



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



**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS EM *CHLOROLOBION BRAUNII*: ESTÍMULO  
INDUZIDO POR COBRE EM CULTURAS DE 200 L**

Guilherme Léo Pasqualinotto\*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Teresa Lombardi

\* bolsista (CAPES)-88887.852972/2023-00

São Carlos – SP  
2025

Guilherme Léo Pasqualinotto

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS EM *CHLOROLOBION BRAUNII*: ESTÍMULO  
INDUZIDO POR COBRE EM CULTURAS DE 200 L**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Teresa Lombardi

**São Carlos - 2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Guilherme Léo Pasqualinotto, realizada em 25/07/2025.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

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

Profa. Dra. Flávia Bottino (INSUMA)

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

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, José Leonel Pasqualinotto e Sandra Elídia de Oliveira Pasqualinotto, que sempre me apoiaram em minhas decisões e se esforçaram para que eu pudesse chegar até onde cheguei, sendo a base de tudo o que sou.

À Prof. Dr. Ana Teresa Lombardi, por ter sido minha orientadora, por seus ensinamentos e por demonstrar dedicação e competência em sua função.

À minha amiga Jaqueline Carmo da Silva, por sua disposição, por ter me ensinado e encorajado de diversas formas, bem como por não medir esforço algum para me ajudar.

À UFSCar, essencial no meu processo de formação profissional.

Aos meus colegas de laboratório, pela convivência e pelo apoio, seja direto ou indireto, que contribuiu para a realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de Financiamento 88887.852972/2023-00) pela concessão da bolsa de estudo.

## Resumo

O cultivo de microalgas é uma área que tem mostrado relevância nos últimos anos. Com isso, diversos estudos e técnicas com intuito de aumentar a viabilidade e ampliar o rendimento de compostos produzidos por microalgas vêm sendo realizados. Estratégias como a manipulação de nutrientes, luz e temperatura podem aumentar a produtividade das microalgas. Dentre essas, a mixotrofia, que combina fontes de carbono orgânico e inorgânico, pode promover ganhos expressivos de biomassa ao unir vantagens de cultivos autotróficos e heterotróficos. O cobre, como micronutriente essencial e cofator enzimático, exerce influência crucial na fisiologia das microalgas, impactando o metabolismo de acordo com sua concentração. O objetivo deste estudo foi adaptar a estratégia descrita na patente INPI BR 102021019778-1 A2 para cultivos de 200 L, resultando em aumento do rendimento de lipídios em *Chlorolobion braunii*. Para tanto testou-se o cobre na concentração de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>+2</sup> livre como agente manipulador, e com foco no aumento de biomassa, foi usada a mixotrofia na fase final do cultivo. O cobre foi adicionado nos cultivos a partir do 3º dia, enquanto a mixotrofia foi induzida a partir do 6º dia de cultivo utilizando-se 0,2 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio (NaO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>). Os cultivos foram feitos em meio BG11, na modalidade batelada alimentada sob condições semicontroladas em estufa agrícola e teve duração de 8 dias, com luz e fotoperíodo natural. Os resultados mostraram variação das condições ambientais, com oscilação de temperatura de 25,5 – 34,6 °C. A mixotrofia resultou em aumento na produção da biomassa de 3 vezes no 8º dia de experimento em relação ao 3º dia. Como esperado, a presença do cobre não interferiu nem na taxa de crescimento e nem na biomassa obtida, restringindo-se a estimular a produção de lipídios em 23% em relação ao tratamento controle. No tratamento com cobre houve uma redução de até 20% no acúmulo de proteínas no 8º dia do período experimental, enquanto carboidratos totais mantiveram-se constantes entre os tratamentos e controle, portanto não sendo influenciado pelo cobre. Este estudo enfatiza o potencial biotecnológico da microalga *Chlorolobion braunii* e reforça a importância de otimizar as condições de cultivo para maximizar a produção de biomoléculas.

Palavras-chave: microalgas, fisiologia, manipulação, biomoléculas, biotecnologia

## Abstract

Microalgae cultivation has gained prominence in recent years. As a result, several studies and techniques have been developed to increase the viability and yield of compounds produced by microalgae. Strategies such as nutrient, light, and temperature manipulation can increase microalgae productivity. Among these, mixotrophy, which combines organic and inorganic carbon sources, can promote significant biomass gains by combining the advantages of autotrophic and heterotrophic cultivation. Copper, as an essential micronutrient and enzymatic cofactor, exerts a crucial influence on microalgae physiology, impacting metabolism depending on its concentration. The objective of this study was to adapt the strategy described in patent INPI BR 102021019778-1 A2 to 200 L cultures, resulting in increased lipid yield in *Chlorolobion braunii*. For this purpose, copper at a concentration of  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> of free Cu<sup>+2</sup> was tested as a manipulating agent, and to increase biomass, mixotrophy was used in the final phase of cultivation. Copper was added to the cultures from the 3rd day onward, while mixotrophy was induced from the 6th day of cultivation using 0.2 g L<sup>-1</sup> of sodium acetate (NaO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>). Cultivations were carried out in BG11 medium, in fed-batch mode under semi-controlled conditions in an agricultural greenhouse and lasted 8 days, with natural light and photoperiod. The results showed variation in environmental conditions, with temperature fluctuations of 25,5 – 34,6 °C. Mixotrophy resulted in a threefold increase in biomass production on day 8 of the experiment compared to day 3. As expected, the presence of copper did not affect either the growth rate or the biomass obtained, limiting itself to stimulating lipid production by 23% compared to the control treatment. The copper treatment resulted in a reduction of up to 20% in protein accumulation on day 8 of the experimental period, while total carbohydrates remained constant between the treatments and the control, thus not being influenced by copper. This study emphasizes the biotechnological potential of the microalgae *C. braunii* and reinforces the importance of optimizing culture conditions to maximize biomolecule production.

Keywords: microalgae, physiology, biomolecules, manipulation, biotechnology

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) da estufa (E) e do cultivo (C) em diferentes horários por 8 dias.

**Tabela 2.** Irradiância ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) da estufa (E) e do cultivo (C) em diferentes horários por 8 dias.

**Tabela 3.** Produtividade de \u00f3leo de *Chlorolobion braunii* cultivada com  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre e da soja (*Glycine max*), considerando a produ\u00e7\u00e3o di\u00e1ria, produ\u00e7\u00e3o total em 100 dias, \u00e1rea necess\u00e1ria para igualar a produ\u00e7\u00e3o de 1 ha de soja e tempo necess\u00e1rio para igualar a produ\u00e7\u00e3o de \u00f3leo de soja em 1 ha. A produtividade da soja foi estimada com base em uma m\u00e9dia nacional de  $3423 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  com rendimento de 18% em \u00f3leo, enquanto a produtividade de *C. braunii* foi calculada a partir de uma produ\u00e7\u00e3o de  $0,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa seca, 75,5% de lip\u00eddios em reatores raceway com coluna de 6 cm de profundidade e ciclo de 8 dias.

**Figura 1.** (a) Pr\u00e9-in\u00f3culo de *C. braunii* cultivada em meio de cultivo BG11 e condi\u00e7\u00f5es controladas em escala laboratorial. (b) Reatores horizontais com 20L de cultivo de *C. braunii* utilizados para o processo de aclima\u00e7\u00e3o em estufa agr\u00edcola durante 2 meses.

**Figura 2.** In\u00edcio do experimento em *raceways* de 200L de cultivo de *C. braunii* em estufa agr\u00edcola. (a) Cultivos com sombrite 60% para o controle de luminosidade. (b) Cultivos de *C. braunii* em *raceways* de 200L sem sombrite.

**Figura 3.** Biomassa seca (liofilizada) de uma amostra de 100 mL coletada para monitoramento de biomassa e posterior an\u00e1lise de pigmentos e biomol\u00e9culas.

**Figura 4.** (a) Ln da concentra\u00e7\u00e3o de c\u00e9lulas reportada como densidade celular de *Chlorolobion braunii* (c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ ) em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental; (b) Medidas de clorofila *a in vivo* (A.U) em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental; (c) Valores de absorv\u00eancia em 684 nm de cada tratamento em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental. Os pontos mostram os valores m\u00e9dios e as barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ( $n=3$ ). Tratamentos: quadrado aberto, controle; quadrado fechado,  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre livre.

**Figura 5.** Concentra\u00e7\u00e3o de fosfato inorg\u00e2nico dissolvido ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no meio de cultivo em culturas de *Chlorolobion braunii* de 200 L cada tratamento em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental (dias). Os pontos mostram os valores m\u00e9dios e as barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ( $n=3$ ). Tratamentos: Quadrado fechado,  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre livre; quadrado aberto, controle.

**Figura 6.** Biomassa seca de *Chlorolobion braunii* obtida nos dias 2, 3, 5, 6, 7 e 8 para os tratamentos. As barras escuras representam tratamentos com adi\u00e7\u00e3o de cobre; barras cinzas os controles. Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia ( $n=3$ ).

**Figura 7.** Concentra\u00e7\u00e3o de pigmentos em *Chlorolobion braunii* (%dw) nos dias 3 e 8 do per\u00edodo experimental: barras listradas representam clorofila *a*; barras lisas, Chl *b*; barras xadrez, carotenoides totais. Barras escuras representam o tratamento com adi\u00e7\u00e3o de  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{+2}$ , enquanto barras cinza representam os tratamentos controle. Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia ( $n=3$ ). Letras iguais sobrescritas indicam aus\u00eancia de diferen\u00e7a significativa ( $p > 0,05$ ).

**Figura 8.** Composição de biomoléculas (% de biomassa seca) em culturas de *Chlorolobion braunii* sob tratamento com  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre (barras escuras) e controle (barras claras), aos dias 3 e 8. Lipídios (barras lisas), proteínas (pontilhadas), carboidratos (listradas) e cinzas (onduladas), barras de erro indicam o desvio padrão da média (n=3). **(a)** Valores médios das biomoléculas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ). **(b)** Representação empilhada das frações, evidenciando sua contribuição relativa à biomassa total.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

**%DW** - Porcentagem de biomassa seca

**%** - Porcentagem

**°C** - Grau Celsius

**$\mu$  L<sup>-1</sup>** - Microlitro

**$\mu$ mol** - Micromol

**mM** - Milimolar

**M** - Molar

**BG11** -Meio Blue Green

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**d<sup>-1</sup>** - Por dia

**d** - Dia

**g** - Grama

**g L<sup>-1</sup>** - Grama por litro

**h** - Hora

**L** - Litro

**L<sup>-1</sup>** - Por litro

**Ln** - Logaritmo natural

**mg L<sup>-1</sup>** - Miligrama por litro

**m<sup>2</sup>** - Por metro quadrado

**min** - Minuto

**s<sup>-1</sup>** - Por segundo

**mol L<sup>-1</sup>** - Mol por litro

**Cu<sup>+2</sup>** - Íons de cobre

**ha** - Hectare

**Kg** - Quilograma

**Kg ha<sup>-1</sup>** - Quilograma por hectare

**Kg ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>** - Quilograma por hectare por dia

**Abs** - Absorbância

**OD** - Densidade óptica

**nm** - Nanômetro

## Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	15
2.1 Objetivos específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Condições de pré-inóculo	16
3.2. Culturas e ampliação de escala	17
3.3. Parâmetros de crescimento	19
3.4. Análise de biomoléculas	21
3.5. Análise estatística	23
4. Resultados e discussão	24
4.1. Parâmetros de crescimento	24
4.2. Concentração de fosfato inorgânico	26
4.3. Biomassa seca	28
4.4. Irradiância e temperatura	30
4.5. Parâmetros bioquímicos	32
5. Estudo da produção de óleo	38
6. Conclusão	50
7. Referências	41

## 1. Introdução

Os compostos de origem biológica desempenham um papel fundamental em diversos setores industriais, atuando desde a matéria-prima até o produto final em inúmeros processos. O avanço contínuo de indústrias como a farmacêutica, energética, de tratamento de efluentes e alimentícia, entre outras (Rizwan et al., 2018), está diretamente associado a este aumento, impulsionando a demanda por soluções produtivas. Como consequência, há um desenvolvimento constante de soluções inovadoras de origem biotecnológica, visando atender de maneira eficiente a crescente necessidade industrial (Jha et al., 2017).

A obtenção de produtos a partir de microalgas destaca-se pelas vantagens que apresenta em comparação a processos convencionais. Entre os principais benefícios, inclui-se o fato de não concorrer por áreas destinadas à agricultura, a elevada diversidade de espécies, que possibilita diferentes estratégias de cultivo, a capacidade de fixação de dióxido de carbono com consequente liberação de oxigênio. Adicionalmente, esses microrganismos são capazes de sintetizar diversos compostos de interesse industrial e podem ser cultivados utilizando resíduos como substrato, agregando valor a subprodutos que seriam descartados (Benedetti et al., 2018). Além disso, a versatilidade do emprego das microalgas também inclui a possibilidade de modulação do cultivo com o interesse de produção de moléculas específicas de alto valor agregado (Velmurugan et al., 2022), como astaxantina (Patel et al., 2022) e lipídios (Chen et al., 2017). Esses aspectos reforçam o crescente interesse nesse tipo de biotecnologia, evidenciando seu potencial sustentável e a viabilidade de produção contínua ao longo do ano (Benedetti et al., 2018; Vázquez-Romero et al., 2022).

A produção de biomassa de microalgas pode ser conduzida, predominantemente, em dois tipos principais de fotobiorreatores, cada um com características operacionais distintas. Os sistemas fechados caracterizam-se por permitir um controle rigoroso das condições operacionais, sendo, portanto, mais apropriados para o cultivo de microalgas com alto valor comercial e elevada sensibilidade à contaminação (Su et al., 2023). Em contrapartida, os sistemas abertos, embora apresentem menor controle sobre as variáveis, são amplamente empregados para o cultivo de cepas mais resistentes, devido à sua

capacidade de produção em larga escala e menor custo operacional (Rodríguez-Miranda et al., 2021).

Apesar dos avanços na área, a tecnologia de cultivo de microalgas ainda enfrenta desafios críticos que limitam sua otimização e ampla aplicação industrial. Entre os principais desafios, destaca-se o elevado custo de produção, atribuído tanto à complexidade dos processos de coleta da biomassa e extração de biomoléculas (Kumar et al., 2020), quanto às exigências técnicas inerentes ao próprio cultivo, como mão de obra especializada, variabilidade de resultados quanto ao rendimento de biomassa em diferentes estudos de cultivos de larga escala, manutenção de condições de cultivo e custo de materiais específicos para a produção (Vázquez-Romero et al., 2022). Nesse contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que visem ao aumento da produtividade de biomassa e produtos provenientes do metabolismo destes organismos, com o objetivo final de viabilizar economicamente a produção em larga escala.

Para que o uso de biorreatores voltados ao cultivo de microalgas se torne economicamente viável, é imprescindível a redução dos custos de produção, aliada ao aumento dos rendimentos de biomassa ou do bioproduto de interesse (Bhatt et al., 2022; Ácien et al., 2012) resultantes de técnicas de manipulação do cultivo. Parâmetros como taxa de crescimento (rendimento de biomassa) e taxa de produção metabólica (acúmulo de biomoléculas) configuram-se como fatores-chave para o escalonamento da tecnologia do cultivo de microalgas em nível industrial e comercial, especialmente considerando o elevado potencial de otimização desses processos em cultivos de larga escala (Benedetti et al., 2018; Bhatt et al., 2022). A literatura evidencia que a modulação de variáveis ambientais, como o fornecimento de luz, temperatura e a concentração de nutrientes específicos, pode influenciar de forma significativa tanto o crescimento celular quanto a produção de compostos metabólicos (Balasubramaniam et al., 2021; Chowdury et al., 2020; Muñoz-Tamayo et al., 2013).

Diversos estudos baseados nas condições de cultivo foram feitos para alcançar uma alta eficiência no desenvolvimento da tecnologia do cultivo de microalgas (Medeiros e Moreira, 2022; Hermadi et al., 2021; Chin et al., 2023) . Segundo Abreu et al. (2022) cultivos fundamentados unicamente em autotrofia, ou seja, alimentados com carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>) apresentam a intensidade luminosa como fator limitante para o aumento de biomassa. Por outro lado, cultivos mixotróficos, ou seja, que recebem uma

fonte de carbono orgânico juntamente aos inorgânicos demonstram um aumento significativo de biomassa ao combinar vantagens de cultivos autotróficos e heterotróficos (Abiusi et al. 2020).

O cobre, como micronutriente, desempenha um papel vital na fisiologia das microalgas, influenciando processos biológicos com base em sua disponibilidade, seja em excesso ou em deficiência (Lombardi e Maldonado, 2011; Agawany et al., 2021; Polat e Altınbaş, 2023). Muitas vezes, observa-se que o cobre pode estimular o acúmulo de biomoléculas em microalgas, com seus efeitos dependendo da concentração de exposição (Dextro et al., 2025; Elleuch, 2024; Agawany et al., 2021). Isso sugere a existência de uma faixa de concentração ideal, com limites superiores e inferiores, dentro da qual as algas podem ajustar seu metabolismo para um desempenho ideal (Aoyagi et al., 2023). Entretanto, o uso do cobre como agente manipulador da biomassa algal é restrito a concentrações ambientais, ou seja, aquelas que não ocasionam danos ao organismo, permitindo que ele continue seu metabolismo normal, sofrendo apenas um estímulo pelo metal.

Além dos fatores específicos de cultivo, a seleção de microalgas é outro fator importante, pois as respostas bioquímicas e fisiológicas às mudanças nas condições de cultivo variam de acordo com as espécies (Singh et al., 2015). A escolha da cepa algal também é, portanto, um fator a ser considerado nos cultivos ampliados, pois precisa ser robusta a ponto de suportar as oscilações ambientais e superar a presença de eventual contaminantes biológicos. A microalga escolhida para este estudo foi *Chlorolobion braunii* (Nägeli, Komárek, 1979), uma espécie cosmopolita de Chlorophyta de água doce. Essa microalga foi selecionada por seu histórico de elevado rendimento de biomoléculas, particularmente lipídios, aumento de volume celular sob estímulo de cobre, além do rápido crescimento observados em estudos prévios em escala laboratorial (Machado et al., 2014; Echeveste et al., 2017; Baracho et al., 2019). Essas características são fundamentais para o tipo de reator (*raceway*) e as manipulações de cultivo propostas neste trabalho.

Este estudo teve como objetivo principal investigar sobre o uso do micronutriente cobre como estimulante da produção de biomoléculas na microalga *Chlorolobion braunii* cultivada em volumes de 200 L. Este estudo é uma ampliação da patente INPI BR 102021019778-1 A2, que foi publicada apenas com resultados referentes à escala

laboratorial. A proposta baseia-se no aprimoramento da conversão de biomassa e da produção de biomoléculas por meio da manipulação das condições de cultivo. Os experimentos foram realizados em uma estufa em condições semicontroladas, com a expectativa de que a interação entre os fatores analisados resulte em um aumento significativo na produção de biomassa e de biomoléculas.

Além disso, esse trabalho foi fundamentado em resultados prévios reportados por Bolli (2023), que indicam um rendimento lipídico de até 80% (base seca) em cultivos de *Chlorolobion braunii* expostos a concentrações de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre, sob condições laboratoriais. Assim, o presente estudo também busca validar e expandir esses achados, avaliando a viabilidade técnica da aplicação desses parâmetros em sistemas abertos de 200 L.

## **2. Objetivos**

O objetivo deste estudo foi investigar, em culturas em larga escala (200 L), sobre o uso do cobre em concentrações ambientais como estratégia para estimular o acúmulo de lipídios em *Chlorolobion braunii*.

### **2.1. Objetivos específicos**

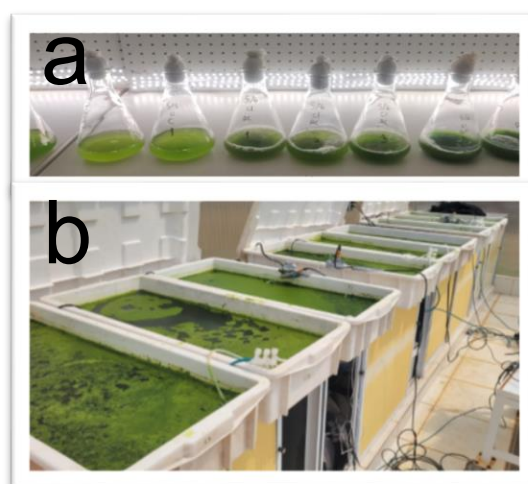
- Avaliar a viabilidade do escalonamento da microalga *Chlorolobion braunii* e desempenho produtivo da microalga em volumes maiores, realizando a transição de 500 mL para 200 L;
- Usar acetato de sódio como fonte de carbono orgânico nos cultivos de *Chlorolobion braunii* em situações de limitação de luz induzindo ao metabolismo mixotrófico;
- Verificar o desempenho dos cultivos com adição de cobre, visando estabelecer uma base para otimização de protocolos de cultivo em escala ampliada.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Condições de pré-inóculo

A microalga *Chlorollobion braunii* (CCMA-UFSCar 137) foi obtida da coleção de culturas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil. No laboratório, as culturas foram mantidas em meio BG11 (Rippka et al., 1979), sob condições controladas de intensidade luminosa ( $350 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fotoper\u00edodo (12 h claro/12 h escuro) e temperatura ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A intensidade luminosa de cultivo foi previamente verificada por meio de curvas r\u00e1pidas de luz (RLC) de acordo com o descrito em Camargo et al. (2020). Para manuten\u00e7\u00e3o em laborat\u00f3rio, o meio BG-11 foi esterilizado em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos, antes da inocula\u00e7\u00e3o das microalgas.

Previamente ao in\u00edcio do experimento, foi feita a aclima\u00e7\u00e3o da cepa em condi\u00e7\u00f5es semicontroladas em estufa, utilizando-se reatores horizontais com 20 L de cultivos durante 2 meses. Os cultivos eram inoculados em novos reatores de 20 L a cada 4 dias com volume de cultura m\u00e3e de 10% v/v para a manuten\u00e7\u00e3o da fase exponencial de crescimento do microrganismo. Para o preparo do meio utilizou-se \u00e1gua corrente do abastecimento comum desinfetada com  $0,8 \text{ mL L}^{-1}$  (hipoclorito de s\u00f3dio a 2,5% - \u00e1gua sanit\u00e1ria comercial). Ap\u00f3s 12 h, o cloro foi neutralizado com tiosulfato de s\u00f3dio (1,3 g de tiosulfato de s\u00f3dio foram dissolvidos em 1 L de \u00e1gua e adicionados a cada reator com 20 L de \u00e1gua).

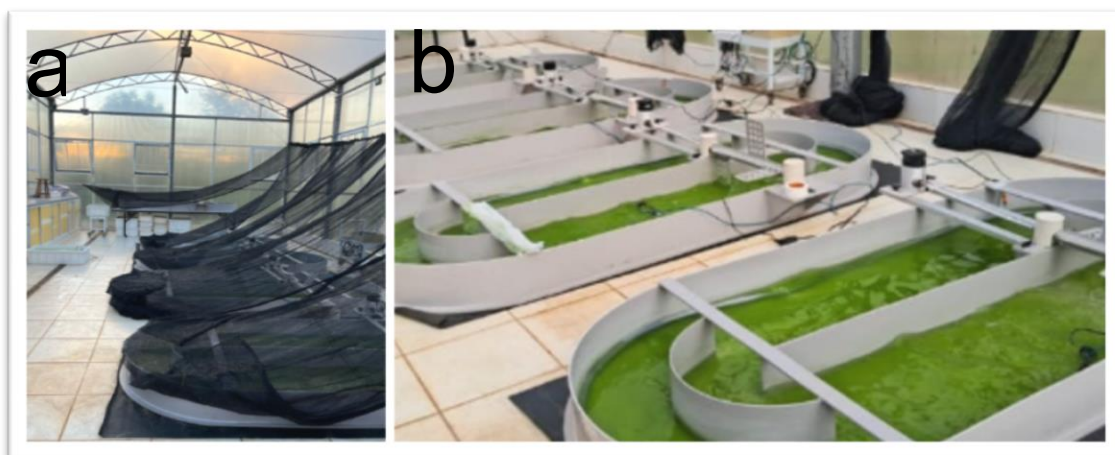


**Figura 1.** (a) Pr\u00e9-in\u00f3culo de *C. braunii* cultivada em meio de cultivo BG11 e condi\u00e7\u00f5es controladas em escala laboratorial. (b) Reatores horizontais com 20L de cultivo de *C. braunii* utilizados para o processo de aclima\u00e7\u00e3o em estufa agr\u00edcola durante 2 meses.

### 3.2. Culturas e Ampliação de Escala

A expansão do cultivo foi realizada em uma estufa agrícola no período de verão, em fevereiro de 2025, sob condições semi-controladas de iluminação natural e temperatura, aplicando-se um inóculo inicial de  $10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. A irradiância e a temperatura foram monitoradas em dois pontos distintos: dentro dos cultivos, e no ambiente da estufa. As medições foram realizadas em 5 horários fixos ao longo do dia (9h, 11h, 13h, 15h e 17h), mantendo-se a sequência horária em todos os dias de experimento (8 dias) conforme mostrado nas tabelas 1 e 2. Essa padronização permitiu acompanhar a variação temporal dessas variáveis, e registrar as oscilações térmicas (°C) e de luminosidade ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), analisando seus efeitos no cultivo. A intensidade luminosa incidente nos cultivos foi parcialmente controlada por meio de sombrites, com bloqueio de 60% nos 2 primeiros dias de cultivo e a temperatura da estufa foi parcialmente controlada com o uso de climatizadores de ar.

Os cultivos foram realizados com 3 réplicas experimentais tanto para os controles como para os tratamentos com cobre. Foram feitos em reatores horizontais do tipo *raceway* com capacidade total de 500 L e volume útil de 200 L, resultando em uma coluna de cultivo com 6 cm. Portanto, 6 cm foi o caminho óptico mantido nas culturas. O caminho óptico das culturas foi mantido constante em 6 cm, uma vez que toda a evaporação observada no sistema de cultivo, com média diária de 1 cm (aproximadamente 30 L), era compensada com a reposição de água desinfetada. Esse controle permitiu garantir a estabilidade do volume. O design experimental considerou o posicionamento intercalado dos reatores dentro da estufa, alternando unidades de tratamento e controle.



**Figura 2.** Início do experimento em *raceways* de 200 L de cultivo de *C. braunii* em estufa agrícola. **(a)** Cultivos com sombrite 60% para o controle de luminosidade. **(b)** Cultivos de *C. braunii* em *raceways* de 200L sem sombrite.

Os reatores foram equipados com bombas submersas com vazão de  $120 \text{ L h}^{-1}$  para promover o movimento de  $\text{CO}_2$  nas culturas em uma coluna horizontal de 7 m. A inserção do  $\text{CO}_2$  nos cultivos foi automaticamente controlada pelo valor do pH, mediante fechamento (pH 6,8) e abertura (pH 8,0) de válvulas solenoides. A água utilizada no meio BG11 foi desinfetada como descrita acima, no tópico 4.1 *Condições de Pré-inóculo*.

Para os cultivos de 200 L foi feita a substituição do carbonato de sódio ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) por bicarbonato de sódio ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) no meio BG11. Experimentos realizados em laboratório mostraram não haver qualquer influência no crescimento populacional de *C. braunii* mediante tal substituição. Essa opção se baseou no fato do pH ser mantido mais próximo da neutralidade com o bicarbonato de sódio em comparação ao carbonato de sódio, este mais alcalino. O cultivo controle constou do meio BG11 modificado sem adição extra de cobre, enquanto o tratamento teve a adição de  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  livre ( $0,229 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ).

Todos os cultivos foram conduzidos em modo batelada alimentada, com adição de 50 L de meio BG11 2x concentrado em cada cultura nos dias 3, 5 e 7 do experimento, sempre no período da manhã (às 9h). As adições foram realizadas de forma a manter as condições originais de cada grupo, preservando a distinção entre o tratamento (com adição extra de cobre) e o controle (com cobre originalmente presente no meio BG11). Considerando a baixa intensidade luminosa nos reatores a partir do dia 6 do experimento,

iniciou-se a mixotrofia por meio da adição de 0,2 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio (NaO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>) em todos os cultivos diariamente ao final do dia (17h), inclusive no controle.

### 3.3. Parâmetros de crescimento

#### 3.3.1. Densidade celular

A densidade celular (cel mL<sup>-1</sup>) de cada reator foi aferida diariamente por meio da média da contagem de células presentes (n = 3 por tratamento). A contagem de células foi realizada em hemocitômetro (Fuchs-Rosenthal), sob microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon, Japão) e foi feita em amostras de 3 mL coletadas dos reatores.

#### 3.3.2. Concentração de clorofila *a in vivo*

A concentração de clorofila *a in vivo* foi obtida diariamente de amostras (4 mL) de cultivos de cada biorreator, utilizando um fluorímetro (Turner Designs; Trilogy, San Jose, Califórnia, EUA). Para isso, foi utilizada uma curva de calibração padrão traçada com as unidades de fluorescência relativa do fluorímetro (RFU) *versus* concentração de clorofila *a* extraídas de *Chlorella vulgaris* em crescimento exponencial (Shoaf e Lium, 1976). A curva foi ajustada por meio de regressão linear e utilizada para calcular a concentração de clorofila *a* através da equação (1).

$$\text{Clorofila } a \text{ mg L}^{-1} = \frac{\text{Florecencia RFU} + 8.07}{11369} \quad (1)$$

#### 3.3.3. Taxa de crescimento

As taxas de crescimento específico foram obtidas através da regressão linear do logaritmo natural utilizando-se os valores de cel mL<sup>-1</sup>, que foram plotados (Ln células mL<sup>-1</sup>) em função do tempo experimental (dias). Durante a fase de crescimento exponencial, foi obtida a reta e o coeficiente angular do ajuste corresponde à taxa de crescimento específico.

### 3.3.4. Absorbância

Diariamente, no mesmo horário, alíquotas de 5 mL de cada cultivo foram transferidas para placas de 6 poços e foi feita a leitura em leitor de placa (Epoch) na densidade óptica (OD) de 684 nm. A absorbância da média dos tratamentos foi reportada em escala logarítmica em função do período experimental (dias).

### 3.3.5. Biomassa seca

A biomassa seca foi determinada nos dias 2, 3, 5, 6, 7 e 8 do experimento. Para isso, amostras de 100 mL de cada reator foram obtidas e centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi removido e as amostras restantes foram liofilizadas e tiveram a massa aferida em balança analítica com precisão de  $10^{-6}$  g (Mettler-Toledo, Suíça).



**Figura 3.** Biomassa seca (liofilizada) de uma amostra de 100 mL coletada para monitoramento de biomassa e posterior análise de pigmentos e biomoléculas.

### 3.3.6. Análise de concentração de fosfato

A concentração de fosfato inorgânico presente no meio de cultivo foi monitorada diariamente de acordo com o método de Strickland & Parsons (1960). Para as análises, amostras de 50 mL foram coletadas de cada reator e filtradas em membranas de 0,2  $\mu$ m, a fim de remover as células. As medições foram realizadas sempre no mesmo horário e previamente à adição de meio de cultivo nos dias 3, 5 e 7 do período experimental. A curva de calibração foi elaborada utilizando fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), e as concentrações foram determinadas por espectrofotometria a 882 nm.

### 3.4. Análise de biomoléculas

As determinações de pigmentos (clorofila *a*; clorofila *b* e carotenoides totais) e de biomoléculas (carboidratos, proteínas e lipídios totais) foram feitas a partir da biomassa seca por liofilização. Essas determinações foram feitas nos dias 3 (crescimento exponencial) e 8 (fase estacionária, último dia do experimento). No ponto amostral do dia 3, as culturas serviram como referência pré-tratamento, pois ainda não haviam recebido cobre extra. As alterações significativas detectadas no dia 8 são, portanto, consistentes com o efeito do cobre após a exposição do cultivo à concentração adicional e a um possível efeito sinérgico que pode ter se dado devido à redução de nutrientes na fase estacionária.

#### 3.4.1. Pigmentos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides totais foram determinados de acordo com o método de Wellburn (1994), método espectrofotométrico que tem como base a extração dos pigmentos no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO). Os pigmentos foram extraídos de amostras de 1 mg de biomassa seca, coletadas nos dias 3 e 8 do experimento, utilizando 3 mL de DMSO como solvente. A extração foi realizada no escuro por um período de 15 minutos. Em seguida, a absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro NANOCOLOR UV/Vis (Macherey-Nagel, EUA) nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm, correspondentes aos picos de absorção característicos dos pigmentos. A concentração dada em mg L<sup>-1</sup> de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais no extrato, foi calculada com base nas equações 2, 3 e 4 apresentadas a seguir e posteriormente convertidas em mg g<sup>-1</sup> de biomassa seca.

$$\text{Clorofila a} = (12,67 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649}) \quad (2)$$

$$\text{Clorofila b} = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665}) \quad (3)$$

$$\text{Carotenóides} = \frac{(1000 \times A_{480}) - (1,29 \times C_a) - (53,78 \times C_b)}{220} \quad (4)$$

### 3.4.3. Carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais foi feita de acordo com metodologia descrita em DuBois et al. (1956), método espectrofotométrico baseado na reação do ácido sulfúrico com a biomassa algal. Para essa determinação foram usados 1mg de biomassa seca dos dias 3 e 8 dos cultivos. Após a reação, foi mensurada em espectrofotômetro NANOCOLOR UV/Vis (Macherey-Nagel, EUA) no comprimento de onda de 485 nm.

### 3.4.4. Lipídios

Amostras de 5,0 mg de biomassa seca de dos dias 3 e 8 de cada reator foram adicionadas a cadinhos previamente calcinados a 400 °C por 8 horas, pesados em balança micro analítica com 1 µg de precisão (Mettler Toledo XPE26). Essas amostras foram quantificadas por gravimetria de acordo com o método de extração e quantificação de lipídios de Parrish (1999). As amostras nos cadinhos foram secas e conservadas em dessecador sob vácuo até estabilização da massa, pelo período de 48 h. A quantificação dos lipídios totais foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{Lipídios} = \frac{2000 \times \text{Massa amostra (mg)}}{400 \times \text{Massa pesada (mg)}} \times 100 \quad (5)$$

### 3.4.5. Teor de cinzas

O teor de cinzas da biomassa liofilizada foi determinado por gravimetria. Aproximadamente 3 g de biomassa liofilizada de cada tratamento (n=2) foram transferidos para cadinhos de alumínio previamente tarados. As amostras foram calcinadas em mufla a 450 °C por um período de 5 horas. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos contendo as cinzas foram novamente pesados. O teor de cinzas foi calculado a partir da diferença de massa, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{\text{massa de cinza}}{\text{massa da amostra seca}} \times 100 \quad (6)$$

### 3.4.6. Proteínas totais

Os resultados são expressos em percentual da biomassa seca a partir da seguinte equação: O teor de proteínas foi estimado subtraindo-se, da massa total da amostra (100%), as frações de lipídios, carboidratos e cinzas previamente determinadas por métodos analíticos específicos. Essa abordagem foi necessária porque a análise direta de proteínas na biomassa se mostrou inviável, uma vez que o método utilizado apresentou valores inconsistentes e significativamente abaixo dos níveis mínimos esperados para uma biomassa microalgal viável. Possivelmente as células algais não foram eficientemente rompidas. Os dados são expressos em percentual da biomassa seca com base na seguinte equação:

$$\text{Proteínas (\%dw)} = 100 - (\%Lipídios + \%Carboidratos + \%Cinzas) \% \quad (5)$$

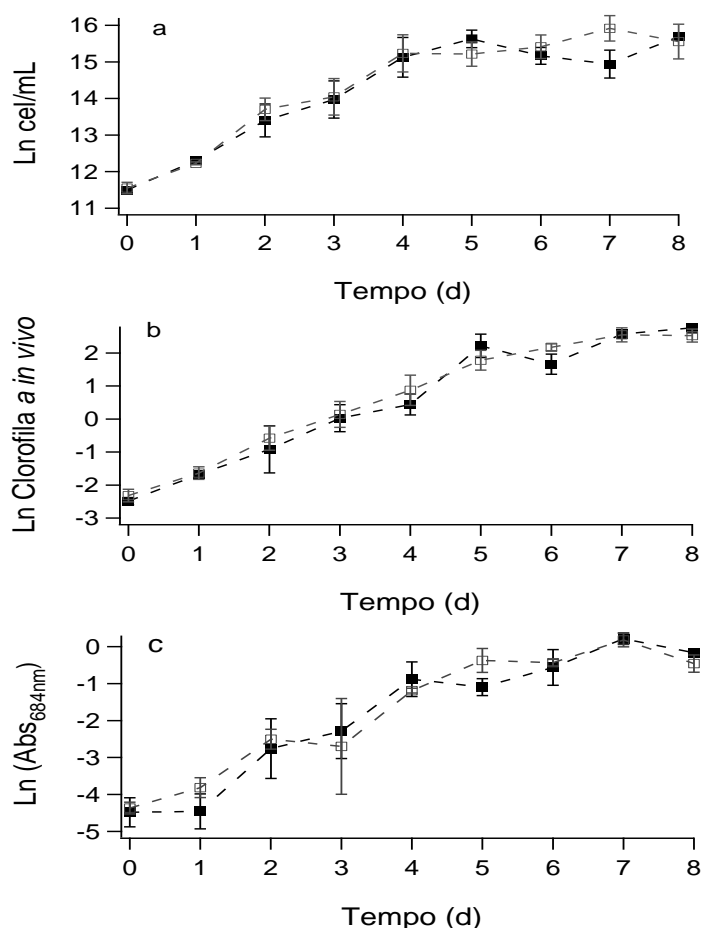
### 3.5. Análise estatística

Os resultados de crescimento (taxa de crescimento e biomassa seca) e dos parâmetros bioquímicos (clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides totais, lipídios, proteínas e carboidratos) foram comparados estatisticamente entre tratamento e controle nos mesmos dias experimentais, utilizando o Teste *t* de Student com o auxílio do programa Minitab 17 (v17.1.0). Antes da aplicação do teste, foi realizada a análise de homogeneidade de variâncias, mostrando que os dados apresentaram comportamento paramétrico ( $p > 0,05$ ), atendendo aos pressupostos do teste *t*. Em relação aos dados de crescimento, a taxa de crescimento foi comparada entre tratamento e controle, enquanto a biomassa seca foi analisada entre os grupos no mesmo dia de coleta. Para os parâmetros bioquímicos, cada biomolécula foi comparada exclusivamente entre tratamento e controle. Não foram realizadas comparações entre diferentes biomoléculas e em diferentes tempos experimentais. Os gráficos foram elaborados no software IgorPro (Wavemetrics, USA).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Parâmetros de crescimento

A Figura 4 apresenta as curvas de crescimento da microalga *Chlorobion braunii* para o controle e cobre livre  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> durante os 8 dias de experimento, com base nos parâmetros densidade celular (Ln cel mL<sup>-1</sup>) (Figura 4a), concentração de clorofila *a in vivo* (Ln RFU) (Figura 4b) e absorvância em 750 nm (Ln Abs 750 nm), relacionada à biomassa total (Figura 4c). Os resultados obtidos fornecem informações sobre a cinética de crescimento desta microalga em 200 L e sua resposta à presença de cobre.



**Figura 4.** (a) Ln da concentração de células reportada como densidade celular de *Chlorobion braunii* (células mL<sup>-1</sup>) em função do tempo experimental; (b) Medidas de clorofila *a in vivo* (A.U) em função do tempo experimental; (c) Valores de absorvância em 684 nm de cada tratamento em função do tempo experimental. Os pontos mostram os valores médios e as barras de erro indicam o desvio padrão (n=3). Tratamentos: quadrado aberto, controle; quadrado fechado,  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre.

Nas três variáveis analisadas, observa-se uma tendência de crescimento em função do tempo experimental, com maior acúmulo entre os dias 3 e 5, indicando a fase exponencial do cultivo. A partir do dia 6, parâmetros apresentam estabilização, sugerindo o início da fase estacionária. A similaridade das curvas de crescimento confirma que, na concentração de cobre testada, não houve inibição do crescimento populacional. Resultados semelhantes foram relatados em Silva et al. (2018), os quais observaram que concentrações de cobre de  $3,2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e  $5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> não provocaram alterações significativas na curva de crescimento de *Chlorobion braunii*, quando comparadas ao controle ( $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre) em cultivos realizados com meio BG11. Em estudos realizados por Echeveste et al. (2017), a adição de cobre na concentração de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> levou a um aumento de 5,3% na densidade celular, enquanto a concentração de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> resultou em um aumento de 14,1%. No entanto, quando o cobre foi introduzido em concentrações de  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> ou superiores, observou-se uma queda na densidade celular indicando que, acima de certos limites, o cobre pode exceder a capacidade adaptativa das células e comprometer seu crescimento. Entretanto, é válido ressaltar que resultados na literatura apontam que os limites de tolerância ao cobre é depende da espécie assim como de sua condição fisiológica (Lombardi e Maldonado 2011; Cavalletti et al., 2022).

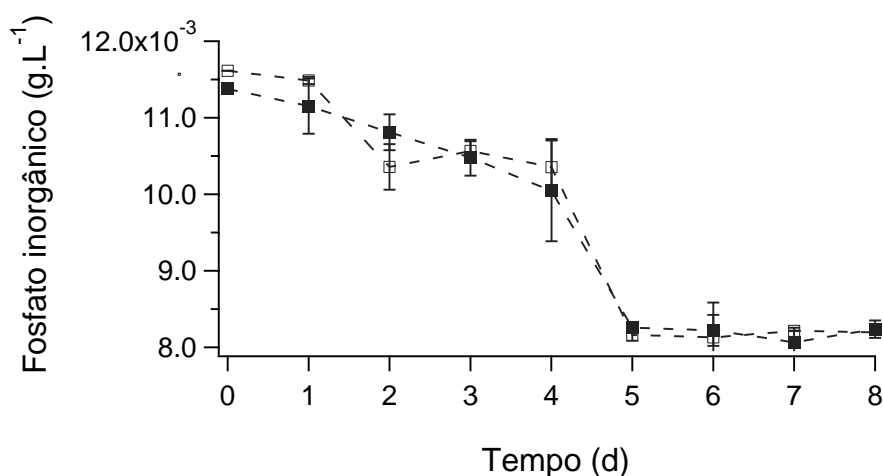
Nossos resultados indicam que a capacidade fotossintética do organismo permaneceu preservada mesmo sob exposição ao metal, uma vez que todas as variáveis de crescimento determinadas estiveram similares nos controles e tratamentos. Isso pode ser visto nas Figuras 4b e 4c. Na figura 4b são apresentados os resultados de clorofila *a* *in vivo*, que são coerentes com os achados de Baracho et al. (2018). Esses autores observaram a manutenção dos níveis de clorofila *a* em cultivos de *C. braunii* submetidas a concentrações de cobre de até  $1,1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> em 48h de cultivo, por outro lado, a partir da concentração de  $1,5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> os autores relataram um declínio nos parâmetros de crescimento. Em contraste com esses achados, Kondzior e Butarewicz (2018), em um estudo com *Chlorella vulgaris*, demonstraram que, embora a espécie apresente certa tolerância ao metal mesmo em concentrações mais elevadas que as analisadas no presente estudo, análises referentes à concentração de clorofila *a* mostrou redução de aproximadamente 39% em relação ao controle quando cultivada em meio BG-11 em concentração de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre após 7 dias de cultivo.

A Figura 4c mostra os resultados de absorvância da clorofila *a* em 684 nm, que seguiram o padrão esperado para o crescimento da microalga, reforçando as tendências observadas para a concentração celular (Figura 4a) e clorofila *a in vivo* (Figura 4b). Esses resultados confirmam que a concentração de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre não apresentou impacto significativo no crescimento e nem na produção de clorofila *a* de *C. braunii*. As pequenas variações observadas estão dentro da faixa de erro e não apontam para uma inibição pelo cobre nessa concentração de acordo com a análise estatística ( $p > 0,05$ ).

Em conjunto, os resultados do crescimento sugerem que *C. braunii* apresenta bom desempenho em condições experimentais exposta ao cobre livre em concentração de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, sem efeitos inibitórios durante os 8 dias de cultivo. A fase exponencial, claramente demarcada entre os dias 3 e 5 reforça este intervalo como ideal para avaliação de produtividade e colheita em estudos futuros.

#### 4.2. Concentrações de fosfato inorgânico

A dinâmica de consumo de fosfato inorgânico nos cultivos de *Chlorolobion braunii* é apresentada na Figura 5. A figura mostra a variação da concentração de fosfato inorgânico ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) usado pelas células e, apesar da adição de 50 L de meio de cultivo 2x concentrado nos dias 3, 5 e 7, não se observa aumento da concentração desse nutriente. Com valores iniciais de fosfato próximos de  $0,0115 \text{ g L}^{-1}$ , o nutriente foi assimilado no dia 5, chegando a concentrações próximas de  $0,008 \text{ g L}^{-1}$ .



**Figura 5.** Concentração de fosfato inorgânico dissolvido ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no meio de cultivo em culturas de *Chlorolobion braunii* de 200 L cada tratamento em função do tempo experimental (dias). Os

pontos mostram os valores médios e as barras de erro indicam o desvio padrão (n=3). Tratamentos: Quadrado fechado,  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre livre; quadrado aberto, controle.

A Figura 5 revelou que o fosfato inorgânico foi consumido gradualmente até o dia 4 com uma redução de 15%. Isso foi seguido por uma intensa redução entre os dias 4 e 5, após a qual, a quantidade de fosfato no meio foi reduzida em aproximadamente 30% em relação ao valor inicial. Chamamos a atenção para o fato do dia 5, concentração mais baixa do fosfato no meio coincidiu com o início da fase estacionária do cultivo. Resultados similares foram obtidos por Faria (2023), em cultivos de *Chlorolobion lunulatum* em 200 L, nos quais a concentração de fosfato foi reduzida em 10x e a cultura adentrou à fase estacionária de crescimento.

Apesar das adições realizadas de meio de cultivo nos dias 3, 5 e 7 (sistema batelada alimentado), que continham reposições de fosfato, não foi observada a esperada recuperação nas concentrações de fosfato dissolvido. Esse padrão sugere que o fósforo adicionado foi rapidamente assimilado pelas células, possivelmente sendo um fator limitante para o crescimento do cultivo. Entretanto, segundo Roopnarain et al. (2014), a concentração ótima de fósforo para microalgas pode variar de 0,001 a 0,179 g L<sup>-1</sup>. Contudo, para *C. braunii*, a concentração de 0,008 g L<sup>-1</sup> de fosfato pode ser considerado um fator limitante para o crescimento, uma vez que essa concentração marcou o início da fase estacionária.

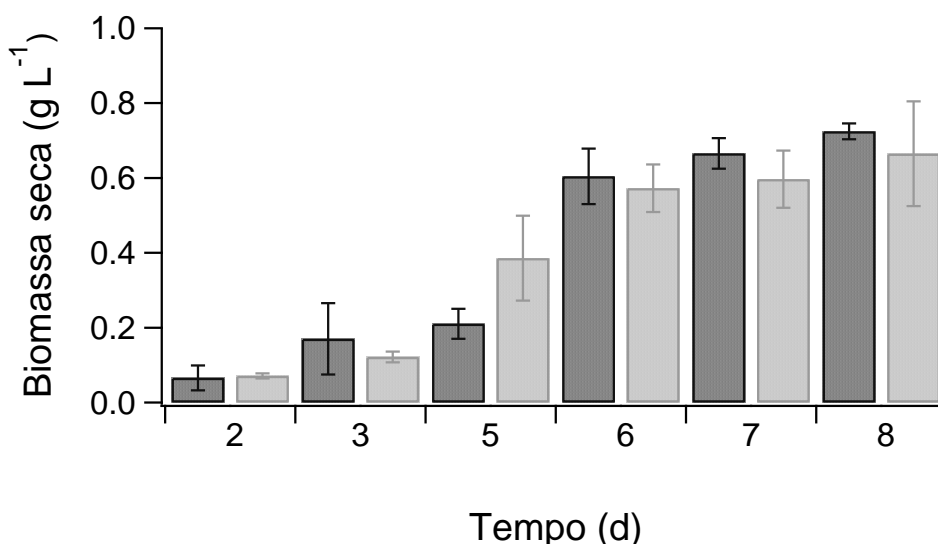
Segundo Maltsev et al. (2023), a limitação de determinados nutrientes, como o fósforo e nitrogênio, em cultivos de microalgas pode estimular a produção de biomoléculas na cultura. Corroborando essa observação, resultados obtidos por Satpati et al. (2016) indicam um aumento de 3 vezes na concentração de lipídios em cultivos de *Chlorella ellipsoidea* submetidos à deficiência de fósforo. De forma similar, resultados obtidos por Shi et al. (2020) apontam que *Nannochloropsis oceanica* apresentou um aumento de até 4,4 vezes no teor total de lipídios quando cultivada sob condições de privação de fósforo, em comparação com as condições controle.

A ausência de recuperação nas concentrações após as adições de meio pode refletir uma alta taxa de absorção associada ao aumento da biomassa e de biomoléculas no sistema do microrganismo, especialmente durante a fase exponencial (Solovchenko et al., 2019).

Além disso, a comparação entre os tratamentos com e sem cobre não evidenciou diferenças expressivas no padrão de consumo de fosfato, sugerindo que, na concentração testada ( $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>), o cobre livre não interferiu significativamente na dinâmica de assimilação de fósforo por *Chlorolobion braunii*.

### 4.3. Biomassa seca

A Figura 6 apresenta os resultados de biomassa seca (g L<sup>-1</sup>) de *Chlorolobion braunii* obtida em diferentes dias de cultivo (2, 3, 5, 6, 7, e 8). Os resultados mostram um aumento progressivo na biomassa seca tanto para os controles como para os tratamentos ao longo do tempo (dias), indicando o crescimento populacional da microalga.



**Figura 6.** Biomassa seca de *Chlorolobion braunii* obtida nos dias 2, 3, 5, 6, 7 e 8 para os tratamentos. As barras escuras representam tratamentos com adição de cobre; barras cinzas os controles. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

Nos primeiros dias do experimento (dias 2 e 3), a biomassa seca foi menor em comparação com os dias posteriores. No dia 2, a biomassa nos tratamentos com cobre (0,06 g L<sup>-1</sup>) e nos controles (0,07 g L<sup>-1</sup>) não apresentaram diferença significativa. Conforme aumentou a densidade celular do cultivo, os valores de biomassa seca também aumentaram. Nos dias subsequentes, a biomassa continuou a aumentar tanto no tratamento como no controle, refletindo a fase exponencial de crescimento. A partir do dia 6, além da alimentação dos cultivos com nutrientes (batelada alimentada), iniciou-se

a adição diária de 0,2 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio em todos os tratamentos, induzindo metabolismo mixotrófico. Isso resultou em aumento da biomassa seca, que passou de valores próximos de 0,35 para 0,6 g L<sup>-1</sup> ao longo dos dias seguintes, cerca de 1,7 vezes a quantidade do dia anterior (dia 5). O valor médio, de máxima biomassa seca foi obtido no último dia de cultivo, sendo 0,72 g L<sup>-1</sup> em tratamentos com a adição de cobre e 0,65 g L<sup>-1</sup> nos controles, sem diferença significativa (p>0,05).

A mixotrofia, mesmo após o período de crescimento exponencial fotossintético da cultura (dia 5), resultou em um aumento notável da biomassa, cerca de 1,7 vezes no dia 6 (fase estacionária). Semelhante aos nossos resultados, Faria (2023) relatou um aumento significativo no rendimento de biomassa seca de *Chlorolobion lunulatum*, com valores de 2 g L<sup>-1</sup> para a condição controle e 2,7 g L<sup>-1</sup> nos tratamentos que incluíram acetato de sódio acima de 10 mg L<sup>-1</sup>, representando, em seu estudo, um incremento de aproximadamente 1,3 vezes em relação ao controle. De forma semelhante, Wen et al. (2019) mostraram a viabilidade da adição diária de 180 mg L<sup>-1</sup> de acetato de sódio ao cultivo da microalga *Graesiela sp.* em escala laboratorial durante 8 dias, resultando em um aumento de biomassa de 15% a 29%. Chavoshi e Shariati (2019) investigaram *Dunaliella salina* sob condições mixotróficas, utilizando concentrações de acetato de sódio entre 4 g L<sup>-1</sup> e 16,4 g L<sup>-1</sup>, e observaram que a densidade celular foi aproximadamente 2x maior na concentração de 8 g L<sup>-1</sup> em comparação ao cultivo autotrófico.

Em relação ao efeito do cobre, a biomassa seca dos tratamentos com adição extra desse metal manteve-se estatisticamente similar ao controle (p>0.05), mantendo-se próximos a 0,8 g L<sup>-1</sup> nos últimos dias de experimento. Diferentemente destes resultados, pesquisas recentes de Bolli (2023) e Baracho et al. (2018) não identificaram diferenças significativas no conteúdo de biomassa em cultivos de *Chlorolobion braunii* em escala laboratorial quando comparando os tratamentos controle e aqueles expostos a concentrações de 1,1x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> de cobre livre durante 96 h e 48 h de cultivo, respectivamente. No entanto, o estudo de Echeveste et al. (2017) registrou um aumento significativo no volume celular de *Chlorolobion braunii* em concentrações de cobre cerca de 5000 vezes maiores do que as usadas no presente estudo. Os autores registraram um aumento de 2,44 vezes no volume celular, passando de um valor médio de 115,6 μm<sup>3</sup> no controle para 282,7 μm<sup>3</sup> no tratamento com o metal. Machado e Soares (2014),

estudando a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, utilizaram análise de imagens microscópicas para identificar alterações no volume celular causadas pela exposição a metais. Seus resultados evidenciaram que, mesmo em concentrações consideradas subinibitórias, a presença de metais é capaz de provocar mudanças no volume das células algais.

Os resultados obtidos nesse estudo apontam que a adição de cobre nas concentrações utilizadas, não exerceu um efeito inibitório significativo no crescimento de *Chlorolobium braunii* quando a cultura foi cultivada sob condições mixotróficas e com adição de meio em batelada. Essa estratégia, revelou-se um método válido para sustentar o acúmulo de biomassa do cultivo, resultando em uma produtividade de 0,6 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca já a partir do 6º dia. Considerando que adicionar acetato de sódio e manter a mixotrofia tem um custo adicional ao processo produtivo, e que a produtividade nos dias 7 e 8 apresentaram concentrações semelhantes à do dia 6, a data de coleta em um sistema produtivo deve ser considerada com cautela. Concluímos que acetato de sódio pode ser uma estratégia intensificadora da produção de biomassa em cultivos de *Chlorolobium braunii* em larga escala.

#### **4.4. Irradiância e temperatura**

Considerando as condições ambientais no cultivo de microalgas em escala ampliada, os dois principais fatores que também podem controlar a produtividade são a intensidade luminosa e a temperatura (Richmond, 1992; (Rodríguez-Miranda et al., 2021). A oscilação desses fatores afeta processos importantes do crescimento algal (Ras et al., 2013). Nas tabelas 1 e 2 são apresentadas as temperaturas (Tabela 1) e intensidades luminosas (Tabela 2) dentro dos reatores e na estufa durante o período experimental. A variação da temperatura nos cultivos acompanhou a variação na estufa, enquanto a luminosidade teve o contribuinte da densidade de células nas culturas.

A amplitude térmica dentro dos cultivos variou ao longo do período experimental, com temperaturas mínimas de 25,5 °C e máximas de 34,6 °C. A escala do cultivo apresentou um impacto significativo nas variações de temperatura, entretanto, a escala de cultivo de 200 L não chega a ter resiliência suficiente para manter a temperatura em uma faixa ideal para o cultivo, sendo et faixa de 20 a 25°C (Ras et al., 2013). Cultivos

em escalas maiores mostram maior resiliência às flutuações térmicas, especialmente em sistemas abertos (De-Luca et al., 2017; Béchet 2013).

**Tabela 1.** Temperatura (°C) da estufa (E) e do cultivo (C) em diferentes horários por 8 dias.

Dia	9h		11h		13h		15h		17h	
	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C
1	28.5	25.7	32.0	27.3	36.0	30.1	33.0	32.7	32.0	29.2
2	31.0	26.9	37.0	29.6	39.0	31.1	29.0	29.0	28.0	27.2
3	39.0	30.1	37.0	31.5	43.0	33.2	35.0	31.2	28.0	27.5
4	27.0	25.5	35.0	30.9	36.0	33.9	31.0	28.9	30.0	29.7
5	30.0	28.8	34.6	34.6	32.8	32.9	31.5	28.4	30.0	29.8
6	29.0	27.3	35.0	31.5	33.2	33.2	34.0	32.5	33.0	29.9
7	29.0	27.8	35.0	30.5	36.0	32.8	33.0	31.7	29.7	29.7
8	35.0	29.5	37.0	32.1	36.6	30.8	30.3	30.2	29.3	28.3

A luminosidade dentro dos cultivos variou ao longo do dia e entre os dias, devido não somente à variação da incidência da luz natural ao longo do período diurno, mas também em decorrência da densidade de células, que aumentou com o tempo. O aumento da densidade de células ou acúmulo de biomassa se dá por ser um sistema batelada, no qual os nutrientes são consumidos e biomassa gerada é acumulada. Em cultivos densos é comum ocorrer o autossombreamento das células, o que pode gerar uma exposição desigual à luz (Abuisi et al., 2020; Vera-Vives, 2024). A coluna de cultivo de 6 centímetros pode ter contribuído para o auto sombreamento decorrente da maior densidade nos últimos dias do período experimental, reduzindo a luminosidade incidente no cultivo de forma homogênea. Culturas mais rasas, com colunas pequenas, de poucos centímetros, podem reduzir tal efeito (Jerez et al. 2016; Saccardo et al, 2022).

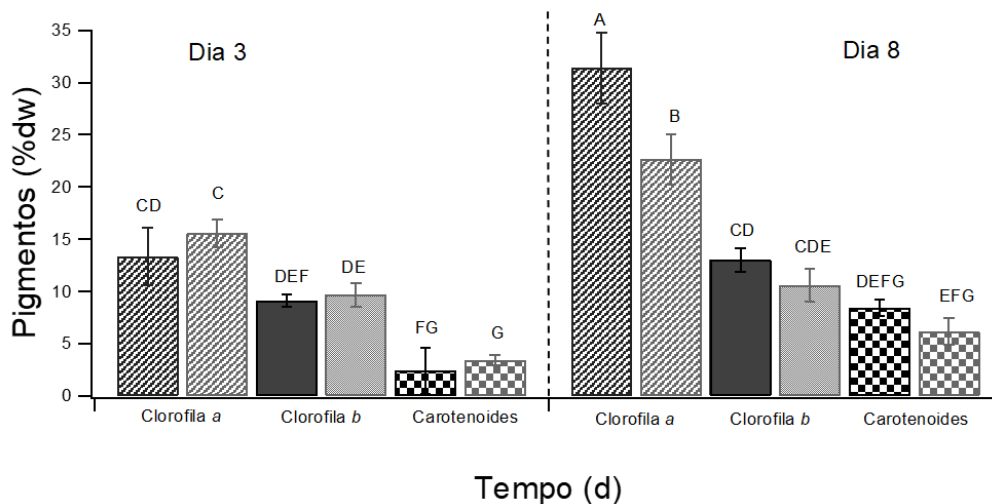
**Tabela 2.** Irradiância ( $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) da estufa (E) e do cultivo (C) em diferentes horários por 8 dias.

Dia	9h		11h		13h		15h		17h	
	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C
1	923	380	1768	387	2784	588	1912	164	1912	105
2	2903	360	3640	613	3608	182	2422	85	1663	72
3	2922	618	4734	557	3220	183	2031	79	488	68
4	864	49	1825	243	2132	441	1997	318	2125	189
5	3163	217	3507	396	4070	485	787	84	740	96
6	3250	209	2706	212	1517	274	669	312	716	188
7	3643	96	4837	136	4042	129	1603	107	1402	10
8	4790	100	3480	115	588	33	3241	52	1551	12

#### 4.5. Parâmetros bioquímicos

##### 4.5.1. Pigmentos

A Figura 7 apresenta a concentração dos pigmentos clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides totais em *C. braunii*, expressos em porcentagem da massa seca (%dw), nos dias 3 e 8 de cultivo, em tratamentos controle e com adição de  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Os dados indicam que a exposição ao cobre promoveu a concentração de clorofila *a* no último dia do experimento.



**Figura 7.** Concentração de pigmentos em *Chlorolobion braunii* (%dw) nos dias 3 e 8 do período experimental: barras listradas representam clorofila *a*; barras lisas, Chl *b*; barras xadrez, carotenoides totais. Barras escuras representam o tratamento com adição de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>+2</sup>, enquanto barras cinza representam os tratamentos controle. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Letras iguais sobrescritas indicam ausência de diferença significativa (p> 0,05).

Diferentemente do presente estudo, Echeveste et al. (2017) não observaram aumento do conteúdo de clorofila *a* em *Chlorolobion braunii* após exposição a concentrações de cobre livre próximas às utilizadas no presente estudo. Entretanto, os autores observaram aumento significativo do pigmento em concentrações 5000x maiores do que a usada no presente estudo, em detrimento do crescimento celular. Segundo os autores Wan et al. (2018) e Silva et al. (2018) a presença do metal em níveis ambientais, como o usado neste estudo, pode atuar como um fator de estímulo para o acúmulo do pigmento, principalmente se acompanhado da manutenção da taxa de crescimento.

Clorofila *b* e carotenoides totais não sofreram alteração mediante a adição do cobre. Resultados semelhantes referentes a clorofila *b* também foram observados por Zhou et al. (2012), e em estudo com *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus*, respectivamente, quando cultivadas em concentrações tóxicas de cobre ( $1,5 \times 10^{-5}$  L<sup>-1</sup>). No entanto, os mesmos autores observaram um estímulo no acúmulo de clorofilas *a* e *b* em *Chlorella pyrenoidosa* quando cultivada na presença de 0,2 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ( $3,1 \times 10^{-6}$  e  $7,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente) e em *Scenedesmus obliquus* cultivadas em  $7,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre. De maneira semelhante, Čypaitė et al. (2014) observaram que a concentração de clorofila *b* em células de *Pseudokirchneriella subcapitata* foi 4% superior ao controle na concentração de  $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Além disso, Li et al. (2021)

também observaram que, em culturas de *Chlorella vulgaris* expostas à mesma concentração de sulfonamidas, a presença de  $3,1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre não provocou alterações significativas no teor de clorofila *b*, enquanto a concentração de  $7,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> resultou em uma redução estatisticamente significativa. Essas concentrações são pelo menos 100x maiores do que a usada no presente estudo.

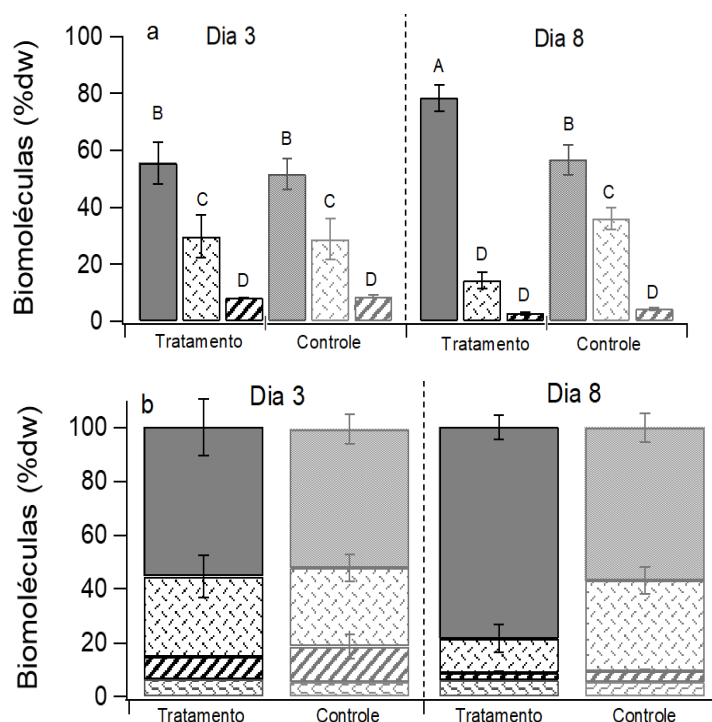
Quanto aos carotenoides totais, a ausência de diferença significativa entre o tratamento com cobre e o controle nos mostra que a concentração de cobre foi insuficiente para causar danos maiores nas células, como era esperado, uma vez que a taxa de crescimento se manteve (Lombardi e Maldonado 2011). Esse padrão pode indicar que não houve a ativação de rotas antioxidantes, já que carotenoides são conhecidos por atuar na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS), que se acumulam sob estresse ambiental (Shi et al., 2020). Hindarti e Larasati (2019), e Filová et al. (2020) observaram aumento nos níveis de carotenoides em cultivos de *Nitzschia sp* expostas a  $5 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e de *Raphidocelis subcapitata* expostas a  $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre, respectivamente. Concentrações 50 e 150x maiores do que a usada no presente estudo.

No geral, os resultados da composição de pigmentos indicaram que a exposição a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> não causou estresse oxidativo nas células. Esses resultados sustentam a ideia de que concentrações ambientais de cobre podem ser exploradas como ferramenta para estimular as células, sem necessariamente causar estresse, desde que mantidas dentro de limites fisiologicamente toleráveis (Aoyagi et al., 2023a; Aoyagi et al., 2023b).

#### 4.5.2. Rendimento de biomoléculas

A Figura 5 apresenta a composição percentual das principais biomoléculas (lipídios, proteínas e carboidratos) acumuladas na biomassa seca de *Chlorolobion braunii* (Fig. 8a), para o tratamento com cobre e para o controle, além do percentual de cinzas (Fig. 8b). No período do experimento em que o cultivo passou pela fase de crescimento exponencial (dia 3) foram observados valores variados entre as diferentes biomoléculas, ficando em torno de 55% da biomassa seca a concentração de lipídios, proteínas 30% e carboidratos se mantiveram em torno de 8%, enquanto as cinzas em 6%. Entretanto, em comparação entre os dois tratamentos, não foram observadas diferenças significativas

para cada biomolécula. Essa microalga pode ser considerada uma espécie oleaginosa, assim como *Botryococcus braunii* (Al Rayaan e Al Rayaan, 2021).



**Figura 8.** Composição de biomoléculas (% de biomassa seca) em culturas de *Chlorolobion braunii* sob tratamento com  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre (barras escuras) e controle (barras claras), aos dias 3 e 8. Lipídios (barras lisas), proteínas (pontilhadas), carboidratos (listradas) e cinzas (onduladas), barras de erro indicam o desvio padrão da média (n=3). **(a)** Valores médios das biomoléculas; letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ). **(b)** Representação empilhada das frações, evidenciando sua contribuição relativa à biomassa total.

Entretanto, no oitavo dia de cultivo (fase estacionária), a composição bioquímica mostrou respostas distintas no tratamento com cobre. O teor de lipídios aumentou significativamente em relação ao controle, cerca de 23% do conteúdo de biomassa seca enquanto o conteúdo proteico diminuiu 20%. Os carboidratos mantiveram-se estáveis, sem variação estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Esses resultados mostram um efeito de estímulo seletivo do cobre na biossíntese de lipídios em *Chlorolobion braunii*, com um aumento significativo dessa biomolécula em tratamentos com adição de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup>.

Considera-se que na presença de um fator de estímulo, como o cobre, o acúmulo de lipídios pode ser decorrente da ativação de mecanismos de defesa contra possível estresse oxidativo induzido pelos íons metálicos, mas depende da concentração do metal (Jin et

al., 2024; Dauda, 2022). Segundo (Sivaramakrishnan e Incharoensakdi, 2022) a síntese de lipídios pode consumir o excesso de elétrons na célula, reduzindo o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e protegendo a célula.

É importante notar que, embora o cobre possa estimular o acúmulo de lipídios como uma resposta fisiológica, a concentração de cobre é um fator crítico. Concentrações pouco acima das requeridas pelo organismo podem afetar sua capacidade fotossintética, exercendo um efeito inibitório no crescimento (Lombardi e Maldonado 2011; Jin et al., 2024; Dextro et al. 2025). Aguilar-Ruiz et al. (2020) observaram um rendimento de lipídios em *Nannochloropsis oculata* de até 2x maior em relação ao controle utilizando a concentração de cobre de 1,74 mg L<sup>-1</sup> (2,7x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>), entretanto a taxa de crescimento diminuiu em 16% e seguiu um padrão de redução à medida que a concentração de cobre aumentou. Em *Spirulina platensis*, El-din (2017) relatou forte inibição no conteúdo de clorofila e de proteínas em concentrações de cobre da ordem de 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, confirmando o efeito tóxico desse metal em níveis mais altos. De Abreu et al. (2014) relataram que, em *Chlorella vulgaris* exposta a 1,6x10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup>, houve redução do teor proteico e da biomassa, novamente evidenciando a toxicidade do metal. De forma similar, Jin et al. (2024) também observaram que, embora o conteúdo lipídico de *Tetrademus obliquus* tenha aumentado com o aumento da concentração de Cu<sup>2+</sup>, o crescimento populacional no cultivo foi menor em 0,8 mg L<sup>-1</sup> (1,2x10<sup>-5</sup> molL<sup>-1</sup>) Cu<sup>2+</sup> do que em 0.5 mg L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> (7,8x10<sup>-6</sup> molL<sup>-1</sup>). Aumentar a concentração de lipídios em detrimento da taxa de crescimento não é o objetivo desta pesquisa, mas sim aumentar lipídios mantendo-se a taxa de crescimento, de modo a gerar biomassa modificada.

O aumento nos lipídios observado neste estudo concorda com os resultados de Baracho et al. (2019), que relataram aumento significativo na produção de lipídios *Chlorolobion braunii* quando exposta a 2,5x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup>. Importante destacar que, nesse mesmo estudo, os autores mostraram que os teores de proteínas e carboidratos totais permaneceram estáveis, reforçando a seletividade da resposta metabólica induzida pelo metal. Por outro lado, nesse mesmo estudo, concentrações mais elevadas do cobre (5x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) resultaram em aumento de até 8x no conteúdo lipídico, entretanto, essa concentração de cobre elevada se mostrou prejudicial para o crescimento da microalga. Exposta a 5x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, *Chlorolobion braunii* apresentou taxa de crescimento 93% menor em relação ao controle em BG11 (Baracho et al., 2019). Elleuch et al. (2024) observaram que, em culturas de *Dunaliella sp.* suplementadas com cobre em

concentração de  $3,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, não houve alteração significativa no teor de carboidratos em comparação ao controle, tampouco diferença no conteúdo de proteínas, mas a taxa de crescimento foi estimulada ao longo do experimento.

A redução no conteúdo proteico de *C. braunii* observada neste estudo (dia 8) pode representar um redirecionamento metabólico como forma de adaptação ao cobre introduzido, e não necessariamente um indicativo de dano celular. A ausência de redução significativa no crescimento do cultivo e da biomassa total do tratamento em comparação ao controle reforça essa interpretação, sugerindo uma regulação metabólica específica com priorização da via lipídica.

Além das condições de cultivo, a seleção da espécie é um fator determinante para o perfil de resposta bioquímica frente à manipulação de fatores ambientais relacionados ao cultivo. Segundo Singh et al. (2015), diferentes espécies podem apresentar comportamentos fisiológicos e metabólicos distintos em relação aos mesmos estímulos. Por exemplo, Silva et al. (2018) observaram em *Scenedesmus quadricauda* que concentrações de cobre da ordem de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> aumentaram significativamente o conteúdo de proteínas e carboidratos totais, mas não os lipídios, sugerindo respostas fisiológicas específicas que podem variar conforme a espécie e a concentração do metal. Adicionalmente, Ghribi et al. (2025) relataram que culturas de *Chlamydomonas sp.* expostas a concentração de 57,61 mg L<sup>-1</sup> ou  $9 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cobre apresentaram aumento significativo tanto no conteúdo de lipídios quanto de carboidratos. No entanto, esse aumento foi acompanhado por uma diminuição no teor de proteínas e no crescimento populacional.

Os resultados do presente estudo não apenas reforçam o potencial do cobre em concentrações ambientalmente relevantes, como agente modulador da produção de biomoléculas (lipídios) em *Chlorolobion braunii*, mas também evidenciam a viabilidade de sua aplicação em sistemas biotecnológicos de cultivo. A capacidade de promover o acúmulo de lipídios sem comprometer significativamente a biomassa indica que o uso controlado de Cu<sup>2+</sup> pode ser uma estratégia eficaz para otimizar o rendimento de compostos de interesse industrial. Assim, este trabalho contribui com novas perspectivas para o desenvolvimento de processos sustentáveis e economicamente viáveis na produção de microalgas.

## 5. Estudo de produção de óleo

A crescente demanda global por fontes sustentáveis de energia e matérias-primas renováveis tem impulsionado o desenvolvimento de alternativas à base de biomassa para a produção de óleos vegetais e biocombustíveis (Hoang et al., 2022; Xue et al., 2020). Tradicionalmente, a soja (*Glycine max*) ocupa posição de destaque nesse cenário, sendo responsável por cerca de 60% da produção mundial de oleaginosas (USDA; FAS, 2025). No Brasil, a soja representa o principal produto do agronegócio (Embrapa Soja, 2020), com uma produção média de 3423 kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2023), apresentando um rendimento de lipídios de aproximadamente 18% da biomassa da semente (Zaabou et al., 2022; Wani et al., 2022), e ciclo produtivo de 100 a 130 dias (EMBRAPA, 2020; Alsanie, 2021). Como resultado, estima-se uma produção de óleo por hectare em torno de 616 kg por ciclo.

Apesar da escala de produção expressiva e da ampla aplicação do óleo de soja tanto na alimentação quanto na produção de biodiesel (Embrapa Agroenergia, 2022), a alta dependência dessa oleaginosa representa um risco estrutural para o agronegócio brasileiro. O sistema está sujeito a impactos de pragas, doenças, variações climáticas e oscilações de mercado (Embrapa Agroenergia, 2022), além de exigir extensas áreas agricultáveis e manejo agrônômico intensivo (Fuentes-Llanillo et al., 2021; Garbelini et al., 2022). Em paralelo, questiona-se a sustentabilidade do uso de culturas alimentares para a produção de biocombustíveis de primeira geração, dado o uso competitivo do solo e os limites da expansão agrícola (Thanigaivel et al., 2022; Foong et al., 2022).

Nesse contexto, novas estratégias, como a de produção de microalgas vêm sendo estudadas como fontes alternativas para a produção de óleo e de biocombustíveis de terceira geração. Tais organismos apresentam alta produtividade por área, ciclo de crescimento curto, flexibilidade bioquímica e podem ser cultivados em áreas que não competem com a agricultura tradicional (Hoang et al., 2022). Estudos bioquímicos demonstram que microalgas podem conter entre 0,9% e 77% de lipídios, além de proteínas (6,0–71%) e carboidratos (4,0–83,6%), o que amplia significativamente seu potencial de uso (Gu et al., 2020).

No presente estudo, a microalga *Chlorolobion braunii* apresentou resultados promissores quanto ao acúmulo de óleo. Neste trabalho, foi investigado o efeito da adição de cobre (10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>) no cultivo dessa espécie, observando-se um aumento substancial

na produção de lipídios em relação ao controle. A microalga atingiu até 78,5% de lipídios na biomassa seca no dia 8 de experimento, sob condições semicontroladas e em escala ampliada de cultivo (200 L), demonstrando potencial para aplicações industriais.

Utilizando reatores tipo *raceway* rasos, com 6 cm de profundidade, ciclo de 8 dias, apresentando um teor de lipídio de 78,5% da biomassa seca e área de 4,125 m<sup>2</sup>, alcançou-se uma produtividade de 0,72 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca por ciclo. Com essa configuração, são viáveis até 12,5 ciclos em 100 dias, totalizando cerca de 3491 kg de óleo por hectare em reatores com 6 cm de profundidade, aproximadamente 5,6 vezes mais que a soja (616 kg de óleo por hectare) no mesmo intervalo. A produção diária estimada de óleo por hectare para *C. braunii* foi de 34,9 kg ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, enquanto a soja apresenta 6,16 kg ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Esses valores indicam que seriam necessários apenas 17,64 dias de cultivo da microalga para igualar a produção de óleo obtida com 100 dias de cultura de soja, ou 0,176 hectare de cultivo de microalga para equiparar a produção de 1 hectare de soja no mesmo período.

**Tabela 3.** Produtividade de óleo de *C. braunii* cultivada com 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> de cobre e da soja (*Glycine max*), considerando produção diária, produção total em 100 dias, área necessária de cultivo de microalgas para igualar a produção de 1 ha de soja (Área microalgas / soja) e tempo necessário para microalgas igualar a produção de óleo soja produzido em 1 ha (Tempo microalgas / soja). Produtividade da soja estimada com base na média nacional de 3423 kg ha<sup>-1</sup> e 18% óleo. Produtividade de *C. braunii* estimada com base 0,72 g L<sup>-1</sup> biomassa seca, 78,5% óleo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Unidade</b>	<b><i>C. braunii</i></b>	<b>Soja</b>
Óleo/dia	kg/ha	34,91	6,16
Óleo em 100 dias	kg/ha	3491,00	616,14
Área microalga / soja	ha	0,176	1
Tempo microalga / soja	dias	17,64	100

Os dados de *C. braunii* mostram o elevado rendimento de óleo na microalga em sistemas batelada alimentada, mesmo tendo um baixo rendimento de biomassa. Ainda que o cultivo de microalgas enfrente desafios como custos energéticos, infraestrutura e

escalabilidade, os resultados obtidos com *C. braunii* indicam que, com otimizações tecnológicas e estratégias de integração com indústrias, a produção de óleo microalgal pode se tornar economicamente competitiva.

Portanto, considerando a produtividade por hectare, o tempo de cultivo reduzido, e a alta concentração lipídica, a microalga *Chlorolobion braunii* destaca-se como uma possível alternativa complementar à soja para suprir a crescente demanda por óleo vegetal, tanto para usos alimentares quanto energéticos. Sua implementação pode contribuir para a diversificação da matriz de produção de óleos, mitigando riscos associados à dependência de monoculturas e promovendo avanços na sustentabilidade dos sistemas bioenergéticos.

## 6. Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciam o potencial biotecnológico da microalga *Chlorolobion braunii* como fonte alternativa para a produção de óleos, o que pode ter interesse industrial. A concentração de cobre usada foi baixa o suficiente para não afetar negativamente a taxa de crescimento, mas alta o suficiente para estimular a célula a produzir e acumular óleo. O acúmulo de óleo no tratamento com cobre foi 23% maior do que no controle, indicando que a concentração aplicada não causou efeitos tóxicos, tornando a estratégia segura e eficiente para aplicação em cultivos de larga escala.

*C. braunii* destaca-se como uma espécie resiliente, mostrando-se tolerante às variações ambientais, respondeu à mixotrofia e à manipulações biotecnológicas direcionadas à otimização da produção de biomoléculas. Entretanto, a produção de biomassa ficou aquém ( $0,72 \text{ g L}^{-1}$ ) do esperado, necessitando de otimização para um rendimento de biomassa compatível com sistemas industriais e que resulte em viabilidade econômica, qual seja, 10 a  $12 \text{ g L}^{-1}$  (Faria 2023).

Apesar dos desafios que ainda limitam o cultivo em escala industrial, os avanços tecnológicos e o uso de estratégias de integração com setores industriais podem tornar o cultivo de microalgas economicamente viável. Considerando sua produtividade por hectare, o tempo de cultivo reduzido e a concentração lipídica expressiva, *C. braunii* apresenta-se como uma alternativa promissora e complementar na produção de óleos vegetais, tanto para fins alimentares quanto energéticos.

Dessa forma, os dados obtidos neste trabalho reforçam o papel estratégico de *Chlorolobion braunii* como uma microalga promissora para o desenvolvimento de sistemas sustentáveis, economicamente viáveis e tecnologicamente otimizáveis, com potencial para atender à crescente demanda global por soluções baseadas em biotecnologia.

## 7. Referências

ABIUSI, F.; WIJFFELS, R. H.; JANSSEN, M. Doubling of microalgae productivity by oxygen balanced mixotrophy. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 15, p. 6065-6074, 2020.

ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Costs analysis of microalgae production. In: **Biofuels from algae**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 551-566. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00021-4>

AĞBULUT, Ü. et al. Microalgae bio-oil production by pyrolysis and hydrothermal liquefaction: Mechanism and characteristics. **Bioresource Technology**, v. 376, 128860, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128860>

AGUILAR-RUIZ, R. J. et al. Removal of copper improves the lipid content in *Nannochloropsis oculata* culture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 44195-44204, 2020.

AKIMOV, A. I.; SOLOMONOVA, E. S.; SHOMAN, N. Y.; RYLKOVA, A. O. Changes in the Growth Rate and Fluorescent and Cytometric Parameters of the Microalga *Dunaliella salina* (Teod.) at Different Cu<sup>2+</sup> Concentrations in the Cultivation Medium. **Contemporary Problems of Ecology**, v. 16, n. 3, p. 356-366, 2023.

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. 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.

ALHO, L. O. G. et al. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. **Environmental Pollution**, v. 265, 114856, 2020.

AL RAYAAN, M.; ALSHAYQI, I. A. A review on oleaginous microorganisms for biological wastewater treatment: current and future prospect. **Journal of Environmental Treatment Techniques**, v. 9, p. 280-288, 2021.

ANGEL, B. M. et al. Time-averaged concentrations are effective for predicting chronic toxicity of varying copper pulse exposures for two freshwater green algae species. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 787-797, 2017.

AOYAGI, L. M.; BARACHO, D. H.; LOMBARDI, A. T. Low-dose copper and blue light increases the yield of value-added biomolecules in *Kirchneriella contorta* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 35, n. 6, p. 2829-2838, 2023.

AOYAGI, L. M.; SILVA, D. H. B.; LOMBARDI, A. T. Processo para estimular o crescimento populacional e rendimento de biomoléculas em microalgas. BR102021019778-1, 10 jan. 2021. Depositante: Fundação Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Classificação IPC: C12R 1/89; C12P 1/00.

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.

BÉCHET, Q.; SHILTON, A.; GUIEYSSE, B. 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**, v. 31, n. 8, p. 1648–1663, 2013.

BENDETTI, M. et al. Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. **Microbial Cell Factories**, v. 17, p. 1-18, 2018.

BHATT, A. et al. Techno-economic analysis of microalgae cultivation for commercial sustainability: a state-of-the-art review. **Journal of Cleaner Production**, v. 370, p. 133456, 2022.

BICUNTO DA SILVA, R. F. et al. The soybean trap: Challenges and risks for Brazilian producers. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 12, 2020.

- BOLLI, J. Investigando *Chlorolobion braunii* em escala laboratorial: uma abordagem fisiológica para o entendimento do efeito sinérgico de cobre e LEDs branco/azul/vermelho na síntese de biomoléculas. 2023.
- BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 61-74, 2004.
- CAMARGO, E. C. 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, C.; LOMBARDI, A. T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, v. 30, p. 79-85, 2018.
- CAVALLETTI, E. et al. Copper effect on microalgae: Toxicity and bioremediation strategies. **Toxics**, v. 10, n. 9, 527, 2022.
- CHAVOSHI, Z. Z.; SHARIATI, M. Lipid production in *Dunaliella salina* under autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. **Biologia**, v. 74, p. 1579-1590, 2019.
- CHEN, B. et al. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products – A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198-1206, 2017.
- CHIA, M. A.; GALADIMA, S. Y.; JAPHET, W. S. Combined effect of atrazine and copper on the growth, biomass production, morphology and antioxidant response of *Scenedesmus quadricauda*. **Phycologia**, v. 54, p. 109-117, 2015.
- CHIN, G. J. W. L. et al. The effects of light intensity and nitrogen concentration to enhance lipid production in four tropical microalgae. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 48, p. 102660, 2023.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 159-182, 2002.

ČYPAITĖ, A.; ŽALTAUSKAITĖ, J.; VENCLOVIENĖ, J. Assessment of chlorophyll-a, chlorophyll-b and growth rate in freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to cadmium and copper. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ENVIRONMENTAL ENGINEERING (9.: 2014). Selected papers**. 9th ICEE, May 2014.

DE LUCA, R. et al. Exploiting meteorological forecasts for the optimal operation of algal ponds. **Journal of Process Control**, v. 55, p. 55-65, 2017.

DE SOUZA, M. P. et al. Potential of microalgal bioproducts: general perspectives and main challenges. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, p. 2139-2156, 2019.

DE SOUZA SCHNEIDER, R. D. C. et al. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. **Algal Research**, v. 32, p. 280-292, 2018.

DEXTRO, R. B. et al. Response patterns of the freshwater green microalgae *Kirchneriella obesa* (Chlorophyta, Sphaeropleales) to free copper ions. **Phycologia**, v. 64, n. 1, p. 12-20, 2025.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 228-235, 2017.

EL AGAWANY, N. et al. Effect of heavy metals on protein content of marine unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 9, 584, 2021.

ELLEUCH, J. et al. Responses of *Dunaliella* sp. AL-1 to chromium and copper: Biochemical and physiological studies. **Chemosphere**, v. 364, 143133, 2024.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil: 2020**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. (Sistemas de Produção, 17). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1123928/1/SP-17-2020-online-1.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2025.

FAO. **The State of Food and Agriculture 2022**. Rome: FAO, 2022. Disponível em: <http://www.fao.org/publications>. Acesso em: 9 jul. 2025.

FAWAZ, E. G.; KAMAREDDINE, L. A.; SALAM, D. A. Effect of algal surface area and species interactions in toxicity testing bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 584-591, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.032>

FILOVÁ, A.; FARGAŠOVÁ, A.; MOLNÁROVÁ, M. Cu, Ni, and Zn effects on basic physiological and stress parameters of *Raphidocelis subcapitata* algae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 41, p. 58426-58441, 2021.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. S. 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.

FOONG, S. Y. et al. The nexus between biofuels and pesticides in agroforestry: Pathways toward United Nations sustainable development goals. **Environmental Research**, v. 214, 113751, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113751>

FUENTES-LLANILLO, R. et al. Expansion of no-tillage practice in conservation agriculture in Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 208, 104877, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104877>

GARBELINI, L. G. et al. Diversified crop rotations increase the yield and economic efficiency of grain production systems. **European Journal of Agronomy**, v. 137, 126528, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126528>

GU, X. et al. Recent development of hydrothermal liquefaction for algal biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 121, 109707, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109707>

HERMADI, I. et al. Development of smart algae pond system for microalgae biomass production. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, v. 749, n. 1, p. 012068, maio 2021.

HINDARTI, D.; LARASATI, A. W. Copper (Cu) and Cadmium (Cd) toxicity on growth, chlorophyll-a and carotenoid content of phytoplankton *Nitzschia* sp. In: **IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE**, 2019. Proceedings... [S.l.]: IOP Publishing, 2019. v. 236, p. 012053.

HOANG, A. T. et al. Biofuel production from microalgae: Challenges and chances. **Phytochemistry Reviews**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09819-y>

IBGE. **Produção de soja**. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/soja/br>. Acesso em: 8 jul. 2025.

JEREZ, C. G. et al. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: estimation of biomass productivity by in-vivo chlorophyll a fluorescence monitoring. **Algal Research**, v. 17, p. 21-30, 2016.

JHA, D. et al. Microalgae-based pharmaceuticals and nutraceuticals: an emerging field with immense market potential. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 4, p. 257-272, 2017.

JIN, Y. et al. A modified cultivation strategy to enhance biomass production and lipid accumulation of *Tetradismus obliquus* FACHB-14 with copper stress and light quality induction. **Bioresource Technology**, v. 400, 130677, 2024.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 155-164, 2002.

JUNIOR, A. A. B. et al. Soybean yield, seed protein and oil concentration, and soil fertility affected by off-season crops. **European Journal of Agronomy**, v. 153, 127039, 2024.

- KONDZIOR, P.; BUTAREWICZ, A. Effect of heavy metals (Cu and Zn) on the content of photosynthetic pigments in the cells of algae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 3, 2018.
- KUMAR, G. et al. Bioengineering of microalgae: recent advances, perspectives, and regulatory challenges for industrial application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 914, 2020.
- KUMAR, K. et al. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 875-885, 2015.
- LI, S. et al. Evaluation of growth and biochemical responses of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* due to exposure and uptake of sulfonamides and copper. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 126064, 2021.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, p. 77-87, 2011.
- LOURENÇO, S. O. et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 1-6, 2014.
- MALTSEV, Y.; KULIKOVSKIY, M.; MALTSEVA, S. Nitrogen and phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 239, 2023.
- MEDEIROS, D. L.; MOREIRA, Í. T. A. Microalgae biomass production from cultivation in availability and limitation of nutrients: the technical, environmental and economic performance. **Journal of Cleaner Production**, v. 370, p. 133538, 2022.

MENEGOL, T. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 28-37, 2017.

NÁPAN, K. et al. Impact of heavy metals from flue gas integration with microalgae production. **Algal Research**, v. 8, p. 83-88, 2015.

NIELSEN, S. L.; HANSEN, B. W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 9, p. 2698-2706, 2019.

PANTHEE, D. et al. Quantitative trait loci for  $\beta$ -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, p. 1005-1012, 2004.

PARISH, C. C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: **Lipids in freshwater ecosystems**. New York: Springer, 1999. p. 4-20.

PATEL, A. K. et al. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 364, 128030, 2022.

PEERS, G.; PRICE, N. M. Copper-containing plastocyanin used for electron transport by an oceanic diatom. **Nature**, v. 441, p. 341-344, 2006.

PERALES-VELA, H. V.; PENA-CASTRO, J. M.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. **Chemosphere**, v. 64, p. 1-10, 2006.

POLAT, E.; ALTINBAŞ, M. A review on microalgal growth stress parameters for sustainable biofuel production. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 25, n. 8, p. 2469-2487, 2023.

PORCELLI, R. et al. Comparative life cycle assessment of microalgae cultivation for non-energy purposes using different carbon dioxide sources. **Science of the Total Environment**, v. 721, 137714, 2020.

RAS, M.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. 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.

- RAS, R. T. et al. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 1, p. 344-351, 2013.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- ROCHA, G. S. et al. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). **Algal Research**, v. 54, 102223, 2021.
- RODRÍGUEZ-MIRANDA, E. et al. Indirect regulation of temperature in raceway reactors by optimal management of culture depth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 1186-1198, 2021.
- 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**, v. 156, p. 408-411, 2014.
- SACCARDO, A.; BEZZO, F.; SFORZA, E. Microalgae growth in ultra-thin steady-state continuous photobioreactors: assessing self-shading effects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 977429, 2022.
- SATPATI, G. G.; GORAIN, P. C.; PAL, R. Efficacy of EDTA and phosphorous on biomass yield and total lipid accumulation in two green microalgae with special emphasis on neutral lipid detection by flow cytometry. **Advances in Biology**, [s. v.], [s. p.], [s. d.].
- SEIXAS, C. D. S. et al. (ed.). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1129309>. Acesso em: 9 jul. 2025.
- SHEA, Z.; SINGER, W. M.; ZHANG, B. Soybean production, versatility, and improvement. In: **Legume crops-prospects, production and uses**. London: IntechOpen, 2020. p. 29-50.
- SHI, Y.; LIU, M.; DING, W.; LIU, J. Novel insights into phosphorus deprivation boosted lipid synthesis in the marine alga *Nannochloropsis oceanica* without

compromising biomass production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 41, p. 11488–11502, 2020.

SHUHAILI, F. et al. Nitrate and phosphate uptake dynamics in two halotolerant strains of *Chlorella vulgaris* is differentially influenced by carbon, nitrogen and phosphorus supply. **Chemical Engineering Journal**, v. 458, 141433, 2023.

SILVA, J. C.; ECHEVESTRE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 57-63, 2018.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land-based fuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 10-16, 2011.

SLOCOMBE, S. P. et al. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51-57, 2013.

SOLOVCHENKO, A. et al. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited. **Algal Research**, v. 43, 101651, 2019.

SOYSTATS. 2018. Disponível em: <http://soystats.com/>.

SU, M. et al. Applications of microalgae in foods, pharma and feeds and their use as fertilizers and biostimulants: Legislation and regulatory aspects for consideration. **Foods**, v. 12, n. 20, 3878, 2023.

TANG, D. et al. Carotenoids and phenolic compounds in microalgae: biosynthesis, accumulation, and industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 894-902, 2011.

TAYLOR, S. R.; MCLELLAN, M. R.; CRAWFORD, D. L. Correlation of photosynthetic pigments and maximal quantum efficiency with copper stress in a marine diatom. **Journal of Phycology**, v. 41, p. 514-520, 2005.

THANIGAIVEL, S. et al. The urge of algal biomass-based fuels for environmental sustainability against a steady tide of biofuel conflict analysis: Is third-generation algal biorefinery a boon? **Fuel**, v. 317, 123494, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123494>

USDA. **Oil crops yearbook**. 2025. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/data-products/oil-crops-yearbook/>.

- VASCONCELLOS, M. T. S. D.; MOREIRA, L. M. Effect of copper and cadmium on the growth of microalgae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1-8, 2008.
- VELMURUGAN, A.; MUTHUKALIANNAN, G. K. Genetic manipulation for carotenoid production in microalgae an overview. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 221-228, 2022.
- VERA-VIVES, A. M. et al. Assessment of photosynthetic activity in dense microalgae cultures using oxygen production. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 208, 108510, 2024.
- WANI, S. H.; BHAT, M. A.; LIN, F. **Soybean improvement**. Cham: Springer, 2022.
- WANG, H. et al. Mechanisms of heavy metal detoxification in marine microalgae: current research and future directions. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 15, p. 8529-8543, 2019.
- WATANABE, M. E. Phytoplankton responses to cadmium and copper: implications for toxicity in aquatic environments. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 33-43, 1988.
- 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.
- XUE, Z. et al. Development prospect and preparation technology of edible oil from microalgae. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 402, 2020.
- ZENG, J. et al. Cu-induced physiological and biochemical changes in *Spirulina platensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, 109569, 2019.
- ZHANG, C. et al. Progress in microalgae research for sustainable development of biofuel and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3164-3173, 2018.
- ZHAO, Q.; XU, Y.; LIU, Y. Soybean oil bodies: A review on composition, properties, food applications, and future research aspects. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 107296, 2022.

ZHENG, Y. et al. Effects of copper and cadmium on chlorophyll content and antioxidant enzyme activity in microalgae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 24, p. 31513-31524, 2021.

ZHOU, G. J. et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2918-2929, 2012.