico como o acetato de sódio ou a glicose podem aumentar o conteúdo de proteínas. De acordo com Cecchin et al. (2018), a mixotrofia pode aumentar a expressão de enzimas envolvidas na síntese de triptofano e assim aumentar o conteúdo de proteínas por células ou ainda pode ocorrer a regulação positiva de várias subunidades de proteínas ribossomais. Wan et al. (2011), observaram que em cultivos mixotróficos o conteúdo de proteínas aumentou com o aumento na concentração de glicose no meio até 15 g L⁻¹, acima disso a concentração de proteínas diminuiu em *C. sorokiniana*. Portanto, é provável que a concentração de acetato de sódio utilizado neste estudo foi insuficiente para estimular a produção de proteínas.

A manutenção constante do teor de carboidratos na biomassa de *C. lunulatum* (15 a 20%), mesmo considerando as variações de intensidade de luz a que os cultivos ficaram expostos, e lipídios em torno de 30% (constante durante o cultivo), pode ser um indicativo de que óleos possa ser uma forma de reserva preferencial nesta espécie, em lugar do amido, comumente o material de reserva das Chlorophyta (Cheng et al., 2017). Nem mesmo a presença de acetato de sódio usado em metabolismo mixotrófico por *C. lunulatum* causou qualquer variação no teor dessas biomoléculas. De acordo com Syrret et al. (1964) e Yu et al. (2022), o

acetato de sódio pode, dependendo da concentração usada, aumentar a expressão de genes envolvidos no metabolismo do carbono, incluindo a glicoxilato e ciclo do ácido tricarbóxico ou ainda aumentar a atividades de várias enzimas envolvidas na síntese de carboidratos, podendo aumentar o acúmulo dessa biomolécula nas microalgas. Possivelmente a concentração de acetato de sódio (100 mg L^{-1} a 1 g L^{-1}) utilizado nesta pesquisa não foi suficientemente alta para estimular a produção de carboidratos (e nem de lipídios), ainda que tenha estimulado a produção de biomassa.

Sabe-se que, além de melhorar o fluxo de carbono no ciclo do ácido cítrico com respectivo ganho de biomassa, o acetato de sódio é precursor da síntese de lipídios em microalgas. A acetil-CoA sintetase catalisa a formação de acetil CoA a partir do acetato em células algais, que por sua vez participa da síntese lipídica (Cheng et al., 2021). Apesar disso, a via de síntese de lipídios com a adição de acetato de sódio, neste estudo, não foi estimulada nas concentrações de acetato utilizadas. Wen et al. (2019), em cultivos com *Graesiella* sp. em *raceway* abertos de 200 m^2 , também observaram que a adição de acetato de sódio aumentou a produção de biomassa, porém a porcentagem de lipídios presentes na biomassa foi relativamente constante e similar em comparação com o controle.

Em geral, os valores de lipídios obtidos neste estudo foram maiores do que os relatados em Gong e Jiang (2011). De acordo com os autores, para que uma cepa de microalga seja utilizada como matéria-prima na produção de biodiesel ela precisaria ter pelo menos 20% de lipídios na biomassa seca. Considerando a proposta dos autores e o fato de que *C. lunulatum* produziu cerca de ~30% de lipídios na biomassa seca, tanto no controle como no tratamento com acetato de sódio, esta é uma cepa com alto potencial para a produção de biocombustível. Os valores de lipídios que obtivemos em porcentagem de biomassa foram próximos ou maiores a outros presentes na literatura. Blanco et al. (2007), cultivaram *Muriellopsis* sp. e obtiveram 23,5% de lipídios na biomassa seca. Ashokkumar e Ramasamy et al. (2012), cultivando *Brotryococcus braunii* em escala ampliada (2000 L) obtiveram 19% de lipídios. Li et al. (2020), cultivando *Nannochloropsis oceanica*, em lagoa aberta ao ar livre obtiveram, em média, um teor de lipídios na biomassa seca de 21%. Confirmamos, portanto, que a espécie estudada neste estudo produz uma quantidade elevada de lipídios durante o crescimento exponencial, mesmo que essa molécula não tenha aumentado na fase estacionária. Sugerimos que, em um estudo futuro, a qualidade dos lipídios seja analisada, por exemplo, determinando-se o perfil de ácidos graxos.

Os resultados obtidos quanto ao potencial antioxidante e compostos fenólicos de extratos de *C. lunulatum* neste estudo, estão dentro do esperado para microalgas em geral. De acordo com a literatura, o percentual antioxidante em microalgas pode variar de 9 a 35% para diferentes espécies (Hemalatha et al., 2013; Saranya et al., 2014; Safafar et al., 2015). Nossos resultados de compostos fenólicos em *C. lunulatum* estão de acordo com os de Hajimahmoodi et al. (2010), que encontraram um total de compostos fenólicos de 7,7 mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹ para *Chlorella vulgaris*. Entretanto, o potencial antioxidante de *C. lunulatum* foi cerca de 3 vezes maior do que o obtido pelos autores para *Chlorella vulgaris*. Apesar do elevado potencial antioxidante de *C. lunulatum* (este estudo), não raro é encontrado na literatura potenciais antioxidantes ainda maiores. Haoujar et al. (2019), determinaram o potencial antioxidante em 4 espécies de microalgas marinhas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloris* sp, *Tetraselmis suecica*, e *Nannochloropsis gaditana*) e encontraram valores que variaram de 51 a 65,5%, além do teor de compostos fenólicos que variou de 22 a 29 mgEq GAE g⁻¹ DW⁻¹.

Análise de nossos resultados mostra que embora tenha havido um aumento no potencial antioxidante com o tempo, os compostos fenólicos não contribuíram para esse aumento, já que o conteúdo de polifenóis totais não se alterou. Os compostos fenólicos são uma importante classe de antioxidantes em plantas superiores e macroalgas, mas só recentemente vêm sendo estudados em microalgas (Coulombier et al., 2021). Sabe-se que esses compostos podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio, principalmente, por transferência de átomos de hidrogênio. Sua atividade antioxidante está relacionada diretamente à sua estrutura química, como o número de grupos hidroxila ou sua posição no ciclo aromático (Shahidi; Ambigaipalan 2015; Coulombier et al., 2021). De acordo com Safafar et al. (2015), apesar dos carotenoides e compostos fenólicos serem os principais contribuintes para a potencial antioxidante, outros compostos bioativos presentes nas microalgas também podem contribuir para tal atributo.

4.6 ANÁLISE TECNO-ECONÔMICA

A Tabela 2 apresentada a seguir mostra os valores de produção anual de biomassa de *C. lunulatum* sem e com a adição de acetato de sódio no meio de cultivo. Nota-se que a adição de acetato de sódio aumentou a produção de biomassa em cerca de 32% e reduziu o custo de produção em 21%.

Tabela 2- Produção de biomassa sem e com a adição de acetato e custo calculado da respectiva produção.

	Biomassa (kg ano ⁻¹)	Custo (R\$/kg)
Sem a adição de acetato (controle)	75,8	1873,08 (342 €/kg)
Com a adição de acetato	100,2	1484,47 (271 €/kg)

A Tabela 3 mostra os valores de porcentagem dos custos de operação para os dois tratamentos, sem e com acetato de sódio. Observa-se que a injeção de CO₂ no meio de cultivo foi o fator que mais impactou no custo de operação, sendo em torno de 26%, seguido dos custos de depreciação, manutenção e energia.

Tabela 3- Custo de operação (%) para produção de biomassa.

	Sem acetato de sódio	Com acetato de sódio
Meio de cultivo	4,56	8,9
Água	0,27	0,25
Energia	13,32	12,72
CO ₂	26,17	24,98
Insumos	9,91	9,46
Manutenção	16,90	16,14
Salário	4,01	3,82
Depreciação	21,44	20,47
Custos diretos	1,12	1,08
Custos indiretos	2,28	2,19

Os resultados obtidos indicam que o custo de produção da biomassa de *C. lunulatum* em escala ampliada ainda é alto quando comparado com valores reportados na literatura. De acordo com Vázquez-Romero et al. (2022), os valores variam entre 2,90 a 290 €/kg. Ainda segundo o autor essa variação no custo de produção da biomassa pode ser atribuída a diversos fatores

como a escala de produção, a suposições feitas através de modelos e projeções ou ainda a falta de homogeneidade nos procedimentos de análise dos custos.

A adição de acetato de sódio no meio de cultivo aumentou os custos operacionais, porém reduziu o custo de produção. Apesar disso, mesmo com a adição de acetato, a produção de biomassa obtida nas condições da estufa agrícola ainda é baixa. Para tornar o custo de produção da biomassa mais atrativo em termos de custo-benefício, é necessário aumentar a produção de biomassa por unidade de área e assim maximizar a produtividade e reduzir os custos de produção. Dentro das condições e equipamentos utilizados neste experimento, seria necessário aumentar a produção de biomassa em pelo menos 5 vezes, passando-se de $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ para $\sim 13,5 \text{ mg L}^{-1}$. Contudo, o custo-benefício varia de acordo com o preço de venda da biomassa, que depende do mercado e do tipo de aplicação. De acordo com Vázquez-Romero et al. (2022), o valor de mercado da biomassa microalgal varia entre 8,97 a 134,48 €/kg. Sendo assim, para que a produção de biomassa de microalgas seja economicamente viável, é necessário não só reduzir os custos de produção, mas também comercializar produtos de alto valor agregado (Cruz, 2011).

Além desses fatores, a injeção de CO_2 no meio de cultivo foi o principal custo na produção das microalgas, como também observado por Acién et al. (2012). Os autores relataram que houve perdas cerca de 25% de CO_2 no processo. Doucha e Lívanský (1995) mostraram que em reatores do tipo *thin-layer* a perda de CO_2 para a atmosfera foi cerca de 54,7%. É provável que no presente estudo tenha havido perdas de CO_2 para a atmosfera, sem total solubilização no meio de cultura, pois a relação do consumo de CO_2 e a produção da biomassa foi cerca de 13 vezes maior do que observado por Acién et al. (2012). Eles obtiveram uma relação de 2,3 a partir de dados experimentais, que está próximo valor próximo teórico de 1,8. De acordo com Cheng et al. (2018), aumentar a eficiência de utilização do CO_2 pode reduzir custos operacionais. É sabido que a eficiência de uso do CO_2 depende da proporção de CO_2 convertido em biomassa e da taxa de transferência de massa do gás para o líquido. Portanto, aumentando-se o tempo de retenção na coluna de borbulhamento do CO_2 , que no nosso caso era de 7 m, pode-se aumentar a eficiência de uso do gás.

De acordo com Caia et al. (2018), uma fração das bolhas injetadas em reatores abertos chegam à superfície antes de se dissolverem na cultura. A concentração de CO_2 no reator geralmente excede a concentração de equilíbrio com a atmosfera criando-se uma tendência de transferência do CO_2 da cultura para a atmosfera. Isso ocasiona um maior consumo nos sistemas abertos. Assim, Caia et al. (2018), propõem a otimização de alguns parâmetros para reduzir as

perdas de CO₂. Entre eles destacam-se o comprimento e a posição do difusor de CO₂, a vazão de CO₂ e a velocidade de rotação das pás. Algumas melhorias de nosso processo produtivo já estão em andamento, como por exemplo, redução do tamanho das bolhas de CO₂, efetuando-se o borbulhamento do gás por meio de placa de vidro sinterizada com tamanho de poro definido (3 a 5 µm) e redução da velocidade de circulação das bolhas.

Como sugestão propomos que outras formas de diminuir o custo com o CO₂ é o uso de fontes de CO₂ alternativas, como gases da combustão industrial (Rossi et al., 2018). Entretanto, os gases industriais possuem, em geral, outros compostos além do CO₂, podendo diminuir a qualidade e a produtividade da biomassa. Além disso, como relatado na literatura, o aumento na escala de produção da biomassa algal pode reduzir seu custo (Acién et al., 2012; Oostlander et al., 2020; Vázquez-Romero et al., 2022). Há também a possibilidade de fazer o reuso do meio de cultivo, porém mais estudos são necessários para avaliar o impacto desses processos na produção de biomassa.

4.7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que *C. lunulatum* é uma microalga Chlorophyta com grande potencial para ser cultivada em larga escala. Isso se deve devido à sua capacidade de tolerar as variações climáticas e manter seu crescimento e homeostase intracelular. Isso pode ser uma garantia de qualidade do produto final se as variações ambientais não forem tão extremas, tais como as que ocorreram neste estudo.

Quanto ao metabolismo mixotrófico, adição de acetato de sódio teve um impacto positivo na produção de biomassa, sem interferir na produção de biomoléculas. *C. lunulatum* mostrou-se promissora na produção de lipídios, representando cerca de 20 a 30% da biomassa seca, quantidade considerada adequada e suficiente de acordo com a literatura para ser explorada comercialmente. Portanto, *C. lunulatum* é uma candidata com grande potencial de aplicação em larga escala.

A análise tecno-econômico do processo produtivo mostrou que os custos obtidos para a produção de *C. lunulatum* ainda são elevados e forneceu novos direcionamentos para que o sistema possa ser melhorado. Alterando-se alguns aspectos do processo os custos poderão ser

reduzidos, com a intenção de tornar viável economicamente a produção de biomassa microalgal.

4.8 REFERÊNCIAS

ABIUSI, Fabian; WIJFFELS, Rene H.; JANSSEN, Marcel. Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S. l.], v. 8, n. 15, p. 6065-6074, 2020.

ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, J.M.; MAGÁN, J.J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 1344-1353, 2012.

ACIÉN, F.G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G.C.; SEPÖLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. Photobioreactors for the production of microalgae. **Microalgae-Based Biofuels And Bioproducts**, [S. l.], p. 1-44, 2017.

ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.

ASHOKKUMAR, Veeramuthu; RENGASAMY, Ramasamy. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 104, p. 394-399, jan. 2012.

BÉCHET, Quentin; SHILTON, Andy; GUIEYSSE, Benoit. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1648-1663, 2013.

RICHMOND, Amos (Org.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2003.

BENEMANN, John. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 5869-5886, 2013.

BLANCO, Antonio M.; MORENO, José; CAMPO, José A. del; RIVAS, Joaquín; GUERRERO, Miguel G.. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. l.], v. 73, n. 6, p. 1259-1266, 2007.

BOROWITZKA, Michael A.. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal Of Biotechnology**, [S. l.], v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013.

BOROWITZKA, M. A. Algal Physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. Em: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing. p. 601-652, 2016.

- CAIA, Margaux; BERNARD, Olivier; BÉCHET, Quentin. Optimizing CO₂ transfer in algal open ponds. **Algal Research**, [S. l.], v. 35, p. 530-538, 2018.
- CARVALHO, Ana P.; SILVA, Susana O.; BAPTISTA, José M.; MALCATA, F. Xavier. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 1275-1288, 2010.
- CECCHIN, M.; BENFATTO, S.; GRIGGIO, F.; *et al.* Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6465, 2018.
- Chacón-Lee, T. L., González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “healthy” foods - possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9, p.655-675.
- CHAVOSHI, Zohreh Zare; SHARIATI, Mansour. Lipid production in *Dunaliella bardawil* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 67, p. e19249, 2019.
- CHENG, Dujia; LI, Dengjin; YUAN, Yizhong; *et al.* Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 75, 2017.
- CHENG, Jie; FAN, Wenxin; ZHENG, Linggang. Development of a mixotrophic cultivation strategy for simultaneous improvement of biomass and photosynthetic efficiency in freshwater microalga *Scenedesmus obliquus* by adding appropriate concentration of sodium acetate. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 176, p. 108177, 2021.
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- COULOMBIER, Noémie; JAUFFRAIS, Thierry; LÉBOUVIER, Nicolas. Antioxidant Compounds from Microalgae: a review. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 549, 2021.
- CAMPO, José A. del; GARCÍA-GONZÁLEZ, Mercedes; GUERRERO, Miguel G.. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007.
- DEMMIG-ADAMS, Barbara; ADAMS, William W. Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. **Science**, [S. l.], v. 298, n. 5601, p. 2149-2153, 2002.
- DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- LENA, Gabriella di; CASINI, Irene; LUCARINI, Massimo; LOMBARDI-BOCCIA, Ginevra. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, [S. l.], v. 120, p. 810-818, 2019.
- DOUCHA, Jiří; LIVANSKY, Karel. Novel outdoor thin-layer high density micro-algal culture system: productivity and operational parameters. **ARCHIV FUR HYDROBIOLOGIE-SUPPLEMENT-**, v. 106, p. 129-129, 1995.
- EGGINK, Laura L; PARK, Hyounghsin; HOOBER, J Kenneth. [No title found]. **BMC Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 2, 2001.

FALKOWSKI, Paul G.; RAVEN, John A. **Aquatic photosynthesis**. Princeton University Press, 2013.

FERNÁNDEZ, F. Gabriel Acién; REIS, Alberto; WIJFFELS, René H.; BARBOSA, Maria; VERDELHO, Vitor; LLAMAS, Bernardo. The role of microalgae in the bioeconomy. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 61, p. 99-107, 2021.

FOLCH, Jordi; LEES, M.; STANLEY, G.H. Sloane. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FREITAS, B.C.B.; CASSURIAGA, A.P.A.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 238, p. 248-253, 2017.

GONG, Yangmin; JIANG, Mulan. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 1269-1284, 2011.

GONZALEZ-FERNANDEZ, Cristina; MUÑOZ, Raúl (Orgs.). **Microalgae-based biofuels and bioproducts: from feedstock cultivation to end-products**. Duxford Cambridge, MA Kidlington: Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier, 2017.

GOSWAMI, Rahul Kumar; MEHARIYA, Sanjeet; KARTHIKEYAN, Obulisamy Parthiba; VERMA, Pradeep. Influence of Carbon Sources on Biomass and Biomolecule Accumulation in *Picochlorum* sp. Cultured under the Mixotrophic Condition. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 3674, 19, 2022.

HAJIMAHMOODI, Mannan; FARAMARZI, Mohammad Ali; MOHAMMADI, Najmeh; *et al.* Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 43–50, 2010.

HANEDA, Renata Natsumi. Biochemical Composition of *Chlorella Sorokiniana* Grown in a Novel Design of Hybrid Photobioreactor. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, 2015.

HAOUJAR, Imane; CACCIOLA, Francesco; ABRINI, Jamal; *et al.* The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4037, 2019.

HEMALATHA, A. *et al.* Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. **Adv. Appl. Sci. Res**, v. 4, n. 5, p. 151-157, 2013.

HU, Qiang. Environmental effects on cell composition. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**, p. 114-122, 2013.

HUESEMANN, M.; CROWE, B.; WALLER, P.; CHAVIS, A.; HOBBS, S.; EDMUNDSON, S.; WIGMOSTA, M.. A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. **Algal Research**, [S. l.], v. 13, p. 195-206, 2016.

JEREZ, Celia G.; MALAPASCUA, José R.; SERGEJEVOVÁ, Magda; MASOJÍDEK, Jiří; FIGUEROA, Félix L. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: estimation

of biomass productivity by in-vivo chlorophyll a fluorescence monitoring. **Algal Research**, [S. l.], v. 17, p. 21-30, 2016

KOBAYASHI, Makio; KAKIZONO, Toshihide; YAMAGUCHI, Kazuya; *et al.* Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 1, p. 17–20, 1992.

LEE, Eunyong; JALALIZADEH, Mehregan; ZHANG, Qiong. Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. **Algal Research**, [S. l.], v. 12, p. 497-512, 2015.

LI, Tao; CHEN, Zishuo; WU, Jiayi; *et al.* The potential productivity of the microalga, *Nannochloropsis oceanica* SCS-1981, in a solar powered outdoor open pond as an aquaculture feed. **Algal Research**, v. 46, p. 101793, 2020.

MARTÍNEZ, Carlos; BERNARD, Olivier; MAIRET, Francis. Maximizing microalgae productivity by shading outdoor cultures. **IFAC-PapersOnLine**, v. 50, n. 1, p. 8734-8739, 2017.

MASOJÍDEK, Jiří; RANGLOVÁ, Karolína; LAKATOS, Gergely Ernő; *et al.* Variables Governing Photosynthesis and Growth in Microalgae Mass Cultures. **Processes**, v. 9, n. 5, p. 820, 2021.

MILLÁN-OROPEZA, Aarón; FERNÁNDEZ-LINARES, Luis. Biomass and lipid production from *Nannochloropsis oculata* growth in raceway ponds operated in sequential batch mode under greenhouse conditions. **Environmental Science And Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 33, p. 25618-25626, 2016.

MORALES, Marjorie; HÉLIAS, Arnaud; BERNARD, Olivier. Optimal integration of microalgae production with photovoltaic panels: environmental impacts and energy balance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 239, 2019.

NORSKER, Niels-Henrik; BARBOSA, Maria J.; VERMUË, Marian H.; WIJFFELS, René H.. Microalgal production — A close look at the economics. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 24-27, 2011.

OGAWA, Takahira; AIBA, Shuichi. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 5, p. 1121–1132, 1981.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 499-506, 2000.

OOSTLANDER, P.C.; VAN HOUCKE, J.; WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J.. Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. **Aquaculture**, [S. l.], v. 525, p. 735310, 2020.

PARRISH, Christopher C. Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples. **Lipids In Freshwater Ecosystems**, [S. l.], p. 4-20, 1999.

PATEL, Anil Kumar; JOUN, Jae Min; HONG, Min Eui; SIM, Sang Jun. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 282, p. 245-253, 2019.

PESSI, Bruno Assis; PRUVOST, Eric; TALEC, Amélie; SCIANDRA, Antoine; BERNARD, Olivier. Does temperature shift justify microalgae production under greenhouse? **Algal Research**, [S. l.], v. 61, p. 102579, 2022.

PIRES, Janaína; TORRES, Priscila B.; SANTOS, Déborah Y. A. C. Dos; CHOW, Fungyi. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, [S. L.], p. 6, 2017.

RAS, Monique; STEYER, Jean-Philippe; BERNARD, Olivier. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Reviews In Environmental Science And Bio/Technology**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 153-164, 2013.

RAI, Monika Prakash; NIGAM, Subhasha; SHARMA, Rupali. Response of growth and fatty acid compositions of *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 58, p. 251-257, 2013.

RICHMOND, Amos. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. **Journal Of Applied Phycology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 281-286, set. 1992.

RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROOPNARAIN, A.; GRAY, V.M.; SYM, S.D.. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 156, p. 408-411, 2014.

ROSSI, Raquel Andrade; CAMARGO, Eduardo Caffagni; CRNKOVIC, Paula Cristina Garcia Manoel; *et al.* Physiological and Biochemical Responses of *Chlorella vulgaris* to Real Cement Flue Gas Under Controlled Conditions. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 8, p. 259, 2018.

SAFAFAR, Hamed; VAN WAGENEN, Jonathan; MØLLER, Per; *et al.* Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.

SAKSHAUG, E.; BRICAUD, A.; DANDONNEAU, Y.; *et al.* Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637–1670, 1997.

SARANYA, C. et al. Evaluation of antioxidant properties, total phenolic and carotenoid content of *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella salina* and *Isochrysis galbana*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 8, p. 365-377, 2014.

SATHASIVAM, Ramaraj; KI, Jang-Seu. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 26, 2018.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects a review. **Journal Of Functional Foods**, [S. l.], v. 18, p. 820-897, 2015.

- SINGLETON, V. L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- SLOCOMBE, Stephen P.; ROSS, Michael; THOMAS, Naomi; MCNEILL, Sharon; STANLEY, Michele S.. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 129, p. 51-57, 2013.
- SMITH, Richard T.; BANGERT, Krys; WILKINSON, Stephen J.; GILMOUR, D. James. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. **Biomass And Bioenergy**, [S. l.], v. 82, p. 73-86, 2015.
- STABLEIN, Michael J.; BARACHO, Douglas H.; WATSON, Jamison T.; SILVA, Jaqueline C.; ZHANG, Yuanhui; LOMBARDI, Ana T.. Microalgal photosynthetic inhibition and mixotrophic growth in Post Hydrothermal Liquefaction Wastewater (PHW). **Algal Research**, [S. l.], v. 60, p. 102548, dez. 2021.
- SYRETT, Pa J.; BOCKS, Sheila M.; MERRETT, M. J. The assimilation of acetate by *Chlorella vulgaris*. **Journal of Experimental Botany**, v. 15, n. 1, p. 35-47, 1964.
- VAN WAGENEN, Jon; FRANCISCI, Davide de; ANGELIDAKI, Irini. Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. **Journal Of Applied Phycology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1775-1782, 2014.
- VÁZQUEZ-ROMERO, Bárbara; PERALES, José Antonio; PEREIRA, Hugo; BARBOSA, Maria; RUIZ, Jesús. Techno-economic assessment of microalgae production, harvesting and drying for food, feed, cosmetics, and agriculture. **Science Of The Total Environment**, [S. l.], v. 837, p. 155742, 2022.
- WÁGNER, Dorottya S.; CAZZANIGA, Clarissa; STEIDL, Michael; *et al.* Optimal influent N-to-P ratio for stable microalgal cultivation in water treatment and nutrient recovery. **Chemosphere**, v. 262, p. 127939, 2021.
- WANG, Yao; GONG, Yingchun; DAI, Lili; SOMMERFELD, Milton; ZHANG, Chengwu; HU, Qiang. Identification of harmful protozoa in outdoor cultivation of *Chlorella* and the use of ultrasonication to control contamination. **Algal Research**, [S. l.], v. 31, p. 298-310, 2018.
- WANG, Yanwen; TIBBETTS, Sean; MCGINN, Patrick. Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 3002, 2021.
- WEISSMAN, Joseph C.; GOEBEL, Raymond P.; BENEMANN, John R. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnology And Bioengineering**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 336-344, 1988.
- WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.
- WEN, Xiaobin *et al.* Sequential phototrophic–mixotrophic cultivation of oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1 in a 1000 m² open raceway pond. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2019.

WILLIAMS, Peter J. Le B.; LAURENS, Lieve M. L.. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, [*S. l.*], v. 3, n. 5, p. 554, 2010.

YAAKOB, Maizatul Azrina; MOHAMED, Radin Maya Saphira Radin; AL-GHEETHI, Adel; GOKARE, Ravishankar Aswathnarayana; AMBATI, Ranga Rao. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: an overview. **Cells**, [*S. l.*], v. 10, n. 2, p. 393, 2021.

YU, Xinlei; YE, Xin; HU, Chaoyang; XU, Nianjun; SUN, Xue. Sodium acetate can promote the growth and astaxanthin accumulation in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* as revealed by a proteomics approach. **Journal Of Oceanology And Limnology**, [*S. l.*], v. 40, n. 5, p. 2052-2067, 2022.

ZHANG, Qing; ZHANG, Junzeng; SHEN, Jingkai; *et al.* A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3–5, p. 445–450, 2006.

ZHENG, Qi; XU, Xiaoyin; MARTIN, Gregory J.O.; KENTISH, Sandra E. Critical review of strategies for CO₂ delivery to large-scale microalgae cultures. **Chinese Journal Of Chemical Engineering**, [*S. l.*], v. 26, n. 11, p. 2219-2228, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

C. lunulatum é uma microalga promissora para a produção de biomassa e biomoléculas, principalmente lipídios, com até 30% de sua biomassa seca como lipídios durante o crescimento exponencial. Em escala ampliada, e sob condições semi-controladas de luz e temperatura, *C. lunulatum* suportou as variações nas condições climáticas e manteve o seu crescimento. Por isso, a consideramos uma espécie robusta. Mostrou ainda ser capaz de assimilar o carbono orgânico fornecido na forma de acetato de sódio, confirmando o metabolismo mixotrófico, atributo que pode ser vantajoso pois contribuiu para aumentar a produção de biomassa. Em conjunto, essas características nos levam a sugerir que *C. lunulatum* é uma candidata adequada para ser explorada na ampliação de escala, principalmente para a produção de óleos.

O custo de produção obtido neste estudo ainda foi alto em comparação com outros custos reportados na literatura, indicando que adequações precisam ser realizadas para que se prossiga à aplicação comercial de *C. lunulatum*. São necessárias mais pesquisas a fim de viabilizar a produção em um custo-benefício favorável. Complementamos que para obter sucesso no cultivo de microalgas, é necessário avaliar diversos fatores que podem interferir na produção de biomassa, como a escolha da espécie, o tipo de reator a ser utilizado, as otimizações nas condições de cultivo, além do controle das condições ambientais, tudo isso aliado às tecnologias de baixo custo. Espera-se que essas limitações sejam superadas em curto prazo, pois as microalgas são uma alternativa atraente e promissora para atender as demandas do mercado de energia e outros produtos com valor agregado.

Os resultados desta pesquisa, da escala laboratorial à escala ampliada, são importantes para a fisiologia e bioquímica de *C. lunulatum* identificando-a como uma microalga com grande potencial biotecnológico e candidata adequada para a ampliação de escala.