

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica – Laboratório de Biotecnologia de Algas

Maria Eduarda Costa Gonçalves

Investigando o crescimento e a composição bioquímica de
***Chlorolobion lunulatum* em escalas de 20 e 200 L**

SÃO CARLOS – SP

2025

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica – Laboratório de Biotecnologia de Algas

Maria Eduarda Costa Gonçalves

**Investigando o crescimento e a composição bioquímica de
Chlorolobion lunulatum em escalas de 20 e 200 L**

Trabalho de conclusão de curso
submetido como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Ana Teresa Lombardi

SÃO CARLOS – SP

2025

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que caminharam ao meu lado durante essa longa e desafiadora jornada, marcada por aprendizados, incertezas, superações e também por muito crescimento pessoal.

À minha família, minha base sólida e meu porto seguro, por todo amor, apoio incondicional e pela confiança depositada em mim mesmo nos momentos em que eu própria duvidei da minha capacidade.

Em especial, ao meu namorado, Gabriel, meu alívio nas horas difíceis, minha voz de calma em meio ao caos, meu abraço nos dias mais duros. Obrigada por nunca soltar minha mão, por acreditar em mim com tanta força, e por me lembrar, mesmo em meio às minhas crises de ansiedade, que eu sou capaz. Tenho certeza que, sem você, esse caminho teria sido muito mais pesado.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me fortalecer, me amparar e por jamais me deixar sozinha nos momentos mais difíceis.

Agradeço, com todo carinho, à minha família, ao meu namorado, aos amigos e ao meu pai que, de diferentes formas, contribuíram para a concretização deste trabalho, seja com palavras de incentivo, acolhimento, ajuda financeira ou apoio prático nos momentos de dúvida.

À professora Ana Teresa, minha orientadora, agradeço pela dedicação, paciência e disponibilidade durante toda a condução deste projeto.

À Dra. Ingritt Moreira em parceria com Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa TT-1. Agradeço à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido por meio do Programa PIPE-TC – Fase 1 (Processo 2024/01378-1) à Dra. Ingritt Moreira e ao Processo 2018/07988-5 (auxílio temático à orientadora). Tais recursos possibilitaram o desenvolvimento deste estudo, que contribuiu significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço ainda aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Algas, por tornarem o ambiente de trabalho mais leve, colaborativo e repleto de momentos engraçados que certamente ficarão na memória.

Resumo

As microalgas verdes têm despertado interesse biotecnológico por sua capacidade de acumular biomoléculas de valor agregado, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos fotossintéticos. Além de serem eficientes na conversão de CO₂ e luz solar em biomassa, as Chlorophyta podem apresentar elevada produtividade por área e versatilidade em diferentes condições ambientais. Entre as espécies promissoras, destaca-se *Chlorolobion lunulatum*, ainda pouco estudada, mas com potencial para cultivos ampliados já demonstrado no Laboratório de Biotecnologia de Algas, onde este estudo foi realizado. O objetivo principal foi avaliar aspectos da fisiologia de *C. lunulatum* em dois sistemas de cultivo de diferentes escalas: em fotobiorreator tubular de 20 L e em lagoas do tipo *raceway* com 200 L. Enquanto em 20L, os cultivos tiveram intensidade luminosa controlada, em 200 L sombrites foram usados para amenizar a intensidade da luz solar incidente. Ao final dos cultivos, foram determinados os teores de lipídios, proteínas e carboidratos, e pigmentos fotossintéticos na biomassa. As taxas de crescimento foram usadas para comparar os cultivos, que foram realizados por dez dias. Os cultivos em 200 L apresentaram maior taxa de crescimento específica (1,14 d⁻¹), maior produção de biomassa e teores superiores de proteínas (até 23% DW), lipídios (28% DW) e carboidratos (16% DW), evidenciando a viabilidade do cultivo em sistemas de maior escala. Por outro lado, os cultivos em 20 L apresentaram concentrações significativamente mais elevadas de clorofila *a* (10,51 mg L⁻¹) e clorofila *b* (8,15 mg L⁻¹), enquanto a concentração de carotenoides na biomassa não apresentou variação significativa entre 20 e 200 L. Os dados indicam que o fotobiorreator tubular favoreceu a síntese de pigmentos fotossintéticos, enquanto o *raceway* o acúmulo de biomoléculas, como proteínas e lipídios. Nossos resultados mostraram que *C. lunulatum* apresenta características bioquímicas que a tornam uma candidata promissora para aplicações industriais, particularmente no setor energético.

Palavras-chave: microalgas; *Chlorolobion lunulatum*; biomoléculas; fotobiorreator; *raceway*; biotecnologia.

Abstract

Green microalgae have attracted biotechnological interest due to their ability to accumulate value-added biomolecules, such as proteins, lipids, carbohydrates, and photosynthetic pigments. In addition to being efficient in converting CO₂ and sunlight into biomass, Chlorophyta species can present high productivity per area and versatility in different environmental conditions. Among the promising species, *Chlorolobion lunulatum* stands out, still little studied, but with potential for expanded cultivation already demonstrated in the Laboratory of Algae Biotechnology, where this study was carried out. Our main objective was to evaluate aspects of the physiology of *C. lunulatum* in two cultivation systems of different scales: in a 20 L tubular photobioreactor and in 200 L *raceway* ponds. While in 20 L, the cultivations had controlled light intensity, in 200 L shade nets were used to mitigate the intensity of incident sunlight. At the end of the cultivation period, the contents of lipids, proteins and carbohydrates, and photosynthetic pigments in the biomass were determined. Growth rates were used to compare the crops, which were grown for ten days. The 200 L crops showed a higher specific growth rate (1.14 d⁻¹), higher biomass production and higher levels of proteins (up to 23% DW), lipids (28% DW) and carbohydrates (16% DW), evidencing the viability of cultivation in larger-scale systems. On the other hand, the 20 L cultures showed significantly higher concentrations of chlorophyll a (10.51 mg L⁻¹) and chlorophyll b (8.15 mg L⁻¹), while the carotenoid concentration in the biomass did not show significant variation between 20 and 200 L. The data indicate that the tubular photobioreactor favored the synthesis of photosynthetic pigments, while the *raceway* favored the accumulation of biomolecules, such as proteins and lipids. Therefore, *C. lunulatum* presents biochemical characteristics that make it a promising candidate for industrial applications, especially in the energetic sector.

Keywords: microalgae; *Chlorolobion lunulatum*; biomolecules; photobioreactor; *raceway*, biotechnology.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fotobiorreatores modelo coluna de bolhas de 20 L com culturas de *Chlorolobion lunulatum*. Em A) Três réplicas experimentais com LED's padrões, sendo um cultivo com iluminação adicional externa à esquerda. Em B) uma réplica experimental com fita interna de super LED.

Figura 2 - Fotobiorreatores do tipo raceway instalados na estufa experimental do Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar). Em A) inóculos sendo aclimatados em tanques de 25 L, em B) três réplicas experimentais em fase exponencial de crescimento e em C) estrutura do raceway, com pás agitadoras e coluna de borbulhamento de CO₂ de 7 metros.

Figura 3 - Parâmetros de crescimento da microalga *C. lunulatum*: Em (A) fotobiorreatores coluna de bolhas de 20 L, onde o Reator 1 é representado por círculos fechados, o Reator 2 por quadrados fechados, o Reator 3 (iluminação adicional externa) por triângulos fechados e o Reator 4 (iluminação com super LEDs) por losangos abertos; em (B) raceway de 200 L, onde R1 é representado por círculos abertos, R2 por quadrados abertos e R3 por triângulos abertos.

Figura 4 - Fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. Em A) nos cultivos de 20 L, média e desvio padrão (n=3). Em B) nos cultivos de 200 L, média e desvio padrão (n=3).

Figura 5 - Rendimento quântico máximo (Fv/Fm). Em A) nos cultivos de 20 L, média e desvio padrão (n=3). Em B) nos cultivos de 200 L, média e desvio padrão (n=3).

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Biomoléculas proteínas, carboidratos, e lipídeos totais em % da biomassa seca e os pigmentos (mg.L^{-1}) carotenoides, clorofilas a e b produzidos por *C. lunulatum* em cultivos de 20 L (laboratório) e 200 L (estufa). Média e desvio padrão (n=4) para 20 L e (n=3) para 200 L.

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. Materiais e métodos	14
3.1. Experimentos 20 L	14
3.2. Experimentos 200 L	16
3.3. Monitoramento e coleta	18
3.4. Análise dos dados.....	19
4. Resultados e discussão	19
4.1. Parâmetros de crescimento e biomassa.....	19
4.2. Composição bioquímica.....	25
5. Conclusões	31
6. Referências bibliográficas	32

1. Introdução

Nos últimos anos, as algas vêm ganhando destaque como produtoras de biomoléculas de interesse industrial, incluindo pigmentos, lipídios, proteínas e carboidratos, com diversas aplicações (Khan et al., 2018). Em especial, as microalgas têm grande potencial para a produção de ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, e carotenoides (Sathasivam, et al., 2019), além de diversos metabólitos secundários, incluindo bioativos potencialmente benéficos, como antioxidantes (Barkia et al., 2019). Esses organismos fotossintéticos apresentam características fisiológicas vantajosas, como alta eficiência na conversão de luz solar e nutrientes, rápidas taxas de crescimento populacional e elevada capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, o que os torna particularmente atrativos para aplicações industriais (Hu et al., 2023). Em razão dessas propriedades, as microalgas têm sido amplamente exploradas com vistas à diferentes aplicações: (i) a nutrição humana e animal (Barkia et al., 2019); (ii) biocombustíveis (Kumar et al., 2020); e (iii) biofármacos, com potenciais aplicações terapêuticas (Bañuelos-Hernández et al., 2015).

Apesar do mercado crescente, poucas espécies de microalgas são exploradas comercialmente, destacando-se o gênero *Chlorella sp.*, *Haematococcus pluvialis* e *Dunaliella salina* (Mobin; Alam, 2017). A cianobactéria *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) também é amplamente encontrada no mercado, mas se trata de um organismo procariótico. Nesse contexto, explorar novas espécies de microalgas pode ampliar o leque de biomoléculas disponíveis e aumentar a diversidade de produtos ofertados no mercado.

Segundo Faria (2023), a espécie de microalga verde *Chlorolobion lunulatum* apresenta potencial para cultivo em larga escala, destacando-se por sua capacidade de tolerar variações climáticas e manter tanto o crescimento quanto a homeostase intracelular em condições semi-controladas. Essas características indicam sua viabilidade para aplicações industriais, sobretudo em ambientes com limitações estruturais ou climáticas. No entanto, a análise tecnoeconômica da produção de *C. lunulatum* realizada pelo autor revelou que os custos atuais de produção ainda são elevados, sugerindo a necessidade de melhorias nos processos de cultivo para tornar sua produção economicamente viável. Além disso, como apontado por Barkia et al. (2019), ainda existem muitos desafios de ordem biológica e econômica relacionados

ao cultivo em larga escala, tais como o fornecimento adequado de nutrientes e o alto custo de equipamentos e insumos, os quais precisam ser superados para viabilizar a produção sustentável de produtos de alto valor, com benefícios tanto nutricionais quanto à saúde.

A eficiência na produção de biomassa pelas microalgas depende da disponibilidade de nutrientes essenciais, que podem ser classificados em macronutrientes e micronutrientes, de acordo com a quantidade requerida. Os macronutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, são necessários em maior quantidade para sustentar o crescimento e a reprodução celular. Já os micronutrientes, incluindo enxofre, potássio e ferro, são demandados em quantidades menores, mas também desempenham funções indispensáveis nos processos metabólicos (Markou et al., 2014). Ainda, de acordo com Markou et al. (2014), para que o crescimento das microalgas não seja limitado, é fundamental que todos os nutrientes essenciais estejam presentes em quantidades apropriadas e quimicamente disponíveis no meio de cultivo. Por esse motivo, as formulações dos meios de cultivo são frequentemente descritas na literatura como padrões estabelecidos, visando atender às demandas nutricionais das microalgas de maneira consistente.

Além da disponibilidade de nutrientes, fatores como temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo desempenham um papel significativo na produtividade de microalgas em escala industrial (Faria, 2023). De acordo com o autor, uma das estratégias promissoras existentes para aumentar a eficiência da produção é a modificação de condições ambientais, que podem estimular a síntese intracelular de biomoléculas e maximizar seu rendimento. Paralelamente, o tipo de reator empregado no cultivo também influencia na produção de biomassa, existindo atualmente dois principais sistemas de cultivo em larga escala: os fotobiorreatores (PBR) fechados e os abertos, por exemplo os *raceway ponds*. Cada sistema apresenta vantagens e limitações, que incluem aspectos relacionados à produtividade, viabilidade econômica e requisitos de manutenção, tais como risco de contaminação e custos operacionais (Faria, 2023).

De acordo com Abdur Razzak et al. (2024), os sistemas abertos representam uma das abordagens mais tradicionais para o cultivo de microalgas, sendo amplamente utilizados devido à sua simplicidade operacional, baixa demanda energética decorrente da utilização de luz natural (Prado et al., 2023), facilidade de manutenção e custo reduzido de construção, além de baixo aquecimento por conta

do processo natural de evaporação, que ajuda no controle térmico. No entanto, esses sistemas apresentam diversas limitações, como baixa capacidade de controle sobre fatores ambientais (luminosidade, temperatura), maior suscetibilidade à contaminação, especialmente em razão da ampla área exposta, e restrições quanto às espécies cultiváveis, sendo eficazes apenas para algumas microalgas robustas. Por outro lado, os sistemas fechados, desenvolvidos com o objetivo de superar essas limitações, oferecem maior controle sobre as condições de cultivo e reduzem significativamente os riscos de contaminação, mas enfrentam problemas de aquecimento elevado. Esses sistemas são particularmente vantajosos para a produção de compostos bioativos de alto valor agregado pois permitem a manipulação e a otimização do cultivo resultando, geralmente, em maior produtividade quando comparados aos sistemas abertos. Contudo, esses reatores também apresentam desvantagens significativas, especialmente no que se refere ao elevado custo de implantação e operação, podendo ser até sete vezes superior ao dos sistemas abertos (Banerjee & Ramaswamy, 2019). Esses custos incluem a necessidade de sensores e equipamentos para controle rigoroso de luz, temperatura, pH, sistemas de bombeamento, de resfriamento e eletricidade. Ademais, há desafios associados à escalabilidade para volumes industriais e ao acúmulo de oxigênio dissolvido no meio, o qual pode exercer efeitos inibitórios sobre o crescimento celular (Abdur Razzak et al., 2024).

Quanto às biomoléculas, nas microalgas, as proteínas desempenham funções cruciais tanto na estrutura quanto no metabolismo. São elementos fundamentais das membranas celulares e do complexo de captação de luz, incluindo diversas enzimas catalíticas essenciais para os processos fotossintéticos (Barkia et al., 2019). Em geral, o teor proteico das microalgas varia entre 30% e 60% da biomassa, dependendo da espécie. A microalga *Chlorella* sp. contém cerca de 50–60% de sua biomassa como proteínas, possuindo todos os aminoácidos essenciais em sua composição, entre eles isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e histidina, acompanhados de aminoácidos não essenciais, como tirosina, cistina, ácido aspártico, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina e arginina (Mosibo et. al., 2024).

Os lipídios, por sua vez, desempenham um papel essencial tanto na reserva de energia quanto nos componentes estruturais, especialmente na estrutura das membranas plasmáticas (Williams; Laurens, 2010). Nas microalgas, o teor lipídico

varia entre 4% e 20% da biomassa (Mosibo et. al., 2024), sendo composto predominantemente por: (i) lipídios neutros, que englobam acilgliceróis, ácidos graxos livres e carotenoides, como o β -caroteno; e (ii) lipídios polares, incluindo diversos fosfolipídios e galactolipídios (Barkia et al., 2019). De maneira geral, as microalgas apresentam elevado teor de lipídios polares durante a fase exponencial de crescimento, enquanto os triacilgliceróis são acumulados em resposta a condições de estresse, geralmente na fase estacionária, quando há limitação de nutrientes (Barkia et al., 2019).

Os carboidratos, que incluem mono-, oligo- e polissacarídeos, exercem tanto funções estruturais quanto metabólicas, sendo os primeiros produtos da fotossíntese e o ponto de partida para a síntese de outras biomoléculas. Eles podem estar associados a proteínas ou lipídios na forma de glicoproteínas e glicolipídios, respectivamente, e é relatado na literatura uma quantidade de 12–30% de carboidratos na biomassa microalgal, a depender da espécie (Mosibo et. al., 2024).

Este estudo teve como objetivo investigar a produção de biomassa e biomoléculas na microalga *Chlorolobion lunulatum* em dois sistemas de cultivo, um de 20 L, conduzido sob condições controladas de luz e temperatura, e outro de 200 L, operado em condições semi-controladas em estufa experimental. A condução desses experimentos e seus resultados poderão fornecer subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias futuras, possibilitando a realização de análises tecno-econômicas para cultivos em larga escala, conforme apontado em estudos anteriores (Faria, 2023).

2. Objetivos

Investigar aspectos da fisiologia da microalga Chlorophyta *Chlorolobion lunulatum* em diferentes escalas de cultivo, 20 L em fotobiorreatores fechados e tubulares, e em 200 L em *raceways*, abertos instalados em estufa. Por meio da caracterização de sua composição bioquímica e análise das taxas de crescimento, com pretende-se contribuir para o avanço do uso de microalgas em aplicações biotecnológicas.

2.1. Objetivos específicos

1 – Avaliar o sistema de cultura de modelo coluna de bolhas de 20 L monitorando variáveis como temperatura, pH e intensidade luminosa durante o cultivo de *C. lunulatum*;

2 – Monitorar o crescimento da microalga *C. lunulatum* em escala de 20 L e em 200 L por meio de métodos analíticos como fluorescência da clorofila *a in vivo* e determinação do rendimento quântico máximo da fotossíntese;

3 – Caracterizar bioquimicamente a biomassa de *C. lunulatum* por meio da determinação de proteínas, lipídios, e carboidratos totais, e clorofilas *a* e *b*, e carotenoides totais nas duas escalas de cultivo.

3. Materiais e métodos

3.1. Experimentos 20 L

A cepa *Chlorolobion lunulatum* (CCMA – UFSCar 500) foi gentilmente disponibilizada pela Prof^a. Dra. Inessa L. Bagatini, curadora da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. A cultura-mãe utilizada para a preparação do inóculo nos experimentos foi mantida sob condições controladas de laboratório em meio BG11 (Rippka et al., 1979) autoclavado (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Luferco, Brasil).

Os fotobiorreatores (FBR) de 20 L utilizados foram do modelo cilíndrico do tipo coluna de bolhas, equipados com iluminação interna e uniforme por luz LED comercial ao longo de toda a coluna. O experimento foi conduzido com três réplicas, sendo que à um deles foi incorporado uma iluminação externa adicional (Figura 1A), acionada somente quando a intensidade luminosa interna se mostrava menor do que a irradiância de saturação fotossintética (E_k), valor no qual a fotossíntese tem sua taxa máxima. Adicionalmente, com o objetivo de avaliar o efeito de uma fonte luminosa de maior intensidade, foi adicionada uma réplica em um fotobiorreator (FBR) equipado com uma fita de super LEDs (Figura 1B). Embora essa réplica adicional apresentasse uma configuração diferenciada em relação à fonte de luz, a intensidade luminosa foi mantida equivalente à dos demais FBRs. A utilização da fita de super LEDs teve como hipótese a possibilidade de prolongar, de forma mais eficiente, a manutenção da irradiância próxima ao ponto de saturação fotossintética (E_k) e assim a taxa de crescimento exponencial da cultura, em comparação às LEDs convencionais. A Figura 1 ilustra os diferentes FBRs utilizados no experimento.

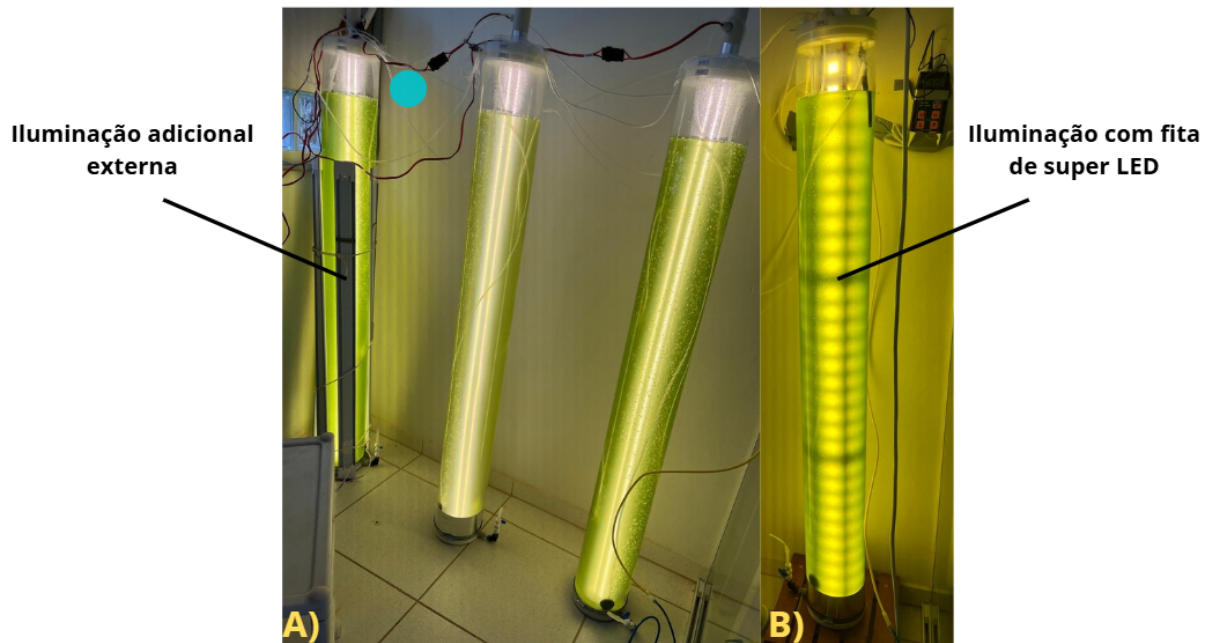


Figura 1 - Fotobiorreatores modelo coluna de bolhas de 20 L com culturas de *Chlorolobion lunulatum*. Em A) Três réplicas experimentais com LED's padrões, sendo um cultivo com iluminação adicional externa à esquerda. Em B) uma réplica experimental com fita interna de super LED.

A intensidade luminosa foi ajustada progressivamente, acompanhando o aumento da densidade celular, mantendo-a constante durante o experimento, com monitoramento realizado diariamente. Os reatores foram borbulhados com ar ambiente através de um soprador com vazão constante, previamente filtrado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ para garantir a exclusão de contaminantes e materiais particulados dispersos no ar. O borbulhamento se deu por meio da inserção de um tubo com pedra porosa para otimizar a aeração da cultura. Adicionalmente, foi integrada uma coluna borbulhadora de CO_2 , utilizada como fonte de carbono para o cultivo, paralela à coluna de ar. O dióxido de carbono, proveniente de um cilindro pressurizado, era liberado manualmente quando o pH da cultura ultrapassava o valor de 8, sendo interrompido ao atingir 7, garantindo a manutenção do pH na faixa ideal para o crescimento microalgal. Essa configuração assegurou o suprimento de ar e CO_2 , fundamentais para a fotossíntese, além de contribuir para a estabilidade do pH. Esse controle foi realizado manualmente por meio do monitoramento durante o período de luz. Todos os dias às 17 h o CO_2 era fechado e introduzido somente no dia seguinte a partir das 9 h. O sistema de borbulhamento proporcionou eficiente homogeneização do meio de cultivo, evitando a sedimentação celular e promovendo condições uniformes ao longo do fotobiorreator.

O meio de cultura não foi autoclavado, mas sim desinfetado. Para isso, foi preenchido o volume de 20 L em cada FBR com água da rede, e à essa água foi adicionado de 0,8 mL L⁻¹ de água sanitária comercial, correspondente a uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Faria, 2023). A adição da água sanitária foi feita às 18 h do dia anterior ao início do cultivo, e às 9 h do dia seguinte, o cloro residual foi neutralizado utilizando-se tiosulfato de sódio em concentração final de 0,066 g L⁻¹ (Faria, 2023). Após uma hora da adição do tiosulfato, a ausência de cloro residual foi confirmada por meio de um teste colorimétrico comercial, usualmente empregado para monitoramento de cloro em água de piscinas. Apenas após a completa eliminação do cloro, os nutrientes do meio de cultura BG11 foram adicionados aos reatores.

Os fotobiorreatores foram inoculados com 10⁵ células mL⁻¹ oriundas de culturas de *C. lunulatum* em fase exponencial de crescimento. As condições experimentais do cultivo foram controladas, com temperatura de 25 °C ± 1, intensidade luminosa de 260 μmol fótons m⁻² s⁻¹ medida com o auxílio de um sensor de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro). A intensidade luminosa adotada corresponde à intensidade de luz na saturação fotossintética (E_k), previamente determinado para *C. lunulatum* através de curvas rápidas de luz (RLC) (Faria, 2023).

3.2. Experimentos 200 L

O experimento de 200 L foi conduzido na estufa experimental do Laboratório de Biotecnologia de Algas da UFSCar, sob condições semi-controladas de luz e temperatura. Para tanto foram usados reatores do tipo *raceway* (Figura 2), em triplicata, com capacidade total de 500 L, mas operando com volume útil de 200 L, correspondente a uma altura de 6 cm de altura da cultura. Os reatores também foram inoculados com uma concentração inicial de 10⁵ células mL⁻¹, utilizando culturas de *C. lunulatum* previamente cultivadas em tanques de 25 L (Figura 2A) e aclimatadas às condições ambientais da estufa agrícola. Essa etapa de adaptação visou garantir a melhor adequação fisiológica das microalgas às condições semi-controladas do experimento, promovendo um crescimento inicial mais uniforme e eficiente. Assim como nos experimentos em escala de 20 L, os reatores foram somente desinfetados com água sanitária e neutralizados com tiosulfato de sódio, conforme descrito por Faria (2023).

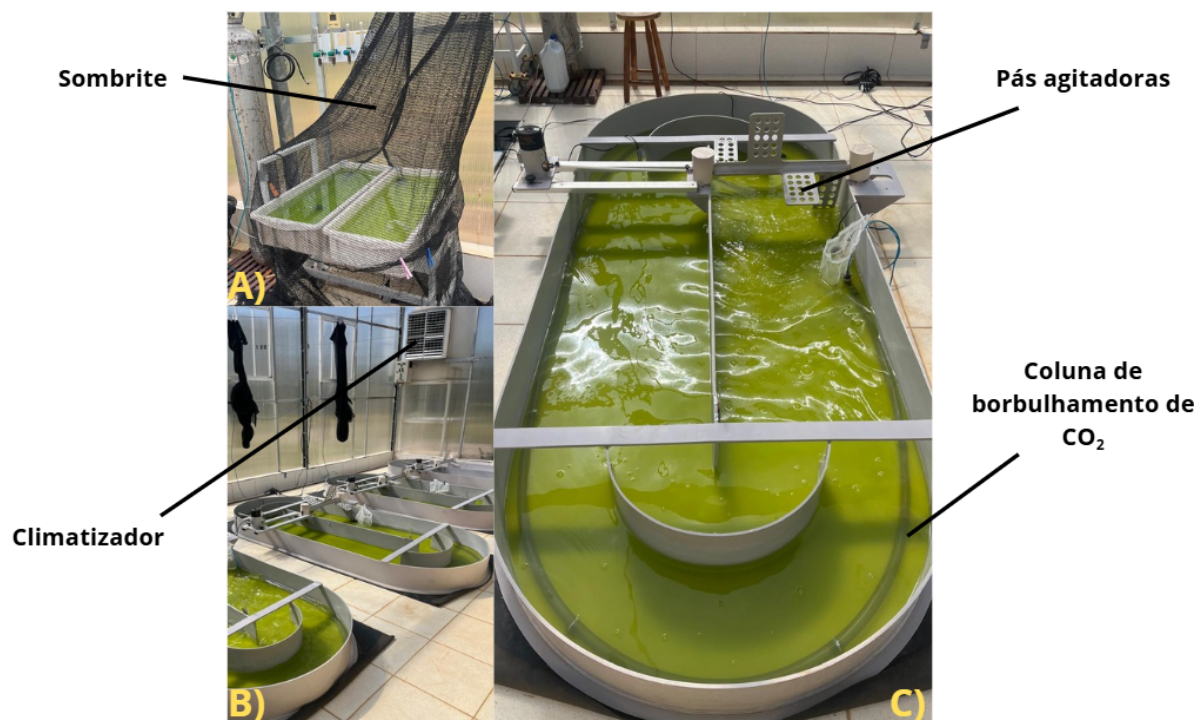


Figura 2 - Fotobiorreatores do tipo *raceway* instalados na estufa experimental do Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar). Em A) inóculos sendo aclimatados em tanques de 25 L, em B) três réplicas experimentais em fase exponencial de crescimento e em C) estrutura do *raceway*, com pás agitadoras e coluna de borbulhamento de CO₂ de 7 metros.

A intensidade luminosa incidente no interior dos cultivos foi monitorada com o auxílio do sensor PAR, com medições realizadas diariamente às 9h, 13h e 16h. Quando necessário, especialmente nas fases iniciais do cultivo, a radiação incidente foi atenuada por meio da aplicação de malha de sombreamento (sombrite), a fim de evitar a exposição das células a intensidades luminosas muito altas. O controle parcial da temperatura no interior da estufa foi realizado por meio de climatizadores de ar (Figura 1B), enquanto a temperatura das culturas foi regulada por meio de termostatos programados em 22 °C. Isso porque o experimento ocorreu no início do período de inverno e, embora a estufa mantivesse temperaturas adequadas durante o dia, a queda térmica à noite exigiu a utilização desses aquecedores termostatizados dentro dos cultivos para a manutenção de temperatura dentro de faixa aceitável para as células algais (22 – 25 °C) uma vez que, externamente, a temperatura poderia chegar a 14 °C durante a noite. A movimentação e a homogeneização das culturas foram asseguradas por pás perfuradas presentes nos *raceways*, que também contribuíram para a aeração (Figura 2C). Adicionalmente, cada reator estava

equipado com uma coluna de borbulhamento de CO₂ de 7 metros de comprimento, com o intuito de otimizar o suprimento de carbono às culturas durante o experimento. Nesse experimento, o controle do pH foi automatizado por meio de um controlador multiparâmetro diaLog DACb (ProMinent®), programado para acionar a liberação de CO₂ sempre que o pH da cultura ultrapassasse o valor 8, interrompendo o fornecimento quando o pH retornava ao valor 7. Esse mecanismo permitiu a manutenção do pH dentro de uma faixa ideal para o crescimento microalgal, contribuindo para a estabilidade das condições do cultivo de forma muito mais eficiente quando comparado ao experimento de 20 L (liberação manual).

Devido às perdas de água por evaporação, o volume da cultura foi ajustado periodicamente com reposição de água desinfetada, de modo a manter constante o volume inicial de 200 L. Esse volume foi previamente demarcado em cada reator utilizando uma régua, correspondendo à altura de 6 cm conforme descrito anteriormente. Esse reajuste foi realizado a cada três dias de cultivo, minimizando possíveis variações nos parâmetros físico-químicos do meio que fossem resultantes da evaporação. Nesse experimento, ao 10º dia de cultivo foram coletadas as amostras para biomassa seca e para quantificação da composição bioquímica. Todas as determinações foram similares às aquelas do experimento de 20 L.

3.3. Monitoramento e coleta

O monitoramento das culturas foi realizado diariamente por meio de diferentes parâmetros analíticos: contagem de células utilizando o citômetro de fluxo Millipore (Muse Cell Analyzer), determinação do rendimento quântico máximo utilizando-se um PhytoPAM (Heinz Walz, Alemanha), fluorescência *in vivo* da clorofila *a* por meio de um fluorômetro Turner (U.S.A), além de medições de absorvância em 570, 684 e 750 nm utilizando um espectrofotômetro (HACH) apenas para verificação de contaminação do cultivo.

As amostras destinadas à determinação da biomassa seca e da composição bioquímica foram coletadas no décimo dia em ambos os cultivos. Para a análise de biomassa, 30 mL de cultura foram retirados, centrifugados em 4000 rpm (Thermo Scientific Legend XTR, USA) e o pellet foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C para posterior liofilização. Após o processo de liofilização, as amostras foram pesadas para obtenção da massa seca. A determinação de proteínas foi realizada com base no protocolo descrito por Slocombe et al. (2013). Lipídios totais foram extraídos conforme

Parrish (1999) e quantificados gravimetricamente em uma balança Mettler Toledo com precisão de 1 µg. A quantificação de carboidratos totais foi conduzida segundo a metodologia descrita em Albalasmeh et al. (2013), e as concentrações de clorofilas *a* e *b*, bem como de carotenoides totais, foram analisadas de acordo com Welburn (1994).

A taxa de crescimento foi calculada com base na densidade populacional expressa em células por mL⁻¹. Para isso, foi aplicado um ajuste por regressão linear na fase exponencial de crescimento, utilizando o logaritmo natural (Ln) da densidade populacional em função do tempo (dias). A inclinação da reta obtida a partir da regressão foi interpretada como a taxa máxima de crescimento específica.

3.4. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas no software R, por meio da interface gráfica R Commander. Inicialmente, foi verificada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Para comparar as médias das variáveis entre os dois sistemas de cultivo (20 L e 200 L), foram aplicados testes t de Student para amostras independentes, considerando variâncias iguais quando os pressupostos foram atendidos. No caso dos carotenoides, cujos dados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$), utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney. Foram comparadas as taxas de crescimento, a produtividade de biomassa e a composição bioquímica da microalga *C. lunulatum* entre os cultivos.

4. Resultados e discussão

4.1. Parâmetros de crescimento e biomassa

As curvas de crescimento obtidas com base na densidade celular (células mL⁻¹) das culturas em 20 L (coluna de bolhas) e em 200 L (*raceway*) são mostradas na Figura 3. Para as culturas de 20 L (Figura 3A), o comportamento foi similar entre as réplicas (R1, R2, R3) e a taxa de crescimento média foi 0,97 d⁻¹ (0,02), considerando o crescimento exponencial sendo do dia 1 ao dia 5. Individualmente os valores obtidos foram 0,97 d⁻¹ para o reator 1 (R1), 0,99 d⁻¹ para R2 e 0,95 d⁻¹ para R3, sendo este último valor para o FBR com luzes adicionadas do lado externo. A taxa de crescimento

do reator 4 ($0,55 \text{ d}^{-1}$), com super LEDs, não foi incluída no cálculo da média e apresentamos aqui a título de exemplo e confirmação de cultivo sem limitação de luz. Nos cultivos de 200 L (Figura 3B), a fase exponencial de crescimento foi identificada entre os dias 1 e 4, tendo taxas de crescimento de $1,06 \text{ d}^{-1}$ (0,12), $1,13 \text{ d}^{-1}$ (0,09) e $1,24 \text{ d}^{-1}$ (0,09) para as réplicas 1, 2 e 3 respectivamente, e o valor médio de $1,14 \text{ d}^{-1}$ (0,09).

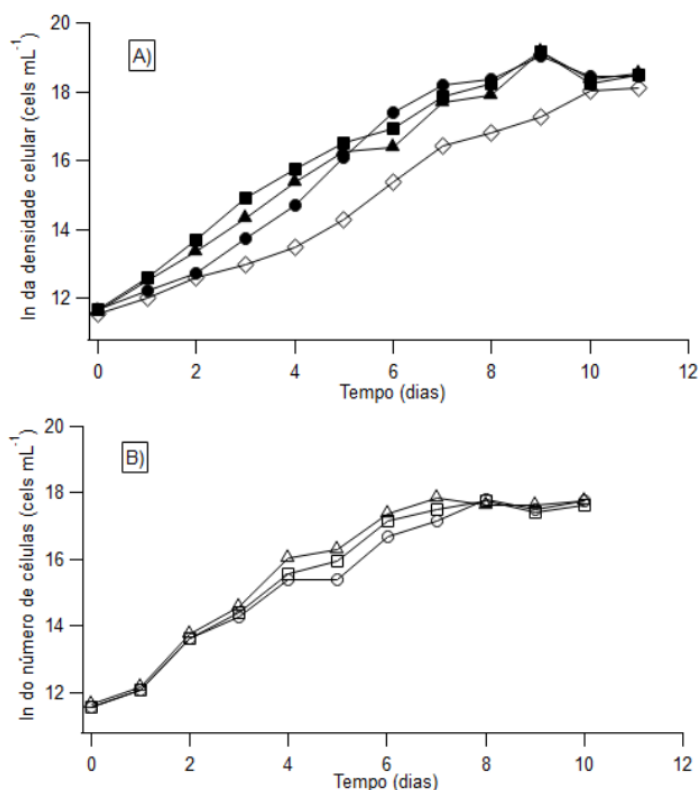


Figura 3 - Parâmetros de crescimento da microalga *C. lunulatum*: Em (A) fotobiorreatores coluna de bolhas de 20 L, onde o Reator 1 é representado por círculos fechados, o Reator 2 por quadrados fechados, o Reator 3 (iluminação adicional externa) por triângulos fechados e o Reator 4 (iluminação com super LEDs) por losangos abertos; em (B) *raceway* de 200 L, onde R1 é representado por círculos abertos, R2 por quadrados abertos e R3 por triângulos abertos.

Considerando os fotobiorreatores de 20 L, os resultados mostraram que a adição de luz externa não resultou em aumento da fase exponencial de crescimento e nem em variação da taxa de crescimento. Destacamos que com a super LED (R4) foi observado um aquecimento no cultivo, apesar do sistema de ventilação projetado para dissipar o calor gerado pela fonte luminosa. A temperatura da cultura passou de 25 °C para 35 °C. Isso pode ter influenciado negativamente a taxa de crescimento, uma vez que a temperatura é um fator determinante na atividade enzimática,

influenciando diretamente as reações metabólicas (Pessi, et al., 2022). Além disso, o aumento da temperatura reduz a solubilidade de gases como o CO₂ e O₂, moléculas que desempenham um papel fundamental na fotossíntese e no metabolismo celular (Pessi et al., 2022), impactando, conseqüentemente, o crescimento das células algais.

Nos FBR de 20 L, foram observados dois fatores críticos durante o cultivo: o auto sombreamento, resultante da elevada densidade da cultura, e a variação do pH da cultura, associada ao consumo de nutrientes e da adsorção de CO₂ pelas microalgas (Barkia et al., 2019). O auto-sombreamento comprometeu a passagem de luz ao longo do caminho óptico no reator tubular, mesmo com os LEDs internos operando em intensidade máxima, limitando a eficiência fotossintética nas camadas mais distantes da luz. Quanto à variação do pH, esta foi diretamente influenciada pela rápida absorção de CO₂ dissolvido pelas microalgas, especialmente durante o fotoperíodo claro, resultando na alcalinização do meio (Barkia et al., 2019). Como mencionado no item 3.1., o sistema não possuía controle automático de pH via CO₂. Assim, para controlar essa flutuação, o gás era liberado manualmente por meio da coluna borbulhadora, exigindo monitoramento e ajustes frequentes a cada 30 - 50 minutos, devido ao rápido consumo do gás pelas células. Entretanto, em situações em que esse monitoramento não pôde ser realizado no intervalo adequado conforme o planejado, o controle do pH tornou-se insuficiente, comprometendo a estabilidade das condições do cultivo.

Assim, embora os cultivos de *Chlorobion lunulatum* tenham sido conduzidos em laboratório sob condições ambientais controladas, a dificuldade de manter sob controle as condições internas no cultivo denso e com elevado volume (20 L) pode ter sido responsável por taxa de crescimento inferior à relatada por Faria (2023) em um sistema semi-controlado de estufa agrícola (200 L). O autor obteve uma taxa de crescimento de 1,45 d⁻¹. No entanto, ao comparar os resultados obtidos com os de Camargo (2020), que investigou a fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e fotossíntese em diversas espécies de microalgas verdes, dentre elas *C. lunulatum*, obteve taxa de crescimento específica 0,90 ± 0,07 d⁻¹ para essa cepa. Esse desempenho mostra que o cultivo conduzido no presente experimento (20 L) está dentro do esperado para a espécie.

Embora o cultivo em reatores de 200 L, sob condições semi-controladas em estufa, tenha apresentado uma taxa de crescimento estatisticamente superior (Teste

t, $p < 0,05$) à dos cultivos de 20 L em ambiente laboratorial controlado, esse sistema está mais suscetível a variações climáticas externas, como oscilações de temperatura e intensidade da radiação solar. Essas flutuações podem tornar as condições de crescimento menos previsíveis e, em alguns casos, subótimas em comparação ao ambiente controlado de laboratório (Pessi et al., 2022). Ainda assim, como o experimento foi conduzido no início do inverno, as temperaturas reduzidas durante o período noturno poderiam ter impactado o metabolismo e o crescimento das algas, apesar do uso de aquecedores termostatizados para manter a temperatura dentro da faixa considerada ideal para a espécie. No entanto, o maior desempenho do crescimento exponencial observado dos cultivos em 200 L sugere que, mesmo diante dessas variáveis ambientais, a microalga estudada demonstrou robustez e capacidade de adaptação, possivelmente beneficiando-se de uma maior disponibilidade de luz natural. Isso mostra que a intensidade luminosa alta pode ter compensado parcialmente as condições adversas, promovendo uma maior taxa fotossintética e, conseqüentemente, em um crescimento mais acelerado. Em comparação aos cultivos de 20 L consideramos que a melhor performance da microalga nos cultivos de 200 L, mesmo sob variações naturais da intensidade luminosa e temperatura na estufa, tenha sido devido à estabilidade do pH graças ao controle automatizado.

Em relação aos outros parâmetros de crescimento, como fluorescência *in vivo* e rendimento quântico máximo, os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos a seguir. A fluorescência *in vivo* representa uma estimativa da clorofila *a* nas células. No gráfico 2, observa-se que, a partir do 7º dia de cultivo, os sistemas de 20 L apresentaram valores significativamente mais elevados de fluorescência *in vivo* quando comparados aos cultivos em escala de 200 L. Esse resultado pode estar associado à uma limitação de luz. Uma análise mais aprofundada desses dados será apresentada na próxima seção.

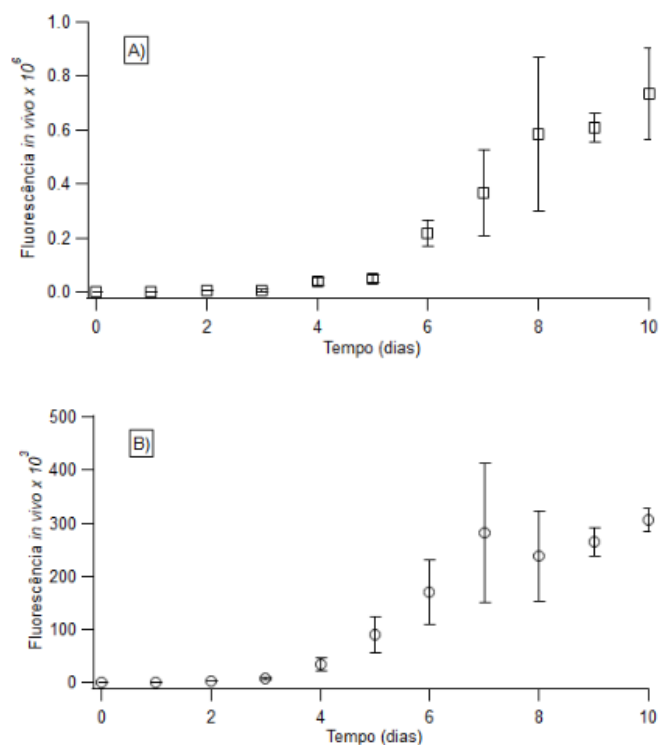


Figura 4 - Fluorescência *in vivo* da clorofila *a*. Em A) nos cultivos de 20 L, média e desvio padrão (n=3). Em B) nos cultivos de 200 L, média e desvio padrão (n=3).

O rendimento quântico máximo (F_v/F_m) é uma medida que expressa a o potencial fotossintético, indicando sobre o estado fisiológico das células, se estão ou não saudáveis. O aparato fotossintético das microalgas é composto pelos fotossistemas I e II, sendo o fotossistema II (PSII) responsável por iniciar a transferência de elétrons da água para a plastoquinona, processo fundamental para a fotossíntese. O PSII é constituído por um complexo pigmento-proteico que inclui o centro de reação, o sistema coletor de luz e o complexo de evolução de oxigênio, responsável pela liberação de O_2 molecular (Lombardi; Maldonado, 2011). Alterações nesse sistema refletem diretamente o estado fisiológico das células e podem indicar respostas ao estresse ambiental. Para microalgas saudáveis, é esperado um valor em torno de 0,7 (Lombardi; Maldonado, 2011). Para sua determinação, é necessário que as amostras sejam previamente adaptadas ao escuro, o que permite que todos os centros de reação do PSII estejam abertos e ávidos por receber elétrons. Nesse estado, registra-se a fluorescência mínima (F_0). Em seguida, aplica-se um pulso de luz intensa, que fecha a maioria dos centros de reação, elevando a fluorescência ao seu valor máximo (F_m). A fluorescência variável

(Fv) é então calculada como a diferença entre Fm e Fo ($F_v = F_m - F_o$). A razão F_v/F_m = $(F_m - F_o)/F_m$ representa o rendimento quântico máximo da fotossíntese no PSII (Xia et al., 2023).

Nos cultivos de 20 L, F_v/F_m esteve dentro da faixa considerada saudável durante todo o cultivo, enquanto que nos cultivos de 200 L, foi possível observar uma diminuição entre os dias 1 e 4, sugerindo que as células enfrentaram algum nível de estresse nesse período inicial. Isso pode ter ocorrido devido à elevada intensidade luminosa na estufa, mesmo utilizando-se sombrites. Esse resultado é compatível com o estudo de Songserm et al. (2024), que relataram que intensidades de luz elevadas (acima de 500 a 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) podem causar fotoinibição em diversas espécies de microalgas, levando à diminuição do rendimento quântico. Esse fenômeno pode estar relacionado a danos ao PSII ou à ativação de mecanismos dissipativos de energia (NPQ), comprometendo temporariamente a eficiência da fotossíntese. A queda inicial observada nos cultivos de 200 L pode, portanto, refletir a maior exposição à luz solar direta nos primeiros dias, antes do aumento da densidade celular e sombreamento interno, que possivelmente reduziram o estresse nos dias subsequentes.

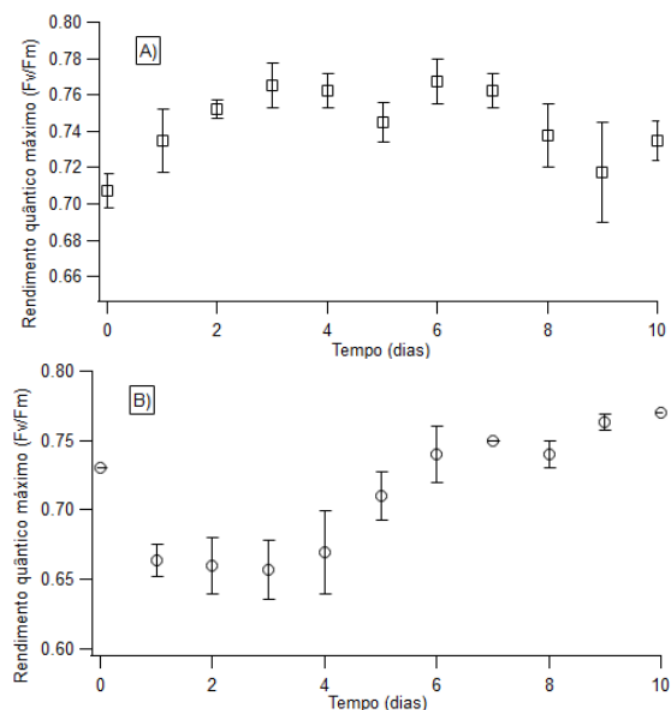


Figura 5 - Rendimento quântico máximo (F_v/F_m). Em A) cultivos de 20 L, média e desvio padrão ($n=3$). Em B) cultivos de 200 L, média e desvio padrão ($n=3$).

Em relação à produção total de biomassa, o sistema de cultivo aberto do tipo *raceway* apresentou produção média de biomassa seca de $1,269 \pm 0,82 \text{ g L}^{-1}$, enquanto no sistema fechado de 20 L, a produção média foi de $1,113 \pm 0,33 \text{ g L}^{-1}$. De acordo com a literatura científica, o rendimento em biomassa seca em cultivos abertos geralmente é baixa ($0,25$ a 1 g L^{-1}) em comparação com fotobiorreatores fechados ($1,5$ a $1,7 \text{ g L}^{-1}$) devido às limitações do cultivo em massa em *raceways*, como condições semi-controladas, contaminação por predadores e espécies competitivas e evaporação (Christenson e Sims, 2011; Khanzada, 2018; Shen et al., 2009). Entretanto, no presente estudo, os rendimentos foram estatisticamente semelhantes (Teste $t > 0,05$), o que sugere que ambos os cultivos tiveram produção, em termos de biomassa seca, iguais. Desse modo, a produção no sistema aberto modelo *raceway* foi superior ao intervalo típico mencionado na literatura, o que pode ser explicado pelo extenso período de adaptação da espécie à estufa experimental antes do experimento ou mesmo ser uma característica da espécie. Por outro lado, a produção no sistema fechado de 20 L foi inferior ao intervalo esperado para fotobiorreatores fechados. Embora esse tipo de reator ofereça vantagens como maior controle de pH e temperatura, melhor proteção contra contaminação, menor perda evaporativa e maior densidade celular, o baixo rendimento de biomassa observado neste estudo pode estar associado a limitações específicas inerentes ao sistema utilizado, como o controle ineficiente de pH ao longo do cultivo. Entre os principais fatores que podem restringir o crescimento das microalgas, destacam-se o acúmulo tóxico de oxigênio, gradientes adversos de pH e CO_2 , além do risco de superaquecimento (Shen et al., 2009). Além disso, a limitação luminosa imposta pela elevada densidade celular representou um dos principais desafios desse tipo de cultivo, uma vez que o aumento da biomassa reduz a penetração de luz e, conseqüentemente reduz a fotossíntese devido ao auto-sombreamento das células, impactando diretamente a irradiância disponível para a cultura (Borowitzka, 2017).

4.2. Composição bioquímica

Os resultados relativos à produção de biomoléculas são mostrados na Tabela 1 para os cultivos de 20 e de 200 L. A análise estatística mostrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os cultivos para proteínas, carboidratos e lipídeos totais, com valores médios superiores no cultivo de 200 L em comparação aos cultivos de

20 L. Em contrapartida, as concentrações de clorofila *a* e *b* foram estatisticamente maiores no cultivo de 20 L. Para os carotenoides totais, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney devido a não normalidade dos dados e o resultado não indicou diferença estatisticamente significativa entre os cultivos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Biomoléculas proteínas, carboidratos, e lipídeos totais em % da biomassa seca e os pigmentos (mg.L⁻¹) carotenoides, clorofilas *a* e *b* produzidos por *C. lunulatum* em cultivos de 20 L (laboratório) e 200 L (estufa). Média e desvio padrão (n=3) para 20 L e (n=3) para 200 L.

Biomoléculas	20 L	200 L
Proteínas totais (%DW)	11,59 ± 5,90	22,61 ± 2,17
Carboidratos totais (%DW)	6,70 ± 4,16	15,61 ± 1,21
Lipídeos totais (%DW)	16,39 ± 5,64	27,99 ± 2,40
Carotenoides totais (mg. L ⁻¹)	1,60 ± 1,87	0,17 ± 0,04
Clorofila <i>a</i> (mg. L ⁻¹)	10,51 ± 2,05	1,89 ± 0,16
Clorofila <i>b</i> (mg. L ⁻¹)	8,15 ± 3,06	0,39 ± 0,04

O aproveitamento de microalgas como fonte de proteína vegana representa uma alternativa sustentável para a produção de alimentos proteicos de alta qualidade, uma vez que diversas espécies apresentam um teor proteico substancialmente superior ao das fontes convencionais (Mosibo et al., 2024). Atualmente, *Chlorella sp.*, uma das microalgas mais amplamente comercializadas, pode apresentar um teor proteico de até 67% do peso seco (DW) (Costa et al., 2024), tornando-se uma fonte promissora para aplicações na indústria alimentícia. No presente estudo, *C. lunulatum* apresentou um teor proteico variando entre 11 a 23% DW, valor consideravelmente inferior ao conteúdo proteico de fontes convencionais, como ovos desidratados (47%), leite desnatado em pó (36%), farinha de amendoim (28%), carne seca (40%) e farinha de soja (44%) de acordo com Mosibo et al. (2024). Ao comparar com outras microalgas, o teor proteico de *C. lunulatum* também foi baixo, especialmente nos cultivos de 20 L. *Chlorella sorokiniana*, por exemplo, pode atingir aproximadamente 40% de proteína em sua biomassa seca (Belkoura et al., 1997; Lizzul et al., 2018). Baldisserotto et al. (2022) reportaram um teor proteico de 48,6 ± 6,5 %DW para *Chlorella vulgaris* e 36,1 ± 5,2 % DW para *Chlorella protothecoides*. De forma

semelhante, Faria (2023) observou que *C. lunulatum*, quando cultivada em escala de 200 L sob condições semi-controladas e em regime mixotrófico com acetato de sódio como fonte de carbono orgânico, apresentou um teor proteico de aproximadamente 50% DW durante a fase exponencial de crescimento. Essa grande discrepância observada pode ser explicada pelo fato da amostra ter sido retirada ao décimo dia de cultivo, período no qual os cultivos estavam na fase estacionária (Figura 3). Durante essa fase, a depleção de nutrientes essenciais, como o nitrogênio, impacta diretamente a síntese de proteínas, uma vez que esse elemento é fundamental para a formação de aminoácidos e enzimas. Estudos prévios mostram que a composição bioquímica das microalgas varia ao longo das fases de crescimento, sendo comum observar uma redução significativa no teor proteico da fase exponencial para a fase estacionária em espécies de microalgas verde como *C. vulgaris* e *Nannochloropsis gaditana* (Fidalgo et al., 1998; Sanchez-Bayo et al., 2020; Wang et al., 2021).

Quanto aos lipídeos, no presente estudo, o teor lipídico foi relativamente maior nos cultivos de 200 L ($27,99 \pm 2,40$ % DW) quando comparado aos cultivos de 20 L ($16,39 \pm 5,64$ % DW) (Tabela 1). Esses valores estão dentro da faixa relatada na literatura para microalgas verdes, cuja composição lipídica pode variar amplamente em função das condições de cultivo e da disponibilidade de nutrientes. Por exemplo, *Chlorella sp.* pode acumular entre 4 e 30% de lipídios em sua biomassa seca sob condições normais (Chakrabarty et al., 2024), caso de *C. sorokiniana* (18-22% DW) (Lizzul et al., 2018), enquanto *Botryococcus braunii* pode atingir aproximadamente 30% DW (Yamaguchi et al., 1987). É altamente evidenciado na literatura que vários fatores estressantes, como privação de nitrogênio, intensidade luminosa e concentrações de metais podem aumentar significativamente o acúmulo de lipídios (Concas et al., 2016; Gim et al., 2016; Sanchez-Bayo et al. 2020). Em estudos conduzidos previamente no Laboratório de Biotecnologia de Algas, onde o presente TCC foi realizado, mostram que espécies do gênero *Chlorolobion*, como *C. braunii*, são capazes de acumular quantidades significativas de lipídios quando expostas a concentrações ambientais de cobre (Baracho et al., 2019). Assim, experimentos adicionais poderiam ser realizados com *C. lunulatum* para verificar seu potencial biotecnológico como microalga acumuladora de lipídios em diferentes concentrações de cobre, por exemplo.

Em relação aos carboidratos intracelulares, embora as microalgas sejam uma fonte potencialmente rica de carboidratos, sua aplicação na indústria alimentícia ainda

é limitada (Mosibo et al., 2024). Estudos recentes indicam que os polissacarídeos derivados de microalgas possuem propriedades funcionais importantes, sendo uma alternativa promissora como prebióticos. Esses compostos podem estimular seletivamente o crescimento de microrganismos probióticos benéficos no trato gastrointestinal, promovendo efeitos positivos à saúde (Gouda et al., 2022; Patel et al., 2021). Além da aplicação nutricional, alguns polissacarídeos extraídos de microalgas têm encontrado outros nichos de mercado, especialmente no setor cosmético, onde são utilizados como agentes higroscópicos e antioxidantes em formulações tópicas, como loções e cremes (Borowitzka, 2013; Mosibo et al., 2024). Além disso, recentemente, a conversão de carboidratos provenientes de microalgas em biocombustíveis sustentáveis, como bioetanol, biobutanol e hidrogênio gasoso, tem sido amplamente investigada como uma alternativa promissora para mitigar a dependência de combustíveis fósseis e reduzir as emissões de carbono (Ortíz-Sánchez et al., 2024).

No presente estudo, os cultivos realizados em reatores de 20 L apresentaram um teor de carboidratos de aproximadamente 6% DW, um valor inferior ao relatado na literatura, que varia entre 12% e 30% da biomassa seca (Mosibo et al., 2024). Em contrapartida, os cultivos nos reatores de 200 L apresentaram um teor de carboidratos de cerca de 16% DW, valor dentro da faixa média relatada para microalgas verdes, inclusive para a mesma cepa. De fato, Faria (2023) observou teores de carboidratos entre 15% e 20% DW para *C. lunulatum* cultivada em escala de 200 L sob condições similares às do presente estudo. Esses dados estão em concordância com os valores observados para outras espécies, como *Nannochloropsis sp.*, que pode acumular de 6% a 30% DW, e *C. vulgaris*, com valores entre 13% e 15% DW em condições normais de crescimento (Abdel-Latif et al., 2022; Morales-Plasencia et al., 2023).

O acúmulo de carboidratos em microalgas está relacionado às condições de cultivo, sendo influenciado por fatores como disponibilidade de nutrientes e fase de crescimento (Morales-Plasencia et al., 2023). Em particular, a limitação de nutrientes e estresse osmótico têm sido amplamente associados ao aumento da produção de carboidratos, uma vez que sob estresse, as microalgas redirecionam o metabolismo para a síntese de reservas energéticas, como amido, glicogênio, amilopectina, sacarose ou mesmo celulose extracelular como uma resposta dos cloroplastos a esses ambientes hostis (Ortíz-Sánchez et al., 2024). No entanto, no presente estudo, é possível que as microalgas ainda não estivessem sob estresse suficiente para

induzir o acúmulo de carboidratos. Mesmo assim, o teor obtido neste estudo nos cultivos de 20 L foi cerca de 50% menor ao esperado. Sabe-se que os carboidratos são produto da fotossíntese e componentes estruturais essenciais, estando presente nas paredes celulares (Silva et al., 2023). Consideramos que possa ter ocorrido problemas na extração e determinação dos carboidratos na biomassa dos cultivos de 20 L. Segundo Templeton et al. (2012) diferentes açúcares podem apresentar respostas espectrofotométricas diferentes, tornando a quantificação suscetível a erros, ainda mais se a extração foi prejudicada por algum motivo, como o ácido ascórbico, erro de pipetagem, entre outros. A metodologia usada assume uma sensibilidade e reatividade uniforme para todos os carboidratos, o que pode não ser válido para as misturas complexas encontradas nas microalgas (Markou et al., 2012).

Os pigmentos fotossintéticos sofreram grande variação entre os cultivos de 20 L e 200 L. Segundo Mulders et al. (2014), os pigmentos fotossintéticos são classificados em primários e acessórios com base em sua associação funcional e estrutural ao aparato fotossintético. A clorofila *a* (Chl *a*) é um pigmento primário, sendo caracterizada como pigmento essencial na fotossíntese oxigênica, presente em todos os organismos que realizam esse processo. Sua principal função é atuar na etapa fotoquímica, convertendo a energia luminosa em energia química. Outros pigmentos, como a clorofila *b* (Chl *b*), desempenham um papel acessório, auxiliando na absorção da luz em diferentes comprimentos de onda e na transferência da energia radiante para os centros de reação fotossintéticos (Streit et al., 2005). Os carotenoides também são considerados pigmentos acessórios e estão amplamente distribuídos entre organismos fotossintetizantes, incluindo microalgas (Streit et al., 2005). Ainda que considerados acessórios, esses pigmentos desempenham funções essenciais tanto na captação de luz quanto na proteção celular contra danos oxidativos e, quando em elevada quantidade podem indicar estresse por excesso de luz (Borowitzka, 2010).

Dessa forma, com base nas funções e na importância de cada pigmento no processo fotossintético, e em situações saudáveis, é esperado que a composição pigmentar siga uma distribuição decrescente, sendo a clorofila *a* o pigmento mais abundante, seguida pela clorofila *b* e, por fim, pelos carotenoides. Essa distribuição está associada ao papel central da clorofila *a* na conversão da energia luminosa em energia química, enquanto a clorofila *b* atua ampliando o espectro de absorção da luz. Estudos indicam que, na natureza, a razão entre clorofila *a* e clorofila *b* é de

aproximadamente 3:1 (Streit et al., 2005). No presente estudo, a distribuição decrescente da composição pigmentar foi observada em todos os cultivos, sendo a clorofila *a* o pigmento majoritário, seguida pela clorofila *b* e pelos carotenoides. Os cultivos conduzidos em fotobiorreatores de 20 L apresentaram teores significativamente mais elevados de clorofila *a* ($10,51 \pm 2,05 \text{ mg L}^{-1}$) e clorofila *b* ($8,15 \pm 3,06 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação aos cultivos de 200 L, que apresentaram valores de $1,89 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,39 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Por outro lado, a concentração de carotenoides totais apresentou menor variação entre os sistemas ($1,60 \pm 1,87 \text{ mg L}^{-1}$ para 20 L e $0,17 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ para 200 L). A razão de chl*a*/chl*b* nos cultivos de 20 L foi de 1,29, enquanto nos cultivos de 200 L de 4,85.

Ao comparar os resultados dos pigmentos fotossintéticos deste estudo com os reportados na literatura, observa-se que *Chlorella sorokiniana*, cultivada em condições laboratoriais, apresentou um conteúdo de clorofila *a* de aproximadamente $1,18 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$, sendo uma das espécies de microalgas verdes com maior teor desse pigmento, entre 30 espécies analisadas em Camargo et al. (2020). Esse valor é semelhante ao observado no cultivo de 200 L em condições semi-controladas deste estudo, porém, os valores observados para os cultivos de 20 L foram consideravelmente superiores, o que pode estar relacionado às condições mais estáveis para a assimilação de luz e síntese de pigmentos. Outros estudos reportaram valores mais altos de pigmentos, sendo *Chlorella* sp. com conteúdo de chl *a* $8,45 \text{ mg L}^{-1}$ e chl *b* $4,33 \text{ mg L}^{-1}$ e *Nannochloropsis* sp. com conteúdo de chl *a* $21,24 \text{ mg L}^{-1}$ e chl *b* $9,66 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (OO et al, 2017).

De acordo com Azaman et al. (2017), durante os cultivos algais, os teores de pigmentos como a clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides podem variar em resposta à intensidade luminosa. Espera-se que os carotenoides, que atuam como agentes fotoprotetores, aumentem sob condição de excesso de luz. No presente estudo, a ausência de diferenças significativas nos teores de carotenoides entre os dois sistemas de cultivo sugere que as culturas não foram expostas a níveis elevados de irradiância que desencadeassem estresse luminoso, no momento da coleta. Entretanto, por outro lado, os valores de clorofila *a* e *b* foram significativamente maiores nos fotobiorreatores fechados, o que pode refletir uma resposta adaptativa das células à menor disponibilidade de luz no interior do sistema, especialmente em estágios avançados do cultivo, quando a densidade celular estava elevada. Nessa condição, o aumento da produção de clorofilas pode estar relacionado à tentativa de

maximizar a captação de luz residual para manter a atividade fotossintética. Assim, as diferenças observadas na composição pigmentar entre os cultivos parecem estar mais associadas à distribuição e disponibilidade da luz dentro dos reatores do que à presença de estresse por excesso de irradiância. Esses achados sugerem que a luz solar incidente na estufa foi adequada para os cultivos em escala de 200 L, mesmo com a alta densidade celular alcançada ao final do experimento.

5. Conclusões

Neste estudo, foram investigados o crescimento e a composição bioquímica da microalga Chlorophyta *Chlorolobion lunulatum* em reatores fechados do tipo coluna de bolhas (20 L), e em reatores do tipo *raceway* abertos com 200 L de cultura, instalados em estufa experimental. Os resultados mostraram que *C. lunulatum* é capaz de se desenvolver em diferentes condições de cultivo, mantendo desempenho satisfatório de crescimento em ambos os sistemas, mas com destaque para o cultivo em *raceway* sob condições semi-controladas, mostrando sua alta adaptabilidade fisiológica. Ademais, os cultivos em escala de 200 L apresentaram taxas de crescimento significativamente superiores aos de 20 L, além de maior acúmulo de biomoléculas, como proteínas, lipídios e carboidratos, apesar da biomassa final não ter diferido estatisticamente entre os sistemas. Tais diferenças reforçam que as condições ambientais e o tipo de reator influenciam diretamente o metabolismo da microalga, e que o momento da coleta das amostras (fase de crescimento populacional) pode ser importante quando se almeja biomoléculas específicas. Isso se deve ao fato de que em fase exponencial há uma tendência de acúmulo de proteínas, enquanto em fase estacionária, de compostos de reserva. Em contrapartida, o sistema de 20 L apresentou menor eficiência na produção de biomoléculas, possivelmente em função de falhas no controle operacional, especialmente na regulação do pH, fator crítico para o crescimento microalgal.

Os dados obtidos neste estudo contribuem para a caracterização bioquímica e fisiológica de *C. lunulatum*, além de fornecerem subsídios relevantes para o planejamento de cultivos em escala ampliada. Como perspectiva futura, destaca-se a importância de estudos voltados à indução controlada de estresses nutricionais ou luminosos, com o objetivo de otimizar a síntese e o acúmulo de lipídios. Além disso,

a caracterização qualitativa desses lipídios deve ser considerada em estudos subsequentes, visto que a composição lipídica impacta diretamente suas aplicações potenciais nas indústrias alimentícia, cosmética e energética.

6. Referências bibliográficas

- ABDEL-LATIF, H. M. R. et al. The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview. **Aquaculture reports**, v. 24, n. 101135, p. 101135, 2022.
- ABDUR RAZZAK, S. et al. Microalgae cultivation in photobioreactors: sustainable solutions for a greener future. **Green Chemical Engineering**, v. 5, n. 4, p. 418–439, 2024.
- 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**, v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- AZAMAN, S. N. A. et al. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. **PeerJ**, v. 5, n. e3473, p. e3473, 2017.
- BALDISSEROTTO, C. et al. Chlorophyta microalgae as dietary protein supplement: a comparative analysis of productivity related to photosynthesis. **Journal of applied phycology**, v. 34, n. 3, p. 1323–1340, 2022.
- BANERJEE, S.; RAMASWAMY, S. Comparison of productivity and economic analysis of microalgae cultivation in open raceways and flat panel photobioreactor. **Bioresource technology reports**, v. 8, n. 100328, p. 100328, 2019.
- BAÑUELOS-HERNÁNDEZ, B.; BELTRÁN-LÓPEZ, J. I.; ROSALES-MENDOZA, S. Production of biopharmaceuticals in microalgae. Em: **Handbook of Marine Microalgae**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 281–298.
- BARACHO, D. H.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. **Journal of Phycology**, v. 55, n. 6, p. 1335-1347, 2019.
- BARKIA, Ines; SAARI, Nazamid; MANNING, Schonna R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 304, 2019.
- BELKOURA, M.; BENIDER, A.; DAUTA, A. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss. **Annales de limnologie**, v. 33, n. 1, p. 3–11, 1997.
- BOROWITZKA, M. A. Carotenoid production using microorganisms. In: **Single Cell Oils**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 225–240.
- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

- BOROWITZKA, M. A.; VONSHAK, A. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. **European journal of phycology**, v. 52, n. 4, p. 407–418, 2017.
- 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.
- CHAKRABARTY, B. et al. Characterization of lipid production in *Chlorella* sp. Cultivated in different plant fertilizers. **Energies**, v. 17, n. 23, p. 6193, 2024.
- CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 686–702, 2011.
- CONCAS, A. et al. Autotrophic growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* in lab batch and BIOCOIL photobioreactors: Experiments and modeling. **Bioresource technology**, v. 211, p. 327–338, 2016.
- COSTA, M. M. et al. Improving protein extraction and peptide production from *Chlorella vulgaris* using combined mechanical/physical and enzymatic pre-treatments. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. e32704, 2024.
- FARIA, Leonardo. Estudo fisiológico de *Chlorella sorokiniana* e *Chlorobion 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.
- FIDALGO, J. P. et al. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)**, v. 166, n. 1–2, p. 105–116, 1998.
- GIM, G. H. et al. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 605–616, 2016.
- GOUDA, M. et al. Microalgae bioactive carbohydrates as a novel sustainable and Eco-friendly source of prebiotics: Emerging health functionality and recent technologies for extraction and detection. **Frontiers in nutrition**, v. 9, p. 806692, 2022.
- HU, J. et al. Emerging technologies for advancing microalgal photosynthesis and metabolism toward sustainable production. **Frontiers in marine science**, v. 10, 2023.
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. 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, 2018.
- KHANZADA, Z T. Growing fresh water microalgae in high ammonium landfill leachate. **American journal of mechanics and applications**, v. 6, n. 2, p. 50, 2018.
- KUMAR, M. et al. Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: Opportunities and challenges. **The Science of the total environment**, v. 716, n. 137116, p. 137116, 2020.
- LIZZUL, A. M. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, 2018.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011.
- MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 631–645, 2012.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLEAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.
- MOBIN, S.; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. **Energy procedia**, v. 110, p. 510–517, 2017.
- MORALES-PLASENCIA, M. E. et al. The effect of nitrogen limitation on carbohydrates and β -glucan accumulation in *Nannochloropsis oculata*. **Algal research**, v. 72, n. 103125, p. 103125, 2023.
- MOSIBO, O. K.; FERRENTINO, G.; UDENIGWE, C. C. Microalgae proteins as sustainable ingredients in novel foods: Recent developments and challenges. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 5, p. 733, 2024.
- MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 229–242, 2014.
- OO, Y.; SU, M.; KYAW, K. Extraction and determination of chlorophyll content from microalgae. 2017.
- ORTÍZ-SÁNCHEZ, E. et al. Cultivation of carbohydrate-rich microalgae with great settling properties using cooling tower wastewater. **Environmental science and pollution research international**, v. 31, n. 27, p. 38999–39014, 2024.
- PARRISH, C. C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. **Lipids in Freshwater Ecosystems**, [s.l.], p. 4-20, 1999.
- PATEL, A. K. et al. Emerging prospects of macro- and microalgae as prebiotic. **Microbial cell factories**, v. 20, n. 1, p. 112, 2021.
- PESSI, B. A. et al. Does temperature shift justify microalgae production under greenhouse? **Algal Research**, v. 61, n. 102579, p. 102579, 2022.
- PRADO, L. DE O. et al. Microalgal cultivation in open and closed systems under a tropical climate: A life cycle comparison. **Journal of cleaner production**, v. 422, n. 138631, p. 138631, 2023.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.
- SÁNCHEZ-BAYO, A. et al. Cultivation of microalgae and Cyanobacteria: Effect of operating conditions on growth and biomass composition. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 12, p. 2834, 2020.

- SATHASIVAM, Ramaraj; RADHAKRISHNAN, Ramalingam; HASHEM, Abeer; et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 709–722, 2019.
- SHEN, Y. et al. Microalgae mass production methods. **Transactions of the ASABE**, v. 52, n. 4, p. 1275–1287, 2009.
- SILVA, G. DO N. et al. Extraction of total carbohydrates by solvents from the microalgae *Chlorella vulgaris* and analysis of the influence of NaNO₃ and photoperiods on microalgae cell growth. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 1, p. 2473–2487, 2023.
- SLOCOMBE, S. P.; ROSS, M.; THOMAS, N.; McNEILL, S.; STANLEY, M. S. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51-57, 2013.
- SONGSERM, R.; NISHIYAMA, Y.; SANEVAS, N. Light influences the growth, pigment synthesis, photosynthesis capacity, and antioxidant activities in *Scenedesmus falcatus*. **Scientifica**, v. 2024, p. 1898624, 2024.
- STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- TEMPLETON, D. W. et al. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 225–234, 2012.
- VALDEZ, N. I. Caracterização da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*: Uma abordagem fisiológica, bioquímica e metabólica. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/16686/TCC_Nicola%cc%81s_Valdez_final_RevAna.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 1 jan. 2025.
- WANG, Y.; TIBBETTS, S. M.; MCGINN, P. J. Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, p. 3002, 2021.
- WELLBURN, A. 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**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- WILLIAMS, P. J. LE B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p. 554, 2010.
- XIA, Q. et al. Determination of Fv /Fm from chlorophyll a fluorescence without dark adaptation by an LSSVM model. **Plant phenomics (Washington, D.C.)**, v. 5, n. 0034, p. 0034, 2023.
- YAMAGUCHI, K. et al. Lipid Composition of a Green Alga, *Botryococcus braunii*. **Agricultural and biological chemistry**, v. 51, n. 2, p. 493–498, 1987.