

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Respostas Fisiológicas de *Chlorella sorokiniana* sob diferentes
condições de cultivo e aplicação de sua biomassa**

Graziela Cristina Montanhim

São Carlos
Junho de 2018

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

GRAZIELA CRISTINA MONTANHIM

**Respostas Fisiológicas de *Chlorella sorokiniana* sob diferentes
condições de cultivo e aplicação de sua biomassa**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, com ênfase em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Teresa Lombardi

São Carlos
Junho de 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Graziela Cristina Montanhim, realizada em 15/06/2018:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello
Exito

Profa. Dra. Paula Cristina Garcia Manoel Crnkovic
EESC/USP

*Aos meus pais, meu irmão, meu esposo e a DEUS, que me permitiu
chegar até aqui, DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por estender Sua mão para que eu me levantasse após cada queda.

Aos meus pais, Vera e Pedro, que são e sempre serão meu alicerce.

Ao meu esposo, Ricardo, pela compreensão, paciência e ajuda.

Ao meu amado irmão Gabriel e à nossa Belinha, que tanto nos diverte.

Aos queridos amigos do grupo JOVIC e aos amigos “Várzeas”.

À minha família, em especial meus avós maternos - Aurita e Luís – e paternos - Carolina e Luiz (*in memoriam*).

À Fernanda e Viviane, pela amizade e por serem as irmãs que a vida me proporcionou.

À Cláudia, que cuida do Laboratório de Biotecnologia de Algas com tanto zelo e carinho.

Aos professores Maria da Graça G. Melão, Sônia C. J. Gualtieri, Inessa L. Bagatini, Paula C. G. M. Crnkovic e Christopher Parrish, pela parceria e ajuda.

Ao Romeu Mattos Leite, da Vila Yamaguishi, pela doação das sementes utilizadas.

Ao biólogo Carlos Aparecido Casali e aos amigos Eduardo, Farid, Jacque e Vinícius, sem palavras...

À melhor parte do meu doutorado: Adriano E. Marchello, Alexsandro C. dos Santos, Andrea C. M. Souza, Camila Candido, Cynthia de Lima, Daniela M. Barreto, Douglas Baracho, Eduardo C. de Camargo, Farid Saadi, Felipe Secco, Jaqueline C. da Silva, Jenna Mackinnon, Leonardo Faria, Lucas Sostena, Mônica de A. Bonini, Rafael Dextro, Raquel Andrade de Rossi, Renata N. Haneda, Suleiman Dauda, Tamires de Freitas, Vinícius O. Araújo.

Aos professores Odete Rocha, Reinaldo G. Bastos e Raquel de A. Rossi, pelas contribuições para melhorias no exame de qualificação.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

À equipe da E. E. Prof. Dr. Segundo Carlos Lopes, em especial à diretora Ângela Guaratti e à coordenadora Márcia Borges pela compreensão, paciência e ensinamentos.

Aos meus alunos da E. E. Prof. Dr. Segundo Carlos Lopes, com quem eu mais aprendo do que ensino e muito me divirto.

Às professoras Mônica F. Caron e Heloísa C. Sisle, por todos os ensinamentos.

À minha eterna orientadora e “mãe científica”, Pro^a Dr^a Maria Inês S. Lima.

À minha orientadora Dr^a Ana Teresa Lombardi, meus sinceros e eternos agradecimentos pela paciência, compreensão, ensinamentos e amizade.

Atipicamente, agradeço aos meus erros, com os quais muito aprendi.

A todas as formas de vida, que ainda me causam curiosidade e me instigam a continuar buscando respostas.

RESUMO GERAL

Microalgas são organismos fotossintéticos que realizam biofixação do CO₂. Podem contribuir na produção de energia e na área da química fina. A biomassa de microalgas carrega consigo biomoléculas de alto valor agregado como lipídios, carboidratos e proteínas, que podem ter sua produção potencializada por meio das condições de cultivo. Selecionar a espécie algal que atenda demandas específicas e identificar fatores limitantes ao crescimento é etapa primordial ao desenvolvimento de cultivos em larga escala. Com o aumento e eventual produção industrial de biomassa algal, aplicações da biomassa, ainda que residual, são de interesse tanto para a redução do resíduo como para dar-lhe um valor. Esta pesquisa teve como objetivos gerais estudar fisiologicamente uma espécie de microalga Chlorophyta em várias escalas de cultivo, caracterizá-la bioquimicamente e aplicar sua biomassa. Em experimentos controlados de laboratório, no primeiro capítulo desta pesquisa consideramos três microalgas Chlorophyta e selecionamos uma, *Chlorella sorokiniana*, com base na taxa de crescimento, rendimento de biomassa e produção de proteínas. Testamos os meios de cultivo BG11 e solução hidropônica em concentração de 10% e 50% almejando redução de custos para posterior escalonamento de cultivo. No segundo capítulo, cujo objetivo foi estudar a fisiologia algal em culturas de 100 e 1000 L, produzimos a biomassa de *C. sorokiniana* para ser aplicada em uma prática agrícola: a peletização de sementes. Nos cultivos ampliados obtivemos concentrações menores de proteínas e lipídios em comparação com escala laboratorial, mas o investimento celular em fotossíntese foi similar às células cultivadas no laboratório. A maior taxa de fixação do carbono foi obtida nos cultivos de 100 L. No capítulo 3 avaliamos a viabilidade do uso de biomassa algal na peletização de sementes, que foram cultivadas avaliando-se parâmetros do crescimento vegetal. Esses resultados mostraram porcentagem de emergência (~90%) equivalente ao controle, indicando a viabilidade de uso de biomassa algal na peletização de sementes de hortaliças, especialmente almeirão. Finalmente, no capítulo 4 avaliamos o efeito de diferentes cores de iluminação no rendimento de biomassa, composição bioquímica e respostas fotossintéticas de *C. sorokiniana*. Para tanto usamos somente diodos emissores de luz (LEDs) azul, vermelha e, mistura de LED azul com vermelha em igual proporção e comparamos com o controle (LED branco). Os resultados mostraram que LED vermelho resultou em menor produtividade bruta (0,0025 mol C [mg Chl a⁻¹ h⁻¹]), biomassa seca e taxa de crescimento e foi o cultivo mais sensível às curvas rápidas de saturação de luz. Células expostas ao LED azul e à combinação azul com vermelho apresentaram comportamento fotossintético equivalente ao controle, mas com maior rendimento de biomassa. Do presente estudo, concluímos que *C. sorokiniana* é uma microalga que suporta as condições adversas comuns em cultivos de larga escala e que sua biomassa apresenta potencial para uso na composição de péletes de sementes de hortaliças. Demonstramos ainda que o uso de LED azul pode estimular a produtividade e alterar a composição bioquímica de *C. sorokiniana*.

Palavras-chave: biomoléculas; curvas de saturação de luz; fotossíntese; microalgas; larga escala; LED; peletização

ABSTRACT

Microalgae are promising photosynthetic organisms, thus important for the biofixation of the CO₂. They have the potential for application in various industrial sectors, such as in the production of renewable energy and in the area of fine chemistry. Microalgae biomass carries valueable biomolecules such as lipids, carbohydrates and proteins that can have their production optimized, depending on culture conditions. Species selection and identification of conditions that stimulate their growth is important for the development of large-scale cultures. The objectives of this research were to investigate the physiology of a Chlorophyta microalgae in different scales, analyse its biochemical composition and apply its biomass. For the development of this research we selected *Chlorella sorokiniana* among three Chlorophyta species based on growth rate, biomass yield and protein production in laboratory controlled experiments. These results are presented in chapter 1. In chapter 2, we scaled *C. sorokiniana* cultures up to 100 and 1000 L keeping them outdoors for the production of biomass and physiology evaluation under the natural conditions of light and temperature. The results showed less proteins and lipids in the biomass of large scale systems in comparison to the laboratory cultures. Although the photosynthetic capacity was similar in either scale, the highest rate of carbon fixation was obtained in 100 L cultures. In chapter 3 the applicability of the biomass produced in the 1000 L cultures was investigated in vegetable seeds pelleting, whose viability was evaluated by monitoring the pelletized seeds germination. These results showed ~ 90% emergence and equivalence with the controls, so confirming the applicability of microalgae biomass in the composition of seed pelleting materials. Finally, in the 4th chapter we investigated if light emitting diodes (LEDs) of different colors would led to improvements in *C. sorokiniana* growth, biomass and photosynthetic physiology. For this, the cells were exposed to blue, red and a blend of 50% each blue and red LEDs accomplishing 100% of PAR as in the controls (white LED). We observed that *S. sorokiniana* exposed to red LED had the lowest biomass productivity (0.0025 mol C [mg Chl a⁻¹ h⁻¹]), dry biomass and growth rates and it was the most sensible culture to photosynthetic light reactions. Cultures exposed to the blue, and the blend of blue/red LEDs showed photosynthetic behavior similar to the control, in addition to higher biomass yield. From the present research as a whole we can conclude that *C. sorokiniana* is a robust freshwater Chlorophyta that supports the adverse conditions of outdoor cultures and that its biomass can be used in seeds pelleting. In addition, we showed that blue LED can improve *C. sorokiniana* productivity and modify its biochemical composition.

Key words: biomolecules; light saturation curves; photosynthesis; microalgae; large scale; LED; pelleting

LISTA DE FIGURAS

Metodologia geral

- Figura 1. Cultivos de *Chlorella sorokiniana* em a) 100 L e b) 1000 L.-----28
- Figura 2. Processo de peletização de sementes de alface. A) semente nua. B) primeira etapa e C) péletes.--
----- 31
- Figura 3. Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob diferentes fontes luminosas. a) azul, b) vermelha, c) azul +
vermelha (50%/50%) e d) branca.-----34
- Figura 4. Esquema da fase fotoquímica fotossintética, mostrando os fotossistemas II e I e os centros de
reação na cadeia transportadora de elétrons.-----36
- Figura 5. Representação esquemática dos cinco níveis de fluorescência, em unidades relativas (RFU),
obtidos a partir da fluorometria PAM: fluorescência máxima em adaptação ao escuro (Fm); fluorescência
máxima em adaptação à luz (F'm); fluorescência mínima em adaptação ao escuro (Fo); fluorescência
mínima em adaptação à luz (F'o) e fluorescência em estado estável de transporte de elétrons (Fs). Quatro
tipos de luz são usados durante as leituras: luz modulada (LM); pulso saturante (PS); luz actínica (LA) e
luz na faixa do vermelho-extremo (VE).-----37
- Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração de clorofila a. Os números (1), (2) e (3)
representam as áreas do gráfico correspondentes às respectivas equações. -----38
- Figura 7. Ajuste linear da curva de calibração para análise de proteínas totais, considerando valores de
absorbância de 595 nm versus o aumento da concentração de BSA (albumina de soro bovino). -----42
- Figura 8. Ajuste linear da curva de calibração para análise de carboidratos totais, considerando valores de
absorbância de 315 nm versus o aumento da concentração de glicose. -----42
- Figura 9. Curvas de calibração das cromatorods (as letras a-j correspondem às rods 1 a 10) componentes
das racks com padrão composto.-----44

Capítulo 1

- Figura 1. Taxas específicas de crescimento (μh^{-1}) das três espécies estudadas nos meios de cultivo BG11,
hidropônico diluído a 10% (H10%) e 50% (H50%). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a
mesma espécie e * indicam diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida
pelo teste de Tukey, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.-----54
- Figura 2. Ln da abundância celular (células mL^{-1}) de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C. sorokiniana* (c)
cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50% (□).-----56
- Figura 3. Ln da densidade óptica (684 nm) expressa em absorbância de células de *A. densus* (a), *C.*
vulgaris (b), e *C. sorokiniana* (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração
10% (○) e 50% (□).-----57
- Figura 4. Ln da concentração ($mg L^{-1}$) de clorofila a de células de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C.*
sorokiniana (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50%
(□).-----58
- Figura 5. Rendimento quântico fotossintético máximo de células de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C.*
sorokiniana (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50%
(□).-----59
- Figura 6. Biomassa seca ($mg L^{-1}$) de culturas de *A. densus*, *C. vulgaris*, e *C. sorokiniana* cultivadas em
meio de cultivo BG11 (listras verticais), hidropônico em concentração 10% (listras horizontais) e 50%
(listras diagonais). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a mesma espécie e * indicam
diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.-----60
- Figura 7. Concentrações totais ($pg célula^{-1}$) de carboidratos (a), proteínas (b) e lipídios (c) de células de *A.*
densus, *C. vulgaris*, e *C. sorokiniana* cultivadas em meio de cultivo BG11 (listras verticais), hidropônico

em concentração 10% (listras horizontais) e 50% (listras diagonais). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a mesma espécie e * indicam diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.-----61

Capítulo 2

Figura 1. Resultados do monitoramento da cultura em relação ao pH do meio (a), concentração de oxigênio dissolvido (b) e temperatura (c) nas culturas de *C. sorokiniana* com 100 L (linha tracejada) e 1000 L (linha contínua). Barras brancas e cinza escuro acima do eixo X representam 12: 12h de regime fotoperíodo claro e escuro, respectivamente.-----69

Figura. 2 Intensidade de luz (a) e rendimento quântico máximo (b) de *C. sorokiniana* cultivada em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).-----71

Figura 3. Curva de crescimento de *C. sorokiniana* em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). O monitoramento do crescimento foi realizado em termos de densidade celular (a); concentração de clorofila a (b), densidade óptica (absorbância) a 684 nm (c) e 570 nm (d). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3). -----73

Figura 4. Resultados da fluorescência da clorofila em relação a (a) máximos (ΦM , barras cinza claro) e operacionais quânticos ($\Phi'M$, barras cinzas escuras); (b) valores de quenchings fotoquímicos (qP, barras cinza claro) e não fotoquímicos (NPQ, barras cinza escuro) para *C. sorokiniana* em três diferentes volumes de cultura. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).-----74

Figura 5. Curva de luz rápida apresentando taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) em função da intensidade da luz (E) para *C. sorokiniana* em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).-----76

Figura 6. Concentração total de proteínas (a), carboidratos (b) e lipídios totais (c) em células de *C. sorokiniana* em três diferentes volumes de cultura. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).-----79

Capítulo 3

Figura 1. Porcentagem de emergência de plântulas de a) almeirão (Alm, semente nua), b) alface (Alf, semente nua) e de plântulas oriundas de péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila+farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade ($p < 0,05$).-----90

Figura 2. Tempo médio de emergência (dias) de plântulas de a) almeirão, b) alface e de plântulas oriundas de péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila e farinha (A+F) na mesma proporção e todos contendo biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). -----91

Figura 3. Massa de 1000 sementes e péletes de a) almeirão e b) alface, sendo os péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila+farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade.-----92

Figura 4. Porcentagem de umidade de sementes e péletes de a) almeirão e b) alface, sendo os péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila e farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade. -----92

Capítulo 4

Figura 1. Curvas de crescimento com base no logaritmo natural da densidade celular de *C. sorokiniana*, mantida em luz LED azul (○), vermelha (□), azul+vermelha (◇) e branca (*) ao longo de cinco etapas em um cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----100

- Figura 2. Curvas de crescimento com base no logaritmo natural da densidade óptica (684 nm) de culturas de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (○), vermelha (□), azul+vermelha (◇) e branca (*) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----101
- Figura 3. Curvas de crescimento com base na fluorescência da clorofila (em unidades relativas, RFU) em culturas de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (a), vermelha (b), azul+vermelha (c) e branca (d) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----102
- Figura 4. Taxa de crescimento (μ , h⁻¹) de *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----103
- Figura 5. Concentração de biomassa seca de *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----104
- Figura 6. Concentração total de proteínas (a), carboidratos (b) e lipídios(c) em células de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. Barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----107
- Figura 7. Valores médios de rendimento quântico máximo (Φ_M , barras cinza claro) e efetivo (Φ'_M , barras cinza escuro) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo de cada etapa com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----109
- Figura 8. Valores médios de coeficiente de dissipação (quenching) fotoquímica (qP, barras cinza claro) e não fotoquímica (NPQ, barras cinza escuro) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo em cada etapa com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----110
- Figura 9. Curvas rápidas de luz em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo de cada etapa com luz azul (a), vermelha (b), azul+vermelha (c) e branca (d) ao longo de cinco etapas. Os símbolos ○, □, △, ◇ e * representam os etapas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----113
- Figura 10. Parâmetros das curvas rápidas de luz: α (a), rETR_{max} (b) e E_k (c) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----115
- Figura 11. Eficiência fotossintética (PB, mol C [mg Chl a]⁻¹ h⁻¹) de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).-----117

LISTA DE TABELAS

Metodologia geral

Tabela 1. Composição do meio hidropônico utilizado para o cultivo de *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*.-----25

Tabela 2. Composição do meio BG11 utilizado para o cultivo de *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*.-----25

Tabela 3. Caracterização do solo utilizado na semeadura de sementes e péletes de alface e almeirão.----32

Capítulo 2

1 Eficiência de uso da luz (α), taxa de transporte de elétrons relativa máxima (rETRmax), irradiância de saturação (E_k) e eficiência fotossintética (PB) de *C. sorokiniana* em culturas com 0,2, 100 e 1000 L.--77

Capítulo 4

Tabela 1. Porcentagem da composição elementar (CHN) e concentração total de biomoléculas em *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelho (AV) e branca (B). Ambas as análises foram realizadas em 72 h da quinta etapa em cultivo semicontínuo. Valores entre parênteses representam desvio padrão (n=3).----- 106

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

C	Carbono
CO ₂	Gás carbônico
PAM	Pulsos de amplitude modulada
PSII e PSI	Fotossistema II e I
β-caroteno	Beta caroteno
LED	Diodo emissores de luz
μ	Taxa específica de crescimento
F _m	Fluorescência máxima em adaptação ao escuro
F' _m	Fluorescência máxima em adaptação à luz
F _o	Fluorescência basal em adaptação ao escuro
F' _o	Fluorescência basal em adaptação à luz
F _v	Fluorescência variável
F _s	Fluorescência em estado estável de transporte de elétrons
LM	Luz modulada
PS	Pulso saturante
LA	Luz actínica
VE	Vermelho extremo
m ²	Metro quadrado
s	Segundo
RFU	Unidades relativas de fluorescência
Chl	Clorofila
nm	Nanômetro
Φ _M	Rendimento fotossintético máximo
Φ' _M	Rendimento fotossintético efetivo (operacional)
q _P	Decaimento fotoquímico
q _N	Decaimento não fotoquímico
NPQ	Decaimento não fotoquímico em perda de calor
AU	Unidade arbitrária
A	Média dos valores de absorbâncias
l	Comprimento do caminho óptico
a*	Coefficiente de absorção específico da chl
ETR	Taxa de transporte de elétrons
μmol	Micromol
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
Φ _e	Coefficiente de rendimento de fixação de C
P ^B	Produtividade bruta
α	Inclinação inicial da curva de saturação de luz
EK	Irradiação saturante

BSA	Albumina sérica bovina
BG11	Blue Green Medium
Atm	Atmosfera
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de polivinila
v/v	Relação volume por volume
M.O.	Matéria orgânica
P	Fósforo
S	Enxofre
K	Potássio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Al	Alumínio
KCl	Cloreto de potássio
H+Al (SMP)	Acidez potencial em solução Schumaker, Mc Lean e Pratney (SMP)
SB	Soma de bases
CTC	Capacidade de troca catiônica
V	Saturação de CTC por bases
M	Saturação por alumínio
mmolc	Milimol de carga
dm	Decímetro
A	Azul
V	Vermelho
AV	Azul+vermelho
BR	Branco
W	Watt
CHN	Carbono:hidrogênio:nitrogênio

Sumário

RESUMO GERAL.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
Metodologia geral.....	8
Capítulo 1.....	8
Capítulo 2.....	9
Capítulo 3.....	9
Capítulo 4.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
Metodologia geral.....	11
Capítulo 2.....	11
Capítulo 4.....	11
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	12
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
II. OBJETIVOS.....	23
II. 1 OBJETIVO GERAL.....	23
II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
III. METODOLOGIA GERAL.....	24
III. 1 Culturas algais em BG11 e solução hidropônica.....	24
III. 2 Culturas algais em 100 e 1000 L.....	26
III. 3 Peletização de sementes de alface e almeirão.....	29
III. 4 Culturas de <i>C. sorokiniana</i> sob diferentes frequências/cores de luz.....	33
III. 5 Análises estatísticas e produção de figuras.....	34
III. 6 Monitoramento diário dos cultivos.....	35
III. 7 Monitoramento em fase exponencial de crescimento.....	38
REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO 1.....	51
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Ankistrodesmus densus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Chlorella sorokiniana</i> PARA ESCALONAMENTO DE CULTIVO.....	51
RESUMO.....	51
INTRODUÇÃO.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 2.....	65
FISIOLOGIA DE <i>Chlorella sorokiniana</i> EM DIFERENTES SISTEMAS E ESCALAS DE CULTIVO.....	65
RESUMO.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

CAPÍTULO 3.....	86
EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE HORTALIÇAS OBTIDAS DE SEMENTES PELETIZADAS COM BIOMASSA DE <i>Chlorella sorokiniana</i>	86
RESUMO	86
INTRODUÇÃO.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	94
CAPÍTULO 4.....	97
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE <i>Chlorella sorokiniana</i> A DIFERENTES CORES DE LED.....	97
RESUMO	97
INTRODUÇÃO.....	98
RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123

I. INTRODUÇÃO GERAL

As algas constituem um grupo diverso de organismos eucarióticos capazes de converter eficientemente a luz solar em energia química através da fotossíntese. Podem ser microscópicas ou macroscópicas, formam a base de cadeias alimentares aquáticas e colonizam os mais variados habitats de água doce, ambiente marinho, solo e fontes termais (SINGH; PATIDAR, 2018). Por serem produtores, desempenham um papel essencial na manutenção e funcionamento ecológico de ecossistemas aquáticos, interferindo direta ou indiretamente em teias alimentares (LEMLEY; ADAMS; BATE, 2016).

Como organismos fotossintéticos, as microalgas são naturalmente fixadoras do gás carbônico (CO₂), um gás importante intensificador do efeito estufa. Atualmente a busca por alternativas para mitigar a concentração de CO₂ atmosférico tem importância prioritária no contexto socioambiental e, dentre essas alternativas, a mitigação biológica do CO₂ poderá contrabalançar de 10 a 20% das emissões por combustíveis fósseis até o ano 2050 (IPCC, 2001).

Uma forma sustentável e eficiente de fixação de CO₂ atmosférico é a fotossíntese e, entre os organismos fotossintetizantes, as microalgas podem fornecer maior quantidade de oxigênio para a atmosfera por unidade de área em comparação aos vegetais terrestres (PULZ; GROSS, 2004). Isso se deve ao fato desses organismos serem formados unicamente por células fotossintetizantes, diferentemente dos vegetais vasculares, que possuem, além das folhas com mesófilo e células clorofiladas, raízes e caule nem sempre clorofilados. Cerca de 513 toneladas de CO₂ são incorporadas anualmente pelo fitoplâncton marinho (BILANOVIC et al., 2009). Além disso, as microalgas apresentam atributos biotecnológicos tal qual rápida velocidade de crescimento e versatilidade metabólica, tornando-as organismos promissores para produção comercial de compostos com alto valor agregado (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013).

Em relação à mensuração da eficiência fotossintética, a técnica de pulso de luz com amplitude modulada (PAM) tem como base a variação da fluorescência de clorofila *a* no fotossistema II (PSII) e permite quantificar os parâmetros fotossintéticos de maneira rápida e simples, estimando ainda o estado fisiológico fotossintetizante da

microalga (KROMKAMP; FORSTER, 2003; NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012; PARKHILL; MAILLET; CULLEN, 2001). A técnica de fluorescência modulada usada nesta pesquisa permite acessar a taxa de transporte de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese, principalmente relativa ao PSII (NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012), que consiste, junto com o estudo do rendimento fotossintético, em poderosa ferramenta para auxiliar a estimar a assimilação de carbono em microalgas.

As microalgas produzem grande variedade de biomoléculas primárias com potencial interesse industrial, tais como proteínas, carboidratos e lipídios, além de grande variedade de compostos intermediários, como carotenoides e ficobilinas (MAADANE et al., 2015). Entretanto, a produção desses compostos depende das condições de cultivo e estado nutricional das células (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; CHIA et al., 2013a; 2013b; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991). Conseqüentemente, tem-se que a síntese dessas moléculas pode ser manipulada sob condições de cultivos definidas e, de acordo com o interesse comercial/industrial que se pretende, moléculas específicas podem ser obtidas em quantidades otimizadas (CHIA et al., 2013a; HANEDA et al., 2015).

As microalgas são uma fonte atrativa de biomassa para a produção de energia e biomoléculas, já que não competem com a agricultura na produção de alimentos e possuem maior rendimento energético por área do que as plantações terrestres tradicionais (RICKLEFS, 2010). No entanto, poucos são os sistemas de cultivo industriais de microalgas em larga escala, pois os custos em raras situações compensam. Os fotobiorreatores, o enriquecimento por nutrientes na formulação do meio nutritivo e o sistema de coleta de biomassa podem tornar-se fatores impeditivos à viabilidade econômica da produção de biomassa algal (CLARENS et al., 2010; LUNDQUIST et al., 2010). Meinerz et al. (2009) demonstraram que a absorção de nutrientes e temperatura de cultivo relacionam-se diretamente à taxa de crescimento e produção de biomassa. Assim, a condição ambiental é importante para o cultivo de microalgas, principalmente em situações nas quais o foco é a otimização da produção de biomassa, para a qual também importa a combinação microalga – fotobiorreator. Até a presente data, não se conhece um modelo de fotobiorreator que seja adequado a todas as espécies microalgas e, por isso a combinação microalga – fotobiorreator é considerada importante. A robustez da microalga é tanto mais importante quanto forem as oscilações das condições ambientais e, igualmente importante quando os nutrientes são fornecidos na forma de resíduos, que carregam consigo contaminantes inorgânicos e orgânicos.

Durante a história do cultivo em massa de microalgas, diferentes sistemas de cultura têm sido desenvolvidos e operados em experimentos e projetos pilotos (BEHRENS, 2005). Duas abordagens principais têm sido estudadas, sendo uma delas o uso de fotobiorreatores fechados e com alto controle para cultivo de cepas específicas objetivando a produção de compostos bioquímicos, tais como enzimas, toxinas, fármacos, antioxidantes, dentre outros (SOLIMENO; ACÍEN; GARCÍA, 2017). A outra abordagem diz respeito a unidades abertas que apresentam menor custo, são mais simples de operar, mas sujeitas a maior contaminação (WEISSMAN; GOEBEL; BENEMANN, 1988; BECKER, 2008). A primeira abordagem padece, em geral, de superaquecimento (LUNDQUIST et al., 2010), enquanto a segunda de contaminação por outros organismos. Apesar dessas dificuldades, os fotobiorreatores fechados são reconhecidamente promissores quanto à pequena área que ocupam em comparação aos tanques abertos e quanto à baixa incidência de contaminação (KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010).

Reconhecendo as vantagens e limitações dos dois modelos de fotobiorreatores para cultivos de microalgas, nomeadamente, os tanques abertos e os fotobiorreatores tubulares fechados, uma equipe multidisciplinar projetou o *fotobiorreator híbrido* de 1000 L que utilizamos nesta pesquisa (capítulo 2). Esse modelo representa uma intersecção dos dois sistemas (abertos e fechados), incluindo as vantagens de ambos e, possivelmente, excluindo suas desvantagens. Assim, utilizamos um fotobiorreator em sistema de cultura semifechado, dentro do qual circula meio nutritivo para o crescimento de microalgas. Tal sistema apresenta maior possibilidade de controle de temperatura por evaporação similar aos sistemas abertos, mas evita a contaminação por outros organismos, tal qual os fotobiorreatores fechados.

Segundo Borowitzka e Moheimani (2013), a maior produção mundial de β -caroteno dá-se em tanques abertos, como na Austrália através do cultivo de *Dunaliella salina*. Entretanto, a maior produção de astaxantina dá-se em fotobiorreatores fechados por meio do cultivo de *Haematococcus pluvialis*, em Israel (PANIS; CARREON, 2016). Em comparação com tanques abertos em larga escala, que facilmente sofrem contaminação, os fotobiorreatores fechados oferecem menor risco e maior controle (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

Um dos grandes impasses na otimização da produção de biomassa algal fotossintética é a limitação por luz, causada por autossombreamento. Ou seja, sombreamento que uma célula faz sobre a outra em decorrência de alta concentração

celular (ANDERSEN, 2005). Com a intenção de superar o problema de autossombreamento, muito tem sido investigado sobre iluminação artificial (BAER et al., 2016; DUARTE e COSTA, 2018; GLEMSER et al., 2015).

A literatura mostra que em microalgas comprimentos de onda azul e vermelho e suas combinações podem afetar a composição bioquímica, vias metabólicas e expressão gênica (SCHULZE et al., 2014). Wishkerman e Wishkerman (2017) apresentaram uma ferramenta de baixo custo que melhora e promove o cultivo de microalgas por meio de LEDs conectados a um sistema que permite definição precisa da composição espectral fornecida aos cultivos. Ra et al. (2016) testaram diferentes condições de cultivo, inclusive fontes luminosas e comprimentos de onda oriundos de LEDs no desenvolvimento de *Nannochloropsis oculata*, *N. oceanica*, e *N. salina*. Sob luz azul, as três espécies apresentaram significativo aumento na produção de biomassa. Duarte e Costa (2018) buscaram avaliar o efeito de LED azul como fonte energética alternativa ao cultivo de *Chlorella fusca* e *Synechococcus nidulans* analisando os parâmetros de crescimento e produção de metabólitos. A luz LED azul induziu o acúmulo lipídico em 23% em *C. fusca* e aumentou em 80% a taxa de crescimento específica de *S. nidulans*. Assim, o tipo, frequência e intensidade luminosa utilizados em um cultivo de microalgas parecem estar diretamente relacionados à quantidade e qualidade de biomassa produzida. No Brasil, a produção de biomassa de microalgas dá-se principalmente para a aquicultura, na alimentação de camarões e moluscos (PEREIRA e ROCHA, 2015). Mas em países como a Alemanha, Áustria, França, Canadá e USA já existem empresas produtoras de microalgas consolidadas no mercado farmacêutico, cosmetológico e de suplementação alimentar (WANG et al., 2015; BARSANTI e GUALTIERI, 2018).

Diante desse cenário, há uma contínua busca por espécies de microalgas robustas e capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos e de como potencializar a biossíntese desses produtos. Dentre os compostos ativos de maior interesse comercial podemos citar os carotenoides e as proteínas (BECKER, 2008).

Pesquisas revelaram que espécies do gênero *Chlorella* contêm carotenoides que podem ser ingredientes de ração animal (GOUVEIA et al., 2008). Além dos carotenoides, as microalgas são potenciais fontes de proteínas, o que também tem despertado interesse pela produção em larga escala. Segundo Becker (2008), o conteúdo proteico de uma alga como a *Chlorella vulgaris* pode chegar a 58% em relação ao peso seco. As proteínas têm sua qualidade nutricional e funções determinadas pela sequência

e conteúdo de aminoácidos que as constituem (BOROWITZKA e BOROWITZKA, 1988; BOROWITZKA, 2013). A substância MMA (mycosporine-like amino acids), por exemplo, confere proteção contra raios ultravioletas e pode estar presente nas algas verdes (SATHASIVAM et al., 2017). Sob condições controladas em meio de cultivo BG11, *Chlorella kessleri* e *Chlorella* sp. apresentaram teores mais elevados de leucina (aminoácido essencial), glutamina, ácido aspártico e arginina (não essenciais), de acordo com Samek et al. (2013).

Considerando-se que a produção de microalgas tende a aumentar em futuro não muito distante, dado aos produtos que sintetizam, estudos que busquem por aplicações da biomassa podem ser vistos como contribuintes da sustentabilidade da produção algal. A geração de resíduos em cultivos industriais é certa e, após a extração de compostos de interesse a partir da biomassa, esta transformar-se-á em resíduo biológico. Mas, se esse resíduo tiver aplicação de interesse industrial, sendo a ele agregado um valor, o resíduo contribuirá para a sustentabilidade e viabilidade da produção.

Diversas são as aplicações que se pode dar à biomassa algal e, dentre elas, a peletização de sementes pode ser promissora. Montanhim et al. (2014) desenvolveram trabalho pioneiro na peletização de sementes utilizando biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. Os autores mostraram que essa biomassa pode ter aplicação como um dos componentes do material cimentante em peletização de sementes de sucupira preta (*Bowdichia virgilioides*), uma árvore nativa do cerrado brasileiro. Após peletização as sementes foram semeadas e valores de porcentagem de emergência de plântulas equivalentes aos das sementes nuas foram obtidos.

A peletização de sementes é prática comum na área agrícola, principalmente para pequenas sementes de hortaliças. Tal técnica tem por finalidade facilitar a mecanização da semeadura, além do benefício de agregar constituintes químicos diversos ao pélete. Dentre as vantagens no uso de sementes peletizadas, destacam-se a redução dos custos de produção de mudas, redução do trabalho manual de distribuição das sementes, possibilidade de incorporação de nutrientes e reguladores de crescimento (LOPES e NASCIMENTO, 2012; SILVA; SANTOS; NASCIMENTO, 2002). A peletização é um processo no qual as sementes são revestidas com camadas sucessivas e alternantes de material cimentante solúvel em água e responsável pela aderência ao tegumento da semente e de material de revestimento (LOPES e NASCIMENTO, 2012; SILVA e NAKAGAWA, 1998) de granulometria preferencialmente fina. Finalmente, a semente peletizada é seca e disponível à semeadura, já que a técnica proporciona

formato e massa adequados ao manuseio ou mecanização. Pelo fato do pélete formar uma barreira, que pode ser considerada protetora à semente, o agricultor pode investir em semeadura mecanizada e direta, dispensando-se a etapa de produção de mudas em viveiros e assim, reduzindo os custos financeiros (CONCEIÇÃO e VIEIRA, 2008). Mas, apesar de todas as vantagens da peletização, há algumas dificuldades descritas quanto ao uso de sementes peletizadas em comparação às sementes nuas, isto é, não peletizadas, tais como o atraso no tempo de germinação, menor emergência de plântulas e plântulas com aspectos atípicos (CORASPE; IDIARTE; MINAMI, 1993).

As microalgas constituem-se de material particulado (célula) e material dissolvido (mucilagem) aderido ao entorno celular (CARONNI et al., 2015). Considerando que o material mucilaginoso nas microalgas é higroscópico e constituído principalmente de polissacarídeos, e que a biomassa celular carrega consigo significativa quantidade de carboidratos, além de proteínas, lipídios (LOMBARDI et al., 2002; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; CHIA et al., 2013a; 2013b) e elementos minerais, acreditamos que a incorporação dessa biomassa algal na peletização de sementes possa contribuir para o processo de germinação das sementes peletizadas mantendo um microclima no seu entorno, o que é importante em períodos de baixa umidade.

Considerando todas as dificuldades que norteiam o cultivo de microalgas em larga escala, esta pesquisa buscou primeiramente entender a fisiologia da microalga Chlorophyta *Chlorella sorokiniana* em cultivos ampliados ao ar livre, com menos controle das condições ambientais em comparação a cultivos de laboratório sob condições controladas. Com a biomassa produzida, investigamos uma possível aplicação, qual seja, a peletização de sementes, visto que dado a composição da biomassa algal, poderíamos desenvolver uma peletização orgânica, ausente no mercado nacional e internacional. Como uma tentativa de alterar bioquimicamente a biomassa algal e vislumbrando ainda aumento de produção, sob condições controladas de laboratório estudamos fisiologicamente a microalga exposta a LEDs de diferentes cores/frequências.

Neste documento, apresentamos esta pesquisa na forma de capítulos, sendo o capítulo 1 referente à seleção de uma espécie de Chlorophyta de água doce dentre *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Seleccionada a microalga, seguimos utilizando a espécie para todo o restante da pesquisa. No capítulo 2 escalonamos o cultivo para 100 L e 1000 L com a espécie seleccionada, qual seja,

Chlorella sorokiniana. Esses cultivos nos renderam a biomassa a ser usada no estudo da aplicação da biomassa, a peletização de sementes orgânicas das hortaliças alface (*Lactuca sativa*) e almeirão (*Cichorium intybus*), cujos resultados são apresentados no capítulo 3. Finalmente, ciente de que a luz pode ser um dos fatores limitantes em cultivos microalgais, testamos diferentes frequências de diodos emissores de luz (LED) no crescimento e respostas fisiológicas de *C. sorokiniana*, como descrito no capítulo 4.

II. OBJETIVOS

II. 1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central desta pesquisa foi estudar fisiologicamente uma espécie de microalga Chlorophyta de água doce em várias escalas de cultivo, caracterizá-la bioquimicamente e aplicar sua biomassa na peletização de sementes.

II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar meio de cultura entre BG11 e solução hidropônica para o cultivo de uma Chlorophyta dentre *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*. Esta seleção de espécie teve como fundamento resultados de bioensaios em laboratório considerando a fisiologia da microalga e avaliando-se a taxa de crescimento e a composição bioquímica (lipídios, proteínas e carboidratos).

- Cultivar a espécie de microalga selecionada em culturas de 100 e 1000 L mantidas no pátio de cultivo de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar) em fotobiorreator híbrido, com a finalidade de estudar a espécie fisiologicamente e produzir biomassa para aplicações futuras na peletização de sementes de hortaliças.

- Avaliar a viabilidade das sementes peletizadas, tendo biomassa algal como parte dos materiais constituintes do pélete. Para tanto, testamos sementes das hortaliças alface (*Lactuca sativa*) e almeirão (*Chicorium intybus*). Estas foram peletizadas, semeadas e o desenvolvimento da plântula foi analisado comparando-se com sementes nuas.

- Em cultivos laboratoriais, estudar fisiologicamente a microalga selecionada sob diferentes cores/frequências de luz. Para tanto, utilizaram-se diodos emissores de luz (LED) nas frequências azul, vermelha e, azul em combinação com vermelha, sendo LED branca usada como controle.

III. METODOLOGIA GERAL

III. 1 Culturas algais em BG11 e solução hidropônica

As cepas das algas *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* foram usadas nesta pesquisa. *A. densus* e *C. vulgaris* foram gentilmente doadas pela Prof^a Dr^a Inessa L. Bagatini, curadora do Banco de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos. *C. sorokiniana* (211-32) é oriunda do Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese, da Universidade de Sevilla, Espanha.

Os meios de cultura utilizados foram solução hidropônica (HOAGLAND; ARNON, 1950 adaptado por CAMARGO et al., 2015) em concentração de 10 e 50% (H10% e H50%) e BG11 (RIPPKA et al., 1979). Solução hidropônica foi testada com o objetivo de se avaliar um meio de menor custo e por resultados pretéritos que mostraram menor contaminação (CAMARGO et al., 2015) e igual densidade celular final em culturas de *Selenastrum capricornutum* (MONTANHIM, 2013) em relação ao cultivo no meio L.C. Oligo. O meio de cultivo BG11 é reconhecidamente adequado para o cultivo do gênero *Chlorella* e amplamente utilizado (HENRARD, et al. 2015; SHARMA et al., 2016).

Por estarem em fase estacionária de crescimento, realizou-se aclimação das cepas antes do início dos procedimentos experimentais.

Foram utilizados Erlenmeyers com 500 mL de capacidade total e 200 mL de meio de cultura em pH 6,8. Os frascos contendo meio de cultivo foram esterilizados em autoclave (121 °C, 20 minutos). Uma cabine de fluxo laminar foi usada para qualquer manipulação dos cultivos e, para isso deixava-se o material dentro da cabine sob ar filtrado e luz ultravioleta por 15 minutos, para que condições assépticas fossem garantidas.

As culturas foram iniciadas com 5×10^4 células mL⁻¹ e feitas com três réplicas. O experimento permaneceu na sala de cultivo do Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar) sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo de 24 °C ±1, 190 μmol fótons m⁻² s⁻¹ e 12h claro/12h escuro, respectivamente.

O crescimento das algas foi acompanhado diariamente por meio da contagem de células em microscópio óptico (hemacitômetro do tipo Fuchs-Rosenthal), densidade óptica (NANOCOLOR UV/VIS de bancada (Macherey-Nagel, EUA), concentração de

clorofila *a* (Turner Designs, Trilogy, USA) e rendimento máximo fotossintético por meio do Phyto-PAM (Phytoplankton Analyzer, Heinz Waltz GmbH, Effeltrich, Alemanha). As tabelas 1 e 2 apresentam os componentes dos meios de cultura hidropônico e BG11 testados e suas concentrações, respectivamente.

Tabela 1. Composição do meio hidropônico utilizado para o cultivo de *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*.

Componentes	Concentração (mol L⁻¹)
Rexolim M48 (Fe Edd HMa) Yara	$2,3 \times 10^{-5}$
Calcinit (Nitrato de Cálcio)	$9,14 \times 10^{-5}$
Crista K (Nitrato de Potássio)	$3,95 \times 10^{-3}$
Sulfato de Magnésio	$2,82 \times 10^{-3}$
Crista MAP (Fosfato monoamônio)	$2,3 \times 10^{-5}$
KSC mix Roullier (micronutrientes)	$6,15 \times 10^{-6}$

Tabela 2. Composição do meio BG11 utilizado para o cultivo de *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana*.

Componentes	Concentração (mol L⁻¹)
Ácido cítrico	$3,12 \times 10^{-5}$
Citrato amônio férrico	3×10^{-5}
NaNO ₃	$1,76 \times 10^{-2}$
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	$1,75 \times 10^{-4}$
MgSO ₄ . 7H ₂ O	$3,04 \times 10^{-4}$
CaCl ₂ . 2H ₂ O	$2,45 \times 10^{-4}$
Na ₂ CO ₃	$1,89 \times 10^{-4}$
MgNa ₂ EDTA . H ₂ O	$2,79 \times 10^{-6}$
H ₃ BO ₃	$4,63 \times 10^{-5}$
MnCl ₂ . 4H ₂ O	$9,15 \times 10^{-6}$
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	$7,65 \times 10^{-7}$
CuSO ₄ . 5H ₂ O	$3,16 \times 10^{-7}$
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	$1,61 \times 10^{-6}$
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	$1,7 \times 10^{-7}$

III. 2 Culturas algais em 100 e 1000 L

Para este estudo utilizou-se a microalga *Chlorella sorokiniana* mantida no banco de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas. Os cultivos que serviram como inóculo cultivados em condições laboratoriais foram realizados em meio de cultura BG11 (RIPPKA et al., 1979) previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm, 20 minutos).

Os inóculos para os cultivos em larga escala (100 e 1000 L) tinham volume de 10% do total da cultura a ser iniciada (BURLEW, 1976) e foram obtidos de cultivos em fase exponencial de crescimento e saudáveis segundo critério apresentado em Lombardi e Maldonado (2011). Este consistia em monitorar diariamente os inóculos para rendimento quântico fotossintético máximo e os mesmos seriam utilizados somente se o valor 0,70 ou maiores eram obtidos, comprovando condições saudáveis.

Tais inóculos foram gradativamente escalonados até atingir volume e densidade suficientes para chegar em 10% do volume total e os volumes ampliados foram iniciados em 10^6 células mL^{-1} . A partir de 5 L, as culturas passaram a ser borbulhadas com ar ambiente. Inóculos para os cultivos de 1000 L foram preparados em caixas de plástico transparente e atóxico (100 L) que permaneceram ao ar livre, no pátio de cultivo de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas. Em 100 e 1000 L pedras porosas foram usadas para borbulhamento e agitação foi gerada por uma bomba submersa (2000 L h^{-1}). Nesses cultivos, o controle do pH foi realizado por injeção de CO_2 controlada pela variação do pH dos cultivos, que foi deste modo mantido em faixa previamente definida de pH 6,5 a 7,2. A liberação de CO_2 foi feita por meio de uma válvula solenoide acoplada a um painel eletrônico (M200, Alemanha, Mettler Toledo®).

O material dos fotobiorreatores de 100 L foi composto por plástico (25 cm de diâmetro e 4.1 m de altura) transparente e os de 1000 L por vidro transparente e incolor (3,22 comprimento x 0,51 largura x 0,76 m de altura), como observado na figura 1.

Para limpeza e desinfecção da água antes do início dos cultivos, já nos reatores de 100 L e de 1000 L com as bombas agitadoras submersas, foi adicionado cloro na concentração final de 0,2%, que permaneceu nos reatores por 12 horas. Após esse tempo, adicionou-se tiosulfato de sódio ($0,02 \text{ g L}^{-1}$) para neutralização do cloro. Em seguida, houve adição das soluções com nutrientes, que eram deixadas em equilíbrio por cerca de 4 h, quando o inóculo era adicionado e então dava-se início os cultivos em escala ampliada.

Os experimentos nos fotobiorreatores de 1000 L foram realizados em duas etapas a fim de se obter triplicata. Os experimentos de 100 L foram realizados com 3 réplicas, mantidas simultaneamente.

Para os cultivos em 1000 L, a temperatura mínima de 25 °C foi mantida por meio de termostatos, mas durante o dia a temperatura máxima atingiu 39 °C, mesmo com sombrite 50%. Após 24 h de cultivo, momento em que o pH apresentava valores acima de 7,0 e após adaptação das células à nova condição, dava-se início o borbulhamento automático de CO₂ controlado por pH e borbulhamento de ar através de um compressor. O monitoramento do pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido foram executados da mesma forma e com o mesmo equipamento dos eletrodos que mensuravam pH/CO₂. Os dados foram registrados a cada minuto por meio do painel eletrônico (Mettler Toledo®).

Para os cultivos nas escalas ampliadas, as condições ambientais foram fundamentalmente as do ambiente (exceto pela temperatura mínima, sendo esta controlada por termostatos). A máxima umidade relativa do ar foi 86% e a mínima 14%. A temperatura máxima foi 33,6 °C e a mínima 12 °C. Já o máximo volume pluvial foi 10,6 mm, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia, estação automática de São Carlos/SP.

A intensidade luminosa interna nos cultivos de 100 e 1000 L foi mensurada ao sol e à sombra por meio de um sensor esférico digital (Biosciences, LI-COR®, LM 5026, USA).

A obtenção da biomassa desses cultivos deu-se por meio de uma membrana polimérica, a fim de concentrar as células e evacuar o meio de cultivo segundo procedimento descrito em Haneda et al. (2015). Como esta membrana resulta em adensamento da cultura, permanecendo ainda na forma líquida, em seguida, a cultura adensada era concentrada até forma pastosa em uma desnatadeira (108GR, Brasil). A pasta de *C. sorokiniana* era armazenada em freezer em temperatura de -22 °C. Essa pasta de biomassa de *Chlorella sorokiniana* era obtida em final da fase exponencial de crescimento.



Figura 1. Cultivos de *Chlorella sorokiniana* em a) 100 L e b) 1000 L. Fonte: arquivo pessoal.

III. 3 Peletização de sementes de alface e almeirão

Pequenas porções de biomassa congelada de *C. sorokiniana* foram utilizadas para a peletização de sementes. Utilizamos sementes orgânicas, já que a biomassa algal é considerada como produto orgânico.

Origem e tratamento das sementes

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e almeirão (*Cichorium intybus* L.), ambas hortaliças folhosas, foram gentilmente doadas pelo Sr. Romeu Mattos Leite, da Vila Yamaguishi, centro referência de produção de alimentos orgânicos em Jaguariúna-SP. Essas hortaliças foram escolhidas por apresentarem sementes pequenas, situação em que a peletização é particularmente importante e, por possuírem alto consumo nacional.

Para a verificação da qualidade das sementes, simultaneamente ao experimento de peletização, foi determinada a porcentagem de germinação das sementes em sala com temperatura, iluminação e fotoperíodo controlados, sendo 24 °C, 266 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 13h/11h (fotoperíodo médio dos dias em que o experimento ocorreu), claro/escuro, respectivamente. Além disso, determinamos também o teor de água (BRASIL, 2009) e a condutividade elétrica quando as sementes nos foram doadas e no decorrer do experimento. A porcentagem de germinação de sementes nuas foi aferida simultaneamente ao experimento com sementes peletizadas e no mesmo ambiente com condições controladas.

Quatro placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram autoclavadas (121 °C por 20 minutos) juntamente com duas folhas de papel filtro (substrato) para a verificação da germinação de cada espécie de hortaliça. As placas foram umedecidas com água destilada em volume correspondente a três vezes a massa (g) do substrato (BRASIL, 2009).

Cinquenta sementes foram postas em cada placa, que foram vedadas com filme PVC e este perfurado com agulha previamente higienizada. As réplicas, tanto de almeirão quanto de alface, foram mantidas em ambiente com condições controladas laboratoriais e, assim, a porcentagem de germinação foi aferida simultaneamente ao decorrer do experimento com sementes peletizadas.

A determinação do teor inicial de água das sementes nuas e peletizadas foi realizada pesando-se 400 sementes de cada tratamento e espécie e subdividindo essa amostra em 4 sub amostras de 100 sementes. Nesse momento, mensurou-se a massa de

1000 sementes. Estas foram secas em estufa de circulação forçada a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 h (BRASIL, 2009). A determinação da condutividade elétrica foi realizada com sub amostras equivalentes, às quais foram adicionados 75 mL de água deionizada em recipiente plástico vedado com PVC. O teste foi mantido em sala com condições controladas de temperatura ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 horas antes da leitura em condutivímetro digital.

Processo de peletização

A biomassa algal úmida de *Chlorella sorokiniana* foi utilizada como material cimentante em todos os tratamentos que envolveram peletização (MONTANHIM, 2014). Foram utilizados três réplicas de dez unidades cada de quatro tratamentos para alface e almeirão, como apresentados abaixo:

- a) Sementes nuas (controle do processo).
- b) Sementes peletizadas com argila em pó como material de revestimento + biomassa algal.
- c) Sementes peletizadas com farinha de trigo orgânica como material de revestimento + biomassa algal.
- d) Sementes peletizadas com argila em pó + farinha orgânica na mesma proporção (v/v) como material de revestimento + biomassa algal.

As sementes foram imersas na biomassa algal até total recobrimento. Em seguida, o material de revestimento foi pulverizado. Nesse momento, inserimos o recipiente com as sementes e os materiais de revestimento e cimentante em um motor, para que o movimento giratório tornasse os péletes mais arredondados, já que ambas as sementes são pequenas e cilíndricas. As sementes permaneceram intocadas por 24 horas. Após esse tempo, pulverizamos água nos péletes com um borrifador e inserimos o material de revestimento novamente. Esperaram-se mais 24 horas para a semeadura.

A peletização das sementes das hortaliças alface e almeirão foi feita em etapas e a figura 2 mostra o resultado final. Os péletes (C) e a semente nua (A) foram utilizados no plantio das hortaliças.



Figura 2. Processo de peletização de sementes de alfaca. A) semente nua. B) primeira etapa e C) péletes. Fonte: arquivo pessoal.

Semeadura

Foram semeados 30 péletes (ou sementes nuas) de cada tratamento em copos plásticos vazados com 80 g de solo a 1 cm da superfície. Os recipientes foram mantidos em sala com temperatura, iluminação e fotoperíodo controlados, sendo 24° C, 266 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 13h/11h, claro/escuro, respectivamente.

Capacidade de campo e umidade do solo

O solo utilizado no experimento com sementes foi oriundo de compostagem e foi gentilmente doado por gestores de uma produção familiar da cidade de São Carlos (SP) e foi analisado pelo Laboratório de Solos, ESALQ-USP, cujos resultados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do solo utilizado na semeadura de sementes e péletes de alface e almeirão.

Parâmetro	Unidade	Valor
Boro (água quente)	mg dm ⁻³	0,44
pH (CaCl ₂)		5,6
Areia total	g kg ⁻¹	769
Cobre (DTPA)	mg dm ⁻³	19,6
M.O. (colorimétrica)	g dm ⁻³	48
Ferro (DTPA)	mg dm ⁻³	143
P (Resina)	mg dm ⁻³	592
Silte	g kg ⁻¹	73
Manganês (DTPA)	mg dm ⁻³	10,8
S (Fosfato de cálcio 0,01 mol L ⁻¹)	mg dm ⁻³	< 6
K (Resina)	mmolc dm ⁻³	1,5
Zinco (DTPA)	mg dm ⁻³	21,2
Ca (Resina)	mmolc dm ⁻³	85
M.O. (Titulação)	g kg ⁻¹	35
Argila	g kg ⁻¹	158
Carbono orgânico	g kg ⁻¹	20
Mg (resina)	mmolc dm ⁻³	26
Al (KCl 1 mol L ⁻¹)	mmolc dm ⁻³	1
H+Al (SMP)	mmolc dm ⁻³	15
SB	mmolc dm ⁻³	112,5
CTC	mmolc dm ⁻³	127,5
V	%	88
M	%	1

Primeiramente, mensuramos a capacidade de campo do solo, que é considerada como a maior quantidade de água que o mesmo é capaz de armazenar sem haver perdas de água por infiltração (LUCIETTI, 2012). Para isso, colocamos uma proveta embaixo do recipiente em que estava o solo e adicionamos água até o gotejamento. Esperamos o gotejamento cessar e a água excedente foi armazenada na proveta. Por meio da subtração do volume adicionado do volume escoado na proveta, mensuramos o volume correspondente a 100% da capacidade de campo (FOLTRAN; TEIXEIRA, 2004).

Um recipiente com solo foi usado como referência e todos os dias o procedimento descrito foi realizado a fim de se saber a quantidade de água a ser adicionada correspondente a 60% de capacidade de campo, valor utilizado nesse trabalho.

III. 4 Culturas de *C. sorokiniana* sob diferentes frequências/cores de luz

Os inóculos da microalga *Chlorella sorokiniana* foram preparados em 800 mL de meio de cultivo BG11 (RIPPKA et al., 1979) previamente autoclavados (121 °C por 20 minutos) e em cabine de fluxo laminar com concentração inicial de 5×10^4 células mL^{-1} em frascos de cultura de tecido com capacidade de 1 L.

Trabalhamos com quatro diferentes cores de luz emitidas por LEDs azul (A), vermelha (V), azul e vermelha (AV) e, branca (BR), como mostra a figura 3. Todos os tratamentos foram submetidos à mesma intensidade luminosa, a saber, $190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mensurada por um medidor de intensidade luminosa PAR digital (Walz, modelo US-SQS/L, Alemanha). Essas cores foram escolhidas devido à emissão de f\u00f3tons em comprimentos de onda que coincidem com a regi\u00e3o de m\u00e1xima absor\u00e7\u00e3o das mol\u00e9culas de clorofila, pigmento componente do fotossistema II de microalgas verdes (CAMPBELL; REECE, 2001; LIMA et al., 2018). As lâmpadas de LED utilizadas no presente trabalho apresentam 14 W de emiss\u00e3o por metro de consumo, 12 V e 40000 horas de dura\u00e7\u00e3o. Nosso experimento durou 360 horas.

O experimento foi realizado em triplicata e mantido na sala de cultivo do Laborat\u00f3rio de Biotecnologia de Algas, UFSCar em $24^\circ\text{C} \pm 1$ com fotoper\u00edodo de 12h/12h claro/escuro.

O tipo de cultivo realizado foi semicont\u00ednuo, em que houve retirada de cultura a cada 72 horas e adi\u00e7\u00e3o de meio de cultivo previamente autoclavado no mesmo volume retirado de modo que a concentra\u00e7\u00e3o celular voltasse a ser 5×10^4 células mL^{-1} . A retirada de cultura e posterior adi\u00e7\u00e3o de meio de cultivo ocorreram quatro vezes, totalizando cinco etapas e 360 horas.

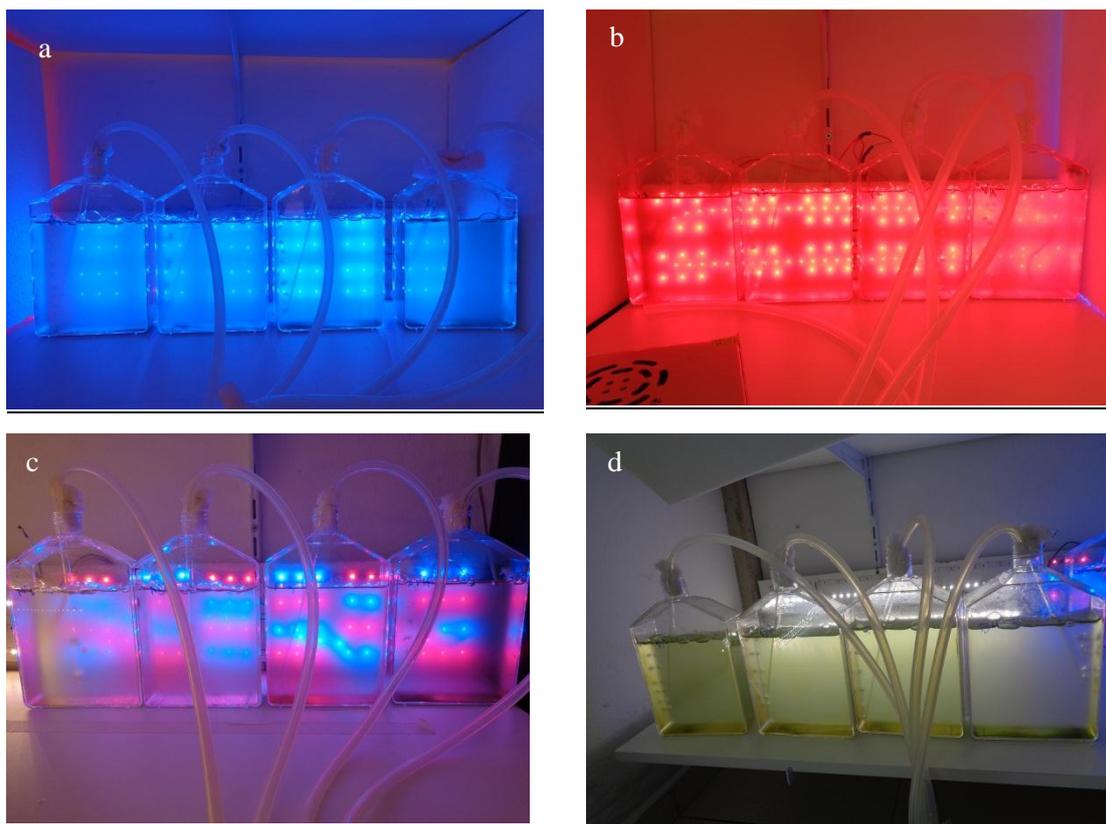


Figura 3. Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob diferentes fontes luminosas. a) azul, b) vermelha, c) azul + vermelha (50%/50%) e d) branca. Fonte: arquivo pessoal.

CHN (carbono:hidrogênio:nitrogênio)

A análise elementar para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi realizada no Centro analítico de instrumentação da Universidade de São Paulo em um analisador elementar - Perkin Elmer 2400 series II. Seu funcionamento é baseado no método de Pregl-Dumas, em que as amostras são submetidas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector de condutividade térmica.

III. 5 Análises estatísticas e produção de figuras

Para comparação dos dados utilizamos o programa Assistat 7.7. Após verificarmos a normalidade e homogeneidade dos dados, estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) univariada para dados paramétricos ou ao teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos ($p < 0,05$). Para a elaboração de gráficos, utilizamos o programa Igor Pro 5.03 (Wavemetrics, U.S.A.).

III. 6 Monitoramento diário dos cultivos

Taxa de crescimento

2 mL de amostra foram retirados uma vez ao dia e fixados com solução de lugol ácida para posterior contagem de células em câmara do tipo Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico (Leica, Alemanha).

As taxas de crescimento específicas (μ) foram obtidas pelo método de representação gráfica que considera como variável dependente o logaritmo natural do número de células por mL de cultivo e como variável independente o tempo experimental. A curva de crescimento assim obtida é submetida ao ajuste por regressão linear na parte exponencial de crescimento e, o coeficiente angular da equação representa a taxa de crescimento específica.

Rendimento fotossintético máximo

Em fase exponencial de crescimento uma amostra de 3 mL era obtida e deixada por 20 minutos no escuro. Em cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico, a amostra era inserida no equipamento onde os pulsos de luz com amplitude modulada (PHYTOPAM - Phytoplankton Analyzer, Heinz Waltz GmbH, Alemanha) eram aplicados. Inicialmente, com as células aclimatadas ao escuro obtém-se a medida de fluorescência basal (F_0) mediante pulso de luz de $1 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, incapaz de excitar os centros de reação. O que se quantifica é a fluorescência natural emitida pela molécula de clorofila *a*, pigmento utilizado para a realização da etapa fotoquímica (STREIT et al., 2005). Nesta situação, os centros de reação do fotossistema II (PSII) estão ávidos por receber elétrons (oxidados), como se observa na figura 4 e então um pulso de luz saturante ($2000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 0,2 segundos é aplicado.

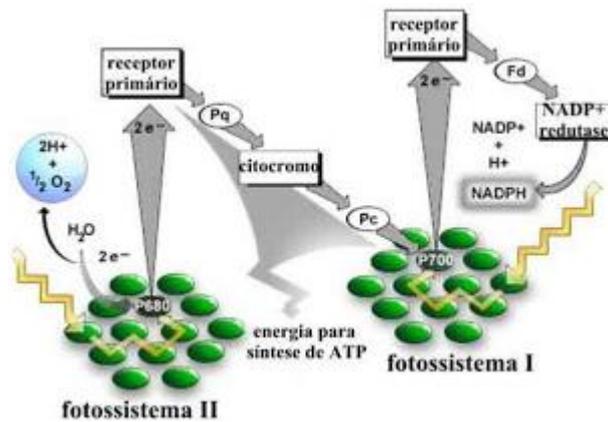


Figura 4. Esquema da fase fotoquímica fotossintética, mostrando os fotossistemas II e I e os centros de reação na cadeia transportadora de elétrons. Fonte: RAVEN (2007).

Esse procedimento tem por finalidade saturar todos os centros de reação de modo que a célula não seja capaz de absorver a luz e, portanto, fluoresce em seu máximo, expressando a fluorescência máxima (F_m). A diferença entre F_m (máximo) e F_o (mínimo) recebe o nome de F_v (fluorescência variável). Ao analisarmos F_v em relação à F_m (F_v/F_m), temos o rendimento quântico máximo, com as células adaptadas ao escuro. Esse valor é uma representação do potencial máximo de fluorescência relacionado à eficiência fotossintética que as células fotoautotróficas apresentam. A teoria embasadora da técnica PAM pode ser encontrada em Maxwell e Johnson (2000). Alterações no valor do rendimento quântico máximo podem denotar estresses fisiológicos afetando o processo fotossintético. Em termos práticos, em nosso estudo esta medida teve por finalidade avaliar os inóculos antes de utiliza-los como inoculantes e o estado fisiológico geral dos cultivos em todas as escalas.

A figura 5 mostra um esquema com os níveis fundamentais de fluorescência obtidos a partir da fluorometria PAM.

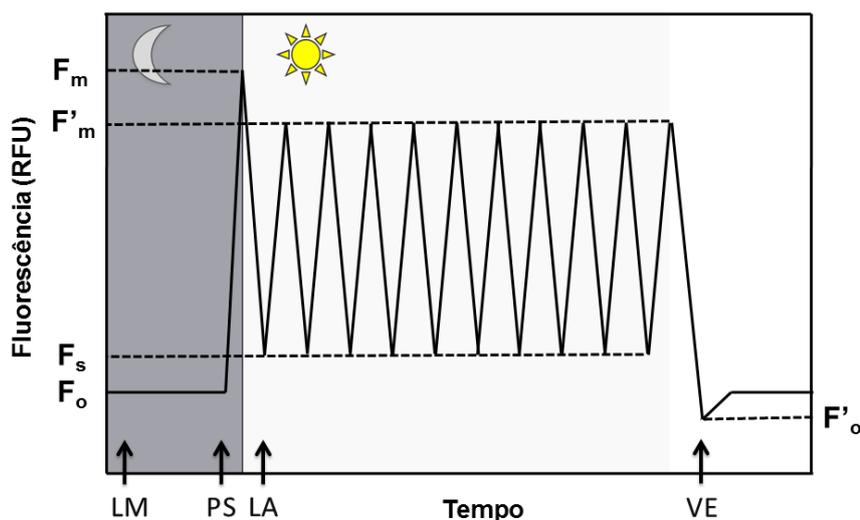


Figura 5. Representação esquemática dos cinco níveis de fluorescência, em unidades relativas (RFU), obtidos a partir da fluorimetria PAM: fluorescência máxima em adaptação ao escuro (F_m); fluorescência máxima em adaptação à luz (F'_m); fluorescência mínima em adaptação ao escuro (F_o); fluorescência mínima em adaptação à luz (F'_o) e fluorescência em estado estável de transporte de elétrons (F_s). Quatro tipos de luz são usados durante as leituras: luz modulada (LM); pulso saturante (PS); luz actínica (LA) e luz na faixa do vermelho-extremo (VE). Fonte: Camargo (2016).

Concentração de clorofila *a in vivo*

A concentração de clorofila *a in vivo* foi determinada utilizando-se um fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, USA). Amostras vivas e adaptadas ao escuro foram inseridas no equipamento que registra o sinal de fluorescência em unidades relativas (RFU). Para a conversão deste valor em concentração de clorofila *a*, uma curva de calibração em que a variável independente é a concentração de clorofila *a* extraída de uma cultura de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento em diferentes densidades *versus* a fluorescência da clorofila *a* como variável dependente é determinada. Após ajuste da parte linear desta curva, a equação resultante foi usada para a transformação dos valores de fluorescência (RFU) em concentração de clorofila *a* (mg L^{-1}).

As equações utilizadas para conversão de unidades relativas de fluorescência (RFU) em concentração de clorofila *a* em mg L^{-1} foram obtidas em intervalos entre 25 e 90 (equação 1), 90 e 2300 (equação 2) e 2300 e 20000 (equação 3), como ilustrado na figura 6.

$$[\text{chl } a] = (\text{RFU} - 22,57) / 34 \quad (1)$$

$$[\text{chl } a] = (\text{RFU} - 50,48) / 28165 \quad (2)$$

$$[\text{chl } a] = (\text{RFU} - 1190,7) / 21627 \quad (3)$$

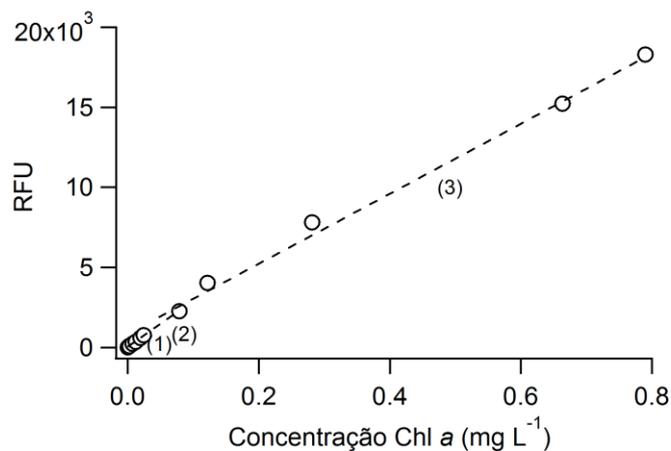


Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração de clorofila a. Os números (1), (2) e (3) representam as áreas do gráfico correspondentes às respectivas equações.

Densidade óptica

Como medida de aumento de biomassa nos cultivos, a densidade óptica também foi mensurada em 684 nm, por meio de espectrofotômetro digital (NANOCOLOR UV/VIS de bancada (Macherey-Nagel, EUA) em 3 mL de amostra.

III. 7 Monitoramento em fase exponencial de crescimento

Biomassa seca

Filtros de fibra de vidro (47 mm de diâmetro, 0,7 µm de diâmetro de poro, Sartorius, Alemanha) tiveram sua massa aferida em balança digital de precisão de quatro casas decimais.

Uma alíquota de cultivo microalgal (50 a 100 mL) foi filtrada em filtros previamente pesados por meio de sistema de filtração a vácuo. Com a biomassa algal, os filtros foram secos em estufa de circulação forçada até a estabilização da massa, geralmente após 48 horas a 38 °C, pois a partir da temperatura de 40 °C a degradação de ácidos graxos voláteis se intensifica (CHALIMA et al., 2017). Permaneceram em

dessecador com sílica por 30 minutos para posterior aferição da massa dos filtros com as células. Subtraindo-se este valor do filtro sem células obteve-se a massa seca das células.

Rendimento fotossintético efetivo ($\phi'M$)

Após os passos para mensuração de rendimento quântico máximo, acionou-se a luz actínica em intensidade próxima à que foi utilizada para o desenvolvimento das culturas ($190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as culturas mantidas em condições laboratoriais). Pulsos de luz de mesma intensidade foram acionados a cada 20 segundos por 15 minutos. Uma vez atingido o estado estável da fluorescência da clorofila (F_s), a fluorescência máxima em condição de adaptação à luz ($F'm$) foi então medida. Com os valores de F_s e $F'm$, foi possível a obtenção dos valores de rendimento fotossintético efetivo, dado por $(F'm-F_s)/F'm$.

A fluorescência mínima ($F'o$), em ausência de luz actínica, foi mensurada a partir de $F_o/(F_v/F_m)+(F_o/F'm)$, de acordo com Oxborough e Baker (1997).

Após aproximadamente 15 minutos houve estabilização dos valores de rendimento fotossintético efetivo, cuja média foi utilizada. Trata-se do rendimento da fluorescência emitida pela microalga em condições de adaptação à luz.

Decaimentos de fluorescência (*quenchings*)

Segundo Juneau, El Berdey e Popovic (2002), mensuramos os valores dos três tipos de dissipações (*quenchings*). O *quenching* fotoquímico (qP) representa a quantidade de energia luminosa diretamente direcionada à fotoquímica da fotossíntese (equação 4). O *quenching* não fotoquímico (qN, equação 5) expressa a energia dissipada (não claramente definida em termos científicos) e, o NPQ representa a quantidade de energia dissipada na forma de calor e que, portanto, não é direcionada à fotoquímica (equação 6).

$$qP = (F'm-F_s) / (F'm-F'o) \quad (4)$$

$$qN=1-[(F'm-F'o)/(F_m-F_o)] \quad (5)$$

$$NPQ=(F_m-F'm)/F'm \quad (6)$$

Fixação de carbono

A biofixação do carbono ou produtividade primária não foi quantificada diretamente. Utilizamos para o cálculo vários parâmetros, dentre eles os valores de clorofila *a* (mg m^{-3}) por meio de um fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, EUA), rendimento fotossintético efetivo, intensidade luminosa utilizada para a obtenção de seus valores e absorção da clorofila *a* (média dos valores de absorbância para os picos nos comprimentos de onda em 400 nm e 700 nm), que compreendem os picos de absorção da molécula de clorofila *a*.

Após a obtenção desses quatro valores, foi necessário o valor do coeficiente da média das absorbâncias. Segundo Cosgrove e Borowitzka (2010), a absorbância (medida em unidades relativas – AU) pode ser convertida em um coeficiente (a , m^{-1}) quando se considera o comprimento do percurso óptico (l , m^{-1}) por meio da equação (7).

$$a = (2,303 \cdot A)/l \quad (7)$$

Sendo A a média dos valores de absorbâncias e l é o comprimento da cubeta, que corresponde ao caminho óptico, sendo seu valor 0,01 m. A unidade de a é m^{-1} . Por meio da equação 8, a pode ser convertido em um coeficiente de absorção específico para clorofila *a* (a^* , $\text{m}^2 \text{mg}^{-1}$).

$$a^* = a/[\text{Chl } a] \quad (8)$$

O cálculo da taxa absoluta de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol e}^- [\text{mg Chl } a]^{-1} \text{s}^{-1}$) foi feito conforme a equação 9, de acordo com Kromkamp e Forster (2003).

$$\text{ETR}_{\text{absoluta}} = a^* \cdot \Phi' M \cdot \text{PAR} \cdot 0,5 \quad (9)$$

Sendo, 0,5 valor que corresponde ao fracionamento da luz incidente que segue para os dois fotossistemas (PSI e PSII). O valor de ETR absoluta é reportado em $\mu\text{mol f\u00f3tons mg de Chl } a^{-1} \text{h}^{-1}$.

A taxa de incorporação do carbono (C) ou biofixação do carbono (P^B – $\mu\text{mol C} [\text{mg Chl } a]^{-1} \text{h}^{-1}$) foi estimada de acordo com Morris et al. (2008) segundo a equação 10. O coeficiente de rendimento da fixação de carbono (Φ_e – $\text{mol C} [\text{mol el\u00e9trons}]^{-1}$) que

utilizamos foi teórico, de 0,25 (GILBERT et al., 2000), considerando 4 elétrons envolvidos na fixação de uma molécula de CO₂.

$$P^B = ETR_{\text{absoluta}} \times \Phi_e \quad (10)$$

Curvas rápidas de saturação de luz e seus parâmetros

As curvas de saturação luminosa foram obtidas por meio do Phyto-PAM, que fornece o rendimento fotossintético efetivo em função do aumento da intensidade luminosa incidente em pulsos de luz com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) no intervalo de 0 a 1728 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a cada 20 segundos durante aproximadamente 7 minutos, resultando em valores de $\phi'M$ para cada pulso de luz.

Multiplicamos as m\u00e9dias dos valores de $\phi'M$ pelos valores correspondentes de PAR (ENR\u00cdQUEZ; BOROWITZKA, 2010).

O ajuste da curva de saturação de luz foi feito de acordo com Jassby e Platt (1976) para a obtenção do valor de inclinação inicial da curva (α), região na qual somente a luz era fator limitante. Nesse intervalo, \u00e9 poss\u00edvel relacionar a convers\u00e3o de luz em energia. A m\u00e1xima taxa de transporte de el\u00e9trons ($ETR_{\text{m\u00e1xima}}$) e a irradia\u00e7\u00e3o saturante (E_k), ponto a partir do qual a luz pode ocasionar fotoinibi\u00e7\u00e3o, tamb\u00e9m foram obtidos por meio dos coeficientes fornecidos pelo ajuste, utilizando-se o software Igor Pro\u2122.

Curvas de saturação de luz foram realizadas e os gr\u00e1ficos elaborados com taxa relativa de transporte de el\u00e9trons no eixo y (rETR) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) no eixo x.

Prote\u00ednas totais

Para mensuração da concentração total de prote\u00ednas, seguiu-se metodologia proposta por Bradford (1976).

Utilizou-se o reagente *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma) para a rea\u00e7\u00e3o. Para a confec\u00e7\u00e3o de curva de calibra\u00e7\u00e3o utilizamos albumina de soro bovino (BSA) (Sigma) como padr\u00e3o na concentra\u00e7\u00e3o de 1 mg mL⁻¹, em dilui\u00e7\u00e3o serial e cuja curva de calibra\u00e7\u00e3o est\u00e1 representada na figura 7.

Todos os materiais utilizados foram previamente imersos em \u00e1cido clor\u00eddrico 5% e as ponteiras utilizadas em curva de calibra\u00e7\u00e3o foram autoclavadas.

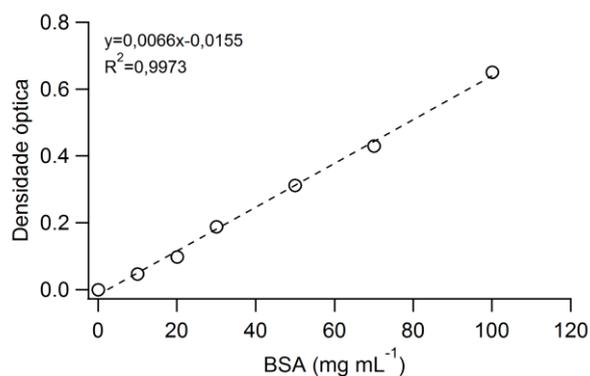


Figura 7. Ajuste linear da curva de calibração para análise de proteínas totais, considerando valores de absorvância de 595 nm versus o aumento da concentração de BSA (albumina de soro bovino).

Carboidratos totais

Para mensuração da concentração total de carboidratos, seguiu-se metodologia proposta por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013).

Para a curva de calibração utilizamos glicose (Synth, Brasil) como padrão na concentração de 1 mg mL⁻¹, em diluição serial e cuja curva de calibração está representada na figura 8.

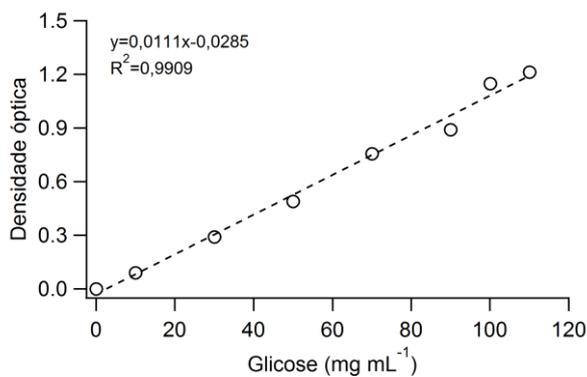


Figura 8. Ajuste linear da curva de calibração para análise de carboidratos totais, considerando valores de absorvância de 315 nm versus o aumento da concentração de glicose.

Lipídios totais

Para mensuração da concentração total de lipídios, seguiu-se metodologia proposta por Parrish (1999) modificada, que utiliza um IATROSCAN TLC/FID (Iatron Laboratories, Japão) como instrumento detector. A cromatografia é de camada delgada em colunas (*rods*) organizadas em conjuntos de dez unidades dispostas em uma estrutura metálica (*rack*) com detecção por ionização em chama. A modificação constou do uso de apenas quatro lipídios em vez de nove, como descrito no método original e, ao invés de varredura parcial, foi feita varredura única. Todos os materiais de vidro, com exceção de balões volumétricos e provetas, foram calcinados em forno mufla a 450 °C por 8 horas. Em seguida, foram enxaguados com metanol e clorofórmio.

A calibração foi feita com solução dos padrões Glycerol tripalmitate, DL- α -Palmitin, 1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine e Nonadecane (Sigma Aldrich), em concentração de 10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ utilizando-se diferentes volumes para o processo cromatográfico para a obtenção de diferentes concentrações na curva de calibração, que estão representadas na figura 9.

Os picos foram obtidos por meio do programa Peak Simple e os valores das áreas de retenção foram utilizados para se obter os valores de concentrações de lipídios, por meio das equações.

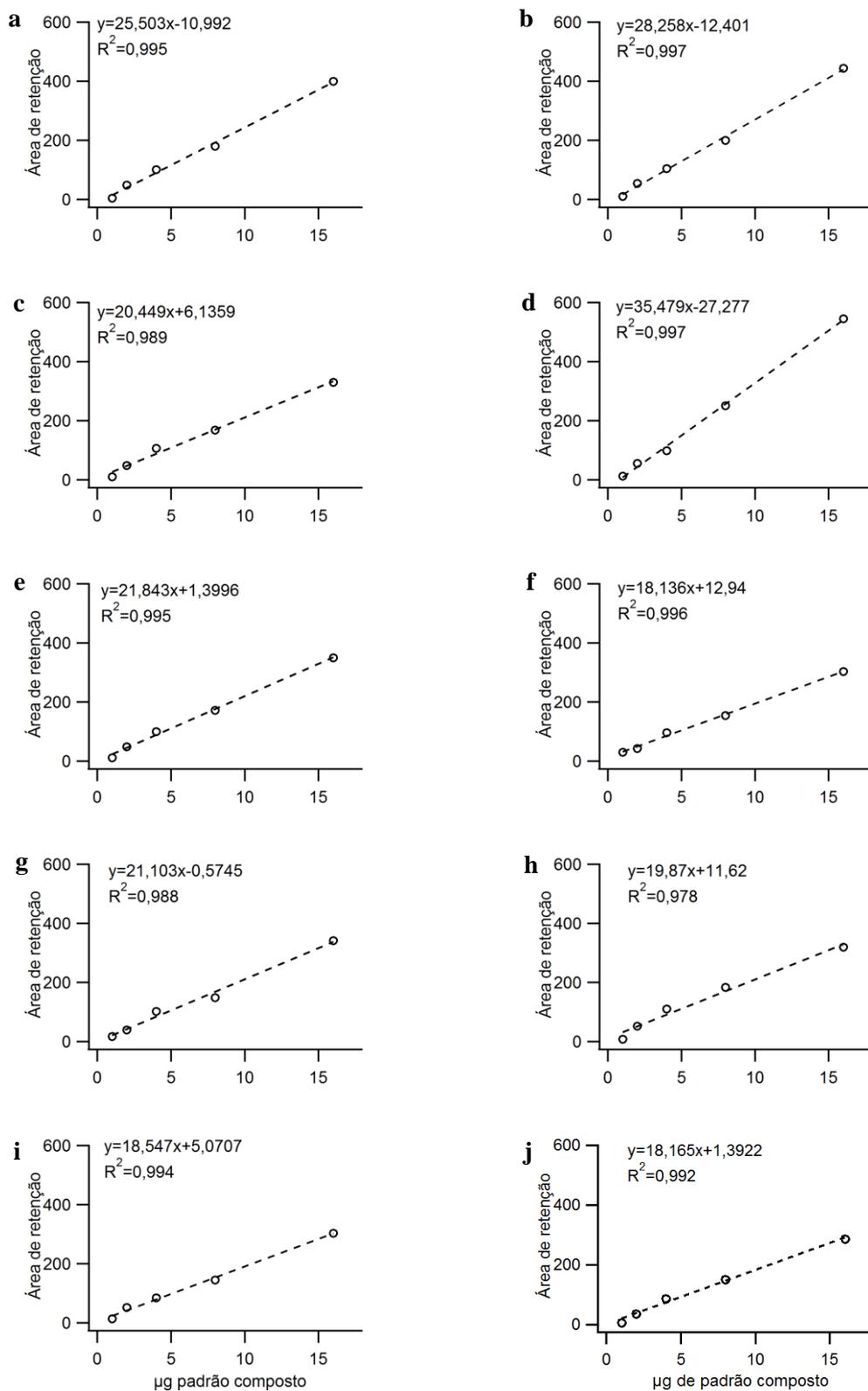


Figura 9. Curvas de calibração das cromatorods (as letras a-j correspondem às rods 1 a 10) componentes das racks com padrão composto.

REFERÊNCIAS

- 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**, v97, p253-261, 2013.
- ANDERSEN, R.A. Algal cultural techniques. **Elsevier**, 589p, 2005.
- BARSANTI, L; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, v31, p107-115, 2018.
- BAER, S.; HEINING, M.; SCHWERNA, P.; BUCHHOLZ, R.; HÜBNER, H. O. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. **Algal Research**, v14, p109-115, 2016.
- BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**. 293 p., New York., 2008.
- BEHRENS, P.W. Photobioreactors and fermenters: The light and dark sides of growing algae. In: ANDERSEN, R.A. **Algal culturing techniques**. Elsevier Academic Press, 589p, 2005.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v26, p9-20, 2008.
- BILANOVIC, D; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G. **Energy Conversion and Management**, v20, p262–267, 2009.
- BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae – their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v25, p743-756, 2013.
- BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. *Dunaliella*. In: Borowitzka M.A.; Borowitzka L.J. (eds) **Micro-algal biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, p27–58, 1988.
- BOROWITZKA, M.A.; MOHEIMANI, N.R. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v18, p47-72. 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. v72, p248-254, 1976.
- BRASIL. **Ministério da agricultura e reforma agrária. Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 398p, 2009.
- BURLEW, J.S. **Algal culture from laboratory to pilot plant**. Washington DC, 1976.
- CAMARGO, E.C.; CASALI, C.A.; LOMBARDI, A.T.; LIMA, M.I.S. Coupling microalgal cultures with hydroponics: prospection for clean biotechnology processes. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v6, n1, p88-94, 2015.
- CAMARGO, E.C. **Cultivo de *Chlorella sorokiniana* exposta a gases de combustão (CO₂, NO₂ e SO₂): crescimento, fotossíntese e bioquímica**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 49p, 2016.
- CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B. **Biology**, 6th ed., Benjamin Cummings, São Francisco, 2001. CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de

microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v9, n4, p542-549, 2011.

CARONNI, S.; BRESCIANI, AL; DELARIA, M.A.; MELONI, F.; NAVONE, A.; PANZALIS, P.; HEIMANN, K.; CECCHERELLI, G. Ecology of the benthic mucilage-forming microalga *Chrysosphaeum taylorii* in the W Mediterranean Sea: Substratum and depth preferences. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, V161, P38-45, 2015.

CHALIMA, A.; OLIVER, L.; CASTRO, L.F.; KARNAOURI, A.; DIETRICH, T.; TOPAKAS, E. Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds. **Fermentation**, v54, n3, p1-17, 2017.

CHIA, A. M.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; PARRISH, C.C. **European Journal of Phycology**,v48, p1-11, 2013a.

CHIA, A. M. LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; PARRISH, C.C. **Aquatic Toxicology**, v128, p171-182, 2013b.

CLARENS, A.F.; RESURRECCION, E.P.; WHITE, M.A.; COLOSI, L.M. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science & Technology**. v44, p1813 -1819, 2010.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D. **Revista Brasileira de Sementes**. v30, p48-53. 2008.

CORASPE, H.M.; IDIARTE, H.G.; MINAMI, K. **Scientia Agricola**, v200, p349-354, 1993.

COSGROVE, J.; BOROWITZKA, M. A. Chlorophyll Fluorescence Terminology: An Introduction. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Developments in Applied Phycology**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, p1–17, 2010.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. **Bioresource Technology**, v247, p1242–1245, 2018.

ENRÍQUEZ, S.; BOROWITZKA, M. A. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: SUGGETT, D. J.; BOROWITZKA, M.; PRÁŠIL, O. (Eds.). **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**. Developments in Applied Phycology. [s.l.] Springer Netherlands, p187–208, 2010.

FOLTRAN, B.N.; TEIXEIRA, E.S. Incidência de *Rhizoctonia* sp. Em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivadas em solo com polímero hidroretentor. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v2, n4, p71-79, 2004.

GILBERT, M.; DOMIN, A.; BECKER, A.; WILHELM, C. Estimation of primary productivity by chlorophyll a in vivo fluorescence in freshwater phytoplankton. **Photosynthetica**, v38, p111-126, 2000.

GLEMSER, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRÜCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v100, n3, p1077-1088, 2015.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A.P.; SOUSA, I. RAYMUNDO, A. BANDERRA, N.M. Microalgae in novel food products. In: Konstantinos, N.; Papadopoulos, N. (eds) **Food chemistry research developments**, p75–111, 2008.

HANEDA, R.N.; VIEIRA, B.H.; FONTES, S.R.; LOMBARDI, G.; CASALI, C.A.; LOMBARDI, A.T.. Biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* grown in a novel design of hybrid photobioreactor. **Journal Microbial and Biochemical Technology**. v7, n2, p76-82, 2015.

HENRARD, A.A.; ROSA, G.M.; MORAES, L.; DE MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. (2015). The cultivation of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture media and stirring setting. **African Journal Microbiology Research**, v9, n21, p1431-1439, 2015.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v347, 32 p. 1950.

IPCC. 2001. Climate change: Synthesis report. Em: **Watson RT e Core Writing Team** (Eds.) Cambridge University Press (Cambridge, UK), 75 p., 2001.

JASSBY, A. D.; PLATT, T. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v21, n4, p540–547, 1976.

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**, v42, n2, p155–164, 2002.

KROMKAMP, J.C.; FORSTER, R.M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**, v38, p103–112. 2003.

KUNJAPUR, A.M.; ELDRIDGE, R.B. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. **Industrial Engineering Chemical Research**, v49, p3516–3526. 2010.

LEMLEY, D.A.; ADAMS, J.B.; BATE, G.C. A review of microalgae as indicators in South African estuaries. **South African Journal of Botany**, v107, p12-20, 2016.

LIMA, G.M.; TEIXEIRA, P.C.N.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; FILÓCOMO, D.; LAGE, C.L.S. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v31, p157-166, 2018.

LOMBARDI, A.T.; MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v108, p77-87, 2011.

LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P.J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, v77, p39-47, 1991.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, A. L. Mucilaginous capsule adsorption and uptake of copper by *Kirchineriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v38, p332-337, 2002.

LOPES, A.C.A.; NASCIMENTO, W.M. Peletização em sementes hortaliças. Embrapa Hortaliças. **Ministério da agricultura, pecuária e desenvolvimento**, 28 p. 2012.

LUNDQUIST, T.J.; WOERTZ, I.C.; QUINN, N.W.T.; BENEMANN, J.R. A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. **Energy Biosciences Institute** p1-178, 2010.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; ARROUSSI, H.E.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v215, p13-19, 2015.

MAXWELL K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v51, p659-668, 2000.

MEINERZ, L.I.; BALLESTER, E.L.C.; VAZ, L.J.; WASIELESKY JR, W. Efeitos da temperatura sobre a absorção de nutrientes e crescimento celular da microalga *Thalassioria weissflogii*. **Atlântica**, v31, n2, p209-212. 2009.

MONTANHIM, G.C. **Uso de biomassa algal para a peletização de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Bowdichia virgilioides* Kunth**, 71 p. Dissertação de mestrado em ecologia e recursos naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2013.

MONTANHIM, G.C.; HANEDA, R.N.; LOMBARDI, A.T.; LIMA, M.I.S. Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Revista Árvore**, v38, n5, p867-877, 2014.

MORRIS, E.P.; PEENE, J.; FOSRSTER, R.; KROMKAMP, J.C. Coupling between Photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. **Aquatic Microbial Ecology**, v50, p301–311, 2008.

NAPOLÉON, C.; CLAQUIN, P. Multi-Parametric Relationships between PAM Measurements and Carbon Incorporation, an In Situ Approach. **PLoS ONE** v7, n7, 2012.

OXBOROUGH, K.; BAKER, N. R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm' without measuring Fo'. **Photosynthesis Research**, v54, n1989, p135–142, 1997.

PANIS, G.; CANEON, J.R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. **Algal Research**, v18, p175-190, 2016.

PARKHILL, J.P.; MAILLET, G.; CULLEN, J.J. Fluorescence-based maximal quantum Yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology** v37, p517–529, 2001.

PARRISH, C. C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: B. C. Wainman [eds.]. **Lipids in Freshwater Ecosystems**. Springer-Verlag: M. T. Arts, p4-20, 1999.

PEREIRA, L.A.; ROCHA, R.M. A maricultura e as bases econômicas, social e ambiental que determinam seu desenvolvimento e sustentabilidade. **Ambiente e Sociedade**, v18, n3, p41-54, 2015.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v65, n6, p635-648, 2004.

RA, C.H.; KANG, C.H.; JUNG, J.H.; JEONG, G.T.; KIM, S.K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v212, p254-261, 2016.

RICKLEFS, R.E. Energia no Ecosistema. In: **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p412-427, 2010.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v111, p1-61, 1979.

SAMEK, D.; MIŠURCOVÁ, L.; MACHŮ, K.; BUŇKA, F.; FIŠERA, M. Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. **Turkish Journal of Biochemistry**, v38, n4, p360-368, 2013.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E.F.A. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S1319562X17302784/1-s2.0-S1319562X17302784-main.pdf?_tid=ac1a8926-2ec1-4c23-b6cc-268b0d5d938e&acdnat=1525311048_19f1a94bff554c1a0726418b07717f37 Acesso em 01 de maio de 2018.

SCHULZE, P.S.C.; BARREIRA, L.A.; PEREIRA, H.G.C.; PERALES, J.A.; VARELA, J.C.S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends Biotechnology**, v32, p423-431, 2014.

SHARMA, A.K.; SAHOO, P.K.; SINGHAL, S.; PATEL, A. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. **Biotechnology**, v6, n116, p5-12, 2016.

SILVA, J.B.C.; NAKAGAWA, J. **Horticultura Brasileira**, v16, p151-158, 1998.

SILVA, J.B.C.; SANTOS, P.E.C.; NASCIMENTO, W.M. Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. **Horticultura brasileira**, v20, p67-70, 2002.

SINGH, G.; PATIDAR, S.K.; Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, v217, p499-508, 2018.

SOLIMENO, A.; ACÍEN, F.G.; GARCIA, J. Mechanistic model for design, analysis, operation and control of microalgae cultures: Calibration and application to tubular photobioreactors. **Algal Research**, v21, p236-246, 2017.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v35, n3, 748-755, 2005.

WANG, H.M.D.; CHEN, C.C.; HUYNH, P., CHANG, J.S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v184, p355-362, 2015.

WEISSMAN, J.C.; GOEBEL, R.P.; BENEMAN, J.R. Photobioreactor design: mixing, carbono utilization, and oxygen accumulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v31, n4, p336-344, 1988.

WISHKERMAN, A.; WISHKERMAN, E. Application note: A novel low-cost open-source LED system for microalgae cultivation. **Computers and Electronics in Agriculture**, v132, p56-62, 2017.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* PARA ESCALONAMENTO DE CULTIVO

RESUMO

Microalgas são organismos fotossintetizantes cuja produtividade por área é considerada superior a de vegetais e culturas agrícolas, devido ao rápido crescimento e por não possuírem estruturas aclorofiladas. Possuem em sua biomassa valor agregado por meio da síntese de moléculas essenciais. Há espécies potencialmente úteis para produção em escalas ampliadas, como é o caso de espécies do gênero *Chlorella*. A escolha da espécie a ser cultivada envolve fatores como robustez aos fatores do ambiente e intrínsecos ao organismo, como por exemplo a produção de biomoléculas de interesse. Neste capítulo de seleção de espécie, as microalgas *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* foram cultivadas em meios de cultura BG11, solução hidropônica em concentrações de 10 e 50% objetivando-se avaliar o crescimento e composição bioquímica para selecionarmos uma única espécie a ser cultivada nas escalas de 100 e 1000 L. Analisaram-se taxa específica de crescimento, concentração de clorofila *a*, densidade óptica, biomassa seca, composição bioquímica e estado fisiológico microalgal por meio do rendimento máximo fotossintético, obtido pela técnica de pulsos de amplitude modulada (PAM). *C. sorokiniana* foi a espécie selecionada, pois apresentou maiores taxas de crescimento ($\sim 0,04 \mu \text{ h}^{-1}$), $\sim 200 \text{ mg L}^{-1}$ de biomassa seca ao final da fase exponencial de crescimento em meio de cultivo BG11 e $1,4 \text{ pg célula}^{-1}$ de proteínas totais, mostrando-se promissora para cultivos em larga escala.

Palavras-chave: biomassa; composição bioquímica; microalgas; seleção de espécies

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintetizantes, base de cadeias alimentares aquáticas, constituindo assim um elo entre ecossistemas aquáticos e terrestres (ODUM; BARRET, 2007). Estão difundidos no mundo todo em sistemas aquáticos, e abrangem uma gama morfológica e de funções ecológicas. São naturalmente fixadoras do CO₂ e sua biomassa possui interesse em vários setores industriais.

A produtividade de cultivos algais é superior à de quaisquer culturas agrícolas conhecidas (PULZ; GROSS, 2004), devido ao rápido crescimento e por não possuírem estruturas como troncos e galhos aclorofilados, caso dos vegetais superiores. Os troncos e galhos podem ser considerados estruturas não produtoras, uma vez que neles não se processa a fotossíntese.

Microalgas possuem em sua biomassa valor agregado por meio da síntese de moléculas essenciais, a saber, carboidratos, lipídios e proteínas, além de substâncias que fazem que seu cultivo seja economicamente interessante, como é o caso β -caroteno (BERTOLDI et al., 2006). Assim, a determinação de compostos bioquímicos produzidos por células microalgais fornece informação a respeito das biomoléculas produzidas e acumuladas na biomassa. Sabe-se que há espécies, como a cianobacteria *Spirulina* e a Chlorophyta *Chlorella* (BECKER, 2008) que são consideradas potenciais produtoras de moléculas protéicas, estando acessíveis a preços populares atualmente. A utilização de microalgas como matéria prima para fabricação de uma gama de produtos é mundialmente conhecida e difundida, já que são organismos cuja biomassa contém substâncias valiosas, como é o caso da astaxantina, pigmento antioxidante produzido por *Haematococcus pluvialis* (LORENZ; CYSEWSKI, 2000), utilizado como componente de cosméticos e com potencial fotoprotetor. Microalgas são comumente utilizadas na aquicultura, pois dada sua composição química, fortalecem o sistema imunológico dos animais aquáticos, seus predadores naturais (SATHASIVAM et al., 2017).

Atualmente, o cultivo de microalgas não é mais somente uma opção de suplementação alimentar, ou componente de uma dieta saudável. Por exemplo, o gasto para produzir 1 Kg de proteína de origem bovina é de 15550 L de água, comparados com 1000 L de meio de cultivo que podem levar a 1 Kg de proteína de origem microalgal. Além disso, há que se considerar também a necessidade de espaço físico destinado aos animais (MELZ, 2013). Podemos fazer a mesma reflexão sobre as carnes

de frango e porco, cujo quilo consome 3900 e 4800 L de água, respectivamente (HOEKSTRA, 2008). Portanto, trata-se de uma necessidade tanto nutricional, quanto ambiental.

Muitas espécies de microalgas são potencialmente úteis para produção em escalas ampliadas, como é o caso de espécies do gênero *Chlorella* (HANEDA et al., 2015), já que este apresenta alta produtividade e tolerância à variação nas condições de cultivo (WANG et al., 2018), além de rápido crescimento e alta produção de proteínas (SCHREIBER et al., 2017). *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890) e *Chlorella sorokiniana* são cosmopolitas e o gênero é conhecido por tolerar situações adversas e extremas. *Ankistrodesmus densus* (KORSHIKOV, 1953) é uma espécie pertencente à classe Chlorophyceae, apresenta lento crescimento, porém, é conhecida pela alta produção de carboidratos, inclusive extracelulares (VIEIRA; MYKLESTAD, 1986).

Chen, Chen e Chang (2017) verificaram o potencial de *Chlorella sorokiniana* ter otimizada sua produção de luteína. Esse pigmento é encontrado na região mácula ocular em seres humanos e auxilia na redução do risco de degeneração macular relacionado ao avançar da idade (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003).

O acompanhamento do cultivo de microalgas pode ser feito com base em curvas de parâmetros de biomassa (concentração celular, densidade óptica, concentração de clorofila *a*) em função do tempo. Um parâmetro importante é a biomassa seca (expresso em mg L⁻¹) e a produtividade (mg L⁻¹ d⁻¹, ou h⁻¹), muito utilizado em estudos focados nos setores industriais (HUANG et al., 2017; KOUTRA et al., 2018). Além disso, a mensuração da eficiência fotossintética permite rápida medição dos parâmetros fotossintéticos e estima o estado fisiológico microalgal (KROMKAMP; FORSTER, 2003) por meio da técnica de pulsos de amplitude modulada (PAM). Trata-se de uma técnica aliada aos parâmetros de análise de biomassa, inclusive em se tratando de seleção de uma espécie a ser cultivada.

Escolher a espécie de microalga envolve questões como a velocidade de crescimento, composição bioquímica, tolerância a adversidades climáticas e produtividade da biomassa. Tais variáveis estão diretamente relacionadas ao meio de cultura utilizado, à concentração e estado fisiológico do inóculo e do cultivo, intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, concentração, agitação e oxigenação da cultura (BROWN et al., 1997). A escolha do meio de cultivo também deve ser feita com cautela, pois até mesmo uma espécie que apresenta produção de biomassa e crescimento

otimizados pode não apresentar desenvolvimento satisfatório se a concentração, qualidade e composição dos nutrientes não estiverem a contento.

Dessa forma, há uma demanda por trabalhos que avaliem o crescimento e composição bioquímica de microalgas para identificar espécies úteis a aplicações comerciais com potencial para ampliação de escala de produção.

Neste estudo, três espécies de microalgas, a saber *Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella sorokiniana* foram cultivadas objetivando-se avaliar o crescimento e composição bioquímica para posterior seleção de uma espécie a ser cultivada com ampliação de escala de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de taxa específica de crescimento das espécies estudadas são mostrados na figura 1.

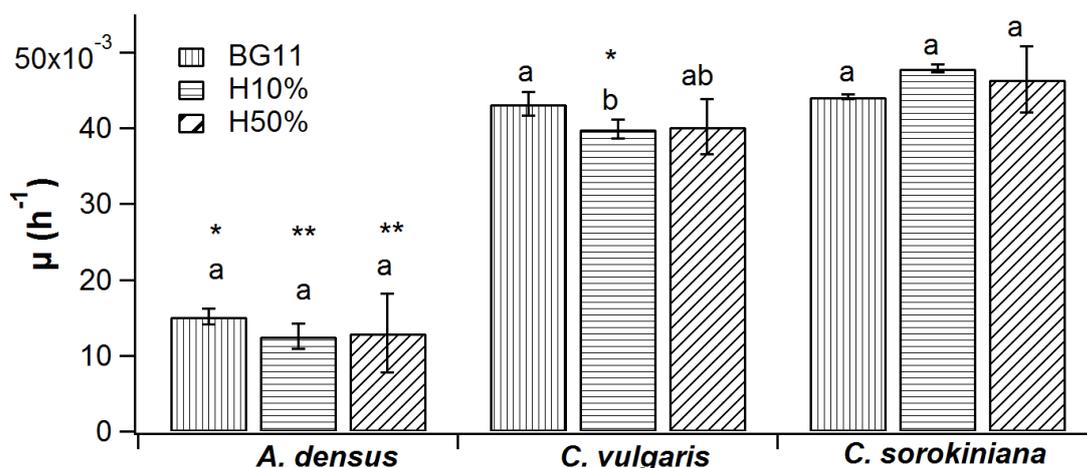


Figura 1. Taxas específicas de crescimento ($\mu \text{ h}^{-1}$) das três espécies estudadas nos meios de cultivo BG11, hidropônico diluído a 10% (H10%) e 50% (H50%). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a mesma espécie e * indica diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Nossos resultados mostraram que *A. densus* apresentou as menores taxas de crescimento, devido ao lento crescimento já relatado em literatura (VIEIRA; MYKLESTAD, 1986).

Hu et al. (2016), ao estudarem espécies microalgais do gênero *Chlorella* buscando maior eficiência em fixação de CO₂ e em acúmulo lipídico, encontraram 0,0163 h⁻¹ de taxa específica de crescimento por hora para *C. vulgaris* com adição de 10% de CO₂ em meio de cultivo BG11, valores abaixo do reportado no presente trabalho.

Souza (2016) observou taxa de crescimento específica de ~0,042 para *C. vulgaris* em seu tratamento fotoautotrófico controle, valor similar ao encontrado no presente trabalho para essa espécie quando cultivada em meio de cultivo BG11. Nesse mesmo meio de cultivo BG11 *A. densus* apresentou menor taxa específica de crescimento em comparação às demais espécies estudadas. *C. vulgaris* apresentou menor taxa de crescimento quando cultivada em meio H10% em comparação ao meio BG11. Já *C. sorokiniana* apresentou valores similares dessa variável para os três meios de cultivo testados, assim como *A. densus*.

De-Bashan et al. (2008) cultivaram *Chlorella sorokiniana* em 400 mL em meio sintético similar a águas residuais com variação luminosa e de temperatura. Encontraram ~0,0125 h⁻¹ de taxa de crescimento específica -valor menor em comparação aos por nós encontrados - em condições de cultivo similares às do presente trabalho.

As curvas de crescimento confeccionadas a partir da abundância celular em função do tempo experimental são mostradas na figura 2. *Ankistrodesmus densus* foi a espécie que apresentou menor taxa de crescimento, demonstrando menor inclinação nas curvas de padrões de biomassa: abundância celular (figura 2), densidade óptica (figura 3) expressa em absorvância a 684 nm, e clorofila *a* (mg L⁻¹) em figura 4, expressas em logaritmo natural.

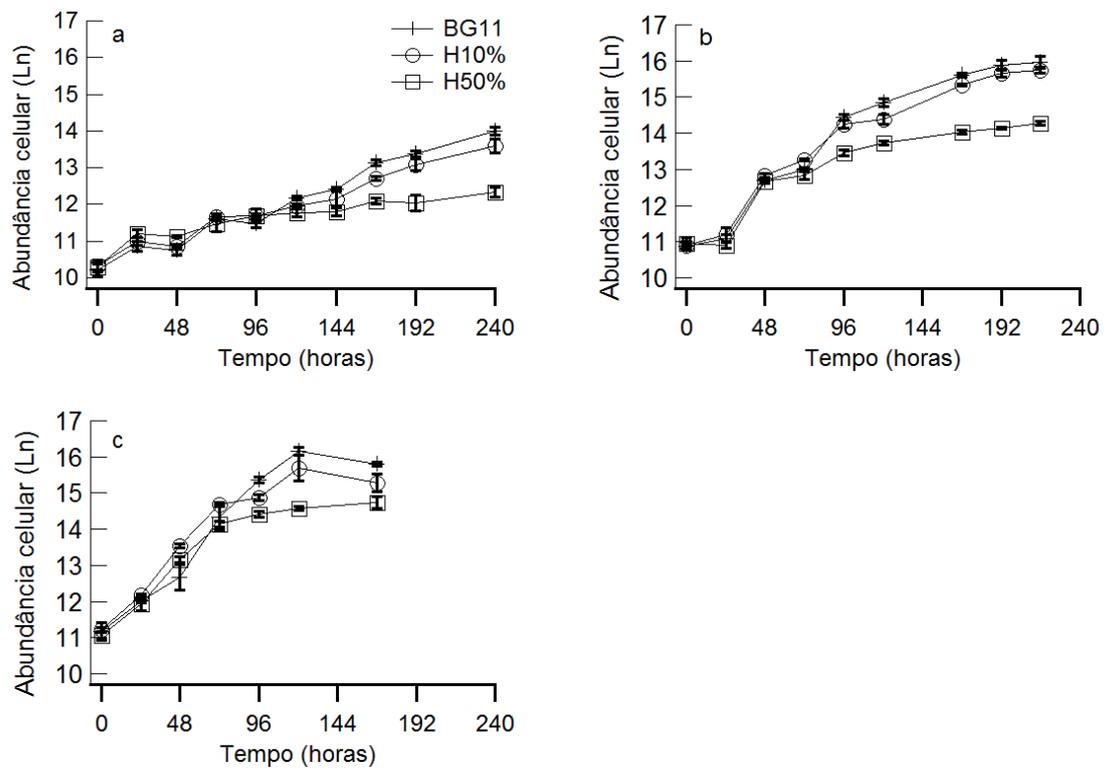


Figura 2. Ln da abundância celular (células mL⁻¹) de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C. sorokiniana* (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (o) e 50% (□)

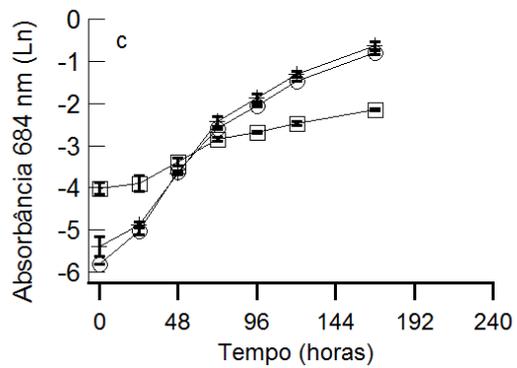
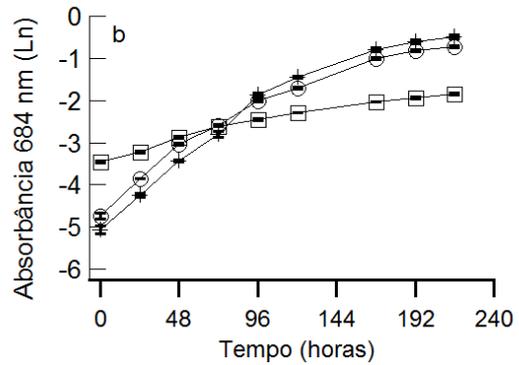
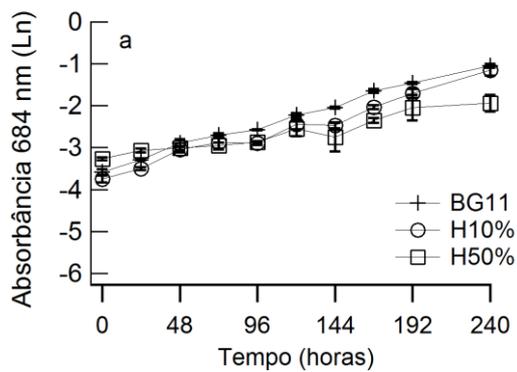


Figura 3. Ln da densidade óptica (684 nm) expressa em absorbância de células de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C. sorokiniana* (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50% (□).

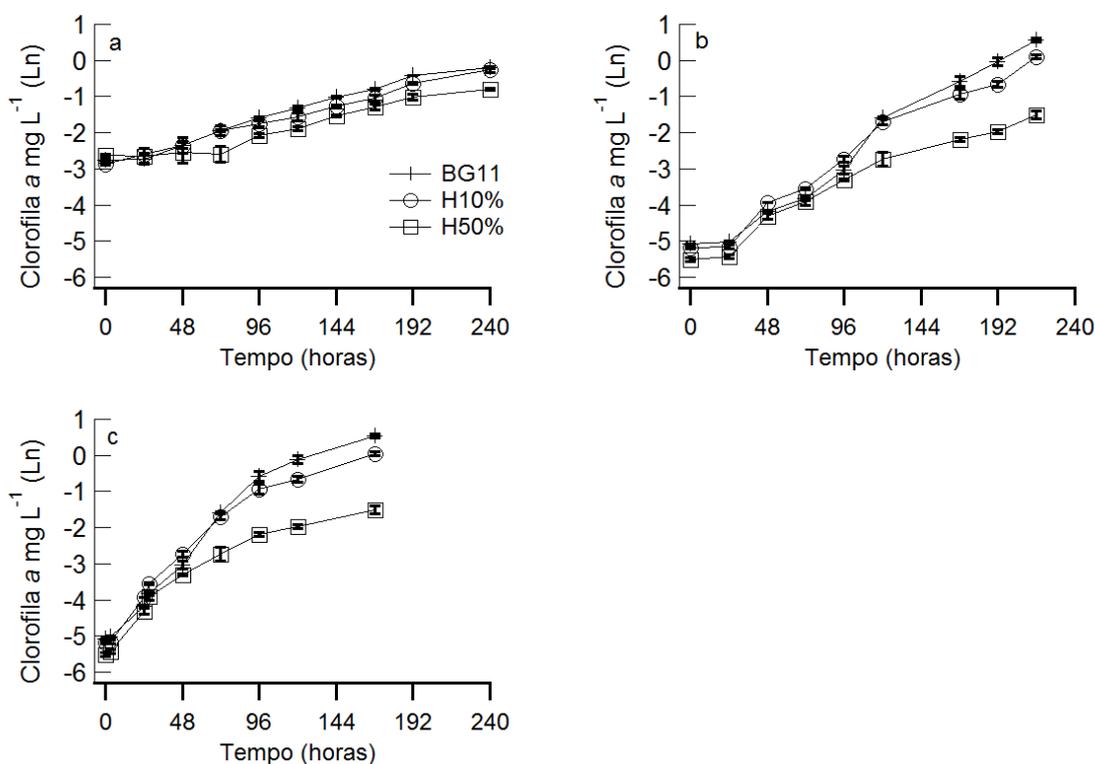


Figura 4. Ln da concentração (mg L^{-1}) de clorofila a de células de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C. sorokiniana* (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50% (□).

Os resultados de absorvância 684 nm (figura 3) e concentração de clorofila a (figura 4), em geral confirmaram os de densidade celular, como esperado, já que todos mostram medidas de biomassa. Desses resultados concluímos que as três espécies algais apresentam menor crescimento em meio de cultura hidropônico em concentração 50%, mas em concentração de 10% o crescimento foi similar ao meio BG11 em *A. densus* e *C. sorokiniana*.

O meio de cultura hidropônico contém em sua formulação um composto férrico com odor e cor fortes. Mesmo diluído a 10%, apresenta coloração rosa avermelhada, o que dificulta a penetração da luz no cultivo afetando seu aproveitamento pelas células microalgais, tornando as taxas de crescimento nesses tratamentos mais baixas. Conseqüentemente, houve menor abundância celular nesses tratamentos após estabilização do crescimento e as curvas que expressam a densidade óptica em comprimento de onda absorvido pela molécula de clorofila *a* (684 nm) e concentração de clorofila *a* são menos abrangentes.

Os valores médios de rendimento quântico fotossintético máximo estão mostrados na figura 5.

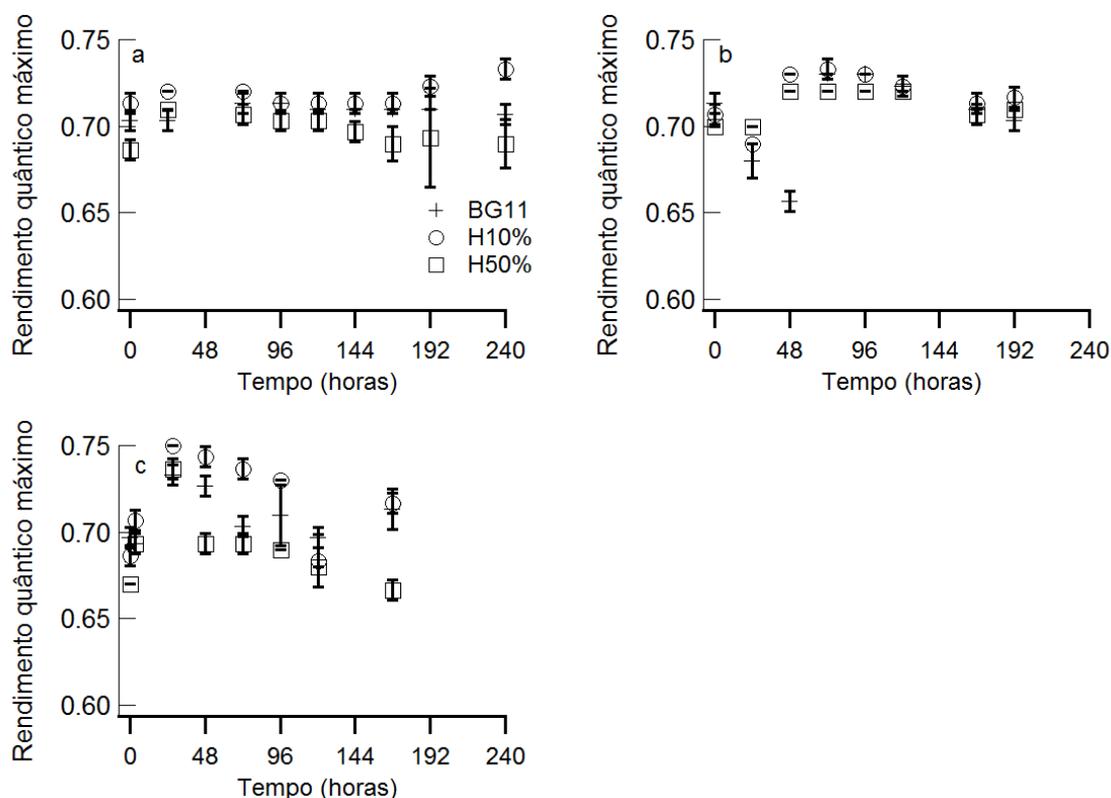


Figura 5. Rendimento quântico fotossintético máximo de células de *A. densus* (a), *C. vulgaris* (b), e *C. sorokiniana* (c) cultivadas em meio de cultivo BG11 (+), hidropônico em concentração 10% (○) e 50% (□).

Com exceção de *C. vulgaris* os valores mais baixos de rendimento quântico fotossintético máximo foram observados em meio H50%, caracterizando que esse meio de cultivo dificulta a manutenção celular em estado saudável considerado ótimo, configurado por valores de tal variável em torno de 0,70 (LOMBARDI; MALDONADO, 2011).

Os valores de biomassa seca (mg L^{-1}) determinada em final da fase exponencial para cada cultivo podem ser observados na figura 6. Os maiores valores de biomassa seca foram encontrados em culturas do gênero *Chlorella* cultivadas em meio BG11. Observamos os menores valores para culturas cultivadas em meio H50%, no qual os valores de rendimento máximo fotossintético estavam também mais baixos, sinalizando condições fisiológicas não adequadas.

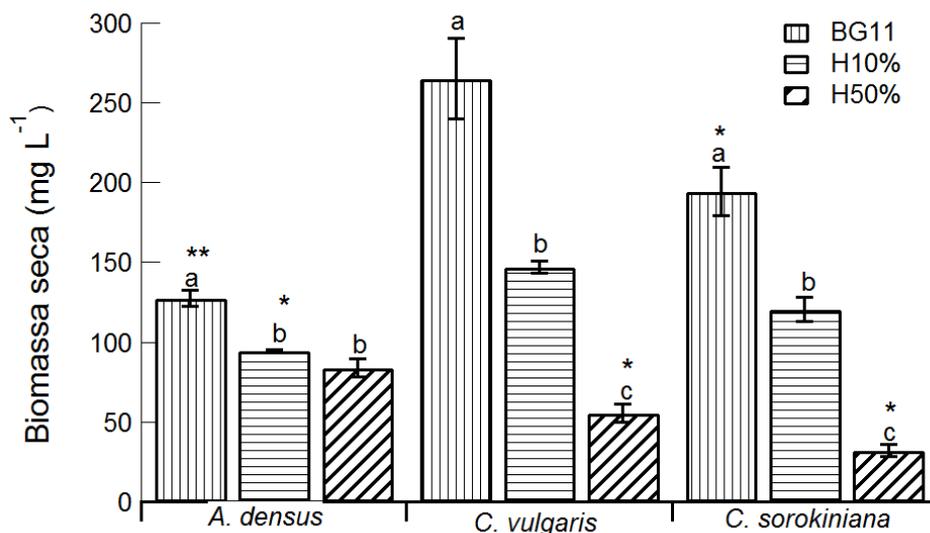


Figura 6. Biomassa seca (mg L⁻¹) de culturas de *A. densus*, *C. vulgaris*, e *C. sorokiniana* cultivadas em meio de cultivo BG11 (listras verticais), hidropônico em concentração de 10% (listras horizontais) e 50% (listras diagonais). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a mesma espécie e * indica diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo *p<0,05 e **p<0,01.

A figura 7 apresenta os valores médios das concentrações totais das biomoléculas carboidratos, proteínas e lipídios. *A. densus* foi a espécie que apresentou os mais altos valores de concentração de biomoléculas energéticas (carboidratos e lipídios). O estoque de moléculas energéticas pode acontecer quando a célula está sendo cultivada em condição estressante (ROCHA et al., 2015), o que pode explicar estoque de tais moléculas em *A. densus* em meio H50%, que também demonstrou menores valores de rendimento máximo fotossintético.

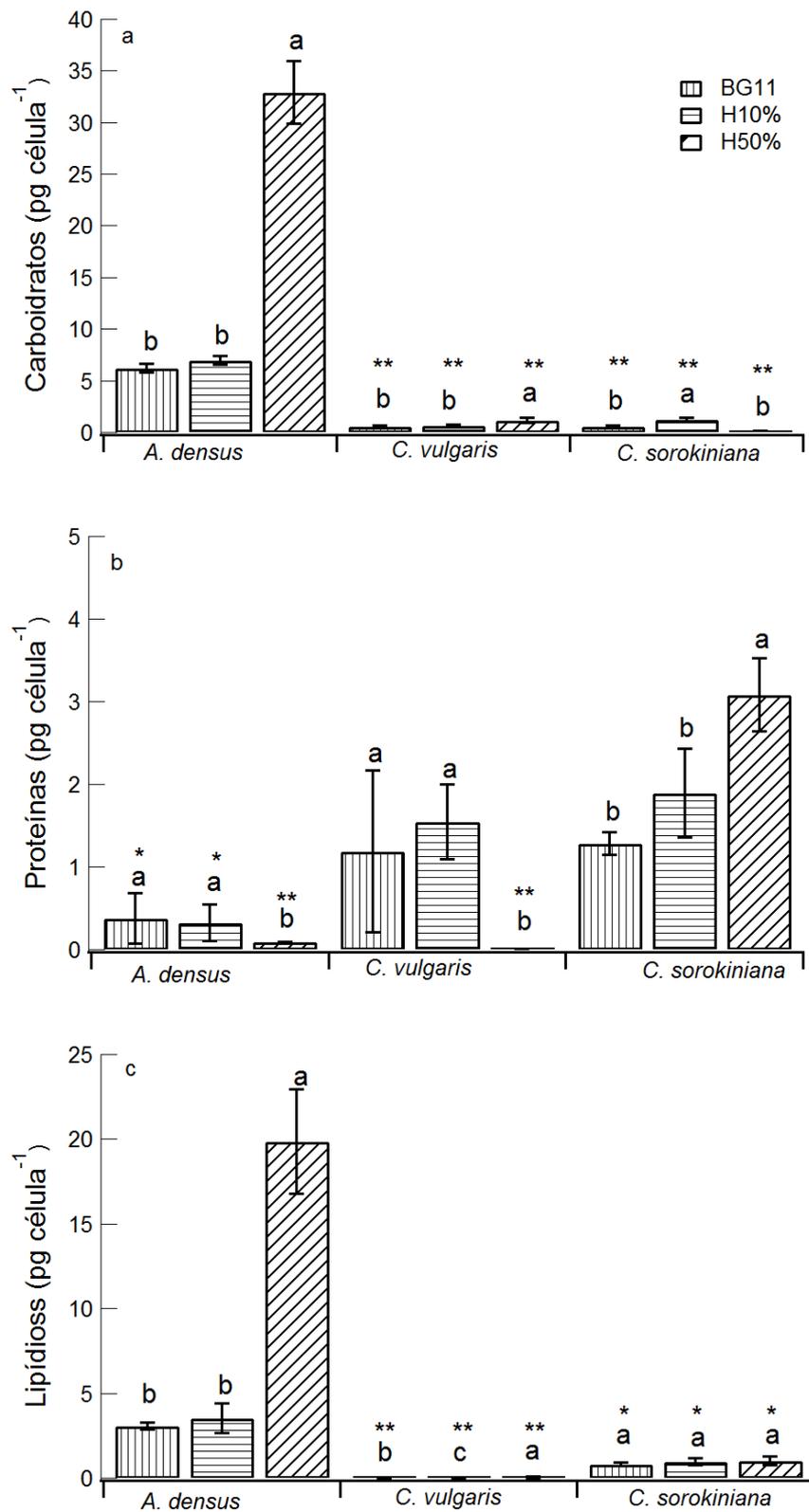


Figura 7. Concentrações totais (pg célula⁻¹) de carboidratos (a), proteínas (b) e lipídios (c) de células de *A. densus*, *C. vulgaris*, e *C. sorokiniana* cultivadas em meio de cultivo BG11 (listras verticais), hidropônico em concentração 10% (listras horizontais) e 50% (listras diagonais). Letras minúsculas indicam diferença estatística para a mesma espécie e * indicam diferença entre os meios de cultivo testados de acordo com ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, sendo *p<0,05 e **p<0,01.

De acordo com Jácome et al. (2017), *Ankistrodesmus braunii* é uma espécie promissora para estudos que envolvem biocombustíveis, já que as células produzem grande quantidade lipídica, característica essa que, com base nos nossos resultados, podemos estender a *Ankistrodesmus densus*, investigada no presente trabalho. Sob as condições fornecidas pelo meio hidropônico 50%, podemos concluir que *A. densus* estava submetida a estresse fisiológico, pois o acúmulo de carboidratos e de lipídios foi significativo, sendo de 4 a 5 vezes maior do que nos meios BG11 e hidropônico 10%.

Chlorella sorokiniana apresentou concentração proteica similar aos reportados em tratamentos controle ($\sim 1,5$ pg célula⁻¹) em Camargo e Lombardi (2017) e, no presente estudo foi a espécie que apresentou maiores concentrações totais de proteínas, assim como maiores taxas de crescimento e biomassa seca (assim como *C. vulgaris*), o que sugere que essas proteínas sejam estruturais. Portanto, é uma microalga com potencial interesse em setores industriais, que demandam produção em larga escala.

CONCLUSÕES

Meio hidropônico em concentração 50% é adequado para produzir altas concentrações de biomoléculas energéticas (carboidratos e lipídios) em *A. densus*. Porém, foi o tratamento em que observamos menores valores de rendimento máximo fotossintético, o que pode sinalizar condições fisiológicas não adequadas de desenvolvimento.

Considerando-se que *C. sorokiniana* apresentou maior taxa de crescimento, além de satisfatórios conteúdos proteicos e de biomassa seca, e por ser uma espécie tolerante a variações ambientais optou-se por realizar cultivos em escala ampliada com esta espécie de microalga.

REFERÊNCIAS

BECKER, E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**, New York, 293p, 2008.

BEYERINCK, M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v47, p725 – 785, 1890.

BERTOLDI, C.F.; SANT'ANNA, E.; BRAGA, M.; OLIVEIRA, J.L. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Grasas y Aceites**, p270-274, 2006.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.D.; DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v151, p315-331, 1997.

CAMARGO, E.C.; LOMBARDI, A.T. Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. **Journal Applied of Phycology**, disponível em : <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1291-3>, 2017. Acesso em 02 de abril de 2018.

CHEN, J.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Lutein production with wild-type and mutant strains of *Chlorella sorokiniana* MB-1 under mixotrophic growth. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v79, p66-73, 2017.

DE-BASHAN, LE.; TREJO, A.; HUSS, V.A.R.; HERNANDEZ, J.P.; BASHAN, Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v99, p4980-4989, 2008.

HANEDA, R.N.; VIEIRA, B.H.; FONTES, S.R.; LOMBARDI, G.; CASALI, C.A.; LOMBARDI, A.T.. Biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* grown in a novel design of hybrid photobioreactor. **Journal Microbial and Biochemical Technology**, v7, n2, p76-82, 2015.

HOEKSTRA, A. Y. The water footprint of food. **Water for food**. p49-61, 2008. Disponível em: <http://waterfootprint.org/media/downloads/Hoekstra-2008-WaterfootprintFood.pdf> Acesso em 07 de julho de 2018.

HU, X.; ZHOU, J.; LIU, G.; GUI, B. Selection of microalgae for high CO₂ fixation efficiency and lipid accumulation from ten *Chlorella* strains using municipal wastewater. **Journal of environmental sciences**, v46, 83-91, 2016.

HUANG, Y.T.; LAI, C.W.; WU, B.W.; LIN, K.S.; WU, J.C.S.; HOSSAIN, M.S.A.; YAMAUCHI, Y.; WU, K.C.W. Advances in bioconversion of microalgae with high biomass and lipid productivity. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v79, p37-42, 2017.

JÁCOME, A.L.M.; BRESAOLA, M.D.; CARVALHO, J.C.M.; NICOLAI, M.; ROSADO, C.; BABY, A.R. Carbohydrates in *Ankistrodesmus braunii* biomass cultivated in tubular photobioreactors. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v14, n2, p242-248, 2017.

KORSHIKOV, A.A. Voznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales). **The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR**. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales. Kyjv [Kiev]: Akad. NAUK URSR, p1-439, 1953.

KOUTRA, E.; ECONOMOU, C.N.; TSAFRAKIDOU, P.; KORNAROS, M. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, v36, n8, p819-833, 2018.

KRINSKY, N.I.; LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, v23, p171-201, 2003.

KROMKAMP, J.C.; FORSTER, R.M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover

measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**, v38, p103–112. 2003.

LOMBARDI, A.T.; MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v108, p77-87, 2011.

LORENZ, R.T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxantin. **Trends in Biotechnolgy**, v18, p160-167, 2000.

MELZ, L.J. Custos de produção de gado bovino: revisão sob o enfoque da contabilidade de custos. **Custos de @gronegócios online**, v9, 2013. Disponível em: <http://www.custoseagronegocioonline.com.br/numero1v9/Bovino.pdf> Acesso em 10 de abril de 2018.

ODUM, E.P; BARRET, G.W. **Fundamentos de Ecologia**. 5. ed., Editora Thomson Pioneira, 616p, 2007.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v65, n6, p635-648, 2004.

ROCHA, G.S. PINTO, F.H.V.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? **Journal of Applied Phycology**, v27, p171-178, 2015.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E.F.A. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S1319562X17302784/1-s2.0-S1319562X17302784-main.pdf?_tid=ac1a8926-2ec1-4c23-b6cc-268b0d5d938e&acdnat=1525311048_19f1a94bff554c1a0726418b07717f37 Acesso em 01 de maio de 2018.

SCHREIBER, C.; BEHRENDT, D.; HUBER, G.; PFAFF, C.; WIDZGOWSKI, J.; ACKERMANN, B.; MÜLLER, A.; ZACHLEDER, V.; MOUDRÍKOVÁ, S.; MOJZES, P.; SCHURR, U.; GROBBELAAR, J.; NEDBAL, L. Growth of algal biomass in laboratory and in large-scale algal photobioreactors in the temperate climate of western Germany. **Bioresource Technology**, v234, p140-149, 2017.

SOUZA, A.C.M. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes de luz**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 83p, 2016.

VIEIRA, A.A.H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). **Journal of Plankton Research**, v8, n5, p985-994, 1986.

WANG, Y.; GONG, Y.; DAI, L.; SOMMERFELD, M.; ZHANG, C.; HU, Q. Identification of harmful protozoa in outdoor cultivation of *Chlorella* and the use of ultrasonication to control contamination. **Algal Research**, v31, p298-310, 2018.

CAPÍTULO 2

FISIOLOGIA DE *Chlorella sorokiniana* EM DIFERENTES SISTEMAS E ESCALAS DE CULTIVO

RESUMO

Microalgas apresentam biomoléculas com alto valor agregado e, por isso, são organismos com uso potencial em vários setores industriais. Mas, cultivar microalgas fotossintéticas em larga escala é ainda um desafio. Diferentemente de cultivos laboratoriais onde as condições ambientais são facilmente controladas, as grandes culturas são sujeitas às variações ambientais e, por isso de difícil controle. Por microalgas serem organismos fisiologicamente moldáveis, tais variações afetam sua fisiologia e, possivelmente a composição bioquímica. O objetivo deste capítulo foi entender a fisiologia da microalga *Chlorella sorokiniana* em cultivos de 100 e 1000 L em ambiente natural. Eles foram comparados com cultivos referência mantidos sob condições controladas e estáveis em laboratório (200 mL). Para tanto, considerou-se o crescimento, a produção de biomassa, a composição bioquímica, a fotoquímica da fotossíntese e a eficiência de assimilação do carbono. Todos os cultivos foram mantidos em fase de crescimento exponencial. A maior taxa de crescimento específica ($\sim 0,07 \text{ h}^{-1}$) e produtividade de biomassa ($\sim 81 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram obtidas nos cultivos de 100 L, mas as maiores concentrações de proteínas ($\sim 10 \text{ pg cél}^{-1}$) e lipídios ($\sim 10 \text{ pg cél}^{-1}$) foram encontradas nos cultivos de 0,2 L. Esta pesquisa é uma contribuição ao entendimento da fisiologia do crescimento e fotoquímica da fotossíntese em *C. sorokiniana*, sendo importante ao se considerar o controle de qualidade da biomassa em sistemas de produção algal.

PALAVRAS CHAVE: biomoléculas, curvas saturação luminosa, fluorescência, fotossíntese, larga escala, microalgas

INTRODUÇÃO

O dióxido de carbono (CO₂) é um importante gás intensificador do efeito estufa, dado que é liberado em elevada quantidade (BHOLA et al., 2016). As microalgas, inclusive, são organismos que captam esse gás por meio da fotossíntese.

O grande interesse econômico e ecológico destinado a muitas espécies de microalgas se deve ao seu rápido crescimento, capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, utilização de nutrientes e, portanto com potencial para biorremediação de variados efluentes industriais (LIU et al., 2016; USHER et al., 2014). As microalgas podem ser cultivadas em grande variedade de modelos de fotobiorreatores (BECKER, 2008) e sistemas de cultivo, tais como batelada, batelada alimentada, contínuo e outros, abrangendo escalas laboratorial e ampliada. Em laboratório, os cultivos ocorrem, em geral, sob condições ambientais controladas, considerando principalmente os fatores de luminosidade, temperatura, e aeração. São culturas de pequeno volume, fácil manipulação e que permitem a limpeza do material após o cultivo (SAMBUSITI et al., 2015). Para cultivos de microalgas em escala de 500 – 1000 L ou maiores, as condições ambientais não são, em geral, controladas. Isso leva a dificuldades para a manutenção do cultivo e, provavelmente diferenças importantes nos aspectos da fisiologia algal.

Os cultivos em larga escala são usados para a produção de biomassa e, em muitos casos, acúmulo de biomoléculas de alto valor agregado, como carotenóides, antioxidantes, e biomoléculas energéticas (ex.: carboidratos e lipídios), que podem ter finalidades comerciais diversas. Com isso, a biomassa algal tem sido altamente requisitada pela indústria farmacêutica (CAMPO et al., 2009), cosmética (MERCURIO et al., 2015; POYATO et al., 2017), alimentícia (YAMASAKI et al., 2005), agrícola (YAAKOB et al., 2014) e de fertilizantes (WU et al., 2013).

A composição bioquímica de microalgas diz respeito à sua condição fisiológica. Sabe-se, por exemplo, que baixas concentrações de proteínas em comparação com carboidratos pode indicar situação desfavorável, ou estressante, assim como altos níveis de lipídios (ROCHA et al., 2016; CHIA et al., 2013); nesse caso, a condição estressante pode ser utilizada para indução de síntese lipídica e aproveitamento desse composto em setores que envolvam bioenergia, por exemplo. Freitas et al. (2017) avaliaram os efeitos do aumento da intensidade luminosa nas concentrações bioquímicas de *Chlorella minutissima* cultivada em meio BBM e observaram um aumento de ~48% de

carboidratos sob $16,88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kumar, Dasgupta e Das (2014) observaram elevado teor proteico em *Chlorella sorokiniana* cultivada sob condições autototróficas de $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e pH 7,3. Entretanto, a deficiência em nitrog\u00e9nio pode levar a baixos teores de prote\u00ednas e elevar os de carboidratos em torno de 50% (GUCCIONE et al., 2014).

Os fotobiorreatores podem ser abertos ao ar livre ou fechados (USHER et al., 2014; CHEN et al., 2011; SINGH; GU, 2010). A escolha do modelo de fotobiorreator deve considerar a temperatura m\u00e9dia local, intensidade luminosa, regime pluvial e esp\u00e9cie algal a ser utilizada (CARDOSO; VIEIRA e MARQUES, 2011) podendo ser adaptados para o desenvolvimento microalgal conforme exig\u00eancias esp\u00e9cie-espec\u00edficas (CHISTI, 2007). Devido \u00e0 demanda de produ\u00e7\u00e3o e \u00e0 \u00e1rea que ocupam, os fotobiorreatores para cultivos em larga escala ficam expostos \u00e0s condi\u00e7\u00f5es ambientais de luminosidade, temperatura, radia\u00e7\u00e3o solar e ventila\u00e7\u00e3o.

\u00c9 prov\u00e1vel que o cultivo algal em escala de bancada ou laboratorial, em condi\u00e7\u00f5es ideais, produza biomassa com composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica distinta daquela produzida em grandes fotobiorreatores, em escala ampliada. Isso ocorre porque diferentes escalas de cultivo algal imp\u00f5em diferentes condi\u00e7\u00f5es \u00e0 biomassa. Desse modo, \u00e9 necess\u00e1rio o conhecimento da fisiologia algal em escala ampliada para que se possa prever a produ\u00e7\u00e3o, por exemplo de biomol\u00e9culas espec\u00edficas. Tem-se que nos grandes fotobiorreatores nem sempre as microalgas fotossint\u00e9ticas est\u00e3o expostas \u00e0 luz o tempo todo. \u00c9 mais comum que a exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 luz seja intercalada com intervalos curtos de sombra conforme o movimento da cultura. Essa varia\u00e7\u00e3o nas condi\u00e7\u00f5es do cultivo algal determina varia\u00e7\u00e3o na composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica e pode ainda ser usada para induzir uma maior s\u00edntese de biomol\u00e9culas (HANEDA et al., 2015).

A efici\u00eancia fotossint\u00e9tica, importante na incorpora\u00e7\u00e3o do CO_2 , \u00e9 afetada pelo estado fisiol\u00f3gico da microalga. Para determin\u00e1-la, a t\u00e9cnica de pulsos de luz de amplitude modulada (PAM) tem sido utilizada e possibilita a determina\u00e7\u00e3o do rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fotossistema II por meio da exposi\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas microalgais \u00e0 luz supersaturante. Fornece a fra\u00e7\u00e3o da energia que \u00e9 direcionada \u00e0s rea\u00e7\u00f5es fotoqu\u00edmicas (qP) e n\u00e3o fotoqu\u00edmicas, principalmente em forma de calor (NPQ) (CUARESMA FRANCO et al., 2012), al\u00e9m da possibilidade de calcular a fixa\u00e7\u00e3o bruta do carbono inorg\u00e2nico via fotoss\u00edntese (KROON; PRIZELIN; SCHJIELD, 1993).

Curvas r\u00e1pidas de satura\u00e7\u00e3o de luz podem informar sobre o estado fisiol\u00f3gico celular, j\u00e1 que condi\u00e7\u00f5es estressantes podem levar a valores mais baixos de taxas de

transporte de elétrons, influenciando assim em toda a atividade fotossintética (CAMARGO, 2016). Fornecem, ainda, informações de como o aparato fotossintético se ajusta às diferentes condições e variações que ocorrem em cultivos, inclusive os de escalas ampliadas.

Considerando que microalgas possuem versatilidade fisiológica e bioquímica e, por isso, se aclimatam a diferentes condições ambientais, buscamos neste trabalho investigar como variam as respostas fisiológicas (crescimento, composição bioquímica e fotoquímica da fotossíntese) de *C. sorokiniana* (SHIHIRA; KRAUSS, 1965) em diferentes escalas de cultivo (escala laboratorial – 200 mL em condições controladas e, escala ampliada de 100 e 1000 L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados de monitoramento da cultura em relação ao pH médio, O₂ dissolvido e condições de temperatura durante as duas culturas de larga escala estão apresentados na figura 1. O pH médio permaneceu na faixa de 6,0 a 7,0 durante todo o experimento devido à injeção intermitente de CO₂ fornecida pelo sistema de controle automatizado de pH. A temperatura e o O₂ dissolvido variaram de acordo com o ciclo natural claro-escuro. Esses parâmetros mudaram de maneira semelhante quando comparados os volumes de cultura, com exceção do O₂ dissolvido de 6 a 30 h. A concentração de oxigênio na cultura de 100 L não diminuiu durante a primeira noite e oscilou no dia seguinte. As temperaturas máximas nas culturas de 100 e 1000 L alcançaram 36 e 39 °C, respectivamente, ambas no terceiro dia de experimento e provenientes da exposição solar.

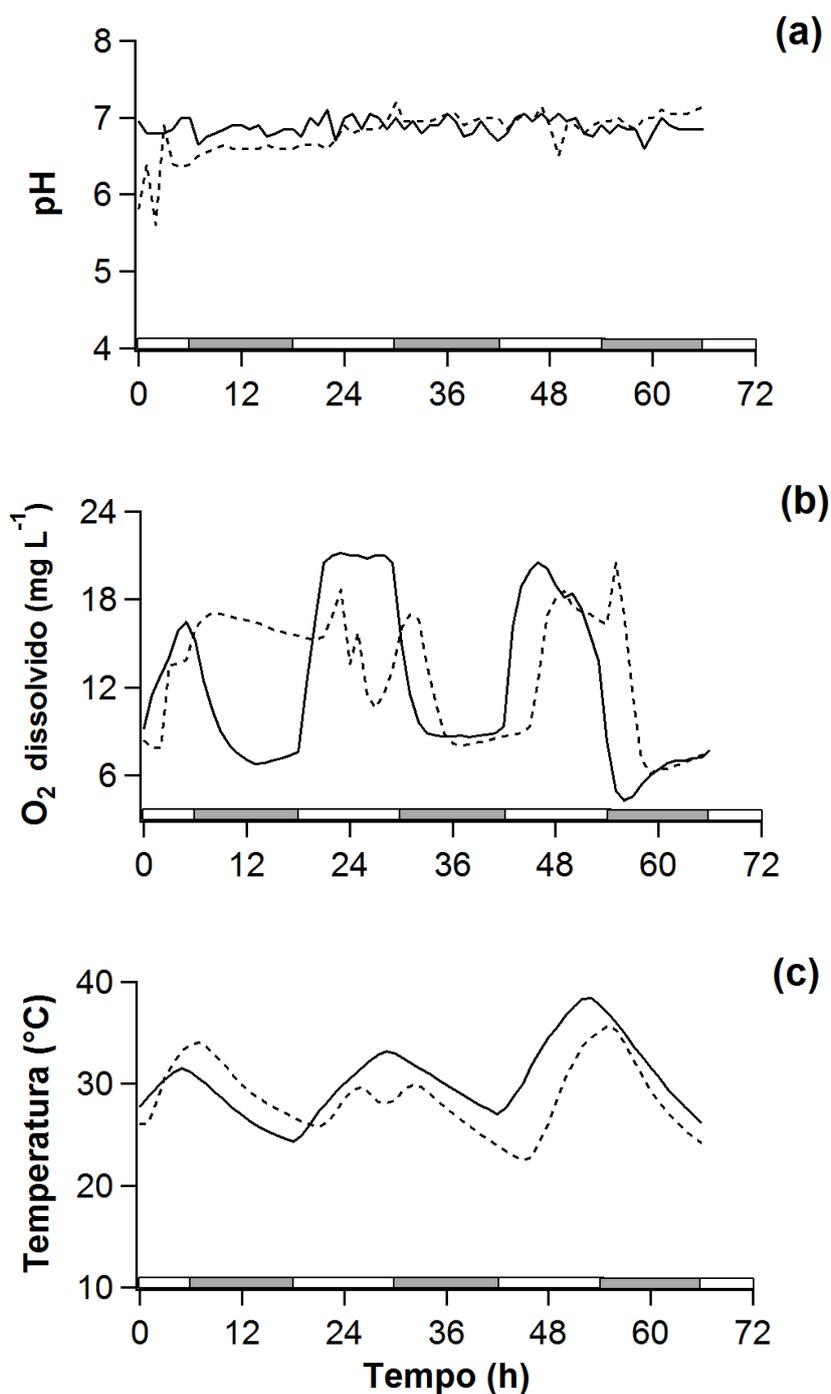


Figura 1. Resultados do monitoramento da cultura em relação ao pH do meio (a), concentração de oxigênio dissolvido (b) e temperatura (c) nas culturas de *C. sorokiniana* com 100 L (linha tracejada) e 1000 L (linha contínua). Barras brancas e cinza escuro acima do eixo X representam 12h de regime fotoperíodo claro e escuro, respectivamente.

Os valores médios de pH registrados estavam de acordo com os reportados para *C. sorokiniana* (6,0-8,0), sendo 7,0 a condição ótima (ZHENG et al., 2013). Apesar da exposição a condições ambientais dinâmicas, *C. sorokiniana* apresentou uma taxa de

crescimento específica mais alta quando cultivada em 100 e 1000 L. Ambos os tratamentos foram realizados sob temperaturas mais altas do que o mantido em condições laboratoriais, o que pode explicar esse resultado. Segundo Kumar, Dasgupta e Das (2014), a taxa de crescimento específica tem uma relação positiva com variações de temperatura entre 20 e 30 °C. Além disso, *C. sorokiniana* é uma espécie termotolerante, capaz de crescer em temperaturas de até 42 °C (MORITA; WATANABE; SAIKI, 2000).

A concentração de O₂ dissolvido mudou drasticamente ao longo do experimento nas culturas de larga escala, uma mudança intimamente associada com o fotoperíodo natural em que as culturas se encontravam e com oscilações de temperatura, mas não afetou o crescimento celular em 100 ou 1000 L, em comparação com a cultura de 0,2 L. Além disso, mesmo com a diminuição de temperatura no período noturno, houve alto consumo de O₂, por se tratar de um componente biologicamente utilizado pelas microalgas e por outros organismos presentes nas culturas de escala ampliada. Embora o oxigênio possa ter efeitos tóxicos ou oxidativos nas espécies de plâncton (MOLINA et al., 2001; TREDICI; ZITELLI; BIAGIOLINI, 1992), algumas cepas de *C. sorokiniana* são conhecidas por tolerar a exposição a misturas gasosas com uma alta porcentagem de O₂ (95%) em sua composição (WAGNER; WELCH, 1969). Altos níveis de O₂ podem inibir o crescimento de *C. sorokiniana*, mas esse efeito parece não ser permanente. Richardson, Wagner e Welch (1969) observaram a divisão celular se normalizar após a concentração de oxigênio ser reduzida para os níveis ambientais esperados. Em nossa pesquisa, a taxa específica de crescimento foi mais elevada em escala ampliada, situação na qual observamos altas concentrações de O₂ nos períodos de alta incidência solar. Além disso, as curvas que representam os parâmetros de biomassa apresentaram tendência de crescimento.

A intensidade de luz dentro dos reatores (figura 2a) diferiu substancialmente dependendo das condições de cultura e volume. O experimento em condições laboratoriais com menor volume médio (0,2 L) foi realizado sob condições de luz artificial constante (130 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Os dois reatores de larga escala foram expostos a irradi\u00e2ncia solar vari\u00e1vel. A irradi\u00e2ncia incidente em 0 h atingiu quase 2000 e 1300 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas culturas de 100 e 1000 L, respectivamente. Como as duas culturas se tornaram mais densas, a intensidade da luz dentro delas diminuiu consideravelmente. O monitoramento di\u00e1rio de ΦM (figura 2b) revelou que *C. sorokiniana* apresentou estresse fisiol\u00f3gico acentuado no primeiro dia de cultivo em

larga escala. Atribuímos esses valores Φ_M baixos à exposição inicial à luz solar de alta intensidade e ao primeiro contato com condições ambientais variáveis. A resistência dessas espécies de microalgas ao estresse, no entanto, foi verificada em 100 e 1000 L com a recuperação de Φ_M para níveis fisiologicamente saudáveis ($\sim 0,70$) nos dias seguintes ao experimento.

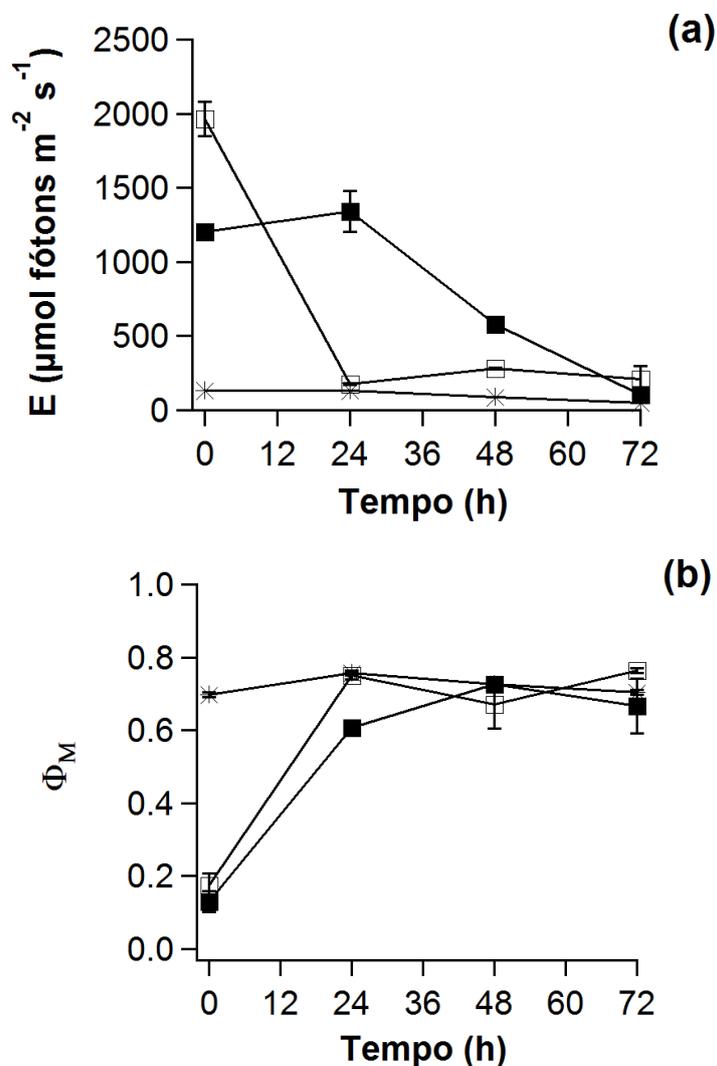


Figura. 2 Intensidade de luz (a) e rendimento quântico máximo (b) de *C. sorokiniana* cultivada em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Os resultados de crescimento (figura 3) também corroboram o aspecto tolerante de *C. sorokiniana*. Densidade celular, concentração de clorofila *a* e densidade óptica (absorbância) aumentaram em todos os experimentos. Nenhuma inibição de crescimento foi verificada. As duas culturas de larga escala iniciaram com inóculos de densidade celular mais altos em comparação com o experimento de laboratório de 0,2 L. As

culturas de 100 L apresentaram a maior taxa de crescimento específica ($0,067 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) em comparação com as de 0,2 L ($0,044 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$) e 1000 L ($0,060 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$). A maior produtividade de biomassa também foi observada em 100 L ($\sim 81 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), enquanto as culturas de 0,2 e 1000 L produziram 25 e $37 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

Os valores da taxa de crescimento específica obtidos nas duas culturas de larga escala foram maiores que os encontrados por Haneda et al., (2015). Os autores cultivaram *C. sorokiniana* sob condições semicontroladas, utilizando biorreatores de 200 L, e a taxa de crescimento resultante foi de $0,046 \text{ h}^{-1}$. Rosenberg et al., (2014) cultivaram 2 L de *C. sorokiniana* em condições de laboratório e encontraram uma taxa de crescimento de $0,015 \text{ h}^{-1}$. A maior taxa de crescimento obtida por Illman, Scragg e Shales (2000) após o cultivo de cinco espécies de *Chlorella* em 2 L foi de $0,041 \text{ h}^{-1}$, o que é próximo do tratamento de 0,2 L ($0,044 \text{ h}^{-1}$) e 1,6 vezes menor que de 100 L, condição em que maior taxa de crescimento foi obtida ($0,067 \text{ h}^{-1}$).

Os resultados de densidade óptica medidos a 684 nm e 570 nm foram quase idênticos, significando que a maioria das partículas presentes nas suspensões de cultura eram células de *C. sorokiniana*, e não contaminantes (LOURENÇO, 2006).

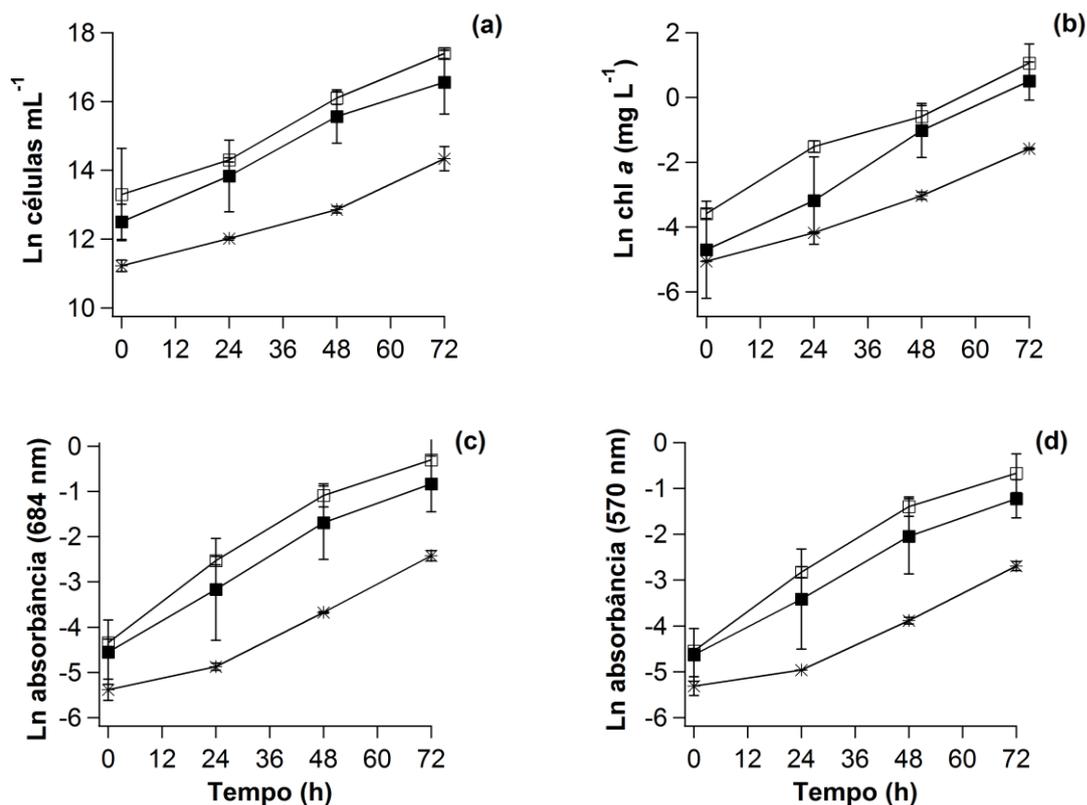


Figura 3. Curva de crescimento de *C. sorokiniana* em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). O monitoramento do crescimento foi realizado em termos de densidade celular (a); concentração de clorofila a (b), densidade óptica (absorbância) a 684 nm (c) e 570 nm (d). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Um dos principais obstáculos ao se cultivar microalgas em fotobiorreatores de larga escala, particularmente os abertos, é a presença inevitável de contaminantes no meio (MORENO-GARCIA et al., 2017; WANG; LAN; HORSMAN, 2012). Como verificado pelo monitoramento da densidade óptica (570 nm) e durante a contagem de células ao microscópio óptico, a contaminação microbiana em nossas culturas foi inexpressiva. Atribuímos esse aspecto positivo ao curto período de cultivo (72 h), ao crescimento rápido de *C. sorokiniana*, ao fato de que as amostras foram coletadas durante sua fase de crescimento exponencial e às tampas de vidro no topo das culturas de 1000 L. Além disso, os cultivos em escala ampliada apresentaram maiores taxas de crescimento. Microalgas e bactérias apresentam influência conjunta em um ambiente e há uma troca metabólica e fisiológica recíproca, pois bactérias nem sempre são

consideradas como potenciais contaminantes, mas sim como componentes de uma interação mutualística com microalgas (FUENTES et al., 2016).

Os rendimentos quânticos máximos (Φ_M) e efetivos ($\Phi'M$) (figura 4a) responderam diferentemente às condições da escala de cultivo: os valores de Φ_M permaneceram semelhantes (sempre $\sim 0,70$), mas $\Phi'M$ diminuiu para 0,35 quando *C. sorokiniana* foi cultivada em 100 e 1000 L em comparação com 0,2 L (0,61). A análise dos decaimentos de fluorescência (figura 4b) indicou que o qP foi maior que o NPQ em todas as condições testadas, apesar do ligeiro aumento no NPQ durante o tratamento de 100 L.

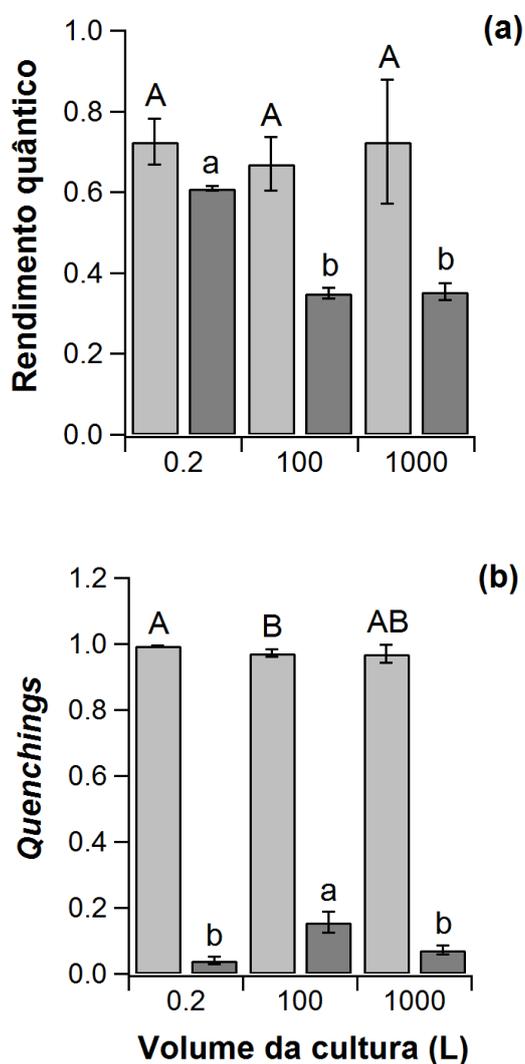


Figura 4. Resultados da fluorescência da clorofila em relação a (a) máximos (Φ_M , barras cinza claro) e operacionais quânticos ($\Phi'M$, barras cinzas escuras); (b) valores de quenchings fotoquímicos (qP, barras cinza claro) e não fotoquímicos (NPQ, barras cinza escuro) para *C. sorokiniana* em três diferentes volumes de cultura. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Nossos resultados de Φ_M corroboram o fato de que altas eficiências fotossintéticas implicam em um alto rendimento de produção de carboidratos pelas microalgas (TALEC et al., 2013), o que pode ser observado na figura 6. O parâmetro Φ_M reflete a atividade fotossintética das células (KROMKAMP et al., 2008). Essa atividade foi reduzida ao cultivar *C. sorokiniana* em 100 e 1000 L, embora as algas fossem fisiologicamente saudáveis e capazes de investir energia em reações fotoquímicas, como evidenciado pela análise qP (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). O coeficiente qP reflete a fração de centros abertos de reação PSII, enquanto o NPQ indica quanta energia é perdida através da dissipação de calor durante a fotoquímica (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Essa perda de energia é conhecida por atuar como um mecanismo de defesa contra o estresse térmico e o dano foto-oxidativo causado pelo excesso de luz (HORTON; RUBAN, 2005; CUAREMA FRANCO et al., 2012). Os coeficientes de qP e NPQ foram inversamente proporcionais. Apesar das condições de temperatura e luz no fotobiorreator de 100 L poderem ter causado em *C. sorokiniana* mais perda de energia por meio da dissipação de calor, este processo de supressão não fotoquímica ainda foi muito mais baixo que o qP. De fato, tem sido argumentado que o aumento da temperatura geralmente leva a uma diminuição na fluorescência de clorofila *a*, mas não no *quenching* fotoquímico (POPIK; GAMAYUNOV, 2015). Os autores explicam que a maior frequência de colisões moleculares ocorre em altas temperaturas e que isso é acompanhado pela desativação de níveis excitados através da radiação, relaxamento menos oscilante do pigmento e, como consequência, diminuição da fluorescência pode ser observada.

Apesar do argumento anterior, a concentração de clorofila *a* aumentou ao longo do tempo em todos os tratamentos e não foi afetada pela temperatura. Segundo Talec et al., (2013), o conteúdo de clorofila da célula pode ser considerado o principal regulador da atividade fotossintética. O fato de ter um comportamento de curva de crescimento semelhante àquele baseado na densidade celular, clorofila *a* sugere que *C. sorokiniana* foi capaz de manter o aparato de clorofila necessário para sustentar a fotossíntese, o que explicaria a recuperação de Φ_M após um dia de experimento. Esta é uma evidência de adaptação às novas condições ambientais presentes no início de nossas culturas de 100 e 1000 L e da resistência de *C. sorokiniana* a condições adversas. Podemos racionalizar que o pigmento foi preservado mesmo considerando as altas temperaturas e o oxigênio dissolvido e, o decaimento da fluorescência foi apenas um processo físico como descrito em Popik e Gamayunov (2015), apoiando nossos resultados de recuperação de Φ_M após

o primeiro dia. Dado que o nosso monitoramento de cultura foi realizado no período da manhã quando a temperatura ainda era amena, não sendo detectada qualquer diminuição na fluorescência de clorofila.

A partir dos resultados da curva de luz (figura 5), observamos que *C. sorokiniana* aumentou gradativamente sua rETR em cada escala de cultivo. Os três parâmetros da curva (α , rETRmax e E_k) e a eficiência fotossintética (P^B) relatada na tabela 1 não indicaram um único tratamento como o melhor. O maior valor de α ($0,60 \pm 0,02$) foi verificado quando as microalgas cresceram em 0,2 L, enquanto as maiores rETRmax ($200,41 \pm 9,86 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e E_k ($349,67 \pm 22,25 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram detectados em 1000 L. Em termos de P^B , as culturas de 100 e 1000 L tiveram os maiores resultados médios: $31,45$ e $34,95 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Uma menor concentração de clorofila foi a razão pela qual P^B foi consideravelmente menor no tratamento de 0,2 L.

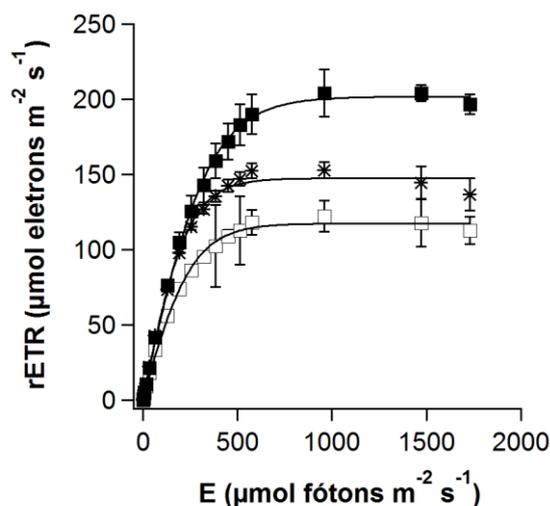


Figura 5. Curva de luz rápida apresentando taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) em função da intensidade da luz (E) para *C. sorokiniana* em culturas com 0,2 L (asteriscos), 100 L (quadrados vazios) e 1000 L (quadrados preenchidos). Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Tabela 1 Eficiência de uso da luz (α), taxa de transporte de elétrons relativa máxima (rETR_{max}), irradiância de saturação (E_k) e eficiência fotossintética (P^B) de *C. sorokiniana* em culturas com 0,2, 100 e 1000 L.

Culture volume (L)	α ($\mu\text{mol elétrons}$ $\mu\text{mol fótons}^{-1}$)	rETR _{max} ($\mu\text{mol elétrons}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E_k ($\mu\text{mol fótons}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	P^B ($\text{mg C L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
0.2	0,62 ± 0,02 ^a	146,66 ± 6,91 ^b	236,90 ± 18,39 ^b	2,07 ± 0,03 ^b
100	0,44 ± 0,02 ^b	115,99 ± 11,6 ^c	266,41 ± 41,34 ^b	31,45 ± 7,16 ^a
1000	0,58 ± 0,06 ^a	200,41 ± 9,86 ^a	349,67 ± 22,25 ^a	34,95 ± 3,35 ^a

Interpretação dos parâmetros das curvas de luz forneceu informações adicionais sobre a atividade fotossintética das algas. A captura e eficiência de utilização da luz (α) observada na cultura de 100 L de *C. sorokiniana* está de acordo com o menor valor de $\Phi'M$ no início do experimento, uma vez que a elevação da inclinação na região de limitação de luz é proporcional ao rendimento quântico efetivo (RALPH; GARDEMANN, 2005). Os maiores valores de rETR_{max} e E_k encontrados para 1000 L são um sinal de aclimatação celular à alta intensidade luminosa como consequência às mudanças para captação de luz (PERKINS et al., 2006). Após 24 h de experimento, menos luz entrou nas culturas em 100 L em comparação com 1000 L. Esta é uma evidência de autossombreamento entre as células, especialmente quando consideramos que a densidade celular em 100 L sempre foi maior que em 1000 L. Autossombreamento pode afetar tanto a produtividade da biomassa quanto a síntese de biomoléculas em microalgas (AGUSTÍ 1991; CHRISMADHA; BOROWITKA, 1994). Porém, pode ter auxiliado na proteção das microalgas contra danos causados pela exposição à alta intensidade de luz imediatamente após o inóculo (~ 1200-2000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tal interpretação é corroborada pelo fato de que o maior valor de rETR_{max} em 1000 L não levou a um P^B proporcionalmente maior, sugerindo uma ruptura no fluxo de elétrons entre o PSII e a fixação de carbono. Isso acontece quando os mecanismos fotoprotetores (por exemplo, fotorrespiração, fotofosforilação cíclica, reação de Mehler) atuam como um depósito de vias alternativa de elétrons (BADGER et al., 2000; FLAMELING; KROMKAMP, 1998; HUOT; BABIN, 2010). Devido a tais

processos regulatórios, é provável que menos elétrons entraram no Ciclo de Calvin, onde ocorre a fixação de carbono.

Nossas estimativas de P^B nas culturas de 100 e 1000 L foram maiores que as medidas primárias de produtividade obtidas por Gentner (1983), que cultivou seis espécies de Chlorophyceae em culturas de 4 L. O autor relatou valores de produtividade de 5,3; 3,6; 3,5; 3,4; 2,3 e 2 $\text{mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para *Scenedesmus acutus*, *S. parisiensis*, *S. bijugatus*, *S. basiliensis*, *Ankistrodesmus braunii* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente. A fixação de carbono em nossas culturas de 0,2 L foi mais próxima de seus resultados, o que é justificável, já que ambos os experimentos foram realizados sob condições controladas. Uma compilação das taxas de consumo de CO_2 de diferentes estudos foi relatada por Ghorbani et al., (2014) e os resultados variam consideravelmente dependendo de parâmetros como temperatura e porcentagem de CO_2 fornecida às microalgas. Cheng et al. (2006) cultivaram *C. vulgaris* em fotobiorreatores de 10 L com 1% de CO_2 / suprimento de ar e relataram uma taxa máxima de fixação de CO_2 de 260 $\text{mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, significando que taxas fotossintéticas otimizadas podem ser alcançadas em sistemas de cultura em larga escala. O aumento de P^B e carboidratos totais em 100 e 1000 L sugere que *C. sorokiniana* aumentou sua eficiência fotossintética para acumular mais carboidratos quando exposta a condições semicontroladas. Isso corrobora a possibilidade de melhorar a produção de carboidratos em microalgas, submetendo-as estrategicamente a certos tipos de estresses fisiológicos, como visto por Markou, Angelidaki, e Georgakakis (2012) e Chen et al. (2013).

As células de *C. sorokiniana* apresentaram composição bioquímica distinta, dependendo da escala de cultura usada (figura 6). Houve maior acúmulo de proteínas e lipídios em detrimento dos carboidratos quando cultivadas sob condições controladas (0,2 L). Em relação às escalas ampliadas, os carboidratos foram predominantes, enquanto as proteínas e os lipídios permaneceram baixos.

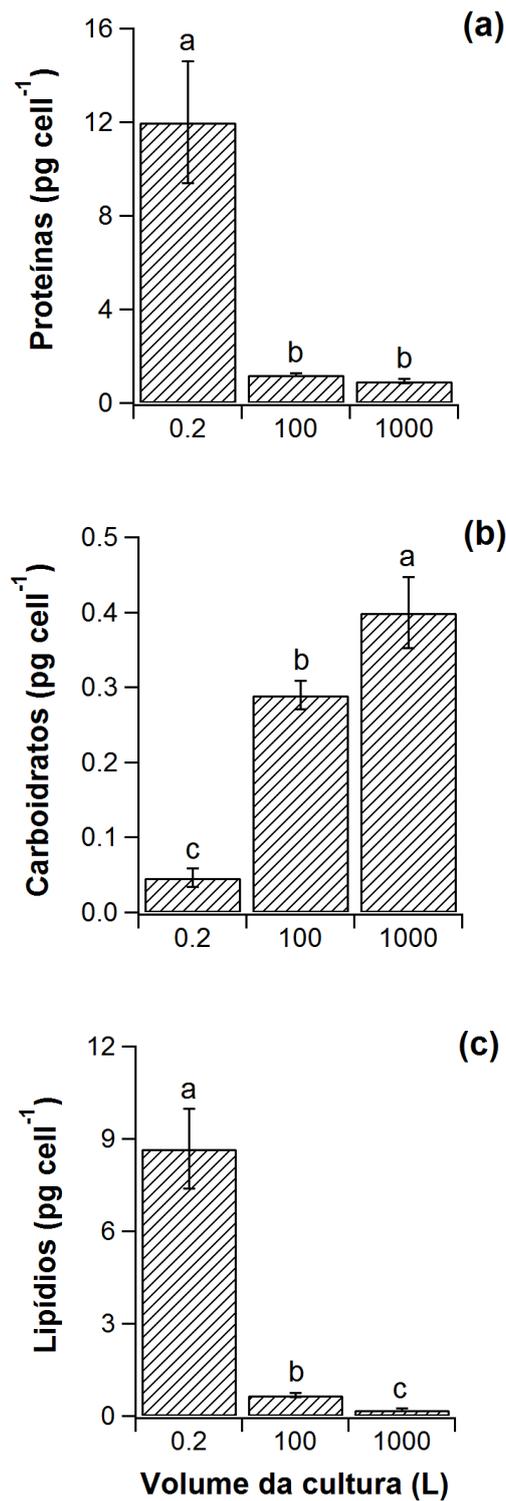


Figura 6. Concentração total de proteínas (a), carboidratos (b) e lipídios totais (c) em células de *C. sorokiniana* em três diferentes volumes de cultura. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

Os resultados obtidos em relação à composição bioquímica de *C. sorokiniana* evidenciaram a tendência desta espécie em produzir mais proteínas e lipídios quando

cultivada sob condições controladas. As proteínas totais quantificadas no tratamento de 0,2 L estão de acordo com o relatado em Kumar, Dasgupta e Das (2014). Eles investigaram os efeitos de diferentes parâmetros físico-químicos em *C. sorokiniana* (culturas de 0,25 L) e obtiveram proteínas como biomoléculas predominantes, seguidas de lipídios e carboidratos. As células de microalgas em condições controladas tendem a acumular mais proteínas, enquanto as moléculas de reserva (carboidratos, lipídios) são produzidas em maior quantidade durante situações estressantes (GUCCIONE et al., 2014; HANEDA et al., 2015; ROCHA et al., 2016; CHIA et al., 2017). O aumento de lipídios e carboidratos em *Chlorella* sp é conhecido como um sinal de estresse causado, por exemplo, por altas concentrações de CO₂ (BHOLA et al., 2017). A exposição a altas intensidades luminosas das duas culturas de larga escala foi provavelmente o fator determinante que levou ao aumento dos carboidratos totais. Tal interpretação é corroborada pelo fato de que outras espécies de *Chlorella* têm um conteúdo reduzido de carboidratos quando cultivadas sob intensidades de luz mais baixas (CHENG et al., 2017; FREITAS et al., 2017).

CONCLUSÕES

Crescimento, fisiologia, fotossíntese e o conteúdo bioquímico de *C. sorokiniana* variaram consideravelmente entre os tratamentos. A cultura de 100 L apresentou a maior taxa de crescimento e produtividade de biomassa. *C. sorokiniana* foi capaz de manter níveis fisiologicamente saudáveis de Φ_M durante a fase de crescimento exponencial em todos os tratamentos, mas Φ'_M diminuiu nas duas culturas de escala ampliada. O decaimento direcionado à fotossíntese, qP , permaneceu sempre próximo de 1,0, o valor máximo adequado. Algas cultivadas em 1000 L apresentaram as maiores $rETR_{max}$ e E_k , evidenciando uma adaptação à alta intensidade luminosa. Tanto 100 como 1000 L resultaram em carboidratos totais e P^B significativamente maiores em comparação com as culturas de 0,2 L. Proteínas totais e lipídios, por outro lado, foram predominantes maiores no tratamento de 0,2 L. No geral, *C. sorokiniana* provou ser uma espécie altamente adaptável e sua composição bioquímica pode ser intencionalmente alterada dependendo das condições de cultivo fornecidas.

REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ, S. Light environment within dense algal populations: cell size influences on self-shading. **Journal of Plankton Research**, v13, p863-871, 1991.
- BADGER, M.R.; Von CAEMMERER S.; RUUSKA, S.; NAKANO, H. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v355, p1433–1446, 2000.
- BECKER, E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**. 293 p., New York, 2008.
- BHOLA, V.K.; SAWALAHA, F.M.; NARS, M.; KUMAARI, S.; BUX, F. Physiological responses of carbon-sequestering microalgae to elevated carbon regimes. **European Journal of Phycology**, v51, n4, p401-412, 2016.
- BHOLA, V.K.; SAWALAHA, F.M.; NARS, M.; KUMAARI, S.; BUX, F. Fuzzy intelligence for investigating the correlation between growth performance and metabolic yields of a *Chlorella* sp. exposed to various flue gas schemes, **Bioresource Technology**, v243, p1078-1086. 2017.
- CAMARGO, E.C. **Cultivo de *Chlorella sorokiniana* exposta a gases de combustão (CO₂, NO₂ e SO₂): crescimento, fotossíntese e bioquímica**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 49p, 2016.
- CAMPO, V.L.; KAWANO, D.F.; DA SILVA, J.R.; CARVALHO, I. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. **Carbohydrate Polymers**, v77, p167-180, 2009.
- CARDOSO, A.S.; VIEIRA, G.E.G.; MARQUES, A.K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Brazilian Journal of Biosciences**, v9, n4, p542-549, 2011.
- CHEN, C.Y.; YEH, K.L.; AISYAH, R.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v102, p71-81, 2011.
- CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H.W.; HO, S.H.; CHENG, C.L.; LEE, D.J.; BAI, F.W.; CHANG, J.S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v78, p1–10, 2013.
- CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v50, p324-329, 2006.
- CHENG, D.; LI, D.; YUAN, Y.; LIN, Z.; XUYANG, L.; WU, T.; WANG, L.; ZHAO, Q.; WEI, W.; SUN, Y. Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. **Biotechnology for Biofuels**, v10, n75, p1-14, 2017.
- CHRISMADHA, T.; BOROWITZKA, M.A. Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricorutum* grown in a tubular photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v6, p67–74, 1994.

CHIA, M.A.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; PARRISH, C.C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, v128-129, p171-182, 2013.

CHIA, M.A.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K.; LORENZI, A.S.; OLIVEIRA, M.C.B. Cylindrospermopsin induced changes in growth, toxin production and antioxidant response of *Acutodesmus acuminatus* and *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrogen conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v142, p189-199, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**. v25, p294–306, 2007.

CUARESMA FRANCO, M.; BUFFING, M.F.; JANSSEN, M.; LOBATO, C.V.; WIJFFELS, R.H. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v24, n4, p693–699. 2012.

FLAMELING, I.; KROMKAMP, J. Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. **Limnology and Oceanography**, v43, p284-297, 1998.

FREITAS, B.C.B.; CASSURIAGA, A.P.A.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v238, p248-253, 2017.

FUENTES, J.L.; GARBAYO, I.; CUARESMA, M.; MONTERO, Z.; VALLE, M.G.; VILCHEZ, C. Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. **Marine Drugs**, v14, p1-16, 2016.

GENTNER, S. R. Measurement of primary productivity in dense algal cultures. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v40, p807–810, 1983.

GHORBANI, A.; RAHIMPOUR, H.R.; GHASEMI, Y.; ZOUGHI, S.; RAHIMPOUR, M.R. A review of carbon capture and sequestration in Iran: microalgal biofixation potential in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v35, p73–100, 2014.

GUCCIONE, A.; BIONDI, N.; SAMPIETRO, G.; RODOLFI, L.; BASSI, N.; TREDICI, M.R. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v7, p1-12, 2014.

HANEDA, R.N.; VIEIRA, B.H.; FONTES, S.R.; LOMBARDI, G.; CASALI, C.A.; LOMBARDI, A.T. Biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* grown in a novel design of hybrid photobioreactor. **Journal Microbial and Biochemical Technology**, v7, n2, p76-82, 2015.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v56, p365-373, 2005.

HUOT, Y.; BABIN, M. Overview of fluorescence protocols: Theory, basic concepts, and practice. In D. Suggett, O. Prasil, and M. A. Borwitzka [eds.], **Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications**, 1st edn. Springer Netherlands, Dordrecht, p103–127, 2010.

ILLMAN, A.M.; SCRAGG, A.H.; SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v27, p631-635, 2000.

KROMKAMP, J.C.; DIJKMAN, N.A.; PEENE, J.; SIMIS, S.G.H.; GONS, H.J. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, v43, n4, p327-344, 2008.

KROON, B.; PRIZELIN, B.B.; SCHOJELD, O. Chromatic regulation of quantum yields for photosystem II charge separation, oxygen evolution, and carbon fixation in *Heterocapsa pygmaea* (Pyrrophyta). **Journal of Phycology**, v29, p453-462, 1993.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C.N.; DAS, D. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. **Bioresource Technology**, v167, p358-366, 2014.

LIU, F.; HUANG, J.C.; ZHOU, C.; HE, S.; ZHOU, W. Development of an algal treatment system for Se removal: Effects of light regimes, nutrients, sulfate and hypersalinity. **Chemosphere**, v164, p372-378, 2016.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology** v96, p631-645, 2012.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v51, p659-668, 2000.

MERCURIO, D.G.; WWAGEMAKER, T.A.L.; ALVES, V.M.; BENEVENUTO, C.G.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts. **Journal of Photochemistry & Photobiology. B, Biology**, v153, p121-126, 2015.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F.G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v92, n2, p113-131, 2001.

MORENO-GARCIA, L.; ADJALLÉB, K.; BARNABÉB, S.; RAGHAVANA, G.S.V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v76, p493-506, 2017.

MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v87, p203-218, 2000.

MÜLLER, P.; LI, X.P.; NIYOGI, K.K. Non-photochemical quenching: a response to excess light energy. **Plant physiology**, v125, p1558-1566, 2001.

PERKINS, R.G.; MOUGET, J.L.; LEFEBVRE, S.; LAVAUD, J. Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms, **Marine Biology** v149, p703-712, 2006.

POPIK, A.Y.; GAMAYUNOV, E.L. The dependence of the fluorescence spectrum of phytoplankton on external influences. **Pacific Science Review: A Natural Science Engineering**, v17, p29–33, 2015.

POYATO, C.; THOMSEN, B.R.; HERMUND, D.B.; ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I.; JÓNSDÓTTIR, R.; KRISTINSSON, H.G.; JACOBSEN, C. Antioxidant effect of water and acetone extracts of *Fucus vesiculosus* on oxidative stability of skin care emulsions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v119, p1-11, 2017.

RALPH, P.J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany** v82, p222–237, 2005.

RICHARDSON, B.; WAGNER, F. W.; WELCH, B. E. Growth of *Chlorella sorokiniana* at hyperbaric oxygen pressures. **Applied Microbiology**, v17, p135–138, 1969.

ROCHA, G.S.; PARRISH, C.C.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, v25, n8, p1468-1477, 2016.

ROSENBERG, J.N.; KOBAYASHI, N.; BARNES, A.; NOEL, E.A.; BETENBAUGH, M.J.; OYLER, G.A. Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana*. **Plos One**, v9, n4, p1-13, 2014.

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDEUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v44, p20-36, 2015.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v14, p2596-2610, 2010.

SHIHIRA, I.; KRAUSS, R.W. *Chlorella*. **Physiology and taxonomy of forty-one isolates**. Maryland: p1-97, 1965.

TALEC, A.; PHILISTIN, M.; FERREY, F.; WALENTA, G.; IRISSON, J.O.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. **Bioresource Technology**, v143, p353-359, 2013.

TREDICI, M.R.; ZITELLI, G.C.; BIAGIOLINI, S. Influence of turbulence and areal density on the productivity of *Spirulina platensis* grown outdoor in a vertical alveolar panel. In: BERTHOLZ-REHBRUCKE, **First European Workshop on Microalgal Biotechnology**, p58–60, 1992.

USHER, P.K.; ROSS, A.B.; VALERO, M.A.C.; TOMLIN, A.S.; GALE, W.F. An overview of the potential environmental impacts of largescale microalgae cultivation. **Biofuels**, v5, n3, p331-349, 2014.

YAAKOB, Z.; ALI, E.; ZAINAL, A.; MOHAMAD, M.; TAKRIFF, M.S. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of Biological Research**, v21, n6, p1-10, 2014.

YAMASAKI, M.; OGURA, K.; HASHIMOTO, W.; MIKAMI, B.; MURATA, K. A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. **Journal of Molecular Biology**, v352, p11-21, 2005.

WAGNER, F. W.; WELCH, B. E. Oxygen-tolerant Strain of *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology**, v17, p139–144, 1969.

WANG, B.; LAN, C.Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v30, p904-912, 2012.

WU, Y.; RAO, B.; WU, P.; LIU, Y.; LI, G.; LI, D. Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. **Plant Soil**, v370, p115-124, 2013.

ZHENG Y.; LI T.; YU X.; SHULIN, C. High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Applied Energy**, v108, p281–287, 2013.

CAPÍTULO 3

EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE HORTALIÇAS OBTIDAS DE SEMENTES PELETIZADAS COM BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana*

RESUMO

O cultivo de microalgas tende a aumentar, uma vez que a demanda por suplementos nutracêuticos, biocombustíveis, ração animal e biorremediação do CO₂ atmosférico ou industrial ganha força rumo à sustentabilidade da sociedade. Com isso, poderá ser gerada elevada quantidade de biomassa algal residual e, a reutilização dessa biomassa pode contribuir com a viabilidade da produção algal tanto em termos financeiros como em termos ambientais. Uma das formas de se utilizar a biomassa algal é como ingrediente em processo de peletização de sementes. O objetivo deste capítulo foi avaliar a viabilidade da utilização de biomassa algal como material constituinte no processo de peletização de sementes das hortaliças alface e almeirão. Para tanto efetuamos a peletização das sementes com dois tipos de materiais de revestimento (argila ou farinha de trigo) e acrescentamos biomassa algal. Realizamos o plantio e cultivo das hortaliças sob condições controladas. Os resultados mostraram que tanto a argila quanto a farinha foram efetivos materiais de revestimento para almeirão, mas não para a alface. No caso do almeirão, 90% de porcentagem de emergência foi obtido, similar ao controle, mas no caso da alface apenas 17% no tratamento que continha farinha. A biomassa de *Chlorella sorokiniana* mostrou-se viável no processo de peletização de sementes de almeirão e de alface.

Palavras chave: alface; almeirão; microalgas; orgânico; peletização

INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas tende a aumentar, uma vez que a demanda por suplementos nutracêuticos, biocombustíveis, ração animal e biorremediação do CO₂ atmosférico ou industrial ganha força em sociedades sustentáveis. Há processos que geram grandes quantidades de biomassa algal como resíduos, tal qual a extração de biodiesel a partir de microalgas (CHADER et al., 2011). Assim, a reutilização, ou destinação adequada, dessa biomassa residual se faz necessária, pois sua decomposição poderia emitir significativa quantidade de CO₂ à atmosfera (LAGUNA, 2012), contrariamente à captação desse gás feita no processo fotossintético durante o cultivo microalgal. Além disso, pode levar à eutrofização de corpos d'água onde se depositar, levando à morte todo um ecossistema previamente consolidado.

Uma das formas de se utilizar a biomassa algal oriunda de cultivos com as mais diversas aplicações é sua utilização como componente do processo de peletização de sementes (MONTANHIM, 2014). Assim, a utilização de biomassa algal traz um apelo ecológico à prática de peletização de sementes. A peletização de sementes é o revestimento de sementes com material que permite aderência, chamado de material cimentante, e com material em pó de granulometria fina, chamado material de revestimento (LOPES; NASCIMENTO, 2012). Tem por finalidade a uniformização e aumento de tamanho de sementes pequenas, facilitando o plantio em semeadoras de precisão (LOPES; NASCIMENTO, 2012). A peletização é uma técnica que pode aumentar a viabilidade das sementes, pois segundo Oliveira et al. (2003), que testaram diferentes materiais de peletização na deterioração de sementes de tomate durante seu armazenamento, as sementes revestidas com areia e microcelulose e sem tratamento fungicida mantiveram sua qualidade por 24 h de armazenamento, independente da embalagem utilizada.

As sementes de hortaliças são de difícil manuseio devido à irregularidade do tegumento, presença de pelos, pequeno tamanho e presença de impurezas, como resquícios da planta mãe. A união dessas características leva a falhas na lavoura, plantas adultas de baixa comercialização por problemas estéticos, além de dificuldades na semeadura (LOPES; NASCIMENTO, 2012). Para otimizar os gastos com sementes e para facilitar o manuseio de sementes pequenas, principalmente, surgiu a prática da peletização, facilitando a semeadura manual ou mecanizada (SILVA, 1997).

A prática da peletização apresenta inúmeras vantagens, como aumento do tamanho das sementes facilitando o manuseio, semeadura direta manual ou mecanizada, e, pode ainda ser veículo para aplicação de doses adequadas de nutrientes, promotores do crescimento e pesticidas. Também há a formação de um microclima mais uniforme ao redor das sementes (SILVA; SANTOS; NASCIMENTO, 2002; LOPES; NASCIMENTO, 2012) em comparação com sementes não peletizadas. Há promoção de maior segurança no manuseio pelo agricultor, há proteção para a semente contra danos mecânicos no manuseio e contra alta umidade, além de melhorar a estética da semente (SANTOS, 2016).

A partir da década de 90, o processo de peletização foi aprimorado e hoje se encontra no auge da indústria sementeira, já que há maior preocupação com segurança do trabalho, proteção ao meio ambiente e sustentabilidade e almeja-se uma semeadura com maior precisão (SANTOS, 2016). Há um custo financeiro embutido na peletização de sementes, já que há necessidade dos produtos cimentante e de recobrimento e, maquinário para peletizar sementes (SANTOS, 2016). Além disso, o pélete pode conferir uma barreira física e dificultar a emissão da radícula e par cotiledonar, aumentando o tempo de emergência das plântulas. No entanto, o tratamento de peletização pode manter inalterada a qualidade fisiológica das sementes e ainda favorecer o desempenho destas em condições adversas. Bertagnolli et al. (2003) estudaram o desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface sob diferentes potenciais hídricos e temperaturas e verificaram que a temperatura de 35 °C e potencial hídrico de -0,9 MPa impediram a germinação das sementes, mas as sementes peletizadas foram mais resistentes aos estresses induzidos nas condições experimentais.

Em processo de peletização de sementes de alface, Queiroz et al. (2015) utilizaram compostos homeopáticos em substituição aos fungicidas e promotores de crescimento convencionalmente utilizados. Esses autores obtiveram mudas saudáveis e vigorosas, exaltando os benefícios de se utilizar materiais menos impactantes no processo de peletização.

Tendo por base que as microalgas apresentam grande quantidade de material mucilaginoso higroscópico constituído principalmente de polissacarídeos, além de proteínas e lipídios (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; HANEDA et al., 2015), sua incorporação na peletização de sementes pode contribuir para o desenvolvimento das plantas, além de fornecer materiais orgânicos biodegradáveis ao solo, como ocorre com o biofertilizante produzido por algas marinhas, principalmente

do gênero *Lithothamnium*, chamado de granulado bioclástico. Este repõe os minerais e condiciona o solo, agregando nutrientes importantes para o desenvolvimento do plantio (VASCONCELOS, 2012).

A procura por uma agricultura com práticas saudáveis e que tenham responsabilidade no uso dos recursos naturais foi expressa no interesse do setor da agricultura brasileiro com a produção de orgânicos, que cresceu 51,7% entre janeiro de 2014 e janeiro de 2015 (BRASIL, 2015). Cerca de 20% dos municípios do Brasil (BRASIL, 2016). O uso de produtos naturais facilitadores do desenvolvimento vegetal em sistemas agrícolas orgânicos torna-se uma técnica interessante, inclusive pela falta de estudos sobre a utilização das microalgas na agricultura (GEMIN, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar a germinação de sementes de hortaliças peletizadas contendo biomassa algal no pélete. Para tanto utilizamos sementes das hortaliças alface e almeirão com dois tipos de materiais de revestimento, argila em pó e farinha de trigo além da biomassa algal e acompanhamos a emergência das plântulas sob condições ambientais controladas.

A escolha das hortaliças foi feita com base de que alface (*Lactuca sativa*) é a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil, sendo fonte de vitaminas e sais minerais, principalmente em vitamina A, com alto teor (MARQUES et al. 2003) de cálcio (VIEIRA, 2010). Assim como brócolis e rúcula, os metabólitos da alface auxiliam na digestão, reduzem o colesterol e o risco de doenças cardiovasculares e auxiliam no crescimento e vigor da pele, ossos e cabelos (RODRIGUES, 2012). Almeirão (*Chicorium intybus* L.) também é uma folhosa que fornece vitaminas A, C e do complexo B, sendo boa fonte de fósforo e ferro (VIEIRA, 2010). O almeirão pertence à família Asteraceae, com sabor amargo pronunciado, que apresenta propriedades nutricionais e farmacológicas (FRANCO, 1987). Juntamente com alface e chicória, almeirão se destaca como uma das hortaliças mais consumidas no Brasil, principalmente em saladas, sendo suas folhas consumidas *in natura* (FILGUEIRA, 2008). Sendo assim, alface e almeirão foram as espécies selecionadas para serem utilizadas no teste de peletização do presente estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de emergência na germinação das hortaliças alface e almeirão para sementes nuas foram, respectivamente 92% (5,25) e 93% (6,83) com tempo médio de germinação de 3,6 (0,07) e 2,9 (0,15) dias. Esses resultados são mostrados nas figuras 1 e 2.

Sabe-se que o atraso no tempo de germinação pode-se dar em virtude da formação de uma barreira às trocas gasosas entre a semente e o meio externo. De acordo com Oliveira, Bruno e Alves (2001), tal barreira forma-se a partir de partículas finas oriundas do material de revestimento, que passam a ocupar os poros do tegumento da semente.

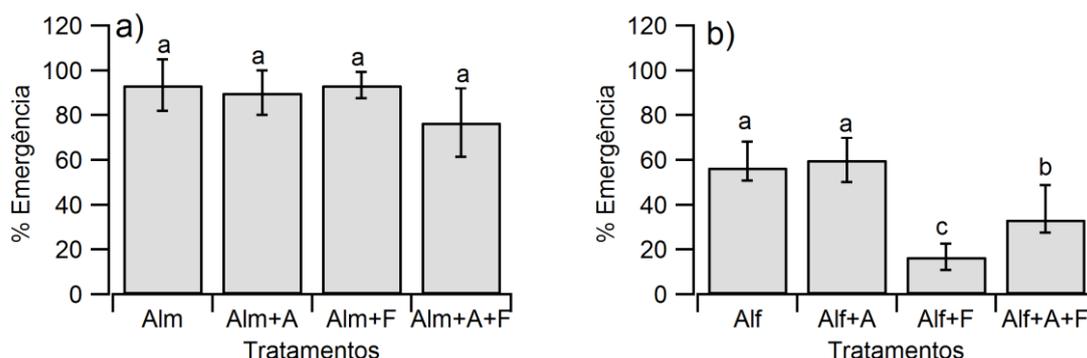


Figura 1. Porcentagem de emergência de plântulas de a) almeirão (Alm, semente nua), b) alface (Alf, semente nua) e de plântulas oriundas de péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila+farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

A porcentagem média de emergência relatada na literatura é menor em sementes peletizadas (FRANZIN; MENEZES, 2002; LOPES; NASCIMENTO, 2012) devido à dificuldade de absorção de água e oxigênio imposta pelo pélete (FRANZIN et al., 2004). Além disso, o pélete retém umidade, o que propicia maior proliferação de microrganismos que se nutrem do endosperma das sementes. Nossos resultados mostram que a farinha absorve alta quantidade de água. Trata-se de um material que retém a água por mais tempo do que a argila, visto que os péletes com farinha

demoraram mais para secar e apresentaram maior valor médio de porcentagem de umidade em relação aos demais tratamentos, o que pode ser observado na figura 4. Em nosso estudo, as sementes de alface peletizadas com farinha e biomassa algal apresentaram a menor porcentagem média de emergência, evidenciando que alface é uma hortaliça mais sensível que almeirão e, talvez esse tipo de peletização não seja o mais indicado para a alface.

Os valores médios de porcentagem de germinação sob condições controladas em placas de Petri foram similares aos encontrados para porcentagem de emergência em sementes de almeirão nuas.

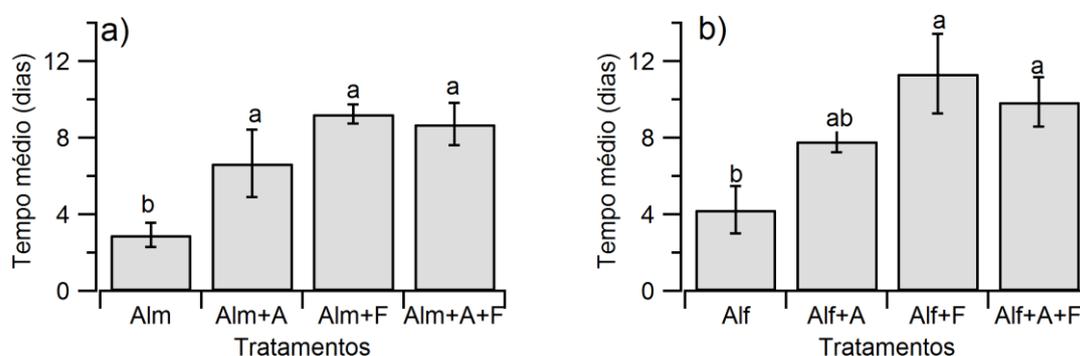


Figura 2. Tempo médio de emergência (dias) de plântulas de a) almeirão, b) alface e de plântulas oriundas de péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila e farinha (A+F) na mesma proporção e todos contendo biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

As sementes nuas e sementes de alface peletizadas com argila como material de revestimento foram as que apresentaram menor tempo de emergência. Com exceção das sementes de alface peletizadas com argila, os demais tratamentos, tanto para alface quanto para almeirão, apresentaram tempo médio de emergência superior nas sementes peletizadas. Estes resultados concordam com os apresentados em Silva, Santos e Nascimento (2002), que avaliaram a viabilidade e o desenvolvimento de plântulas de alface oriundas de sementes peletizadas com diferentes proporções de bentonita e cola à base de acetato de polivinila (PVA). Observaram que as sementes nuas apresentaram menor tempo de emergência do que as peletizadas. É esperado que sementes peletizadas apresentem maior tempo médio de emergência em comparação com sementes nuas (SILVA; SANTOS e NASCIMENTO, 2002; MONTANHIM, 2014), já que a radícula e

o primeiro par de cotilédones devem ultrapassar a barreira imposta pelo pélete, ausente na semente nua.

Analisando-se o processo de peletização, para ambas as hortaliças, almeirão e alface, as sementes nuas apresentaram menor valor de massa de 1000 sementes em relação aos valores para 1000 péletes com argila, farinha e, argila e farinha, como visto na figura 3. As sementes de almeirão são mais esféricas do que as de alface e apresentaram boa aderência com argila, o que levou ao maior valor de massa de 1000 péletes em relação aos demais tratamentos.

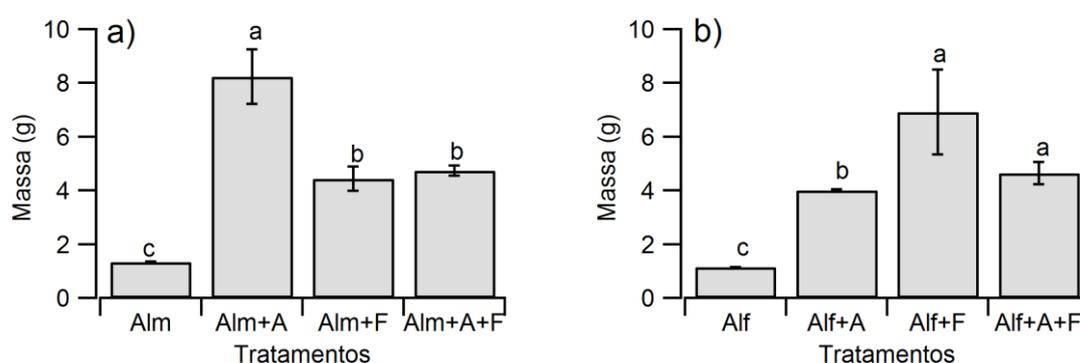


Figura 3. Massa de 1000 sementes e péletes de a) almeirão e b) alface, sendo os péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila+farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade.

A figura 4 apresenta os valores médios de porcentagem de umidade das sementes e seus péletes.

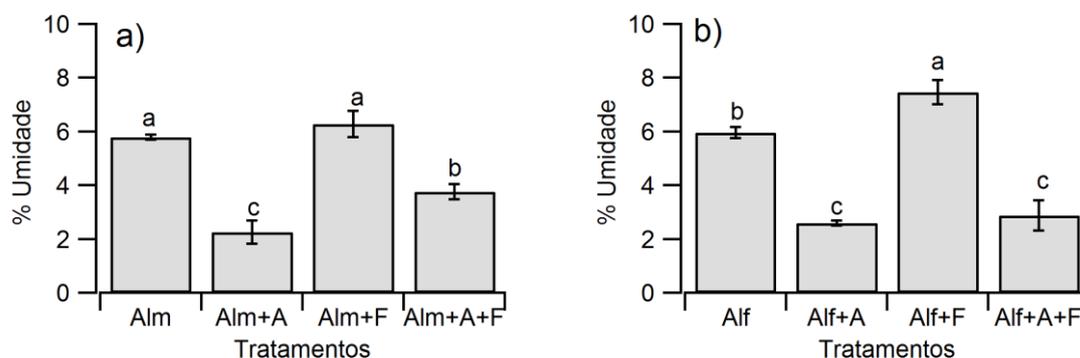


Figura 4. Porcentagem de umidade de sementes e péletes de a) almeirão e b) alface, sendo os péletes feitos com argila (A), farinha (F), argila e farinha (A+F) na mesma proporção e biomassa algal. Letras diferentes significam diferença estatística entre os tratamentos, considerando 5% de probabilidade.

A umidade das sementes peletizadas é fator importante a ser considerado pois relaciona-se com a presença de microorganismos endofíticos, que são fungos e bactérias que habitam o interior das partes aéreas das plantas sem causar-lhes danos aparentes (AZEVEDO, 1998). Quanto maior a umidade da semente, maiores serão as chances de proliferação dos microorganismos endofíticos. Nossos resultados (figura 5) mostraram que os péletes que continham apenas farinha como material de revestimento apresentaram os valores mais elevados de umidade. Este fato pode estar diretamente relacionado ao menor valor médio de porcentagem de germinação para a alface, já que a retenção de água promove a proliferação de microrganismos e a consequente decomposição da semente. Além disso, a adição de água ao pélete com farinha faz com que o glúten se evidencie, o que pode ter ainda contribuído para a menor porcentagem de emergência dos péletes de alface com farinha como material de revestimento. Esse comportamento não foi observado para os péletes das sementes de almeirão com farinha, cuja emergência foi de ~90%, quer tenha sido usada a farinha ou a argila.

De modo geral, o solo encontrava-se em condições adequadas para a realização do experimento e, de acordo com a rede Embrapa de Laboratórios, o teor de matéria orgânica presente no solo utilizado nesse trabalho é considerado alto e de boa qualidade.

Os valores encontrados de condutividade elétrica evidenciam que as sementes não estavam em processo de expressiva liberação de metabólitos ao meio externo, o que possibilitou sua utilização neste teste. Sementes de almeirão apresentaram diferença de condutividade elétrica num intervalo de 30 dias de 2,11 (0,61) $\mu\text{S cm}^{-1}$ e alface de 2,81 (0,31) $\mu\text{S cm}^{-1}$.

De acordo com Sobral et al. (2015), o pH do solo com valores entre 5,2 e 5,3 não causa danos às raízes, sendo os ideais para plantios e sementeiras. O valor de saturação por bases (88%) maior que 70% indica ser desnecessária a calagem e a capacidade de troca catiônica (CTC) indica que a adubação feita no solo anteriormente ao experimento foi adequada, não necessitando de acréscimo de nitrogênio e potássio. O solo é médio-arenoso, de acordo com a classificação do teor de argila.

Consideramos a argila como um material de revestimento mais efetivo do que a farinha, já que levou a valores similares de porcentagem de emergência de plântulas de almeirão em relação ao tratamento controle e os péletes com argila continham menor teor de umidade. Além disso, semente de alface peletizada com argila apresentou porcentagem de emergência equivalente ao tratamento controle, contrariamente ao tratamento da semente dessa hortaliça peletizada com a mistura de farinha com argila.

Inferimos que a argila possa ter retido determinadas substâncias tóxicas e algas, funcionando como uma barreira de retenção (RODRÍGUEZ-LIÉBANA et al., 2016). A contribuição da biomassa de *C. sorokiniana* nos péletes pode ser devida à presença de biomoléculas nessa biomassa. Entretanto, avaliar o efeito da composição bioquímica da biomassa algal não era objetivo desta parte da pesquisa, mas pode ser aqui sugerido como um prosseguimento do estudo da peletização de sementes de hortaliças.

CONCLUSÕES

A biomassa algal de *Chlorella sorokiniana* usada como parte do material na peletização de sementes junto aos materiais de revestimento argila em pó e farinha em pó mostrou-se viável no processo de peletização de sementes, como confirmado durante estudo da emergência de plântulas de almeirão e de alface.

O desenvolvimento das plântulas sugeriu que sementes de alface não se desenvolveram satisfatoriamente perante peletização, mas as sementes de almeirão desenvolveram-se como do esperado, sendo comparáveis aos controles. Entretanto, como ocorre com a maioria das sementes peletizadas, o tempo de emergência foi menor na semente nua do que na semente peletizada.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, p117-137, 1998.

BERTAGNOLLI, C.M.; MENEZES, N.L.; STORCK, L.; SANTOS, O.S.; PASQUALLI, L.L. Desempenho de sementes nuas e peletizadas de alface (*Lactuca sativa* L.) submetidas a estresses hídrico e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, v25, p7-13, 2003.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v26, p9-20, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Notícias: produção sustentável**, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/03/numero-de-produtores-organicos-cresce-51porcento-em-um-ano>> Acesso em: 10/07/2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Notícias: sustentabilidade**, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/06/22porcento-dos-municipios-brasileiros-tem-producao-organica>. Acesso em: 10/07/2018.

CHADER, S. MAHMAH, B.; CHETEHOUNA, K.; MIGNOLET, E. Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana* a green microalga. **Revue des Energies Renouvelables**, v14, p21-26, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**, 3ed. Viçosa: Editora UFV, 421p, 2008.

FRANCO, G. **Teor vitamínico dos alimentos**. Rio de Janeiro: José Olympio. 141p, 1987.

FRANZIN, S.M.; MENEZES, N.L. Análise de Sementes em duas temperaturas e qualidade de água para a germinação de sementes peletizadas de alface. **Informe Técnico**, Santa Maria, n1, p1-4, 2002.

FRANZIN, S.M.; MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; ROVERSI, T. Avaliação do vigor de sementes de alface nuas e peletizadas. **Revista brasileira de sementes**, v26, p114-118, 2004.

GEMIN, L.G. **Aplicações foliares de suspensões da microalga *Scenedesmus subspicatus* como biofertilizante no cultivo orgânico do tomateiro**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 55p, 2016.

HANEDA, R.N.; VIEIRA, B.H.; FONTES, S.R.; LOMBARDI, G.; CASALI, C.A.; LOMBARDI, A.T.. Biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* grown in a novel design of hybrid photobioreactor. **Journal Microbial and Biochemical Technology**. v7, n2, p76-82, 2015.

LAGUNA, V.G. **Chuvvas provocam aumento de algas na piscina, contaminando a água e a saúde do usuário**. Sibrape, News, 2012. Disponível em <http://www.sibrape.com.br/news> Acesso em 02 de abril de 2018.

LOPES, A.C.A.; NASCIMENTO, W.M. Peletização em sementes hortaliças. Embrapa Hortaliças. **Ministério da agricultura, pecuária e desenvolvimento**. Documentos 137, 28p, 2012.

MARQUES, PAA; BALDOTTO, PV; SANTOS, ACP; OLIVEIRA, L. Qualidade de mudas de alface formadas em bandejas de isopor com diferentes números de células. **Horticultura Brasileira**, v21, n4, p649-651, 2003.

MONTANHIM, G.C.; HANEDA, R.N.; LOMBARDI, A.T.; LIMA, M.I.S. Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Revista Árvore**, v38, n5, p867-877, 2014.

OLIVEIRA, A.P.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, E.U. Influência do substrato e da temperatura na germinação de sementes peletizadas de tomate. **Revista brasileira de sementes**, v23, n2, p72-77, 2001.

OLIVEIRA, J.A.; PEREIRA, C.E.; GUIMARÃES, R.M.; VIEIRA, A.R.; SILVA, J.B.C. Efeito de diferentes materiais de peletização na deterioração de sementes de tomate durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v25, n2, p2027, 2003.

QUEIROZ, R.L.; ROSA, E.S.M.D.; MARQUES, M.; GOULART, V.A.; MARQUES, G.F. Formação de mudas de alface provenientes de sementes peletizadas com altas diluições. **Revista Fitos (agroeologia)**, v9, n3, p177-184, 2015.

RODRIGUES, P. A importância nutricional das hortaliças. **Hortaliças em revista**, uma publicação de Embrapa Hortaliças, n2, p6-9, 2012.

RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J.A.; LÓPEZ-GALINDO, A.L.; CISNEROS, C.J.; GÁLVEZ, A.; ROZALÉN, M.; SANCHEZ-ESPEJO, R.; CABALLERO, E.; PEÑA, A. Adsorption/desorption of fungicides in natural clays from Southeastern Spain. **Applied Clay Sciences**, v132, p401-411, 2016.

SANTOS, S.R.G. Peletização de Sementes Florestais no Brasil: Uma Atualização. **Floresta e ambiente**, v23, n2, 286-294, 2016.

SILVA, J.B.C. **Avaliação de métodos e materiais para peletização de sementes**. Tese de doutorado (Doutorado em Agronomia), UNESP, 127 p., Botucatu, 1997.

SILVA, J.B.C.; SANTOS, P.E.C.; NASCIMENTO, W.M. Desempenho de sementes peletizadas de alface em função do material cimentante e da temperatura de secagem dos péletes. **Horticultura brasileira**, v20, p67-70, 2002.

SOBRAL, L.F.; BARRETTO, M.C.V.; SILVA, A.J.; ANJOS, J.L. Documentos 206: **Guia prático para interpretação de resultados de análises de solo**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 13p, 2015.

VASCONCELOS, Y. Fertilizante marinho. Uso de algas calcárias como adubo em lavouras de cana pode elevar a produtividade em até 50%. **Revista Pesquisa FAPESP**, edição 197, p62-65, 2012.

VIEIRA, D.F.A. Catálogo brasileiro de hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país. **Embrapa Hortaliças**, SEBRAE, 60p, 2010.

CAPÍTULO 4

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Chlorella sorokiniana* A DIFERENTES CORES DE LED

RESUMO

A produção de microalgas é uma iniciativa importante em projetos biotecnológicos de mitigação das mudanças climáticas e de obtenção de biomassa com finalidade comercial. Neste estudo, investigamos o efeito de diodos emissores de luz (LED) nas cores azul, vermelha e azul em combinação com vermelho no crescimento, desempenho fotossintético, composição elementar (CHN), fotossíntese, crescimento e bioquímica da microalga *Chlorella sorokiniana* ao longo de um cultivo semicontínuo com duração de 360 horas. Usamos LED branco como tratamento controle. Embora tenha apresentado curvas de crescimento similares em todas as condições testadas, *C. sorokiniana* teve uma taxa de crescimento ($\sim 0,063 \text{ h}^{-1}$) e uma produtividade de biomassa seca ($\sim 108 \text{ mg L}^{-1}$) mais elevadas nos dois tratamentos com luz azul, assim como a emissão mais acentuada de fluorescência da clorofila *a*. A dissipação fotoquímica ($qP \sim 1.0$) e os rendimentos quânticos máximo ($\Phi_M \sim 0.7$) e efetivo ($\Phi'_M \sim 0.6$) das microalgas permaneceram elevados. As taxas de fotossíntese e o percentual de CHN na biomassa algal não foram afetados significativamente por nenhum dos tratamentos luminosos. O aumento da intensidade luminosa em curvas rápidas de luz evidenciou que a luz vermelha tende a diminuir a taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{\text{max}}$) e a irradiância saturante (E_k) das microalgas. Um aumento pronunciado no conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios totais foi observado logo no início do cultivo com luz azul. *C. sorokiniana* pode ter a produtividade estimulada e composição bioquímica modificada quando exposta à luz azul em torno de 72 horas.

Palavras chave: biomoléculas; crescimento; LED; fotossíntese; luz; microalgas

INTRODUÇÃO

As algas contribuem com 40 a 50% do oxigênio presente na atmosfera, são importantes produtores primários nos oceanos (ANDERSEN, 2005) e constituem a base dos ecossistemas aquáticos (ODUM; BARRET, 2007). As microalgas, em particular, possuem alta relevância para setores da indústria que liberam quantidades ambientalmente preocupantes de dióxido de carbono (CO₂), principalmente aquelas que ainda utilizam a queima de derivados de petróleo como combustível para atividades diversas (KLINTHONG et al., 2015). Além da capacidade de mitigar o CO₂ atmosférico, o cultivo de microalgas atrai cada vez mais o interesse de indústrias pela possibilidade de produção de biomassa com alto valor agregado, rica em biomoléculas como carboidratos, proteínas e lipídios (BECKER, 2008), antioxidantes e carotenoides (AHMED et al., 2014; MAADANE et al., 2015). A biomassa algal pode, dependendo de sua composição, ser utilizada na culinária, na suplementação alimentar humana e animal, no enriquecimento de rações (BECKER, 2004), fertilização de solos, tratamento de resíduos e no preparo de cosméticos (HU, 2004).

Vários são os fatores abióticos necessários ao crescimento e desenvolvimento de microalgas, como temperatura, pH do meio de cultura, fotoperíodo, concentração de oxigênio e gás carbônico – quando utilizados – e, principalmente, o fornecimento adequado de luz, tanto em termos de quantidade quanto qualidade (CARVALHO et al., 2011). Informações sobre intensidade luminosa e fotoperíodo no crescimento de microalgas são frequentemente encontradas na literatura (SINGH; SINGH, 2015).

A cor da iluminação também é fator influente em cultivos de microalgas, considerando, principalmente, a composição espécie-específica de pigmentos nesses organismos (CARVALHO et al., 2011). A manipulação do espectro luminoso em favor da otimização do processo fotossintético é uma estratégia importante na produção de biomassa e síntese de biomoléculas de interesse comercial (BAER et al., 2016; RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017). A ideia central é focar o espectro da radiação incidente em comprimentos de onda (λ) efetivamente absorvidos pelo aparato fotossintético, maximizando, portanto, o aproveitamento da luz pelas algas. A cor azul (λ 420 – 470 nm) e vermelho (λ ~ 660 nm) são as faixas de comprimento de onda absorvidas pelo pigmento central da fotossíntese, a clorofila (BAER et al., 2016). Tal especificidade foi selecionada ao longo da evolução dos diferentes grupos de organismos fotossintetizantes (SCHULZE et al., 2014). Clorofilas *a* e *b*, presentes em

algas verdes como *Chlorella*, absorvem luz nos intervalos de 450-475 nm e 630-675 nm (YAN; ZHENG, 2014). Luzes azul e vermelha são consideradas as mais apropriadas para cultivos de microalgas (RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017) e sua influência em diferentes aspectos da fotossíntese é mais efetiva do que a de cores mal absorvidas por células fotossintetizantes, como o verde, por exemplo (BIALON; RATH, 2018).

A iluminação artificial em cultivos algais apresenta vantagens como a possibilidade de regulação da intensidade, do espectro e do fotoperíodo (BLANKEN et al., 2013; CARVALHO et al., 2011), além da constância do fornecimento, diferentemente da luz solar, que pode sofrer variações consideráveis em regiões de clima instável. Apesar disso, a iluminação artificial exige um investimento econômico para poder ser empregada. A produção de biomoléculas de alto valor agregado em cultivos de microalgas pode, no entanto, compensar tal custo (BLANKEN et al., 2013). Dentre os tipos de iluminação artificial existentes, os chamados diodos emissores de luz (LEDs) tem sido bastante utilizados em cultivos de microalgas (BAER et al., 2016), pois apresentam baixas dissipação de calor e demanda energética, alta durabilidade, não contêm mercúrio e possuem um estreito espectro de emissão (RADZUN et al., 2015; SCHULZE et al., 2014). O uso de LEDs também é uma solução para otimizar a produtividade e a composição bioquímica da biomassa produzida por microalgas (LIMA et al., 2018).

Dentre os tipos de cultivo de microalgas existentes, o cultivo semicontínuo cria condições propícias para estudos fisiológicos com variáveis específicas, uma vez que fatores limitantes de crescimento, como limitação nutricional do meio de cultura e o autossombreamento das células são minimizados (ANDERSEN, 2005). A atividade fotossintética e o estado fisiológico algal são parâmetros de avaliação importantes quando o efeito de qualquer variável ambiental potencialmente estressante é estudado. O uso da técnica de fluorometria com pulso de amplitude modulada (PAM) auxilia nesse propósito (CAMARGO; LOMBARDI, 2017) e fornece informações relevantes sobre aproveitamento da luz e taxa de transporte de elétrons em condições fixas ou gradualmente crescentes de intensidade luminosa.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da iluminação com LED branco, azul, vermelho e uma combinação 1:1 de azul com vermelho na fisiologia, composição bioquímica e atividade fotossintética de uma espécie de microalga, *Chlorella sorokiniana*. Essa microalga é considerada um organismo modelo para testes

laboratoriais, devido à sua termotolerância e elevada taxa de crescimento (HUESEMANN et al., 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1, 2 e 3 apresentam as curvas de crescimento de *C. sorokiniana* com valores médios do logaritmo natural da concentração celular, densidade óptica (684 nm) e concentração de clorofila *a*, respectivamente, em relação ao tempo de cultivo semicontínuo, ao longo de cinco etapas.

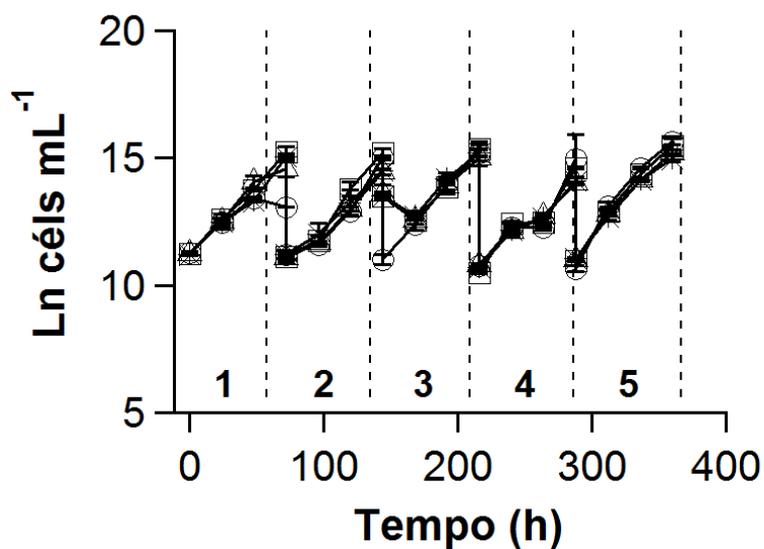


Figura 1. Curvas de crescimento com base no logaritmo natural da densidade celular de *C. sorokiniana*, mantida em luz LED azul (○), vermelha (□), azul+vermelha (◇) e branca (*) ao longo de cinco etapas em um cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

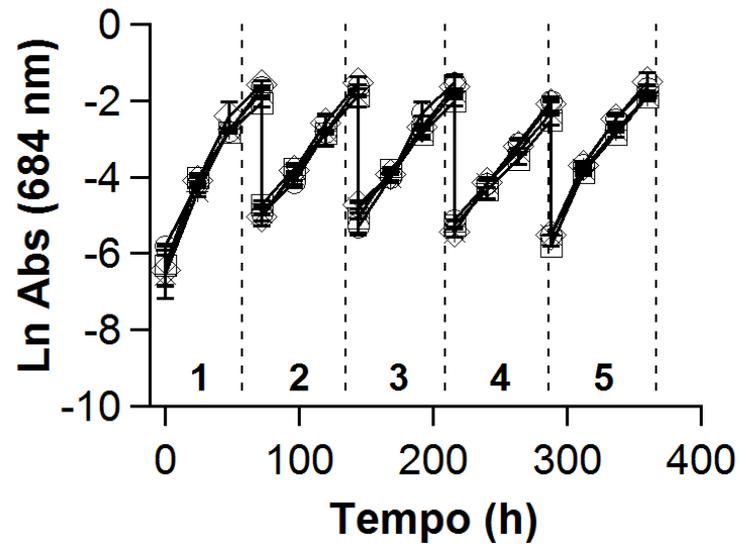


Figura 2. Curvas de crescimento com base no logaritmo natural da densidade óptica (684 nm) de culturas de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (○), vermelha (□), azul+vermelha (◇) e branca (*) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

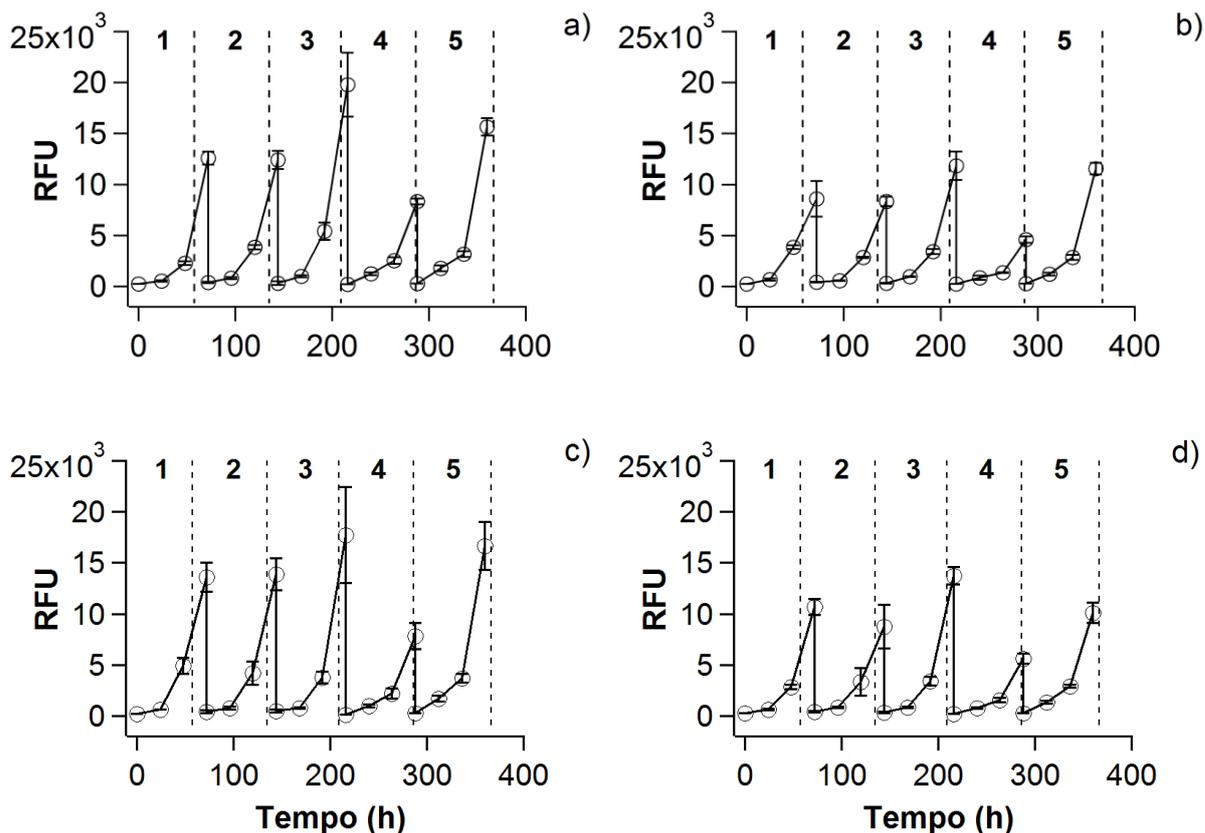


Figura 3. Curvas de crescimento com base na fluorescência da clorofila (em unidades relativas, RFU) em culturas de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (a), vermelha (b), azul+vermelha (c) e branca (d) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Os números de 1 a 5 correspondem às etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

De modo geral, as curvas de crescimento foram similares em todos os tratamentos, com base em todos os parâmetros analisados. Observamos picos mais elevados de RFU nos tratamentos com luz azul, evidenciando que esse comprimento de onda age diretamente na quantidade de moléculas de clorofila *a*. Um aumento significativo, tanto de clorofila quanto de carotenoides, também foi detectado na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, cultivadas com luz LED azul (DUARTE; COSTA, 2018). Ojit et al. (2015), ao intensificarem a disponibilidade luminosa, observaram uma diminuição da concentração de clorofila *a* em uma espécie de cianobactéria e trataram esse fato como uma estratégia de prevenção contra danos foto-oxidativos causados pela produção de radicais livres, o que pode acontecer quando a célula está exposta a fontes luminosas energéticas, como LED vermelha.

A figura 4 apresenta as taxas de crescimento específicas das células algais sob as diferentes fontes luminosas. No tratamento com luz azul, *C. sorokiniana* iniciou seu crescimento com uma taxa menor do que nas demais condições, mas conseguiu aumentá-la da segunda etapa em diante. Nos dois tratamentos com LED azul, *C. sorokiniana* conseguiu manter maiores taxas de crescimento ($\sim 0,063 \text{ h}^{-1}$) ao longo de todo o experimento, comparado às taxas obtidas com vermelho ($\sim 0,054 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$) e branco ($0,053 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Valores maiores de biomassa seca (figura 5) também foram detectados para os tratamentos com azul ($108,93 \pm 6,63 \text{ mg L}^{-1}$) e azul+vermelho ($107,43 \pm 14 \text{ mg L}^{-1}$) ao longo das etapas de cultivo comparados a vermelho ($68,2 \pm 4,57 \text{ mg L}^{-1}$) e branco ($85,43 \pm 11,59 \text{ mg L}^{-1}$). Percebe-se, portanto, um efeito positivo da luz azul na concentração de biomassa, devido, possivelmente, ao aumento do volume celular de *C. sorokiniana*, uma vez que os resultados de crescimento por densidade celular foram similares em todas as condições testadas. Assim, racionalizamos que quanto mais duplicações celulares houver em um período, maior será a produção de biomassa considerando-se o mesmo intervalo de tempo.

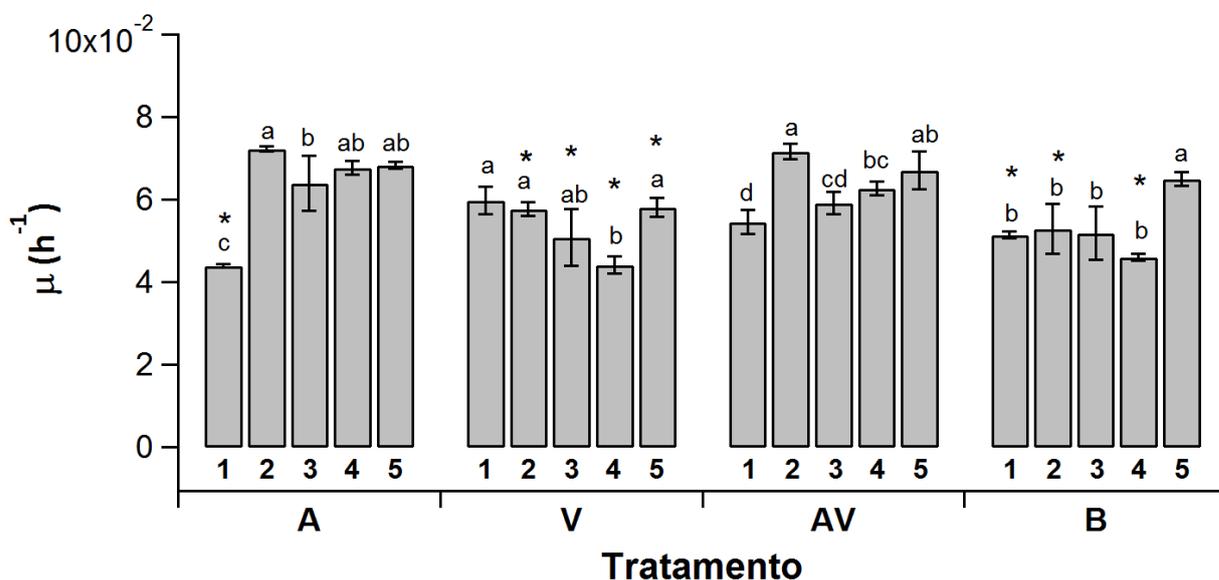


Figura 4. Taxa de crescimento (μ, h^{-1}) de *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão ($n = 3$).

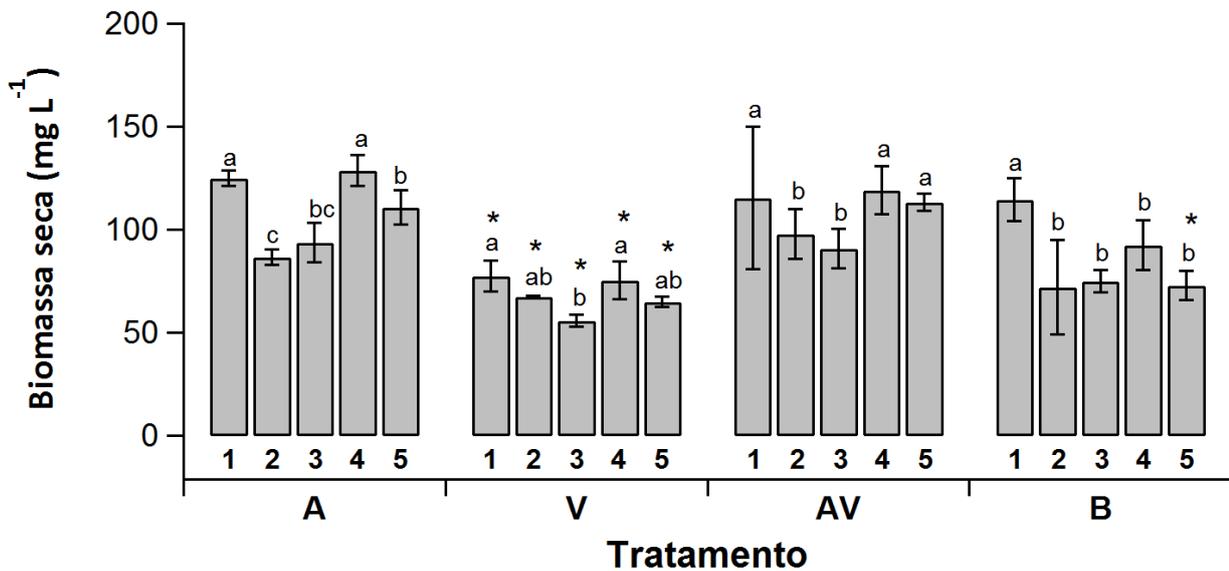


Figura 5. Concentração de biomassa seca de *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

O aumento do tamanho celular e consequente acúmulo de biomassa algal em cultivos mantidos sob iluminação azul já foram detectados em outras espécies de *Chlorella* e em *Nannochloropsis* (ATTA et al., 2013; BIALON; RATH, 2018; IZADPANA et al., 2018; KIM et al., 2014; KOC; ANDERSON; KOMMAREDDY, 2012; RA et al., 2016a; SUDIBYO et al., 2017). Bialon e Rath (2018) argumentam que a luz azul favorece o aumento do tamanho das células, mas compromete a divisão celular, devido à maior expressão de um gene inibidor de crescimento (minD), além de aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio. A maior taxa de crescimento em *C. sorokiniana* que observamos nos dois tratamentos com luz azul contrasta com parte dos dados informados na literatura. Segundo Schulze et al. (2014), a faixa luminosa de vermelho a vermelho longo (630-750 nm) costuma induzir altas taxas de crescimento e a formação de células menores em microalgas de diversas linhagens. Essa tendência de aumento da taxa de crescimento por luz vermelha foi observada em *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella zofingiensis* e *Nannochloropsis salina* (KOC; ANDERSON; KOMMAREDDY, 2012; KIM et al., 2014; SIRISUK et al., 2018; SUDIBYO et al., 2017).

Apesar disso, maiores taxa de crescimento por iluminação azul também já foram detectadas em *C. vulgaris*, *Nannochloropsis* sp e *Synechococcus nidulans* (ATTA et al., 2013; DAS et al., 2011; DUARTE; COSTA, 2018). Por estender o espectro de absorção da clorofila, a combinação luminosa de azul com vermelho tem sido apontada como a mais efetiva no crescimento de diversas espécies de microalgas, como *Chlorella* sp., *Isochrysis galbana* e *Phaeodactylum tricornutum* (SIRISUK et al., 2018; YAN; ZHENG, 2014). Lima et al. (2018) testaram combinações de luzes azul e vermelha no cultivo de *Arthrospira platensis* e a combinação que resultou em maior produtividade diária de biomassa por volume de cultura foi 70% de luz vermelha e 30% de luz branca. Koc, Anderson e Kommareddy (2012) recomendaram iniciar um cultivo de *C. kessleri* utilizando LED vermelho, priorizando a densidade celular, e depois mudar a iluminação para azul, de modo a aumentar o tamanho das células, ganhando assim em termos de biomassa. Uma sugestão contrária foi proposta por Kim et al. (2014) para *C. vulgaris*: eles inicialmente iluminaram o cultivo com luz azul e depois mudaram para vermelho, de modo a obter mais biomassa e produtividade lipídica. Fica claro, portanto, que a melhor estratégia de aplicação e manipulação da qualidade da luz depende do objetivo almejado a partir do cultivo. Percebe-se que o efeito das cores no crescimento de microalgas, além de ser espécie-específico, varia de acordo com outras condições de cultivo, particulares de cada estudo. Também é importante ressaltar que a melhor composição espectral da luz para uma determinada cepa de microalga não é necessariamente a melhor para outras gerações da mesma cepa (MERCADO et al., 2004).

Em relação à análise elementar (tabela 1), as porcentagens de carbono (~ 40%), hidrogênio (~ 7%) e de nitrogênio (~ 8%) não diferiram ao longo das etapas do cultivo semicontínuo quando comparamos todos os tratamentos. No mesmo período de amostragem para análise de CHN (72 h da 5ª etapa), observamos, também, um conteúdo bioquímico distinto em *C. sorokiniana*, dependendo do tratamento empregado. As células produziram mais carboidratos quando expostas a ambas as luzes monocromáticas, se comparadas com o controle. A luz vermelha foi a que mais estimulou a síntese proteica e a que resultou em menor concentração de lipídios totais. Mais lipídios foram produzidos no tratamento controle.

Tabela 1. Porcentagem da composição elementar (CHN) e concentração total de biomoléculas em *C. sorokiniana* mantida em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelho (AV) e branca (B). Ambas as análises foram realizadas em 72 h da quinta etapa em cultivo semicontínuo. Valores entre parênteses representam desvio padrão (n=3).

Propriedade	Determinação	A	V	AV	B
Composição elementar (%)	Carbono	38,05 ^a (1,89)	39,84 ^a (2,15)	39,49 ^a (0,91)	39,45 ^a (2,47)
	Hidrogênio	6,51 ^a (0,12)	6,64 ^a (0,24)	6,72 ^a (0,17)	6,55 ^a (0,41)
	Nitrogênio	7,72 ^a (0,84)	8,14 ^a (0,11)	8,07 ^a (0,31)	7,86 ^a (0,31)
Biomoléculas (% pg cél ⁻¹)	Carboidratos	33,13 ^a (5,37)	28,88 ^a (5,12)	25,27 ^{ab} (1,71)	20,81 ^b (3,04)
	Proteínas	50,82 ^b (5,87)	67,95 ^a (4,82)	54,28 ^b (1,50)	40,75 ^c (5,02)
	Lipídios	16,05 ^b (5,02)	3,56 ^c (0,65)	20,45 ^b (2,25)	38,44 ^a (3,99)

Os resultados de composição bioquímica ao longo de todo o experimento (figura 6) evidenciam a rápida resposta fisiológica da *C. sorokiniana* à luz azul em particular. Antes do experimento, as microalgas encontravam-se aclimatadas a condições distintas de iluminação, em luz branca. O primeiro contato com a luz monocromática azul levou, portanto, ao acúmulo substancial dos três tipos de biomoléculas. A queda na concentração das biomoléculas a partir da primeira etapa evidencia a adaptação às novas condições de iluminação. A produção lipídica oscilou mais do que as outras biomoléculas durante o cultivo em todos os tratamentos, podendo este ser um indício de adaptação a uma situação de estresse não necessariamente associada à qualidade das luzes (MARKOU; NERANTZIS, 2013; ROCHA et al., 2016).

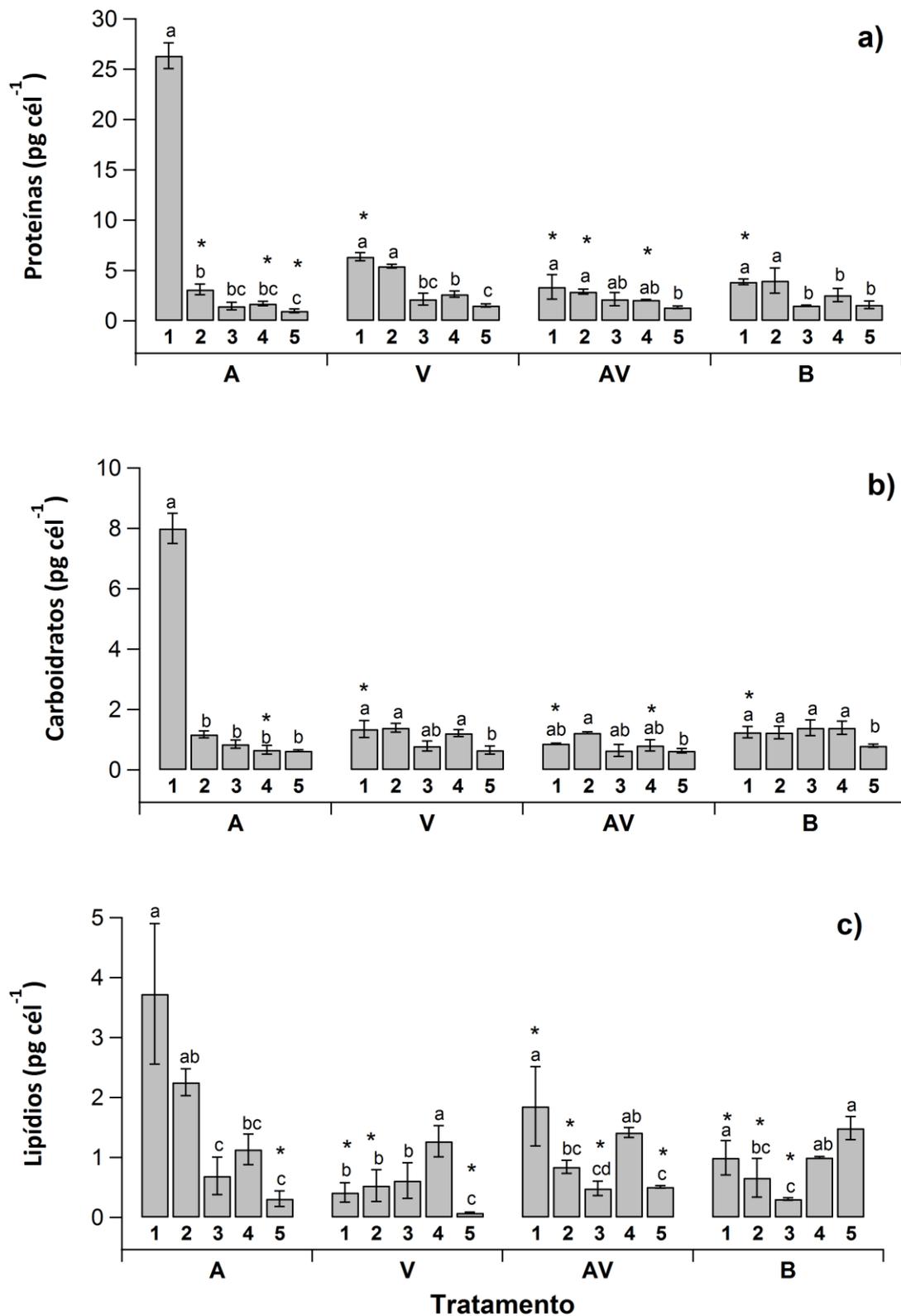


Figura 6. Concentração total de proteínas (a), carboidratos (b) e lipídios(c) em células de *C. sorokiniana* mantidas em luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas em cultivo semicontínuo. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. Barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

Efeitos diversos das luzes azul e vermelha na composição bioquímica de microalgas já foram detectados. Em *C. zofingiensis*, a luz azul estimulou uma maior produção de carboidratos e lipídios, se comparada à luz vermelha (SUDIBYO et al., 2017). O mesmo estudo também mostrou que tais resultados variam conforme a salinidade do meio de cultura. Apesar disso, Sudibyo et al. (2017) argumentam que a luz vermelha, por ter comprimentos de onda maiores e, portanto, menos energia, é mais estável do que as luzes azul e branca, razão pela qual sua influência em bioquímica pode não ser tão expressiva. Kamiya e Saitoh (2002) sugeriram que a exposição de mutantes de *C. kessleri* à luz azul aumenta a quebra endógena de reservas de carboidratos, na forma de amido, de modo a elevar a formação de glicose para rápido consumo (KAMIYA; SAITOH, 2002). A alga parda *Isochrysis* sp. também apresentou menos carboidratos quando cultivada sob luz azul, embora sua atividade fotossintética tenha sido maior, se comparada à de amostras expostas à luz branca (MARCHETTI et al., 2013). Em contrapartida, a produção de proteínas em *Isochrysis* sp. sob luz azul aumentou.

Muitos trabalhos já comprovaram a influência da qualidade da luz na produção lipídica da microalgas. Sabe-se que a luz LED azul aumenta a concentração de lipídios em *Chlorella fusca* LEB 111, chegando a representar 23% do peso fresco celular (DUARTE; COSTA, 2018). De acordo com Zhang, Dong e Jin (2017), o percentual de lipídios totais em *C. vulgaris* (31,18% da biomassa seca) e *Ankistrodesmus falcatus* (13,76%) foi maior quando ambas foram cultivadas sob luz azul do que sob luz vermelha. Atta et al. (2013) também obtiveram maior conteúdo lipídico em *C. vulgaris* usando luz azul com $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12/12 h. Um maior estímulo à produção de lipídios por luz azul foi igualmente verificado em *Chlorella* sp. IG-B-96, *C. sorokiniana* IG-W-96 e *C. vulgaris* IG-R-96, se comparado à luz vermelha (IZADPANA et al., 2018). Curiosamente, comprovou-se que a luz verde também pode resultar em maior concentração de lipídios em *N. salina*, *N. oceanica*, *N. oculata* e *Picochlorum atomus* (RA et al., 2016a, 2016b). Tal fato pode ser associado à menor taxa de crescimento, uma vez que a luz verde é pouco absorvida pelas moléculas de clorofila, o que forçaria as células a acumularem mais material de reserva energética com o pouco que conseguem aproveitar de luz.

Uma forma de se estimar o aproveitamento da energia fótica pelo fotossistema II (PSII) é a medição do rendimento (ou eficiência) fotossintético, tanto máximo (Φ_M)

quanto efetivo (Φ'_M). Essa comparação dos dois rendimentos de *C. sorokiniana* ao longo do experimento é apresentada na figura 7. Não foi verificada variação significativa dos dois parâmetros em nenhuma das condições luminosas testadas. Os valores de Φ_M próximos a 0,70 são uma evidência de que as microalgas se encontravam em uma condição fisiologicamente saudável (LOMBARDI; MALDONADO, 2011; ZIJFFERS et al., 2010).

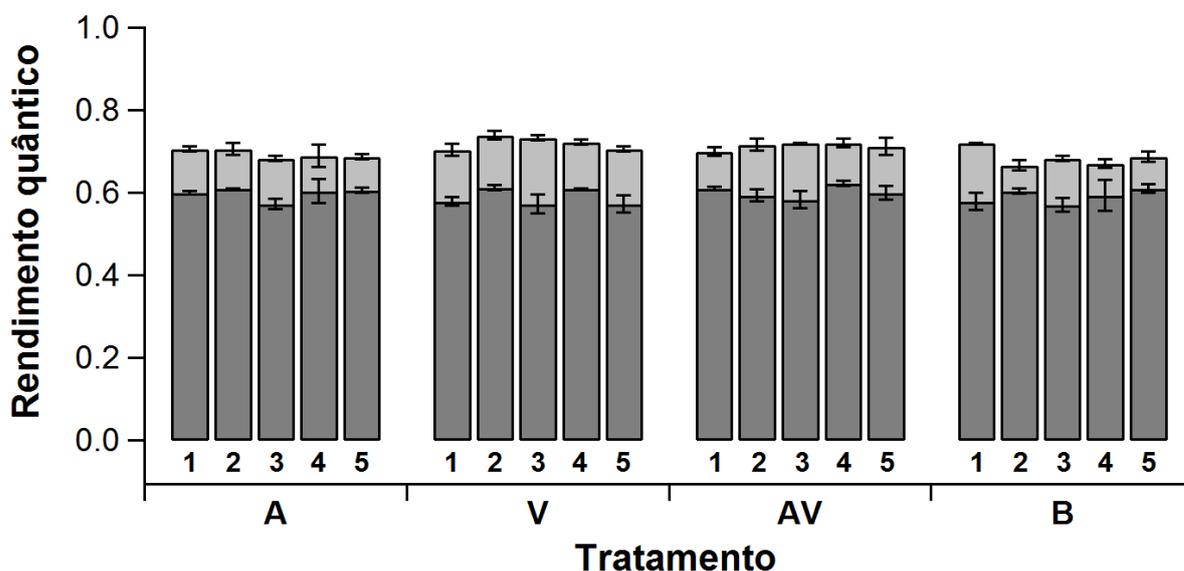


Figura 7. Valores médios de rendimento quântico máximo (Φ_M , barras cinza claro) e efetivo (Φ'_M , barras cinza escuro) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo de cada etapa com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

Um aumento de Φ_M chegou a ser verificado em culturas de *C. reinhardtii* mantidas com iluminação azul (0,63) e branca (0,64), se comparados a resultados obtidos com luz laranja (0,53) e amarela (0,50) (DE MOOIJ et al., 2016). A partir de resultados observados em *C. vulgaris*, Bialon e Rath (2018) argumentam que a luz vermelha é mais bem aproveitada na cadeia de transporte de elétrons, a quantidade de biomassa produzida por fóton absorvido (ou “eficiência quântica”) é maior e a divisão celular assexuada (principal forma de reprodução em *Chlorella*) aumenta. Por ser menos energética, ela também não favorece a formação de espécies reativas de oxigênio, reduzindo, por tanto, o nível de estresse celular. De acordo com Hauschild, Nelson e

Krotkov (1962), a luz azul pode afetar a taxa fotossintética de *Chlorella pyrenoidosa* se a cultura tiver baixa densidade celular, mas não resulta em alterações significativas quando a cultura é mais densa. Existe, portanto, bloqueio exercido pelo autossombreamento de culturas, capaz de minimizar efeitos da luz incidente sobre culturas muito concentradas.

Os dados de rendimento quântico de *C. sorokiniana* são coerentes com o destino da energia indicado pelos coeficientes de dissipação fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ), mostrados na figura 8. Espera-se, em teoria, que mudanças em qP sejam proporcionais aos valores de Φ'_M (MISRA; MISRA; SINGH, 2012), o que foi confirmado em nosso caso, uma vez que ambos os parâmetros se mantiveram similares em todos os tratamentos. O qP é uma medida da fração de centros de reação do PSII que se encontram oxidados e, portanto, aptos a receber elétrons (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). O coeficiente NPQ, por sua vez, engloba mecanismos não-fotoquímicos que diminuem o sinal de fluorescência com a função protetora de dissipar a energia luminosa em excesso (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001), fazendo-o na forma de calor. Tais processos não foram estimulados em *C. sorokiniana* em nenhum tratamento em particular.

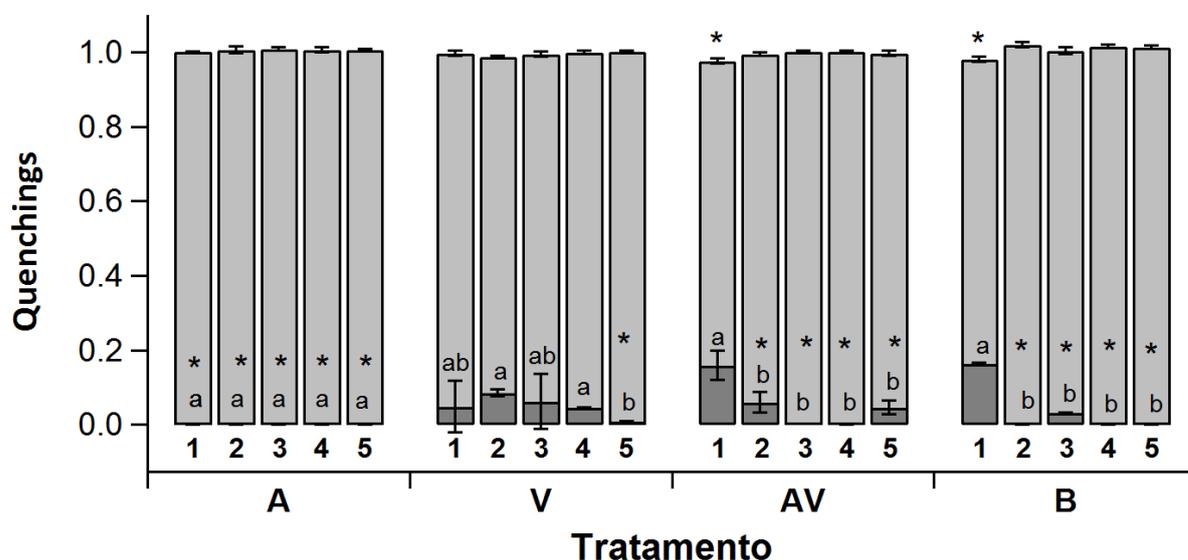


Figura 8. Valores médios de coeficiente de dissipação (quenching) fotoquímica (qP, barras cinza claro) e não fotoquímica (NPQ, barras cinza escuro) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo em cada etapa com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

Sabe-se, no entanto, que a luz azul estimula fotorreceptores e favorece o acúmulo de pigmentos fotossintéticos, principalmente aqueles com função acessória (SCHULZE et al., 2014). A maior produção de carotenoides está relacionada a mecanismos de fotoproteção, incluindo processos de dissipação não-fotoquímica (LARKUM, 2016; SCHULZE et al., 2014). Considerando que a luz azul, possui comprimento de onda menor e sendo mais energética do que a vermelha (ROCHA et al., 2010), deve de fato, estimular mecanismos de fotoproteção. Além de estimular a biossíntese de pigmentos carotenoides, que absorvem luz no intervalo λ de 400-550 nm, a luz azul pode ativar a produção de clorofila, o funcionamento de complexos de captura de luz e o metabolismo de nitrogênio a partir do estímulo de fotorreceptores do tipo criptocromo (BAER et al., 2016; RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017). Em culturas de *C. vulgaris*, um aumento na liberação de energia térmica foi detectado em células expostas à combinação de luzes azul+vermelha, comparado a tratamentos com luz branca e luzes azul+vermelho+vermelho longo (KULA et al. 2014). Segundo apresentado em DÖRGE; KOWALLIK (1984) e KOWALLIK; GAFFRON (1966) a luz azul pode levar ao aumento da respiração em *Chlorella* sp., portanto, os autores sugerem que sob cultivo mixotrófico, com fonte de carbono orgânico no meio, a luz azul é contraindicada.

Resultados de varredura espectrofotométrica reportados por De Mooij et al. (2016) revelaram que o coeficiente de absorção de luz em *C. reinhardtii* não se altera de forma significativa quando a cultura é iluminada por luz branca quente, amarela, vermelha, laranja e azul. De acordo com Schulze et al. (2014), o número de fótons em comprimentos de onda azul e vermelho que podem ser capturados pela molécula de clorofila em algas depende da estrutura celular, composição de pigmentos e arranjo dos cloroplastos. A adaptação à luz em organismos fitoplanctônicos pode envolver mecanismos ainda mais elaborados, como o chamado de empacotamento de pigmentos (SAKSHAUG et al., 1997). Esse empacotamento depende tanto do tamanho da célula quanto da concentração de pigmentos nela presentes. Pigmentos empacotados dentro dos cloroplastos são menos eficientes na absorção de luz por unidade de massa pigmentar do que pigmentos dispersos em uma solução rasa em termos ópticos. Células adaptadas a ambientes com pouca luz tendem a apresentar pigmentos empacotados, o que acarretaria em uma absorção menor de luz, embora o aumento no conteúdo total de pigmentos possa compensar e até mesmo superar essa perda de eficiência (SAKSHAUG et al., 1997).

O tipo de reação fisiológica de um organismo fotossintetizante à luz é revelado não apenas por meio de mudanças na composição de pigmentos celulares, mas por alterações nas chamadas curvas de saturação de luz, definidas, neste caso, como “curvas rápidas de luz” (RALPH; GADEMANN, 2005; SAKSHAUG et al., 1997). As curvas rápidas de luz que obtivemos neste estudo são mostradas na figura 9. De modo geral, observamos que os dois tratamentos com luz vermelha resultaram em curvas com amplitudes mais variadas ao longo das cinco etapas do que o tratamento com luz azul e o controle com luz branca. Isso pode estar associado ao fato de a luz vermelha fornecer energia suficiente para suprir apenas a exigência das moléculas de clorofila para elevar um elétron ao primeiro estágio de excitação no complexo antena (GLEMSER et al., 2015). A luz azul, mais energética, pode elevar os elétrons diretamente para seu segundo estado excitado e o retorno desses elétrons ao seu estado fundamental libera energia transferida aos componentes dos fotossistemas I e II. A luz azul tem, conseqüentemente, um papel de regulador essencial no crescimento e metabolismo celular (MATTHIJS et al., 1996; GLEMSER et al., 2015).

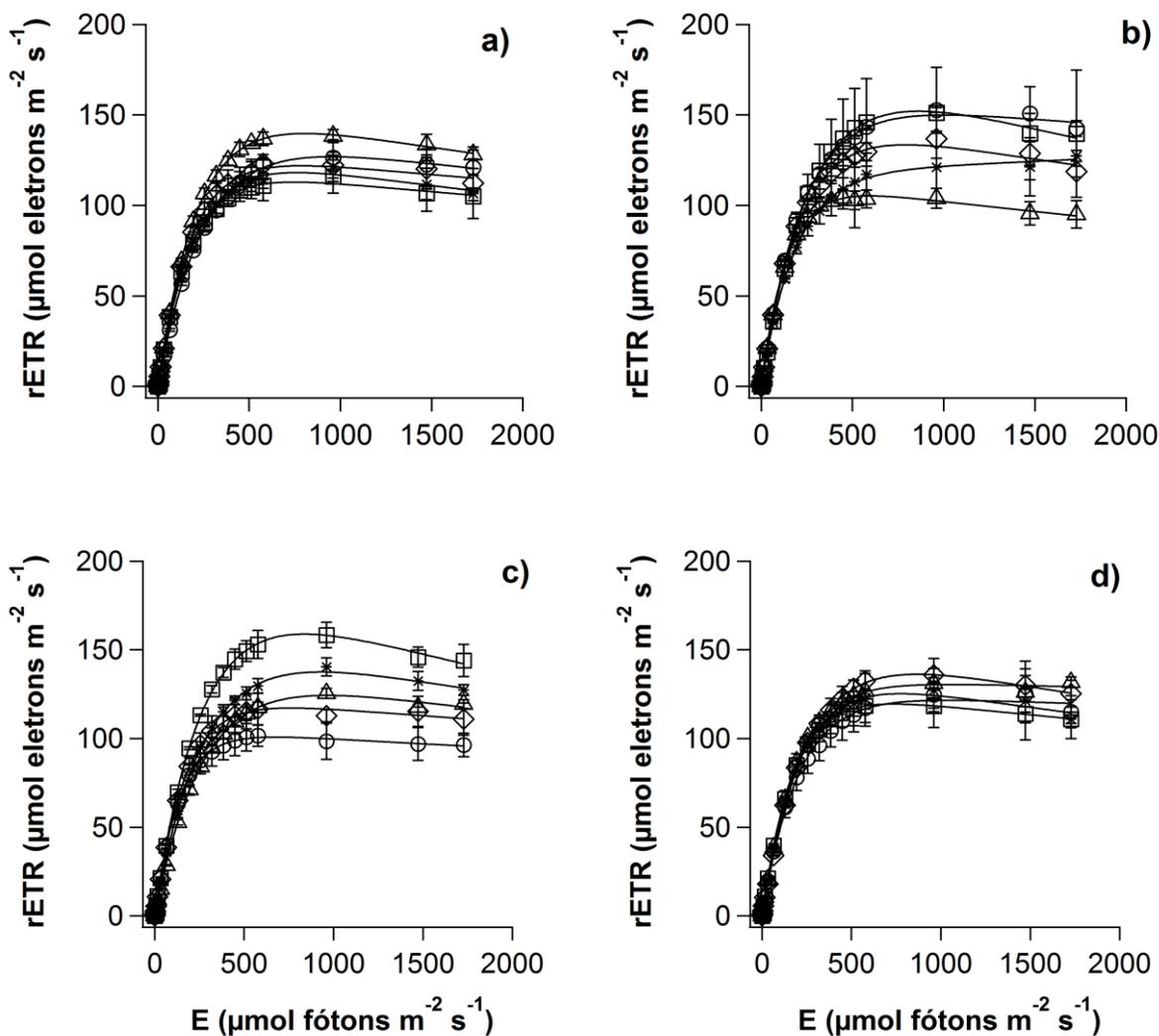


Figura 9. Curvas rápidas de luz em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo de cada etapa com luz azul (a), vermelha (b), azul+vermelha (c) e branca (d) ao longo de cinco etapas. Os símbolos \circ , \square , Δ , \diamond e $*$ representam os etapas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão ($n = 3$).

Os três parâmetros derivados das curvas de luz (inclinação inicial (α), taxa de transporte de elétrons relativa máxima ($rETR_{max}$) e irradiância saturante (E_k) foram detalhados na figura 10. Em três dos tratamentos (azul, azul+vermelho e branco), o α na quinta etapa diminuiu comparado ao α registrado na primeira etapa. Interpretamos que esses três tratamentos, por fornecerem mais energia do que o vermelho isolado, estimularam *C. sorokiniana* a captar mais luz logo no começo do experimento (etapa 1). A inclinação das curvas em cultivos mantidos apenas com luz vermelha se manteve a mesma ao longo de todo o experimento. Observou-se nas culturas iluminadas com

vermelho e branco uma diminuição da $rETR_{max}$ ao longo das etapas. Após a aclimatação, os menores valores médios de $rETR_{max}$ e E_k foram observados no tratamento de luz vermelha. Inferimos que, nesse tratamento, menos energia chegou às células, havendo, portanto, menor excitação de elétrons e um limite de irradiância saturante mais baixo.

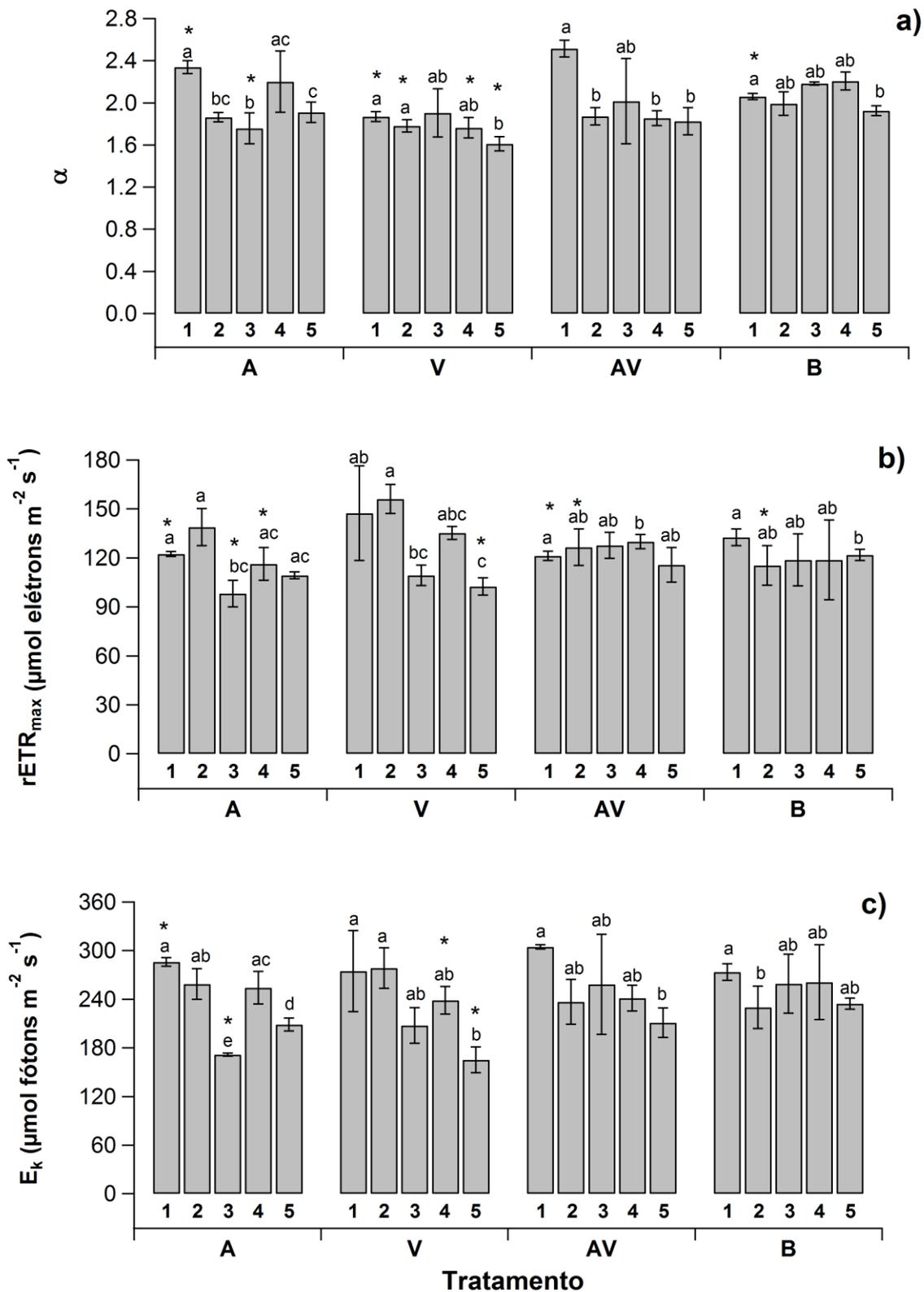


Figura 10. Parâmetros das curvas rápidas de luz: α (a), $rETR_{max}$ (b) e E_k (c) em células de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento e * indicam diferença estatística entre as etapas. As barras de erro indicam o desvio padrão ($n = 3$).

O ajuste no valor de E_k indica um balanço entre absorção de luz e transporte de elétrons da molécula de água até o CO_2 (ESCOUBAS et al., 1995; SAKSHAUG et al., 1997), no ciclo de Calvin. Valores de intensidade menores do que E_k resultam em maior rendimento quântico e menor taxa fotossintética; valores maiores que E_k , contudo, não resultam em um aumento pronunciado da fotossíntese. A intensidade luminosa usada durante o cultivo ($190 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) n\u00e3o ultrapassou o valor saturante de E_k . Se ela fosse excessivamente alta, esperar-se-ia um aumento na dissipação da energia n\u00e3o aproveitada no transporte linear de elétrons sob a forma de fluoresc\u00eancia ou calor, processos de dissipação n\u00e3o-fotoqu\u00edmica tipicamente indicados por NPQ (M\u00dcLLER; LI; NIYOGI, 2001). Microalgas, de modo geral, possuem alta efici\u00eancia fotossint\u00e9tica em condi\u00e7\u00f5es de menor intensidade luminosa, uma vez que a luz em excesso nunca \u00e9 plenamente aproveitada na fotoss\u00edntese (DE MOOIJ et al., 2016). As diferen\u00e7as observadas nos resultados de α , tanto dentro de cada tratamento quanto entre tratamentos, evidenciam uma varia\u00e7\u00e3o de valores n\u00e3o observada nas medi\u00e7\u00f5es de Φ_M . Isso corrobora a cr\u00edtica feita por Saroussi e Beer (2007) com rela\u00e7\u00e3o a trabalhos que consideram α igual a Φ_M . Assim como os rendimentos qu\u00e2nticos e os coeficientes de dissipação energ\u00e9tica, a taxa de fotoss\u00edntese (P^B) tamb\u00e9m n\u00e3o revelou nenhuma tend\u00eancia n\u00edtida de resposta a uma determinada condi\u00e7\u00e3o luminosa em particular (figura 11). N\u00e3o observamos diferen\u00e7a significativa entre os tratamentos para uma mesma etapa, evidenciando que os diferentes comprimentos de onda aos quais as c\u00e9lulas foram expostas n\u00e3o causaram qualquer impacto na fixação de carbono.

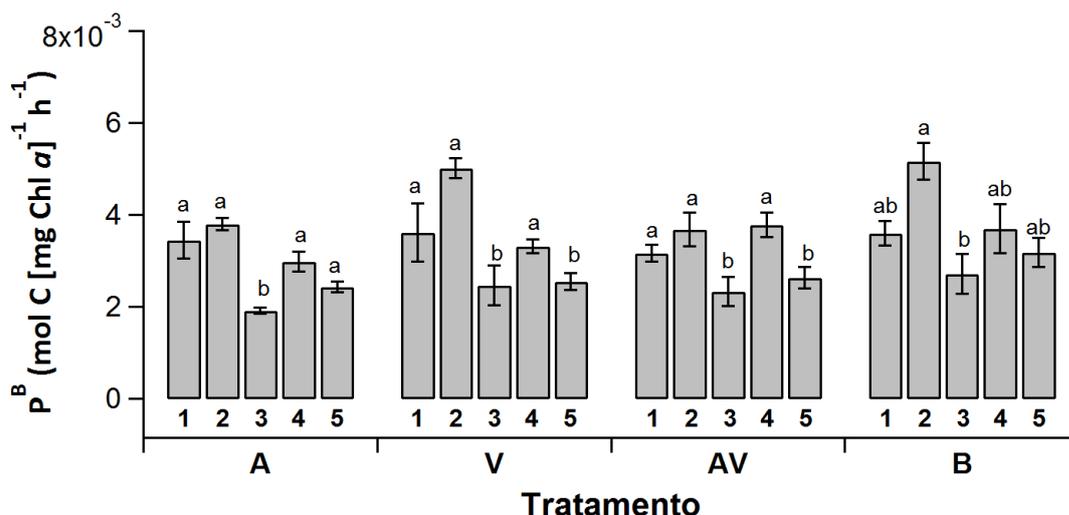


Figura 11. Eficiência fotossintética (P^B , mol C [mg Chl a]⁻¹ h⁻¹) de *C. sorokiniana* em 72 h de cultivo semicontínuo com luz azul (A), vermelha (V), azul+vermelha (AV) e branca (B) ao longo de cinco etapas. Letras minúsculas indicam diferença estatística dentro de um tratamento. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

A partir dos resultados de Φ_M , Φ'_M , qP, NPQ e P^B percebemos que *C. sorokiniana* não tem sua fotossíntese facilmente afetada por luzes azul, vermelha ou pela combinação de ambas, pelo menos não nas condições aqui estudadas. Intensidades luminosas mais elevadas, como aquelas aplicadas na construção das curvas de luz, ressaltam diferenças não observadas nas condições ambientais de cultivo. A intensidade deve ser cuidadosamente considerada, mesmo em estudos que avaliem preferencialmente a influência dos comprimentos de onda, uma vez que o crescimento das microalgas depende de um balanço cuidadoso entre quantidade e qualidade da luz (RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017).

Em termos de fotossíntese, o investimento para obtenção e instalação de luzes LED alternativas (como azul e vermelho monocromáticos) pode não compensar para essa espécie em particular, se comparado ao uso do LED branco. Em *C. vulgaris*, Bialon e Rath (2018) observaram que a luz branca oferece os melhores resultados em termos de crescimento e desempenho fotossintético, pois, segundo os autores, ela contempla todos os comprimentos de onda presentes no espectro visível e fornece os benefícios específicos de todas as cores às células algais. Para outras espécies, porém, a iluminação azul ou vermelha pode ser benéfica, seja na produção de biomassa como um todo ou na síntese de determinadas biomoléculas de interesse comercial.

CONCLUSÕES

C. sorokiniana apresentou comportamento similar nas curvas de crescimento por densidade celular e densidade óptica em todas as condições testadas. A maior emissão de fluorescência *in vivo* nos cultivos sob luz azul e azul+vermelho evidenciam uma concentração mais elevada de clorofila nas células. Esses mesmos tratamentos resultaram em maiores taxas de crescimento e produção de biomassa seca. A composição elementar (CHN), os rendimentos quânticos e os coeficientes de dissipação energética de *C. sorokiniana* não se alteraram de forma significativa. A taxa de fotossíntese também não mostrou tendência nítida em resposta aos diferentes tratamentos. Diferenças mais pronunciadas foram detectadas por meio de curvas rápidas de luz e da análise bioquímica, com destaque para o aumento substancial de proteínas, carboidratos e lipídios totais na primeira exposição das células à luz azul. Diante do observado, percebemos que a luz azul tem uma influência sobre a produtividade e a composição bioquímica de *C. sorokiniana*, embora esta espécie, nas condições testadas, seja robusta e resistente a mudanças induzidas pela qualidade da luz, principalmente em termos fotossintéticos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P.M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food chemistry**, v165, p300-306, 2014.
- ANDERSEN, R.A. Algal cultural techniques. **Elsevier**, 589p, 2005.
- ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v148, p373-378, 2013.
- BAER, S.; HEINING, M.; SCHWERNA, P.; BUCHHOLZ, R.; HÜBNER, H. O. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. **Algal Research**, v14, p109-115, 2016.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. USA: Blackwell publishing, p312-351, 2004.
- BECKER, E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**. 293 p., New York, 2008.
- BIALON, J.; RATH, T. Growth rates and photon efficiency of *Chlorella vulgaris* in relation to photon absorption rates under different LED-types. **Algal Research**, v31, p204-215, 2018.

BLANKEN, W.; CUARESMA, M.; WIJFFELS, R.H.; JANSSEN, M. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. **Algal Research**, v2, p333–340, 2013.

CAMARGO, E.C.; LOMBARDI, A.T. Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v29, p1-11, 2017.

CARVALHO, A.P.; SILVA, S.O.; BAPTISTA, J.M.; MALCATA, F.X. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 89, p1275–1288, 2011.

DAS, P.; LEI, W.; AZIZ, S.S.; OBBARD, J.P. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, v102, n4, p3883–3887, 2011.

DE MOOIJ, T.; DE VRIES, G.; LATSOS, C.; WIJFFELS, R.H.; JANSSEN, M. Impact of light color on photobioreactor productivity. **Algal Research**, v15, p32–42, 2016.

DÖRGE, U.; KOWALLIK, W. No effect of red light on oxygen uptake enhanced by blue light in *Chlorella*. **Journal of Plant Physiology**, v116, n2, p167–171, 1984.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. **Bioresource Technology**, v247, p1242–1245, 2018.

ESCOUBAS, J.M.; LOMAS, M.; LAROCHE, J.; FALKOWSKI, P.G. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v92, n22, p10237–10241, 1995.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v990, n1, p87–92, 1989.

GLEMSER, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRÜCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v100, n3, p1077-1088, 2015.

HAUSCHILD, A. H. W.; NELSON, C. D.; KROTKOV, G. The effect of light quality on the products of photosynthesis in green and blue-green algae, and in photosynthetic bacteria. **Canadian Journal of Botany**, v40, n12, p1619–1630, 1962.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. USA: Blackwell publishing, p264-272, 2004.

HUESEMANN, M.; CROWE, B.; WALLER, P.; CHAVIS, A.; HOBBS, S.; EDMUNDSON, S.; WIGMOSTA, M. A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. **Algal Research**, v13, p195–206, 2016.

IZADPANA, M.; GHESHLAGHI, R.; MAHDAVI, M.A.; ELKAMEL, A. Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth

characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. **Algal Research**, v9, p154–158, 2018.

KAMIYA, A.; SAITOH, T. Blue-light-control of the uptake of amino acids and of ammonia in *Chlorella* mutants. **Physiologia Plantarum**, v116, n2, p248–254, 2002.

KIM, D. G.; LEE, C.; PARK, S.M.; CHOI, Y.E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v159, p240–248, 2014.

KLINTHONG, W.; YANG, Y.H.; HUANG, C.H.; TAN, C.S. A review: microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. **Aerosol and Air Quality Research**, v15, p712–742, 2015.

KOC, C.; ANDERSON, G. A.; KOMMAREDDY, A. Use of red and blue light-emitting diodes (LED) and fluorescent lamps to grow microalgae in a photobioreactor. **The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, v65, n1, p1–8, 2012.

KOWALLIK, W.; GAFFRON, H. Respiration induced by blue light. **Planta**, v69, n1, p92–95, 1966.

KULA, M.; RYS, M.; MOZDZEN, K.; SKOCZOWSKI, A. Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. **Engineering in Life Sciences**, v14, p57–67, 2014.

LARKUM, A. W. Photosynthesis and light harvesting in algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). **The Physiology of Microalgae**. Developments in Applied Phycology. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, v6, p 67–87, 2016.

LIMA, G.M.; TEIXEIRA, P.C.N.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; FILÓCOMO, D.; LAGE, C.L.S. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v31, p157–166, 2018.

LOMBARDI, A.T.; MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v108, p77–87, 2011.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; ARROUSSI, H.E.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v215, p13–19, 2015.

MATTHIJS, H.C.P.; BALKE, H.; VANHES, U.M.; KROON, B.M.A.; MUR, L.R.; BINOT, R.A. Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). **Biotechnology and Bioengineering**, v50, p98–107, 1996.

MARCHETTI, J.; BOUGARAN, G.; JAUFFRAIS, T.; LEFEBVRE, S.; ROUXEL, C.; JEAN, B.S.; LUKOMSKA, E.; ROBERT, RENÉ, CADORET, J.P. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). **Journal of Applied Phycology**, v25, n1, p109–119, 2013.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v31, n8, p1532–1542, 2013.

MERCADO, J.M.; SAAVEDRA, M.P.S.; REYES, G.C.; LUBIÁN, L.; MONTERO, O.; FIGUEROA, F.L. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. **Aquatic Botany**, v78, p265-277, 2004.

MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH, R. Chlorophyll fluorescence in plant biology. In: MISRA, A. N. (Ed.). **Biophysics**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, p 171–192, 2012.

MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant physiology**, v 125, n 4, p 1558–1566, 2001.

ODUM, E.P; BARRET, G.W. **Fundamentos de Ecologia**. 5. ed., Editora Thomson Pioneira, 616p, 2007.

OJIT, S.; INDRAMMA, T.; GUNAPATI, O.; AVIJEET, S.; SUBHALAXMI, S.A.; SILVIA, C.; INDIRA, D.; ROMI, K.; MINERVA, S.; THADOI, D. The response of phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*, **Journal Applied of Biology and Biotechnology**, v3, p1-6, 2015.

RA, C. H.; KANG, C.H.; JUNG, J.H.; JEONG, G.T.; KIM, S. K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v212, p254–261, 2016a.

RA, C. H.; KANG, C.H.; JUNG, J.H.; JEONG, G.T.; KIM, S. K. Enhanced biomass production and lipid accumulation of *Picochlorum atomus* using light-emitting diodes (LEDs). **Bioresource Technology**, v218, p1279–1283, 2016b.

RALPH, P. J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v82, p222–237, 2005.

RADZUN, K.A.; WOLF, J.; JAKOB, G.; ZHANG, E.; STEPHENS, E.; ROSS, I.; HANKAMER, B. Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. **Biotechnology Biofuels**, v8, p1-17, 2015.

RAMANNA, L.; RAWAT, I.; BUX, F. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v80, p765–773, 2017.

ROCHA, M.N.; FUJIMOTO, T.G.; AZEVEDO, R.S.; MURAMATSU, M. O azul do céu e o vermelho do pôr- do -sol. **Revista Brasileira de ensino de física**, v32, n3, p1-3, 2010.

ROCHA, G.S.; PARRISH, C.C.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, v25, n8, p1468-1477, 2016.

SAKSHAUG, E.; BRICAUD, A.; DANDONNEAU, Y.; FALKOWSKI, P.G.; KIEFER, D.A.; LEGENDRE, L.; MOREL, A.; PARSLOW, J.; TAKAHASHI, M. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v19, p1637–1670, 1997.

SAROUSI, S.; BEER, S. Alpha and quantum yield of aquatic plants derived from PAM fluorometry: Uses and misuses. **Aquatic Botany**, v86, n1, p89–92, 2007.

SCHULZE, P.S.C.; BARREIRA, L.A.; PEREIRA, H.G.C.; PERALES, J.A.; VARELA, J.C. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v32, n8, p422-430, 2014.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v50, p431–444, 2015.

SIRISUK, P.; RA, C.H.; JEONG, G.T.; KIM, S.K. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. **Bioresource Technology**, v253, p175-181, 2018.

SUDIBYO, H.; PRADANA, Y.S.; SAMUDRA, T.T.; BUDIMAN, A.; INDARTO; SUYONO, E.A. Study of cultivation under different colors of light and growth kinetic study of *Chlorella zofingiensis* Dönz for biofuel production. **Energy Procedia**, v105, p270-276, 2017.

YAN, C.; ZHENG, Z. Performance of mixed LED light wavelengths on biogas upgrade and biogas fluid removal by microalga *Chlorella* sp. **Applied Energy**, v113, p1008-1014, 2014.

ZHANG, Y.; DONG, F.; JIN, P. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content in microalgae. **DEStech Transactions on Environment, Energy and Earth Science**, ICSEEP, p184–189, 2017.

ZIJFFERS, J.W.; SCHIPPER, J.J.; ZHENG, K.; JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. **Marine Biotechnology**, v12, p708–18, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de espécies é etapa primordial para trabalhos e estudos com microalgas, pois há espécies que produzem elevadas concentrações de biomoléculas energéticas (carboidratos e lipídios) e outras investem em produção de biomoléculas estruturais, caso das proteínas, como mostrado no capítulo 1 deste trabalho.

Devido à sua versatilidade metabólica, rápido crescimento e por permitirem manipulação no cultivo, cultivar microalgas tem se tornado uma atividade econômica para vários setores industriais, como a fabricação de ração animal, suplementação alimentar, indústria farmacêutica e cosmética. Assim, os cultivos em larga escala são cada vez mais atrativos, especialmente em se tratando de produção de biomassa com valor agregado. Porém, ainda são desafiadores, pois há muitos fatores limitantes a serem contornados, como a baixa intensidade luminosa incidente ao se atingir elevadas concentrações celulares (capítulo 2).

O destino dado à biomassa algal residual é importante para agregar valor ao resíduo e possivelmente contribuir com redução de custos dos cultivos. Uma das propostas desse trabalho, descrita no capítulo 3, é a inovadora utilização de biomassa algal como componente do material cimentante no processo de peletização de hortaliças, sendo assim uma vertente do mercado orgânico.

A peletização é o processo de revestimento de sementes, utilizando-se um material que confere aderência, ou material cimentante, e material de revestimento em pó. É uma técnica bastante utilizada para sementes pequenas e frágeis, a fim facilitar o manuseio e a semeadura manual ou mecanizada. Mas, tem sido pouco utilizada como recurso para a incorporação de elementos que agreguem componentes oriundos de matéria orgânica.

Trata-se de um trabalho promissor, pois nesta pesquisa, observamos igual porcentagem de emergência para plântulas de almeirão oriundas de tratamento controle (sementes nuas) e de sementes peletizadas com biomassa algal, argila, farinha, ou farinha+argila.

Para se potencializar a produção de biomassa algal, deve-se investigar, principalmente, o fator luz, pois muitos relatam se tratar de um fator limitante que impede ou potencializa o progresso de produção de biomassa. Nesse sentido, luz azul e azul+vermelha oriundas de diodo emissores de luz (LEDs) mostraram-se eficientes, principalmente em produtividade.