

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Caracterização de microalgas e cianobactérias: abordagens ecofisiológica e  
biotecnológica

Jaqueline Carmo da Silva

São Carlos – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Caracterização de microalgas e cianobactérias: abordagens ecofisiológica e  
biotecnológica

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi

São Carlos

Junho -2022



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jaqueline Carmo da Silva, realizada em 29/06/2022.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior (UNESP)

Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho (IB USP)

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi (UNIFESP)

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

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida, meu sobrinho, Pedro Henrique Quaglia da Silva.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Ana Teresa Lombardi, por todos ensinamentos, por toda paciência, dedicação, por nunca desistir de mim e por todo incentivo. Sem ela não teria sido a metade da pessoa que sou hoje. Agradeço muito pela compreensão que ela sempre demonstrou, pelos conselhos, pelas nossas risadas e por todos os desafios que enfrentamos juntas. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu e meus irmãos estudássemos, que sempre me apoiaram e que nunca me deixaram desistir. Agradeço por eles serem o meu porto seguro. Amo vocês.

Ao Ricardo Buscariolli que ao longo desses anos esteve ao meu lado incondicionalmente, me apoiando e sendo um ombro amigo. Agradeço imensamente por tudo o que ele fez e faz por mim.

Aos meus amigos Isabela França, Roberta Freitas, Jonas Paulino, Rafael Barty, Rafael Dantas, Vinicius Araújo, Tamires Freitas, em especial, ao Douglas Baracho, que está sempre ao meu lado, por toda ajuda, por sempre estar disposto a ouvir meus desabafos. A trajetória foi mais leve com ele ao meu lado.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, Guilherme Pasqualinotto, Nicolás Valdez e Flávio Daniel, que me fizeram aprender todos os dias.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Algas por toda a ajuda durante o projeto: Leonardo de Faria, Lucas Cardoso, Amanda de Lima, Rafael Oliveira, Suleiman Dauda, Renata Porto, Lucas Solidade, Leonardo Murilo, Alexandre e Julia Bolli.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente: Pedro Echeveste, Alessandro Claudino, Farid Saadi, Vinicius Araújo, Graziela Montanhim, Camila Candido, Daniela Barreto, Tamires Freitas, Rafael Barty, Cinthya de Lima, Carlos Casali, Adriano Marchello e Eduardo de Camargo.

Ao Professor Dr. Felix Figueroa pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

À Sandra Quirós por toda ajuda e amizade durante o meu período na Espanha.

Aos membros da banca Profa. Dra. Odete Rocha, Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior, Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi por todas as contribuições.

Ao Laboratório de Pescado e Cromatografia Aplicada – (Universidade Federal da Bahia).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos: 2019/07579-0 e 2018/07988-5.

## RESUMO

As microalgas são organismos fotossintéticos, em geral, de crescimento rápido, com necessidades nutricionais simples e plasticidade fisiológica. Produzem biomoléculas em grande variedade e muitas de alto valor agregado. Em comparação com o número de espécies conhecidas, poucas são comercialmente usadas e descritas em relação à composição bioquímica. Esta pesquisa teve como objetivo principal investigar a fisiologia de microalgas com uma abordagem biotecnológica. Iniciamos o estudo investigando 12 cepas, incluindo organismos dos grupos Bacillariophyta, Cyanobacteria e Chlorophyta e uma cepa escolhida para ser submetida à manipulação bioquímica. A fixação de CO<sub>2</sub> foi quantificada visando associar a produtividade de microalgas com a redução de um importante gás de efeito estufa. As algas foram cultivadas em fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho (PBR) com iluminação interna em modo batelada sob condições controladas. Como resposta fisiológica avaliaram-se parâmetros de crescimento e fotossíntese (PhytoPAM), biomoléculas (carboidratos, proteínas e lipídios totais, composição de ácidos graxos, clorofila *a* e carotenoides) e potencial antioxidante. Complementamos o estudo com análise da biomassa por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria (TG). Os resultados mostraram que *Desmodesmus spinosus* teve o maior rendimento de biomassa algal (2,4 g L<sup>-1</sup>), além de apresentar teores de clorofila *a* e carotenoides totais elevados, assim como *Monoraphidium indicum*. Quanto à composição de ácidos graxos, *Nannochloropsis gaditana* destacou-se na produção de ácido eicosapentaenoico (EPA). Entretanto, *Kirchneriella aperta* foi destaque nos parâmetros: atividade antioxidante (69%), conteúdo de proteínas e carboidratos, taxas fotossintéticas (~0,80) e maior taxa de fixação de CO<sub>2</sub>. FTIR mostrou que as espécies com o maior teor lipídico foram nas Chlorophyta *N. gaditana*, *K. aperta*, *M. indicum*, *Chlorolobion guanense* e *Ankistrodesmus densus*. TG mostrou 3 estágios de decomposição térmica para todas as espécies. A microalga *K. aperta* foi selecionada para estudo da manipulação bioquímica. Nele, a alga foi exposta às diferentes cores de luz e concentração de cobre, isolados e em combinação. Mostramos que o cobre e as cores de luz de isolados resultaram em maiores concentrações de biomoléculas em comparação com os fatores combinados e com o controle. Por fim, um ensaio de ampliação de escala (250 L) empregando-se a microalga *Chlorella fusca* foi realizado em reator do tipo *raceway* mantido em estufa. Desenvolvido na Espanha, esse estudo mostrou que o monitoramento da fotossíntese em tempo real apresentou valores de rETR duas vezes maior em comparação com análise pontual efetuada em laboratório. Além disso, a microalga *C. fusca* apresentou altas concentrações de compostos fotoprotetores. Os presentes resultados fornecem informações relevantes sobre a fisiologia, fotossíntese e caracterização bioquímica de diferentes microalgas e destacam espécies potenciais para prosseguir investigação com objetivo de aplicações comerciais.

Palavras-chave: Bioprospecção, microalgas, composição bioquímica, fotossíntese

## ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms, generally fast-growing, with simple nutritional requirements and physiological plasticity. They produce biomolecules in great variety and many with high added value. Compared to the number of known species, few are commercially used and described in relation to their biochemical composition. This research aimed to investigate the physiology of microalgae with a biotechnological approach. We started the study by investigating 12 strains, including organisms from the Bacillariophyta, Cyanobacteria, and Chlorophyta groups and a strain chosen to be subjected to biochemical manipulation. CO<sub>2</sub> fixation was quantified to associate microalgae productivity with the reduction of important greenhouse gas. Algae were grown in a high-performance cylindrical photobioreactor (PBR) with internal lighting in batch mode under controlled conditions. As a physiological response, such as growth and photosynthesis parameters (PhytoPAM), biomolecules (carbohydrates, proteins, lipids total, fatty acid composition, chlorophyll *a*, and carotenoids), and antioxidant potential were evaluated. We complement the study with an analysis of the biomass by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetry (TG). The results showed that *Desmodesmus spinosus* had the highest yield of algal biomass (2.4 g L<sup>-1</sup>), in addition to presenting high levels of chlorophyll *a*, and total carotenoids, as well as *Monoraphidium indicum*. As for the fatty acid composition, *Nannochloropsis gaditana* stood out in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). However, *Kirchneriella aperta* stood out in the parameters: antioxidant activity (69%), protein and carbohydrate content, photosynthetic rates (~0.80), and higher rate of CO<sub>2</sub> fixation. FTIR showed that the species with the highest lipid content were in Chlorophyta *N. gaditana*, *K. aperta*, *M. indicum*, *Chlorolobion guanense* and *Ankistrodesmus densus*. TG showed 3 stages of thermal decomposition for all species. The microalgae *K. aperta* was selected for the study of biochemical manipulation. In it, the alga was exposed to different colors of light and copper concentration, alone and in combination. We showed that copper and isolated light colors resulted in higher concentrations of biomolecules compared to the combined factors and the control. Finally, a large-scale test (250 L) using the microalgae *Chlorella fusca* was carried out in a raceway reactor maintained in an oven. Developed in Spain, this study showed that real-time monitoring of photosynthesis showed rETR values twice as high compared to spot analysis performed in the laboratory. In addition, the microalgae *C. fusca* showed high concentrations of photoprotective compounds. The present results provide relevant information on the physiology, photosynthesis, and biochemical characterization of different microalgae and highlight potential species for further investigation with the aim of commercial applications.

Keywords: Bioprospecting, microalgae, biochemical composition, photosynthesis

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

**Figura 1.** Fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho com iluminação interna em diferentes fases de cultivo.....29

### Capítulo 1.

**Figura 1:** Parâmetros de crescimento. (a)  $\ln$  de densidade celular (célula  $\text{mL}^{-1}$ ) e (b)  $\ln$  clorofila *a* in vivo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para as Cianobactérias em função do tempo experimental; (c) taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) e (d) biomassa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ). Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). 40

**Figura 2.** Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) para as espécies cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Equação de regressão linear:  $2,54x - 0,517$ ,  $r = 0,723$  ..... 41

**Figura 3.** Composição dos pigmentos. (a) Clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (b) Carotenoides totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em função do tempo experimental. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). ..... 42

**Figura 4.** Concentração de ficocianina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) para as espécies de cianobactérias. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). ..... 42

**Figura 5.** Composição bioquímica das espécies cultivadas. (a) Proteínas totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (b) Carboidratos totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (c) Razão Proteínas:Carboidratos. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). ..... 42

**Figura 6.** Rendimento quântico fotossintético máximo (Fv/Fm) relatado em unidades de fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P.mucicola*; ampulheta aberta: *S .brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3) ...45

**Figura 7.** Parâmetros de fluorescência em fase exponencial de culturas: (a) rendimento quântico PSII, (b) Dissipação da fluorescência. Símbolos: círculo cinza: dissipação fotoquímica (qP); círculo preto: dissipação não fotoquímica (NPQ). As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3) .....46

**Figura 8.** Curva rápida de luz (RLC) feitas com culturas em fase exponencial representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (a) RLC de algas verdes; (b) RLC de cianobactérias e diatomáceas. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P.mucicola*; ampulheta aberta: *S .brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3) ...47

**Figura 9.** Parâmetros fotossintéticos obtidos após o ajuste RLC de acordo com Platt et al. (1980) em função de cada espécie. (a)  $\alpha$  ( $\text{mg C. mg Chl a}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]$ ), (b)  $E_k$  ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (c)  $rETR_{\text{max}}$  ( $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Círculos brancos:  $E_k$  de cultivo; Círculos pretos:  $E_k$  após o cultivo. ....47

**Figura 10.** Fixação teórica de carbono ( $\text{g C} [\text{mg Chl a}]^{-1} \text{h}^{-1}$ ) para as microalgas investigadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).....48

## Capítulo 2

**Figura 1.** Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das espécies de microalgas e cianobactéria cultivadas em fotobiorreator cilíndrico. ....65

**Figura 2.** Comportamento térmico das biomassas, curvas de TG - termogravimétrica (a) e DTG – derivada da TG (b) das espécies microalgais e cianobactérias cultivadas em fotobiorreator cilíndrico com injeção de CO<sub>2</sub>. .....65

**Figura 3.** Porcentagem de ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) das microalgas. Barras brancas: SFA; barras cinzas: MUFA e barras listradas: PUFA. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3) .....66

### Capítulo 3

**Figura 1.** Parâmetros de crescimento. (a) Ln de densidade celular (cel. mL<sup>-1</sup>) em função do tempo experimental (h); (b) taxa de crescimento (d<sup>-1</sup>) e (c) biomassa seca (g L<sup>-1</sup>) para os diferentes tratamentos. Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> mol L<sup>-1</sup>; círculo aberto e linha tracejada: luz azul; cruz e linha tracejada: luz vermelha; ampulheta aberta: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz azul; gravata aberta: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz vermelha. Barra preta: controle; barra branca: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz vermelha; barra com pontos: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).....80

**Figura 2.** Composição dos pigmentos. (a) Clorofila a (µg mL<sup>-1</sup>); (b) Carotenoides totais (µg mL<sup>-1</sup>) para cada tratamento. Barra preta: controle; barra branca: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz vermelha; barra com pontos: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3). .....81

**Figura 3.** Rendimento quântico fotossintético máximo (Fv/Fm) em unidades de fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental. Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>; círculo aberto e linha tracejada: luz azul; cruz e linha tracejada: luz vermelha; ampulheta aberta: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz azul; gravata aberta: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz vermelha. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3). .....84

**Figura 4.** Rendimento quântico efetivo (Φ<sub>M</sub>) do PSII para cada tratamento. Barra preta: controle; barra branca: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz vermelha; barra com pontos: 3 x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3) .....85

**Figura 5.** Curvas rápidas de luz (RLC) em culturas de fase exponencial representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, µmol de elétrons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR, µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto: 3x10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>; círculo aberto: luz azul; cruz: luz

vermelha; ampulheta aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul; gravata aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3). .....86

**Figura 6.** Parâmetros fotossintéticos obtidos após o ajuste RLC de acordo com Platt et al. (1980) para os diferentes tratamentos. (a)  $\alpha$  ( $\text{mg C. mg Chl a}^{-1} [\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}]$ ), (b)  $E_k$  ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (c)  $rETR_{\text{max}}$  ( $\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Barra preta: controle; barra branca:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha; barra com pontos:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul. As barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 3). .....87

## Cap\u00edtulo 4

**Figura 1.** Par\u00e2metros de crescimento de *Chlorella fusca*. a Ln densidade celular (c\u00e9lulas  $\text{mL}^{-1}$ ) em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental (dias); b. Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) como tempo (h). As barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia (n = 3) .....103

**Figura 2.** Rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo de *Chlorella fusca* em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental. ....104

**Figura 3.** a. Curvas de luz r\u00e1pida (RLC) em culturas de 24 h (c\u00edrculo aberto), 48 h (quadrado aberto), 72 h (tri\u00e2ngulo aberto) e 120 h (ampulheta aberta) representadas como taxa relativa de transporte de el\u00e9trons ( $rETR$ ) em fun\u00e7\u00e3o de fotossinteticamente radia\u00e7\u00e3o ativa (PAR); b.  $ETR_{\text{max}}$  (el\u00e9trons  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); c. ( $\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{ s}^{-1} [\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$ ); d.  $E_k$  em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental. ....105

**Figura 4.** (a) Curvas de luz r\u00e1pida (RLC) em culturas de 24 h (c\u00edrculo aberto), 48 h (quadrado aberto), 72 h (tri\u00e2ngulo aberto) e 120 h (ampulheta aberta) representadas como taxa relativa de transporte de el\u00e9trons ( $aETR$ ) em fun\u00e7\u00e3o da radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (PAR); (b)  $ETR_{\text{max}}$  ( $10^3 \mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) em fun\u00e7\u00e3o do tempo experimental. ....106

**Figura 5.** Varia\u00e7\u00e3o di\u00e1ria do rendimento qu\u00e2ntico efetivo (YII), taxa relativa de transporte de el\u00e9trons ( $rETR$ ) expressa como  $\mu\text{mol de el\u00e9trons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e Irradi\u00e2ncia fotossint\u00e9tica ativa (PAR) expressa como  $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em *Chlorella fusca* crescendo em *raceway* em condi\u00e7\u00f5es de casa de vegeta\u00e7\u00e3o. ....107

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1.

**Tabela 1-** Espécies de microalgas e cianobactérias investigadas e número registrado da cepa com os respectivos valores de irradiância saturante ( $E_k$ ).....35

**Tabela 2** – Potencial antioxidante sequestrante de radicais DPPH (%) das espécies estudadas. Os valores representam a média de  $n=3$  e os valores entre parênteses, o desvio padrão da média. ....44

### Capítulo 2.

**Tabela 1-** Composição de ácidos graxos das microalgas e cianobactérias (%) cultivadas em fotobiorreator. Abreviações: PUFA, ácidos graxos poliinsaturados; MUFA, ácidos graxos monoinsaturados; SFA, ácidos graxos saturados.....68

### Capítulo 3.

**Tabela 1** – Biomoléculas em *K. aperta* para os diferentes tratamentos em 48 h de exposição. Proteínas e Carboidratos totais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), produtividade específica de proteínas e carboidratos ( $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), atividade antioxidante (DPPH, %) e lipídios totais (%).  $\text{Cu}^{2+}$ : concentração de cobre  $3 \times 10^{-9} \text{ Cu}^{2+} \text{ mol L}^{-1}$ . Os números entre parênteses indicam o desvio padrão da média ( $n=3$ ). ....83

### Capítulo 4.

**Tabela 1-** Composição bioquímica de *Chlorella fusca* em diferentes tempos experimentais. ....109

**Tabela 2-** Matriz de correlação para os parâmetros estudados de *Chlorella fusca*. Símbolos:  $F_v/F_m$ : rendimento quântico máximo;  $E_k$ : irradiância de saturação;  $\text{ETR}_{\text{max}}$ : taxa relativa máxima de transporte de elétrons;  $\alpha$ : eficiência fotossintética. ....110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
°C	Graus Celsius
$\mu$	Taxa de crescimento específica
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}^{-3}$	Micrometro cúbico
$a^* \text{Chl } a$	Coefficiente de absorção específico para clorofila <i>a</i>
aETR	Taxa absoluta de transporte de elétrons
ANOVA	Análise de Variância
BBM	Meio Basal de Bold
C	Carbono
CB	Calvin-Benson
CCIBt	Coleção de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt), São Paulo, Brasil
CCMA UFSCar	Coleção e Cultura de Microalgas Universidade Federal de São Carlos
Cd	Cádmio
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Clorofórmio
$\text{Chl } a$	Clorofila <i>a</i>
$\text{cm}^{-1}$	Por centímetro
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
$\text{d}^{-1}$	Por dia
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTG	curva termogravimétrica diferencial
$\text{DW}^{-1}$	Por peso seco
Ek	Irradiância saturante
EPA	Ácido eicosapentaenoico
$F'_M$	Fluorescência máxima das células adaptadas ao claro
$F'_o$	Rendimento mínimo de fluorescência da clorofila na presença de centros de reação abertos do fotossistema II
$F_M$	Fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro
$F_o$	Fluorescência inicial de adaptação ao escuro
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
$F_v/F_m$	Rendimento fotossintético máximo
$F_v$	Variação da fluorescência final em relação a inicial
g	Gramas
GAE	Ácido gálico
h	Hora
IO-USP	Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo
L	Litro
l	Comprimento do caminho óptico
LED	Diodos emissores de luz
$\text{m}^{-2}$	Por metros quadrados

$m^{-3}$	Por metros cúbicos
maxETR	Taxa máxima (relativa) de transporte de elétrons
min	Minutos
mm	Milímetro
N	Nitrogênio
NPQ	Dissipação não-fotoquímica
OD	Densidade óptica
P/C	Razão Proteínas:Carboidratos
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
$P^B$	Produtividade primária
PBR	Fotobiorreator
PGE	Floroglucinol
pH	Potencial hidrogeniônico
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
qP	Dissipação fotoquímica
rETR	Taxa de transporte de elétrons relativa
RFU	Unidades de fluorescência relativa
RLC	Curvas rápidas de saturação de luz
rpm	Rotação por minuto
$s^{-1}$	Por segundo
SAFAs	Ácidos graxos saturados
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
TG	Termogravimetria
UV/Vis	Ultravioleta/visível
Y(II)	Rendimento quântico efetivo de PSII
$\alpha$	Eficiência fotossintética
$\Phi'_M$	Rendimento fotossintético efetivo
$\omega-3$	ômega- 3
$\Phi_e$	Coefficiente teórico de rendimento de fixação de $CO_2$

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é apresentada da seguinte maneira: Introdução geral, Justificativas e Objetivos, e, para melhor organização, foi dividida em quatro capítulos que constam de Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. Cada capítulo foi escrito em formato de artigo. As referências citadas em cada capítulo foram agrupadas no final da tese.

**Capítulo 1.** Apresentamos os resultados obtidos sobre o crescimento, rendimentos fotossintéticos, curva de luz, fixação do CO<sub>2</sub>, proteínas totais, carboidratos totais, pigmentos e atividade antioxidante. Doze espécies de diferentes grupos foram cultivadas em um novo fotobiorreator (PBR) de alta performance (patente submetida em outubro/2021 e publicada em junho/2022) em que confirmamos a eficácia do sistema.

**Capítulo 2.** Traz a caracterização da biomassa por análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TG/DTG) e de determinação de ácido graxos. Assim como a caracterização bioquímica (capítulo 1), essas análises permitiram direcionar a biomassa para aplicações comerciais.

**Capítulo 3.** Com base nos resultados do capítulo 1, a cepa *Kirchneriella aperta* foi selecionada para a realização da manipulação bioquímica por fatores abióticos (qualidade de luz e íons de cobre), sendo avaliado o crescimento, parâmetros fotossintéticos e a composição bioquímica (proteínas, carboidratos, lipídios e atividade antioxidante).

**Capítulo 4.** Refere-se ao cultivo de *Chlorella fusca* em escala ampliada em que o objetivo principal foi demonstrar as diferenças das análises fotossintéticas realizadas durante o cultivo (*in situ*) e medidas no laboratório (*ex situ*) além de realizar a caracterização bioquímica. Supervisão Prof. Dr. Felix Lopez Figueroa, Universidade de Málaga, Espanha.

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO GERAL	18
1.2.	CYANOBACTÉRIAS E MICROALGAS	20
1.2.1.	Cianobactérias	20
1.2.2.	Chlorophyta	21
1.2.3.	Ochrophyta	24
1.3.	FOTOSSÍNTESE	25
1.4.	SISTEMAS DE CULTIVO	27
1.4.1.	Sistemas abertos	27
1.4.2.	Sistemas fechados	28
1.4.3.	Fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho	28
2.	Capítulo 1- Caracterização bioquímica e fisiológica de 12 espécies de microalgas e cianobactérias em fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho	31
	RESUMO	31
	INTRODUÇÃO	32
	MATERIAL E MÉTODO	33
	RESULTADOS	38
	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÕES	56
3.	Capítulo 2- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, termogravimetria e ácidos graxos na bioprospecção de microalgas	58
	RESUMO	58
	INTRODUÇÃO	59
	MATERIAL E MÉTODOS	61
	RESULTADOS	62
	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÕES	72
4.	Capítulo 3- O uso de diferentes qualidades de luz e cobre para o aumento de biocompostos na microalga <i>Kirchneriella aperta</i>	73
	RESUMO	73
	INTRODUÇÃO	74
	MATERIAL E MÉTODOS	75

RESULTADOS .....	78
DISCUSSÃO .....	87
CONCLUSÕES .....	92
5. Capítulo 4- Cultivo de <i>Chlorella fusca</i> em escala ampliada: caracterização fotossintética e bioquímica. ....	94
RESUMO .....	94
INTRODUÇÃO.....	95
MATERIAL E MÉTODOS.....	97
RESULTADOS .....	102
DISCUSSÃO .....	110
CONCLUSÕES .....	115
6. ....CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
7. ....REFERENCIAS .....	117

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico, principal componente das emissões de gases de efeito estufa, apresenta grandes desafios e exige processos de mitigação. A mitigação biológica tem se mostrado promissora porque o CO<sub>2</sub> atmosférico pode ser convertido em biomassa por autótrofos e as microalgas são organismos eficientes para esse processo (WANG et al., 2008). Microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos que formam um amplo grupo caracterizado por serem microscópicos, com capacidade de fixação de CO<sub>2</sub> e que desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos. Por meio do processo fotossintético, as microalgas são responsáveis por aproximadamente 40% do oxigênio global na atmosfera (MORENO-GARRIDO, 2008). Além disso, são importantes produtores primários nas cadeias alimentares aquáticas e grandes contribuintes para a dinâmica das trocas gasosas no planeta (BOROWITZKA, 2016). Considerando a capacidade fotossintética de microalgas fotoautotróficas, o uso desses organismos para mitigação de CO<sub>2</sub> atmosférico tem recebido cada vez mais atenção (HALSEY; MILLIGAN; BEHRENFELD, 2010).

As microalgas são uma fonte natural de uma grande variedade de compostos (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; BOROWITZKA, 2016), e como resultado de sua diversidade, adaptação e plasticidade metabólica, alguns desses compostos atraem o interesse comercial. A biomassa microalgal é considerada rica em proteínas, carboidratos (CHIA et al., 2013; ROCHA; LOMBARDI; MELÃO, 2016) e minerais, para fins alimentares; os pigmentos e carotenoides produzidos por esses organismos podem ter aplicações especiais nas indústrias cosmética e farmacêutica (BOROWITZKA, 2013). Além disso, foram detectados em microalgas, enzimas, lipídios com ácidos graxos valiosos, conhecidos principalmente por sua insaturação e propriedades anti-inflamatórias (CHIA et al., 2013; CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991) e fitoesteróis (MARTIN-CREUZBURG; ELERT, 2009).

As proteínas se enquadram na categoria de compostos estruturais, constituintes do material genético e responsáveis pela mediação das reações celulares nas microalgas; sendo seu uso proposto como suplementação alimentar (BECKER, 2007).

Os carboidratos são uma das fontes de energia e nutrientes biológicos mais importantes da natureza. As algas conseguem acumular alto conteúdo de carboidratos (HO; CHEN; CHANG, 2012) com potencial para serem utilizadas como matéria-prima de fermentação para a produção de bioetanol (HARUN; DANQUAH; FORDE, 2010).

Os pigmentos presentes nas algas são responsáveis pela absorção de luz, apoiando a fixação de CO<sub>2</sub> e proteção das células contra danos por radiação excessiva. Três grupos principais de pigmentos são encontrados nas microalgas: carotenoides, ficobilinas e clorofilas (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Os carotenoides têm atividades antioxidantes intrínsecas que constituem a base de proteção contra o estresse oxidativo (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014); eles protegem a clorofila de danos ocasionados por excesso de luz. Ficobilinas são menos comuns em Rhodophyta e Cyanobacteria, onde têm importante função de captura de fótons (MANIRAFASHA et al., 2016). Esses pigmentos podem ser usados como corantes de alimentos, cosméticos e aditivos alimentares (YE; JIANG; WU, 2008). A clorofila *a* é comum a todos os organismos fotossintéticos e constitui o principal pigmento nas reações fotoquímicas.

Os compostos antioxidantes têm aplicações potenciais em alimentos, cosméticos e medicamentos; em humanos, esses compostos atuam como proteção eficiente contra os estressores oxidativos e de radicais livres (PULZ; GROSS, 2004). Além disso, a geração de outros compostos bioativos escassos, em particular aqueles que apresentam resposta imunológica, atividades anticâncer, anti-inflamatórias e antibióticas (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009; GARRIDO et al., 2013; OLAIZOLA, 2000; PASQUET et al., 2011) têm demonstrado ocorrer em microalgas. Assim, esses metabólitos bioativos de origem microalgal são de interesse especial no desenvolvimento de novos produtos para as indústrias médicas, farmacêuticas, cosméticas, alimentícias, tecnologia de alimentos e para a produção de “energia verde” como o biogás (COLLET et al., 2011), biodiesel (CHISTI, 2007), bio-hidrogênio (CHOCHOIS et al., 2009), bioplásticos (RAHMAN; MILLER, 2017) e bioetanol (JOHN et al., 2011), em que se há uma tendência global e crescente para produtos considerados saudáveis, ambientalmente sustentáveis e ecologicamente corretos (ARIEDE et al., 2017).

Neste contexto, a bioprospecção é uma ferramenta que visa o isolamento e identificação de espécies de algas capazes de sintetizar compostos bioativos para aplicações nos mais diversos setores comerciais.

## 1.2. CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS

### 1.2.1. Cianobactérias

As *Cyanophyceae* ou algas verde-azuladas são, hoje, geralmente referidas como Cianobactérias. O termo cianobactéria reconhece que essas algas procarióticas são mais intimamente relacionadas com as bactérias procarióticas do que com algas eucarióticas. Elas existem em diferentes morfologias, incluindo unicelulares, suspensas ou bentônicas, ou agregados e formas filamentosas, tricoma único ou feixes com ou sem bainha (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001) ou ainda coloniais.

As cianobactérias apresentam clorofila *a* e tem a água como o doador de elétrons durante a fotossíntese, levando à evolução do oxigênio. A maioria produz o pigmento ficocianina que conferem às células uma cor azulada quando presente em concentração suficientemente elevada, sendo responsáveis pelo nome popular de algas verde-azuladas; em alguns casos, o pigmento acessório vermelho, ficoeritrina, também é formado (WHITTON; POTTS, 2002).

As cianobactérias foram identificadas como uma nova e rica fonte de compostos bioativos e têm sido considerado um dos grupos mais promissores de organismos para produzi-los (BHADURY; WRIGHT, 2004; DAHMS; YING; PFEIFFER, 2006). Esses organismos têm aplicações na maricultura, alimentos, combustível, fertilizantes, corantes e produção de vários metabólitos como toxinas, vitaminas, enzimas e produtos farmacêuticos (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Considerando a diversidade e potenciais usos de cianobactérias na biotecnologia, o estudo fisiológico e bioquímico fornece o direcionamento para avaliar qual espécie é mais promissora para possíveis aplicações. Dentre as mais diversas espécies, destacamos quatro gêneros investigados nesta pesquisa:

#### *Nostoc*

O gênero *Nostoc* é caracterizado por ser filamentoso, apresentar tricomas envoltos em uma bainha, geralmente se divide por fissão binária em apenas um plano e geralmente não exibe ramificação verdadeira, mas ramificação pode ocorrer. Heterocistos e acinetos são formados, e a reprodução ocorre por fragmento dos tricomas, móveis (hormogonia).

Os numerosos tricomas formam frequentemente agregados gelatinosos ou colônias, aparentemente de dois tipos (DODDS; GUDDER; MOLLENHAUER, 1995).

#### *Geitlerinema*

O gênero *Geitlerinema* é constituído por células filamentosas pertencentes à ordem Oscillatoriales, podendo ser encontrado em diferentes habitats aquáticos, como ambientes de água doce ou marinhos. Apresenta tricoma delgado, altamente móvel, flexível e deslizante, com forma arredondada em ambas as extremidades e a ausência obrigatória de bainha (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Phormidium*

O gênero *Phormidium* é caracterizado por apresentar tricomas cilíndricos; levemente ondular intensamente ou parafusar irregularmente como enrolado, sem restrições e ligeiramente constricto nas paredes transversais, 1-12 µm de largura, com células crescendo após divisão com aproximadamente o tamanho original da célula-mãe, capacidade de formar bainhas ao redor dos tricomas dependentes das condições ambientais, bainhas firmes, aderentes aos tricomas, não lamelados, tricomas móveis na bainha e sem bainha (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Sphaerocavum*

Colônias microscópicas, flutuantes, em estágios jovens, na forma de pequenas cavidades esféricas ou irregulares, posteriormente ocas, amplamente elípticas, cilíndricas ou irregulares em forma, com buracos na superfície da colônia, ligeiramente achatada; envelope mucilaginoso estreito, difluente, imperceptível, incolor; células esféricas, inicialmente mal-arranjadas, sempre na superfície da colônia; conteúdo da célula com aerótipos. Divisão celular em dois planos em gerações sucessivas (DE AZEVEDO; SANT' ANNA, 2009).

### 1.2.2. Chlorophyta

As Chlorophyta, ou algas verdes, possuem clorofilas *a* e *b*, e reservam amido no cloroplasto, geralmente em associação com um pirenóide. Chlorophyta, portanto, difere

do resto das algas eucarióticas na formação do produto de armazenamento no cloroplasto em vez de no citoplasma.

Chlorophyta, que compreende a maioria das algas. O filo acomoda uma grande variedade de algas desde o menor eucarioto conhecido (ou seja, *Ostreococcus*) a algas simbióticas (BAUDELET et al., 2017).

Para este trabalho destacam-se os gêneros a seguir:

#### *Ankistrodesmus*

Esse gênero apresenta espécies com indivíduos coloniais, predominantemente de vida livre, agrupados em feixes, às vezes em colônias compostas. As células podem ser fusiformes, cilíndricas ou lunares, retas, encurvadas ou torcidas em espiral, muito alongadas.

A reprodução sexuada ocorre pela formação de dois, quatro, oito ou, mais raro, 16 autósporos por esporocisto, com o mesmo formato da célula-mãe, inclusos na parede celular materna antes de serem liberados para o meio.

O gênero, de distribuição cosmopolita, inclui cerca de 20 espécies (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Desmodesmus*

São representados por cenóbios planos, livre-flutuantes, formados por duas, quatro, oito, ou 16 células fusiformes, elipsoidais ou cilíndricas, dispostas lado a lado em série linear, mais raramente em duas séries alternantes, unidas por sua face dorsal. A maioria das espécies apresenta espinhos nos polos das células externas do cenóbio, os quais também podem estar presentes em um ou ambos os polos das células internas. Cada célula é uninucleada e contém um cloroplasto parietal com um pirenoide. A reprodução assexuada dá-se pela formação de autocolonias, as quais são liberadas pela ruptura da parede da célula-mãe (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Monoraphidium*

As células são solitárias, cilíndricas ou fusiformes, retas, arqueadas, em forma de meia-lua, de “S” ou espiraladas, muitas vezes afiladas nas extremidades, contendo um cloroplasto parietal com ou sem pirenoide. A reprodução assexuada se efetua pela formação de dois a 16 autósporos por esporocisto, produzidos em uma ou duas séries

paralelas; após deslizarem ao longo do eixo da célula-mãe, autósporos se isolam completamente, e sua liberação ocorre por ruptura longitudinal ou transversal da parede materna (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Kirchneriella*

Indivíduos coloniais, de vida livre. As células são lunadas ou irregularmente torcidas, envoltas por uma mucilagem homogênea. O plastídio parietal preenche quase todo o interior da célula. A reprodução assexuada ocorre pela formação de dois, quatro ou oito autósporos por esporocisto, inclusos na mucilagem materna: os autósporos são produzidos em séries e liberados pela ruptura da parede da célula-mãe (FRANCESCHINI et al., 2009).

#### *Chlorolobion*

Caracterizada por serem células unicelulares e de flutuação livre ou anexada. As células são semilunares a fusiforme, sem processos alongados; paredes celulares lisas. Células uninucleadas; cloroplasto único e parietal, com pirenoide único. Reprodução assexuada por autósporos. Estágios flagelados e reprodução sexuada desconhecida (COMAS, 1980).

#### *Tetraselmis*

*Tetraselmis* é um gênero de uma alga flagelada (Prasinophyceae) que contém muitas espécies marinhas e poucas espécies de água doce. As células móveis de *Tetraselmis* têm quatro flagelos, que emergem de uma depressão anterior (ou apical) da célula. Esse gênero tem um processo de formação de parede celular que é único entre algas verdes à medida que as células sintetizam pequenas escamas no aparelho de Golgi, que sofrem exocitose através de vesículas secretoras derivadas de Golgi para formar uma parede sólida (teca) composta por escamas fundidas. Em relação ao habitat, a maioria das espécies de *Tetraselmis* são de vida livre (planctônicas ou bentônicas), embora algumas espécies vivam em habitats especializados, por exemplo, como endossimbionte em platemintos (MARTIGNIER et al., 2018).

#### *Chlorella*

As microalgas do gênero *Chlorella* podem ser células esféricas, subesféricas ou elipsoides, únicas ou formando colônias com até 64 células, mucilagem presente ou

ausente. Apresentam cloroplasto único, parietal, com pirenoide presente circundado por grãos de amido. A reprodução ocorre por autósporos. Autósporos são liberados através da ruptura da parede da célula mãe. A célula-filha pode permanecer ligada aos restos da parede da célula mãe e formar colônias com envelopes de mucilagem. Apresentam parede celular rígida que preserva a integridade da célula contra invasores e ambientes hostis (SAFI et al., 2014).

### 1.2.3. Ochrophyta

Grupo de algas caracterizado pela coloração castanho-dourado, coloração dada principalmente pela concentração de fucoxantina. Os representantes desse grupo são providos de plastídios endossimbióticos secundários com clorofila *a* e *c* (DE REVIERS, 2006).

#### *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis* é um gênero de formato esférico não móvel com diâmetro médio de 2 a 3  $\mu\text{m}$ . Conseguem sintetizar biopigmentos de alta qualidade como astaxantina, zeaxantina e cantaxantina, utilizados para diversas aplicações industriais. Além disso, eles têm capacidade de acumular alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (YUKESH KANNAH et al., 2021).

#### *Diatomácea CCMA-293*

As diatomáceas são organismos unicelulares, providos de parede celular de sílica bivalve complexa, a frústula, apresentando bandas conectivas. As células podem se reunir como colônias ou pseudofilamentos. Não possuem flagelos, mas as espécies que apresentam rafe (fenda longitudinal disposta na frústula de um grande número de formas da ordem Pennales) podem se mover sobre um substrato, excretando substâncias mucilaginosas. A mucilagem induz a adesão ao substrato, e uma série de microfibrilas situada na região da rafe está envolvida nos movimentos. Outro fenômeno de mobilidade nas diatomáceas corresponde à capacidade de se enterrarem periodicamente nos sedimentos. Elas estão amplamente distribuídas na natureza (DE REVIERS, 2006).

### 1.3. FOTOSÍNTESE

A fotossíntese é a conversão biológica da energia luminosa em energia química, armazenada na forma de compostos de carbono orgânico. O processo fotossintético inicia-se com a absorção da luz e a transferência de sua energia para estruturas especiais, chamadas centros de reação, onde a energia é utilizada na separação da carga elétrica. Esses três processos - absorção, transferência de energia e separação de carga primária - constituem as chamadas reações de luz da fotossíntese e são fundamentalmente semelhantes em todos os organismos fotossintéticos.

A fotossíntese é um processo fotobioquímico que incorpora duas reações principais: reações dependentes e as independentes de luz (SEKAR; RAMASAMY, 2015). As reações dependentes de luz envolvem a captura de energia luminosa e sua subsequente conversão em transportadores de energia, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e adenosina trifosfato (ATP). O oxigênio, liberado como subproduto da fotólise da água, fornece os elétrons necessários ao longo das reações de luz. Os elétrons são transferidos para dois grandes complexos de proteínas denominados fotossistema I (PSI) e fotossistemas II (PSII). Na primeira fase, a luz absorvida excita clorofilas especiais, P680, dentro do PSII. Isso inicia a translocação de elétrons através da membrana tilacoide formando uma cadeia de transporte de elétrons (RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017; SEKAR; RAMASAMY, 2015) que segue rumo ao PSI, onde nova energia luminosa será absorvida (clorofilas P700) para contribuir com o transporte dos elétrons. Esse processo gera ATP e NADPH, os substratos para fixação de CO<sub>2</sub> por meio das reações independentes da luz.

As reações de fixação do CO<sub>2</sub> não requerem luz e são regularmente referidas como o ciclo de Calvin-Benson (CB). A incorporação de uma molécula de CO<sub>2</sub> a uma molécula de açúcar requer três ATP e dois NADPH. O ciclo CB envolve três fases, ou seja, fixação de CO<sub>2</sub>, redução do 3-fosfoglicerato (uso de ATP e NADPH) e regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) usando ATP. O ciclo CB envolve treze reações enzimáticas diferentes, no entanto, uma enzima é crítica para esta via, a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO). A enzima RuBisCO é responsável pela fixação de CO<sub>2</sub>, servindo como transformação biológica de carbono (RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017; SEKAR; RAMASAMY, 2015).

As reações de luz da fotossíntese podem ser estudadas por técnicas não destrutivas como a fluorescência da clorofila *a* do PSII, que nesse caso tem como base a

propriedade natural de fluorescência da clorofila *a*. O uso do método de fluorometria de pulso de amplitude modulada (PAM) fornece diferentes parâmetros de fluorescência que caracterizam o estado da fotossíntese (FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013; GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; SCHREIBER, 2007). O método fluorométrico PAM emprega uma combinação de três tipos diferentes de luz (modulada, actínia e saturante) e isso permite analisar a cinética de indução da fluorescência nos organismos fotossintetizantes.

Por meio da técnica PAM, parâmetros como o rendimento quântico máximo e o rendimento quântico operacional do PSII representam ferramentas úteis para os bioensaios com organismos fotossintetizantes porque indicam, respectivamente, a capacidade do centro de reação adaptado ao escuro e adaptado à luz em converter energia luminosa em energia química (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). Também é bem aceito que a dissipação fotoquímica (qP) e a dissipação não fotoquímica (NPQ) são úteis na medição de processos de conversão de energia durante o processo fotossintético (SCHREIBER; SCHLIWA; BILGER, 1986; SCHREIBER, 2007). Dentre os parâmetros que auxiliam na avaliação da capacidade fotossintética, a curva rápida de luz (RLC) mede o rendimento quântico efetivo em função da irradiância.

A RLC fornece informações detalhadas sobre as características de saturação do transporte de elétrons, bem como o desempenho fotossintético geral da alga (RALPH; GADEMANN, 2005). Essas curvas podem ser descritas por três regiões: ao início, há uma região limitada por luz, seguida de uma região saturada de luz e, eventualmente, uma região de fotoinibição por excesso de luz (irradiância supra ótima). Com baixa irradiância, a fotossíntese é limitada, definindo-se na curva uma inclinação ascendente inicial ( $\alpha$ ) sendo proporcional à eficiência de captura de luz e ao rendimento quântico efetivo (SCHREIBER, 2004). A irradiância mínima que causa saturação da fotossíntese ( $E_k$ ) é determinada encontrando a interceptação de  $\alpha$  com a taxa fotossintética máxima (ETR<sub>max</sub>) (SAKSHAUG et al., 1997). O parâmetro  $E_k$  está relacionado à dissipação da energia, onde a dissipação fotoquímica (qP) domina abaixo e no entorno do  $E_k$ , enquanto a dissipação não-fotoquímica (NPQ, qN) começa mostrar-se acima de  $E_k$  (HENLEY, 1993), contrabalançando o excesso de luz e permitindo que a fotossíntese se mantenha, mantendo-se no platô da curva. Nessa situação tem-se a máxima capacidade fotossintética, representada pela taxa de transporte de elétron relativa máxima (rETR<sub>max</sub>) (Schreiber, 2004). Com irradiância ainda mais alta, a fotossíntese tende a sofrer declínio, situação em que NPQ e qN tendem a dominar sobre qP. Com as curvas de fotossíntese

*versus* irradiância (P–E) tradicionais, esse declínio está geralmente associado à fotoinibição (HENLEY, 1993), no entanto, com RLCs, esse declínio pode estar ligado à regulação dinâmica para baixo de PSII (WHITE; CRITCHLEY, 1999), não à fotoinibição, pois não há tempo suficiente para ocorrer danos ocasionados pela luz.

#### 1.4.SISTEMAS DE CULTIVO

O cultivo de microalgas e cianobactérias é uma das áreas de impulso biotecnológico com enorme potencial de mercado para a produção de diversos produtos como biodiesel, bioetanol, cosméticos, suplemento alimentar e, conseqüentemente, a mitigação do CO<sub>2</sub>. Contudo, a produção de biomassa algal ainda é um processo custoso e desafiador. Neste contexto, o desenvolvimento de tecnologia de biorreatores é uma ferramenta que visa reduzir custos e aumentar a produtividade da produção (EVENS et al., 2000).

Dentre as várias categorias de fotobiorreatores para microalgas fotossintéticas, pode-se defini-los como sistemas abertos ou fechados.

##### 1.4.1. Sistemas abertos

O cultivo em reatores abertos oferece uma forma simples e econômica de produção algal. Esses reatores são mais comumente usados do que os fechados para cultivos em larga escala, incluem grandes lagoas rasas, tanques circulares e tanques do tipo *raceway*. A relação comprimento/largura é um parâmetro importante na concepção de um reator tipo *raceway*. Maior largura pode resultar em baixa velocidade de corrente, o que não é desejável para mistura e transferência de massa. O comprimento e a profundidade são determinados, respectivamente, pelo volume de cultura que uma unidade pode conter e penetração da luz. Em geral, esse tipo de reator opera com 15 a 20 cm de profundidade (PULZ, 2001).

Outro reator de sistema aberto amplamente utilizado é o reator conhecido como *thin-layer*, que consiste em duas pistas inclinadas conectadas por um canal através do qual a cultura fluiu da área superior para a inferior. No final da pista inferior, há um tanque de retenção, que por meio de bombeamento a cultura é transportada para a pista superior.

A cultura é depositada em um tubo que possui muitas saídas para distribuição. O nome do reator se refere à fina camada que o mesmo propicia as culturas que, em geral, é de cerca de 6 mm (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2009).

A principal desvantagem dos sistemas abertos é a ameaça permanente de contaminação e grande área necessária para sua instalação. A principal desvantagem em termos de produtividade parece ser a limitação por luz devido à alta espessura da camada (KUMAR et al., 2015; PULZ, 2001). Entretanto, a altura da camada pode ser reduzida e culturas mais densas torna-se realidade.

#### 1.4.2. Sistemas fechados

Os sistemas fechados foram inicialmente projetados para superar alguns problemas associados aos sistemas dos cultivos abertos, como baixa densidade e contaminação (CHISTI, 2007). Um fotobiorreator (PBR) pode ser definido como qualquer recipiente fechado (ou quase fechado) para produção fotoautotrófica (ANDERSEN, 2005). Um bom projeto de PBR deve usar a luz de forma eficiente; a iluminação deve ser uniforme, reduzir o auto sombreamento e ainda fornecer uma rápida transferência de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Esses sistemas apresentam condições de cultivo reprodutíveis, e hidrodinâmica controlável, entretanto sofre com aquecimento (SHOW; LEE; CHANG, 2011). Além disso, o projeto de PBR deve ser adequado para o cultivo de várias espécies de microalgas e evitar a incrustação no reator (KUMAR et al., 2011).

Dentro desse contexto, há uma busca constante de novos fotobiorreatores a fim de aprimorar os cultivos de microalgas, como o fotobiorreator utilizado neste trabalho.

#### 1.4.3. Fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho

A produção de biomassa de qualidade e reprodutibilidade em altas concentrações é necessária para a prospecção de biomoléculas, dado que microalgas apresentam plasticidade fisiológica e, conseqüentemente, sua composição bioquímica varia com a condição ambiental. Nesta pesquisa, finalizamos o desenvolvimento de um PBR (BR 102020023994-5 A2) ao qual demos o nome de PBR de alto desempenho. Ele suporta o cultivo de diferentes espécies de microalgas, admitindo regulação na agitação, cor e intensidade da luz, do pH/CO<sub>2</sub>, e possui baixo índice de contaminação. O PBR usado neste estudo tem capacidade para 3 L de meio de cultivo, é cilíndrico com iluminação

interna por diodos emissores de luz (LED) intermediado por um controlador de iluminação e controle automático do CO<sub>2</sub>. Nesse sistema, a luz permanece constante em todas as fases do cultivo. Desse modo, os cultivos não sofrem auto sombreamento, resultando em alta produção de biomassa algal (e seus metabólitos), em cultivos saudáveis.



**Figura 1.** Fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho com iluminação interna em diferentes fases de cultivo.

## **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

Os estudos sobre microalgas e compostos bioativos vêm contribuir com o desenvolvimento de compostos de alto valor. A atual produção de bioprodutos por meio desses microrganismos pode ser insustentável se o processo não estiver bem estabelecido (DE SOUZA et al., 2019). Desse modo, caracterizar a biomassa de diferentes microalgas torna-se importante para a inserção no mercado de novos produtos e devido à alta variabilidade biológica desses organismos, conhecer sua composição e bioprodutos de modo a ampliar a diversidade de microalgas que possam ser aplicadas comercialmente apresenta grande interesse industrial. Setores como a indústria farmacêutica, nutracêutica, e alimentícia são os grandes interessados nesse conhecimento.

Dada à plasticidade fisiológica das microalgas, no nosso entendimento, essa caracterização precisa ser feita em condições de cultivo saudável sob crescimento

exponencial, condição esta facilmente reprodutível. É com esta informação que conheceremos a fisiologia das cepas e poderemos sugerir mecanismos de manipulação bioquímica para o aumento de bioprodutos de interesse. Forneceremos assim o conhecimento necessário aos setores industriais para poderem optar por organismos de interesses específicos.

Uma das características importantes no cultivo de microalgas é a possibilidade de mantê-las em fotobiorreatores, não necessitando de áreas agriculturáveis. Mas o controle de processo para manter condição ideal ou quase, como iluminação e agitação, que pode variar conforme a alga que se cultiva, ainda é objeto de pesquisa mundial. Isso ocorre, pois, as necessidades das microalgas são muitas vezes individuais, demandando conhecimento específico. Uma tecnologia adequada e de bom aceite na área seria o desenvolvimento de um fotobiorreator capaz de manter em crescimento diferentes microalgas com diferentes características, ou seja, pertencentes a diferentes grupos taxonômicos.

Esta pesquisa teve como objetivos contribuir com informações sobre a fisiologia de microalgas considerando a biotecnologia dos cultivos microalgas, e a caracterização de biomoléculas e, para isso, propusemos um modelo de fotobiorreator (PBR) cilíndrico com iluminação interna em que é possível controlar a intensidade luminosa. Utilizando o PBR proposto e já testando sua eficácia para diferentes grupos, nele cultivamos e caracterizamos 12 espécies de microalgas e cianobactérias. Foram analisados o crescimento, fotossíntese, fixação de CO<sub>2</sub>, composição bioquímica (proteínas, carboidratos, lipídios e pigmentos), atividade antioxidante, ácidos graxos, e complementou-se com análises da biomassa por meio de FTIR e termogravimetria. Realizamos manipulação bioquímica de uma cepa promissora (*Kirchneriella aperta*) e ainda um cultivo em escala ampliada (250 L) com a microalga *Chlorella fusca*.

Assim, reforçamos que todos os aspectos desta pesquisa são importantes para o atual estado da arte na biotecnologia de microalgas. O desenvolvimento do PBR que conseguiu manter ampla variedade de espécies em crescimento saudável, a caracterização bioquímica das espécies, que forneceu informações novas e ampliou as já existentes acerca das microalgas, indicando potenciais cepas para aplicações específicas. Além disso, o cultivo em escala ampliada mostrou que o monitoramento *in situ* fornece informações mais precisas do que os *ex situ* para culturas ampliadas.

Esta pesquisa abrange a fisiologia e biotecnologia de microalgas e assim contribui para novas informações.

## 2. Capítulo 1- Caracterização bioquímica e fisiológica de 12 espécies de microalgas e cianobactérias em fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho

### RESUMO

Microalgas e cianobactérias são fontes naturais de uma grande variedade de compostos. Como resultado de sua diversidade, adaptação e plasticidade metabólica, alguns desses compostos são produzidos exclusivamente por microalgas e com alto interesse comercial. Nosso objetivo foi avaliar a produção de biomassa e caracterizar 12 espécies de microalgas e cianobactérias quanto à sua composição bioquímica, características de crescimento e fotossíntese. Os organismos foram cultivados em um novo fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho (PBR) com iluminação interna em modo de cultura batelada. A intensidade da luz foi mantida quase constante, ajustando-a conforme a irradiância fotossintética ativa (PAR) monitorada nas culturas à medida que as culturas cresciam. Cada espécie foi cultivada em sua respectiva intensidade de luz onde a fotossíntese satura ( $E_k$ ). Quantificamos proteínas totais, carboidratos, pigmentos, atividade antioxidante, taxa de crescimento, rendimento de biomassa e os parâmetros fotossintéticos como rendimento quântico máximo, efetivo e curva de luz. Os resultados mostraram que as taxas de crescimento das algas verdes foram superiores ao habitualmente descrito na literatura e as taxas fotossintéticas mostraram que todos os cultivos estavam saudáveis. As proteínas totais foram maiores em *Kircheneriella aperta* e *Nannochloropsis gaditana*, mas os carboidratos foram maiores em *K. aperta*. O potencial antioxidante com quase 70% também foi maior em *K. aperta*, seguida por *Chlorolobion guanense* (41%) e *Ankistrodesmus densus* (35%). *Desmodesmus spinosus* e *Monoraphidium indicum* são microalgas potenciais à produção de clorofila *a* e carotenoides totais devido ao alto rendimento desses compostos. O rendimento de biomassa foi maior em *D. spinosus* (2,4 g L<sup>-1</sup>), seguido por *N. gaditana*, *A. densus*, *Tetraselmis gracilis* e *M. indicum* (~ 1 g L<sup>-1</sup>). Entre as cianobactérias, *Geitlerinema* sp. foi a melhor espécie para produzir ficocianina. Os presentes resultados fornecem informações relevantes sobre a fisiologia e caracterização bioquímica de diferentes microalgas e destaca espécies potenciais para aplicações comerciais.

Palavras-chave: Bioprospecção, Biotecnologia, Carboidratos, Fotossíntese, Proteínas, Pigmentos

## INTRODUÇÃO

As microalgas podem ser únicas na síntese de compostos específicos. Porém, poucas espécies são exploradas comercialmente, dessa forma, a busca por novas espécies que atendam às necessidades comerciais contribui para o desenvolvimento da biotecnologia das microalgas.

No entanto, apesar do interesse e dos esforços até o momento, o cultivo de microalgas tem seus desafios. Uma das limitações no cultivo de microalgas para coleta de biomassa e/ou biomoléculas é o projeto e a operação de fotobiorreatores (PBR). As culturas em batelada são os sistemas mais simples de produzir algas, mas as condições internas variam muito com o tempo, refletindo na variação da condição fisiológica e da composição bioquímica como produto. Portanto, um PBR com um sistema que controle parâmetros importantes de cultivo como pH e luz, garante células saudáveis, reprodutibilidade e, conseqüentemente, qualidade da biomassa (SIMUTIS; LÜBBERT, 2015).

A qualidade da biomassa é um ponto crucial a ser considerado tanto para investigações fisiológicas quanto para aplicações comerciais; a razão proteínas/carboidratos (P/C) tem sido sugerida como um indicador do estado fisiológico das microalgas (GANF; STONE; OLIVER, 1986; KILHAM et al., 1997).

Assim, os objetivos desta pesquisa foram avaliar a capacidade de um novo PBR no cultivo de diferentes microalgas e prospectar 12 espécies de microalgas e Cyanobacteria (6 Chlorophyta, 1 Ochrophyta, 1 Bacillariophyta e 4 Cyanobacteria) quanto à sua composição bioquímica e fisiologia.

As culturas foram cultivadas em um PBR cilíndrico de alto desempenho baseado em modo de cultivo em batelada com pH, CO<sub>2</sub> e iluminação interna controlados. Para avaliar o desempenho do PBR e caracterizar as cepas como contribuintes para a biotecnologia das microalgas, alguns aspectos da fisiologia das algas foram monitorados. Especificamente, analisamos as taxas de crescimento, taxa de fixação de CO<sub>2</sub>, rendimentos quânticos, dissipação da fluorescência, curva de luz, produção de biomassa, pigmentos (clorofila *a* e carotenoides totais), biomoléculas (carboidratos e proteínas) e atividade antioxidante. Por fim, destacamos diversos organismos com potencial para produção comercial. Nossas descobertas podem ajudar outros pesquisadores que buscam PBR em escala laboratorial de alto desempenho e aqueles que se concentram na

biotecnologia e produção de microalgas. Neste estudo, microalgas e cianobactérias serão referidas coletivamente como microalgas.

## MATERIAL E MÉTODO

### *Fotobiorreator e condições de cultura*

As culturas de microalgas foram realizadas em fotobiorreator em escala de laboratório (PBR). O PBR consiste em um modelo tubular de vidro de borosilicato com uma coluna borbulhante com capacidade de 3 L. Possui paredes de 2,5 mm de espessura, garantindo maior resistência e facilidade de manuseio e limpeza; diâmetro interno é de 95 mm com caminho óptico de 35 mm. Além disso, o sistema possui duas entradas na tampa superior para inserção dos eletrodos de pH e temperatura. O PBR possui iluminação emitida de dentro para fora feita de tiras de LED comerciais uniformemente distribuídas por toda a coluna, garantindo que a energia da luz seja direcionada para as células.

Os organismos (SISGEN A5EF193) usados para esta investigação foram 5 Chlorophyta de água doce (*Ankistrodesmus densus* 003, *Chlorolobion guanense* 387, *Desmodesmus spinosus* 062, *Kirchneriella aperta* 123, *Monoraphidium indicum* 549), duas Cyanobacteria de água doce (*Phormidium mucicola* 059 e *Sphaerocavum brasiliense* 593), uma Bacillariophyta (Diatomácea 293). Eles foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini, curadora da Coleção e Cultura de Microalgas de água doce do Departamento de Botânica (Laboratório de Ficologia, Universidade Federal de São Carlos, Brasil (CCMA UFSCar)) que está cadastrada no World Data Center for Microorganisms sob o n.º 835. Além disso, duas outras Cianobactérias foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Célia Leite Sant'anna da Coleção de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt), São Paulo, Brasil (*Nostoc* sp. 3206 e *Geitlerinema* sp. 3241), e duas espécies marinhas (*Nannochloropsis gaditana*, uma Ochrophyta, e *Tetraselmis gracilis*, uma Chlorophyta) fornecidas pelo Instituto de Oceanografia da Universidade de São Paulo (IO-USP, Brasil).

As culturas de monoalgais foram mantidas no PBR de alto desempenho contendo 2 L de meio BG-11 para Chlorophyta e Cyanobacteria e para a diatomácea foi utilizado

o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972); para as espécies marinhas o meio foi BG-11 com 30 g L<sup>-1</sup> de sal marinho. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave. As culturas foram mantidas em pH 6,8 - 7,0 por adição automática de CO<sub>2</sub> (15% v/v) em mistura com argônio (85% v/v), incubado a 25 °C ± 1 com fotoperíodo 12:12 claro/escuro.

A melhor intensidade de luz para as diferentes espécies foi determinada a partir de curvas rápidas de saturação de luz, realizadas pela técnica de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* do PSII, a partir da qual foi determinada a irradiância saturante (E<sub>K</sub>). Cada espécie foi cultivada em seu respectivo E<sub>K</sub> (Tabela 1). A intensidade da luz durante o cultivo foi mantida constante pelo controle da luz e medida com um microssensor quântico esférico (Walz-Germany) conectado a um medidor de luz (LI-250A, LI-COR, EUA).

Todas as culturas, exceto as de cianobactérias, foram inoculadas com 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> em crescimento exponencial de células saudáveis. Os inóculos de Cyanobacteria foram baseados em unidades de fluorescência relativa (RFU; clorofila *a in vivo*) determinadas usando um Fluorômetro de Turner (EUA). Os tratamentos foram realizados em triplicata, e o tempo experimental variou de 6 a 10 dias, dependendo da espécie.

**Tabela 1-** Espécies de microalgas e cianobactérias investigadas. Cada espécie tem sua própria identificação (número de cepa) e respectivos valores de irradiância saturante (E<sub>K</sub>).

Espécies	Código	E <sub>K</sub> (μmol fótons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>Ankistrodesmus densus</i>	CCMAUFSCar-003	150
<i>Chlorolobion guanense</i>	CCMAUFSCar-387	200
<i>Desmodesmus spinosus</i>	CCMAUFSCar-062	230
<i>Kirchneriella aperta</i>	CCMAUFSCar-123	200
<i>Monoraphidium indicum</i>	CCMAUFSCar-549	270
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	IO	250
<i>Tetraselmis gracilis</i>	IO	240
<i>Geitlerinema</i> sp	CCIBt-3241	260
<i>Nostoc</i> sp	CCIBt-3206	170
<i>Phormidium mucicola</i>	CCMAUFSCar-059	60
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	CCMAUFSCar-563	60
<i>Diatomacea</i>	CCMAUFSCar-293	60

### *Crescimento e determinação de biomassa seca*

As culturas foram monitoradas diariamente para contagem de células (células mL<sup>-1</sup>) e concentração de clorofila *a in vivo* (mg L<sup>-1</sup>) usando um Fluorômetro Turner Design segundo o procedimento descrito em Silva et al. (2018). As células foram contadas em microscópio óptico em câmara de Fuchs-Rosenthal e por citometria (MUSE®, Millipore - EUA).

As taxas de crescimento foram determinadas por regressão linear do logaritmo natural das células mL<sup>-1</sup> *versus* tempo (dias) para as algas verdes e diatomáceas na fase de crescimento exponencial. Para as cianobactérias, clorofila *a in vivo* foi usada no lugar das células mL<sup>-1</sup>. A inclinação da equação de regressão linear da fase de crescimento exponencial correspondeu à taxa de crescimento específica. A regressão linear e a plotagem dos dados foram realizadas no software Igor Pro (Wavemetrics, EUA).

O peso seco foi determinado usando filtros de fibra de vidro de 47 mm (Sartorius-Germany ou Millipore-USA) previamente calcinados a 400 °C por 8 h. As amostras (50 mL) foram filtradas em bomba de vácuo (Millipore-USA) e os filtros foram secos a 40 °C por 24 h, removidos e colocados em um dessecador por pelo menos 30 min e pesados em balança microanalítica com 1 µg resolução (Metler Toledo-Switzerland).

### *Composição de biomoléculas e atividade antioxidante*

As biomoléculas determinadas consistiram na quantificação de clorofila *a*, carotenoides totais, ficocianina, carboidratos totais, proteínas totais, lipídios totais e atividade antioxidante.

A clorofila *a* e os carotenoides totais foram medidos diariamente e seguiram a metodologia descrita em Wellburn (1994). As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose que foram dissolvidas em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) à temperatura ambiente. O extrato foi lido a 480, 665, 649 nm usando espectrofotômetro (NANOCOLOR, Macherey-Nagel, Alemanha).

A extração e determinação da ficocianina seguiram a metodologia descrita em Yéprémian et al. (2017). Após a extração do pigmento, as amostras foram lidas a 620 e 650 nm em espectrofotômetro (NANOCOLOR-Macherey-Nagel, Alemanha).

Os carboidratos totais foram determinados de acordo com Albalasmeh; Berhe; Ghezzehei (2013). Em que é usado ácido sulfúrico e tem a glicose como padrão para a curva de calibração. Amostras de cultura (30 mL) foram centrifugadas (4400 rpm, 20 °C, 15 min) em uma centrífuga refrigerada (Legend XTR; Thermo Scientific, EUA), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido congelado (-22 °C) até análise, que não ultrapassou 10 dias.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com Bradford (1976) com protocolo de extração conforme descrito em Rausch (1981). Amostras de cultura (50 mL) foram centrifugadas conforme descrito para carboidratos. Após a extração das proteínas, uma alíquota de 100 µL da amostra digerida foi adicionada à 5 mL do reagente *Coomassie Brilliant Blue*. Proteínas totais foram determinadas em função de uma curva de calibração feita com padrão de albumina bovina.

O potencial antioxidante foi analisado em extratos de amostras liofilizadas por meio da técnica de DPPH, seguindo a metodologia descrita por Pires et al. (2017), uma modificação de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Para fazer o extrato, 50 mg de biomassa seca foi extraída em 1 mL de etanol 70%, sonicada (Sonics - EUA) no escuro e centrifugada (4000 rpm, 15 min a 20 °C) em uma centrífuga refrigerada (Legend XTR; Thermo Scientific, EUA). Este processo de extração foi repetido 3 vezes e os extratos foram somados.

#### *Parâmetros fotossintéticos*

Os parâmetros fotossintéticos foram obtidos através de fluorômetro de amplitude de pulso modulado, PhytoPAM (Heinz-Walz Effeltrich, Alemanha). Para as algas verdes foi utilizado o PhytoPAM-I, que apresenta quatro comprimentos de onda e para as cianobactérias e diatomácea as medidas fotossintéticas foram realizadas no PhytoPAM-II, este possui cinco comprimentos de ondas no qual são mais abrangentes para estes grupos de algas. O rendimento fotossintético quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) foi determinado após 15 min de aclimação das algas no escuro; o rendimento fotossintético quântico efetivo ( $\Phi'_M$ ) foi medido após a alga ter sido aclimatada à luz por 10 min durante a fase exponencial, assim como a dissipação de fluorescência fotoquímica (qP) e não-fotoquímica (NPQ). As equações seguiram as de Juneau; El Berdey; Popovic (2002), conforme descrito abaixo:

$$\Phi_M = F_M - F_0/F_M \quad (1)$$

$$\Phi'_M = (F'_M - F'_S)/F'_M \quad (2)$$

$$qP = F'_M - F_S/F'_M - F'_0 \quad (3)$$

$$NPQ = (F_M - F'_M)/F'_M \quad (4)$$

$$F'_0 = F_0/([F_v/F_m] + [F_0/F'_M]) \quad (5)$$

Onde,  $F_M$ : Fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro;  $F_0$ : fluorescência inicial de adaptação ao escuro;  $F'_M$ : fluorescência máxima adaptada ao claro;  $F_v$ : variação da fluorescência final em relação a inicial;  $F'_0$ : é o rendimento mínimo de fluorescência da clorofila na presença de centros de reação abertos do fotossistema II.

As curvas rápidas de saturação de luz (RLC) fornecem a taxa relativa de transferência de elétrons (rETR) da cadeia fotossintética foram obtidas na fase exponencial. O ajuste matemático da RLC foi feito de acordo com Platt; Gallegos; Harrison (1980) para obter o valor da inclinação inicial das curvas ( $\alpha$ ), onde apenas a luz é um fator limitante da fotossíntese, a taxa máxima (relativa) de transporte de elétrons (ETRmax) e a irradiância saturante ( $E_k$ ); sendo o  $E_k$  calculado a partir da divisão de ETRmax por  $\alpha$ .

#### *Produtividade primária ( $P^B$ )*

A produtividade teórica primária ou fixação de carbono foi determinada conforme descrito em Candido; Lombardi (2020). Para este cálculo foram determinados: a concentração de clorofila  $a$  ( $\text{mg m}^{-3}$ ) conforme Wellburn (1994); varreduras de absorvância de comprimento de onda de 400 a 700 nm no extrato de clorofila, realizadas usando um espectrofotômetro UV/Vis (NANOCOLOR-Macherey-Nagel, Alemanha), os coeficientes de absorção de luz da clorofila  $a$  ( $a$ ) foram calculados considerando as varreduras de absorvância média ( $A$ ) como descrito na equação 6:

$$a = 2303x (A/l) \quad (6)$$

Onde,  $l$  é o comprimento do caminho óptico da cubeta.

O coeficiente de absorção específico para clorofila *a* ( $a^*$  Chl *a*) foi determinado pela equação 7:

$$a^* \text{ Chl } a = a/[\text{Chl } a] \quad (7)$$

A taxa absoluta de transporte de elétrons (aETR) foi calculada de acordo com a equação 8:

$$a\text{ETR} = 0.5 \times a^* \text{ Chl } a \times \text{PAR} \times \Phi'_M \quad (8)$$

Assim, a taxa teórica de fixação de carbono foi determinada de acordo com Morris et al. (2008), e indica a quantificação de carbono fixada por mol de elétrons transportados ao longo da cadeia de transporte de elétrons. O coeficiente teórico de rendimento de fixação de CO<sub>2</sub> ( $\Phi_e$ , mol C [mol elétrons]<sup>-1</sup>) de 0,2 (MORRIS et al., 2008) foi usado para o cálculo desta taxa, assumindo que cinco elétrons são necessários para fixar o átomo de carbono.

#### *Análise de dados*

As análises estatísticas (ANOVA *One-way*) foram realizadas com o software Minitab 17. Os gráficos foram feitos usando o software Igor Pro versão 5.4.

## RESULTADOS

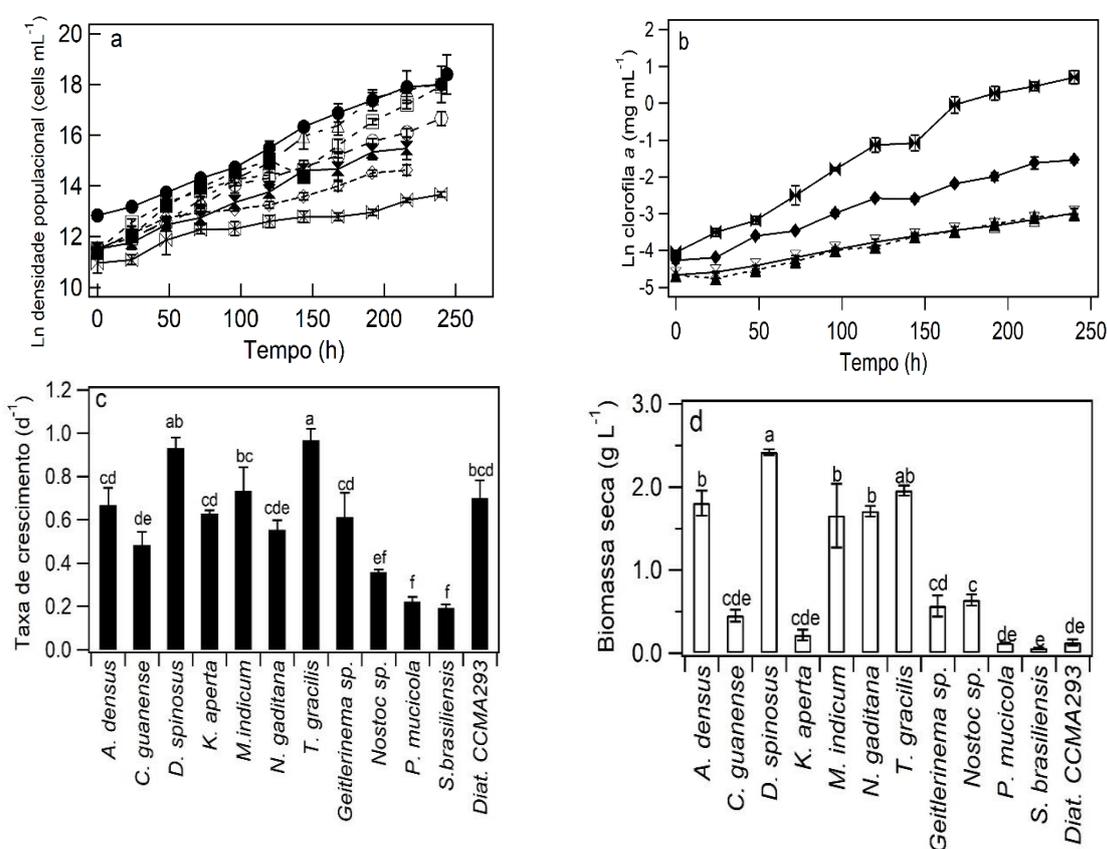
### *Crescimento e Composição Bioquímica*

Os parâmetros de crescimento em função do tempo experimental (horas) são mostrados na Figura 1. O logaritmo natural da densidade celular (células mL<sup>-1</sup>) para todas as espécies, exceto as cianobactérias, é mostrado na Figura 1a. Para as cianobactérias In clorofila *a in vivo* (mg mL<sup>-1</sup>) é mostrado na Figura 1b. As taxas de crescimento (d<sup>-1</sup>) são apresentadas em Figura. 1c, e a biomassa seca em Figura 1d.

Esses resultados mostraram que a Diatomácea CCMA-UFSCar293 apresentou a menor densidade celular, enquanto altas densidades celulares foram obtidas para *N. gaditana*, *D. spinosus* e *M. indicum* (Fig. 1a). Em relação às taxas de crescimento, os

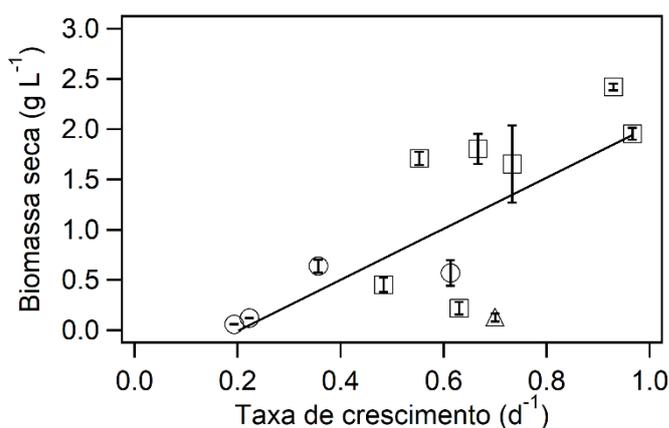
menores valores ( $\sim 0,2 \text{ d}^{-1}$ , Fig. 1c) foram obtidos para as cianobactérias *P. mucicola* e *S. brasiliense*.

As Chlorophyta *D. spinosus* e *T. gracilis* foram as espécies que apresentaram as maiores taxas de crescimento ( $\sim 1,0 \text{ d}^{-1}$ ). A biomassa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) foi maior para *N. gaditana*, *A. densus*, *T. gracilis* e *M. indicum*, com cerca de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ , mas a maior biomassa foi obtida em culturas de *D. spinosus* ( $2,4 \text{ g L}^{-1}$ ); *K. aperta*, *C. guanense*, *P. mucicola*, *S. brasiliense* e a Diatomácea CCMA-UFSCar293 produziram a menor biomassa.



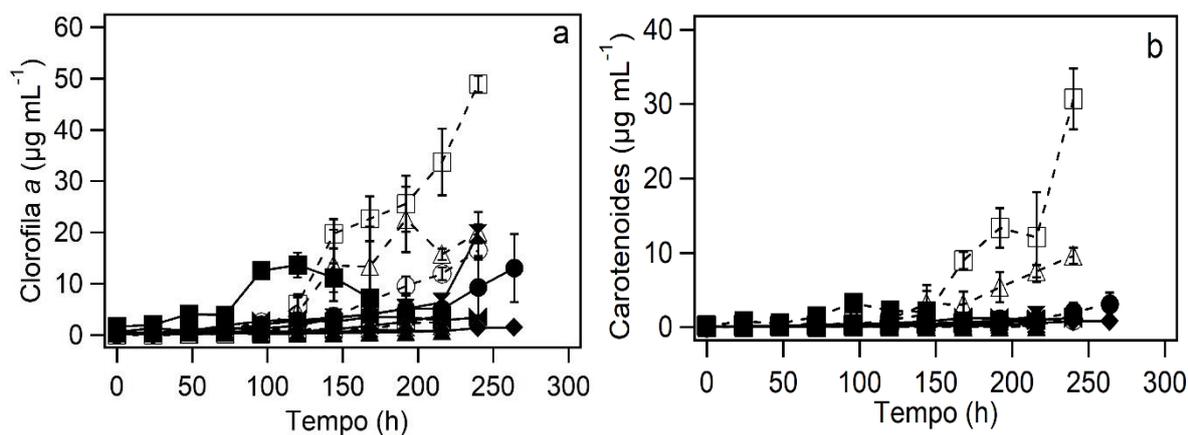
**Figura 1:** Parâmetros de crescimento. (a) Ln do número de densidade celular (célula. mL<sup>-1</sup>) e (b) Ln clorofila a in vivo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para as Cianobactérias em função do tempo experimental; (c) taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) e (d) biomassa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ). Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema sp.*; diamante fechado: *Nostoc sp.*; gravata aberta: *Diatomácea CCMA-UFSCar293*. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

A Figura 2 relaciona taxas de crescimento e dados de produção de biomassa seca para todos os organismos cultivados. Observamos que existe uma relação funcional entre essas duas variáveis, com um coeficiente de correlação de 0,723 (rendimento de biomassa =  $-0,517 + 2,54 \times$  taxa de crescimento,  $r = 0,723$ ).



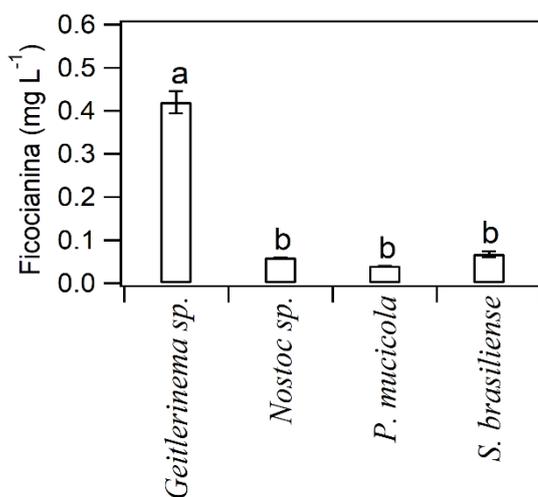
**Figura 2.** Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da taxa de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) para as espécies cultivadas. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ). Equação de regressão linear:  $2,54x - 0,517$ ,  $r = 0,723$ . Símbolos: quadrado aberto: algas verdes; círculo aberto: cianobactérias; triângulo: diatomácea.

Os resultados relacionados à clorofila *a* e aos carotenoides totais são apresentados na Figura 3. Após 10 dias de crescimento, *D. spinosus* acumulou maiores quantidades de clorofila *a* e carotenoides totais, atingindo o valor de  $\sim 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto as demais espécies produziram cerca de  $\sim 2$  a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 3a). A maior concentração de carotenoides totais (Fig. 3b) também foi obtida por *D. spinosus* ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no último dia de experimento, em comparação às demais espécies cultivadas. *M. indicum* acumulou  $\sim 20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorofila *a* e  $\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides; as demais espécies apresentaram cerca de 1 a  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de carotenoides.



**Figura 3.** Composição dos pigmentos. (a) Clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (b) Carotenoides totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em função do tempo experimental. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

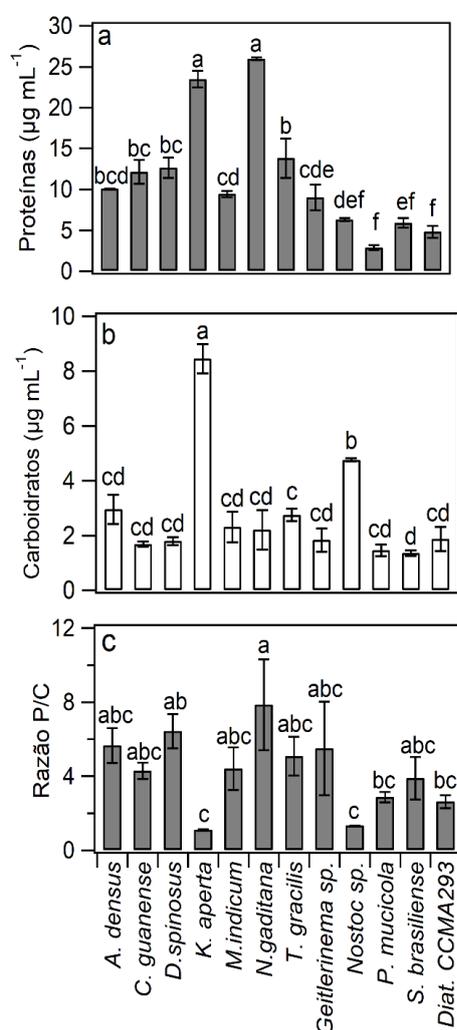
Em relação ao conteúdo de ficocianina (Fig. 4), os resultados mostraram que a *Geitlerinema* sp. foi a espécie que mais produziu esse pigmento ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). As demais cianobactérias produziram em torno de  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 4.** Concentração de ficocianina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) para as espécies de cianobactérias. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

As proteínas e carboidratos totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) são mostrados na Figura 5. A Chlorophyta *K. aperta* e a Ochrophyta *N. gaditana* produziram em torno de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , espécies promissoras para a síntese de proteínas (Fig. 5a), já as Bacillariophyta e Cyanobacteria produziram menos. Em relação aos carboidratos, *K. aperta* apresentou a maior concentração cerca de  $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 5b), o que pode estar relacionado à sua cápsula mucilaginosa. A cianobactéria *Nostoc* sp. foi a segunda espécie que mais acumulou carboidratos, cerca de  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A razão proteínas/carboidratos (razão P/C) é mostrada na Figura 5c. Todas as proporções foram superiores a 1,0, mas a maior foi observada em *N. gaditana* ( $\sim 8$ ).



**Figura 5.** Composição bioquímica das espécies cultivadas. (a) Proteínas totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (b) Carboidratos totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (c) Razão Proteínas:Carboidratos. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

O potencial antioxidante sequestrante do radical DPPH (%) das espécies cultivadas é apresentado na Tabela 2. Todas apresentaram alguma atividade antioxidante, exceto a Diatomácea CCMA-UFSCar293, cujo extrato não apresentou atividade detectável. O extrato de *K. aperta* apresentou ~ 70% de atividade antioxidante, a maior entre as espécies investigadas. *C. guanense* e *A. densus* apresentaram 41 e 36%, respectivamente. Entre as cianobactérias, *Geitlerinema* sp. exibiu 30%. Para as outras espécies, o potencial obtido variou de 7 a 25%.

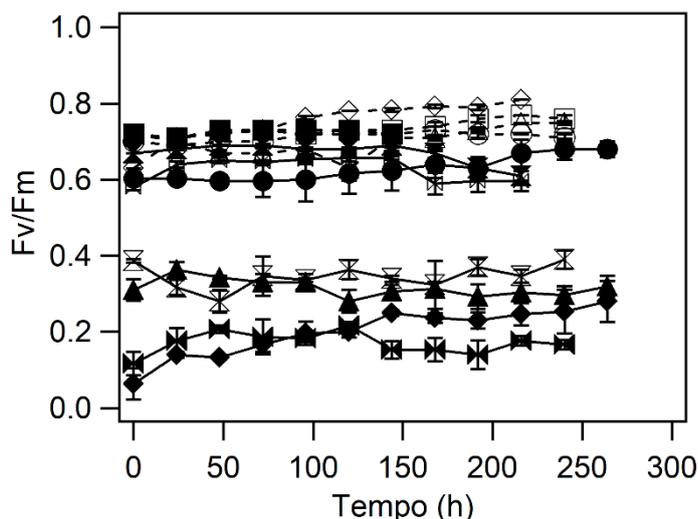
**Tabela 2** - Potencial antioxidante sequestrante de radicais DPPH (%) das espécies estudadas. Os valores representam a média de n=3 e os valores entre parênteses, o desvio padrão da média.

Espécies	Potencial antioxidante (%)
<i>A. densus</i>	36 (1.97) <sup>BC</sup>
<i>C. guanense</i>	41 (6.60) <sup>B</sup>
<i>D. spinosus</i>	19 (8.47) <sup>BCDE</sup>
<i>K. aperta</i>	69 (4.32) <sup>A</sup>
<i>M. indicum</i>	25 (5.00) <sup>BCDE</sup>
<i>N. gaditana</i>	11 (1.10) <sup>DEF</sup>
<i>T. gracilis</i>	7 (2.52) <sup>EF</sup>
<i>Geitlerinema</i> sp.	30 (1.45) <sup>BCD</sup>
<i>Nostoc</i> sp.	14 (2.00) <sup>CDEF</sup>
<i>P. mucicola</i>	24 (2.90) <sup>BCDE</sup>
<i>S. brasiliensis</i>	12 (1.50) <sup>DEF</sup>
<i>Diatomacea</i> CCMA- UFSCar293	ND*

ND\*- não detectado

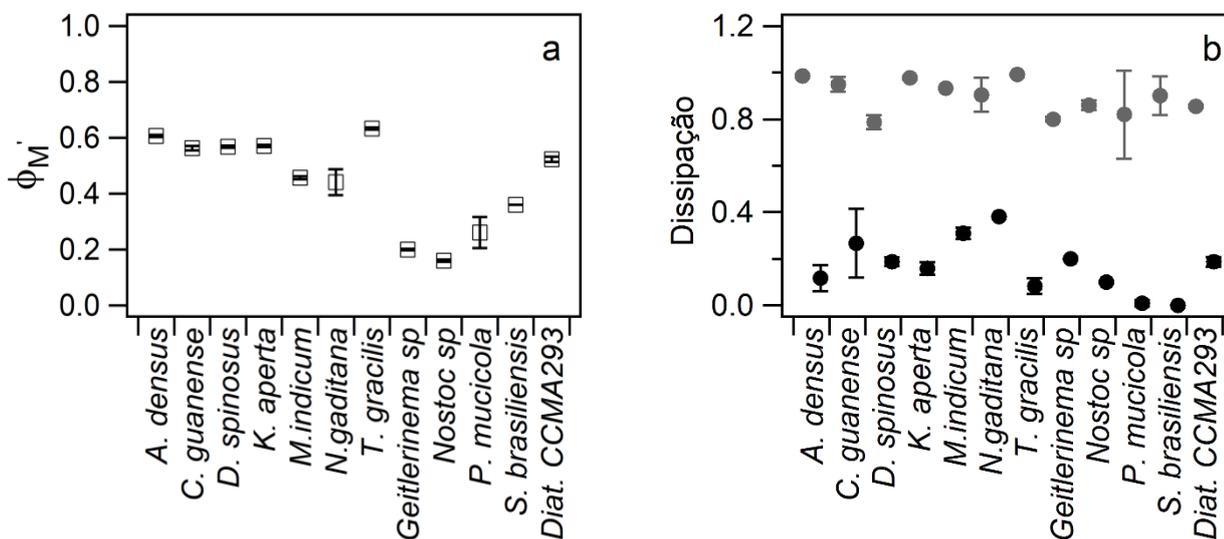
### Análise Fotossintética

O rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) em função do tempo experimental é reportado na Figura 6. Este parâmetro variou de  $\sim 0,6$  a  $0,8$  para algas verdes e diatomáceas, enquanto para cianobactérias o rendimento quântico máximo variou de  $0,1$  a  $0,4$ .



**Figura 6.** Rendimento quântico fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) relatado em unidades de fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

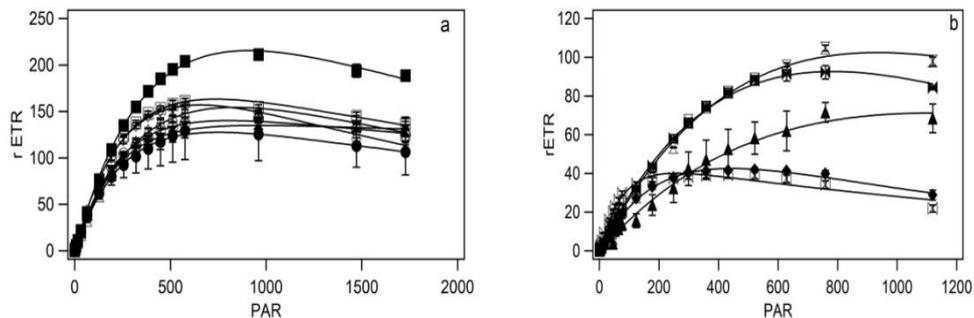
A Figura 7 mostra o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (PSII) (Fig. 7a) e dissipação de fluorescência (Fig. 7b) para as células em crescimento exponencial. O rendimento quântico efetivo ( $\Phi'_M$ ) foi de aproximadamente  $0,6$  para a maioria das espécies; para as cianobactérias, esse parâmetro ficou em torno de  $0,2$  a  $0,3$ . A dissipação fotoquímica ( $qP$ ) permaneceu em torno de  $\sim 0,8$  e, conseqüentemente, os valores de dissipação não fotoquímica (NPQ) permaneceram baixos para todas as espécies, indicando condições ideais de cultivo.



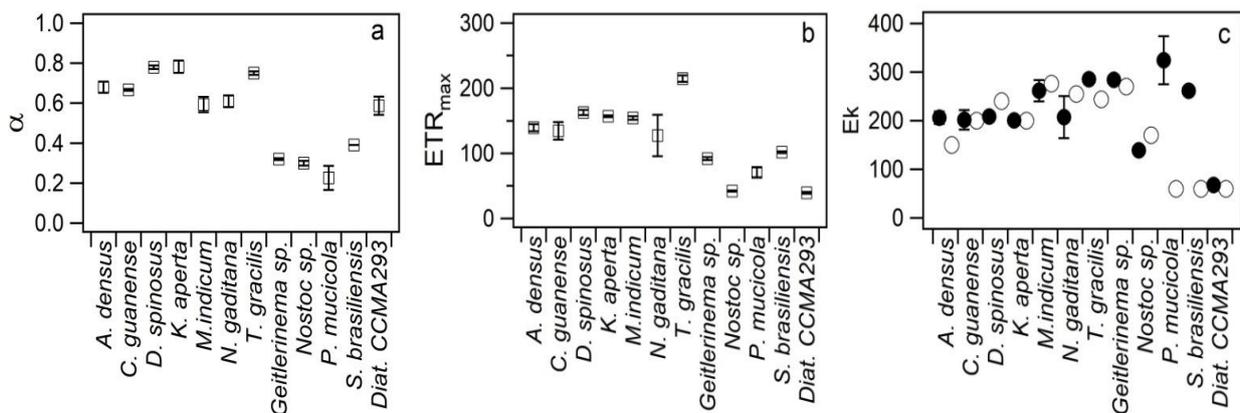
**Figura 7.** Parâmetros de fluorescência em fase exponencial de culturas: (a) rendimento quântico PSII, (b) Dissipação da fluorescência. Símbolos: círculo cinza: dissipação fotoquímica (qP); círculo preto: dissipação não fotoquímica (NPQ). As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

As curvas rápidas de luz representadas por rETR *versus* intensidade de luz são apresentadas na Figura 8. A Figura 8a reporta as curvas para algas verdes e a Figura 8b para cianobactérias e diatomáceas. Observamos que a maioria das espécies de algas verdes apresentou curvas de amplitude moderada em função do aumento da intensidade luminosa, assim, a taxa máxima de transporte de elétrons (ETR<sub>max</sub>) para essas espécies foi em torno de 150  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , como pode ser visto na Figura 8a. Por outro lado, *T. gracilis* foi a espécie mais adaptada ao aumento de PAR, exibindo maior amplitude em sua curva, conseqüentemente a maior ETR<sub>max</sub> entre as espécies estudadas ( $\sim 220 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fig. 8b). A cianobactéria *Nostoc sp* atingiu a saturação fotoquímica com aumento do PAR, em 178  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto as demais espécies adaptaram-se bem, evidenciado pela amplitude da curva. A diatomácea exibiu um comportamento semelhante a *Nostoc sp*, e ambas as espécies apresentaram a menor ETR<sub>max</sub> entre as espécies estudadas ( $\sim 40 \mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fig. 8b).

A Figura 9 relata a inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ), a ETRmax e a irradiância de saturação ( $E_k$ ). A inclinação inicial da curva ( $\alpha$ ) representa a eficiência de absorção de luz. Esses resultados mostraram que para as algas verdes a eficiência variou de 70 a 80%, enquanto para cianobactérias ficou em torno de 40%, e para a diatomácea em 60%. A eficiência de absorção de luz afeta a taxa de transporte de elétrons, de modo que quanto mais eficiente, maior tende a ser a ETRmax. Em relação aos valores de  $E_k$ , estes permaneceram próximos aos valores de  $E_k$  de cultivo; com exceção das cianobactérias *P. mucicola* e *S. brasiliense* cujos valores de  $E_k$  foram maiores, indicando que essas espécies tendem a tolerar alta incidência de luz.

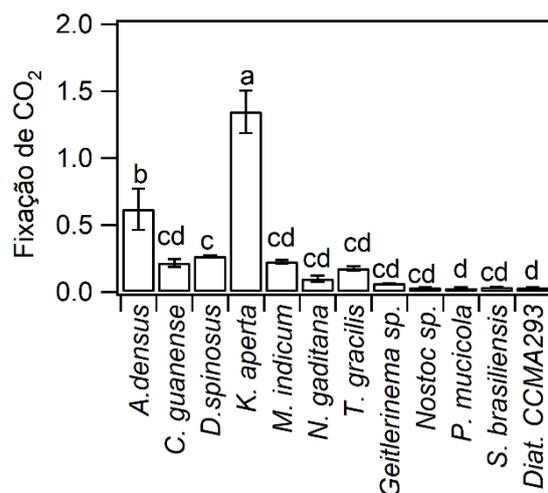


**Figura 8.** Curvas rápida de luz (RLC) em culturas de fase exponencial representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (a) RLC de algas verdes; (b) RLC de cianobactérias e diatomáceas. Círculo aberto: *A. densus*; quadrado aberto: *D. spinosus*; triângulo aberto: *M. indicum*; círculo fechado: *N. gaditana*; quadrado fechado: *T. gracilis*; diamante aberto: *K. aperta*; ampulheta fechada: *C. guanense*; triângulo fechado: *P. mucicola*; ampulheta aberta: *S. brasiliense*; gravata fechada: *Geitlerinema* sp.; diamante fechado: *Nostoc* sp.; gravata aberta: Diatomácea CCMA-UFSCar293. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).



**Figura 9.** Parâmetros fotossintéticos obtidos após o ajuste RLC de acordo com Platt et al. (1980) em função de cada espécie. (a)  $\alpha$  ( $\text{mg C. mg Chl a}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]$ ), (b)  $E_k$  ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (c) rETRmax ( $\mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Círculos brancos:  $E_k$  de cultivo; Círculos pretos:  $E_k$  após o cultivo.

A Figura 10 apresenta a fixação teórica de carbono para as espécies estudadas. As microalgas *K. aperta* e *A. densus* foram as espécies que mais fixaram carbono, 0,9 e 0,6 g C [mg Chl  $a^{-1}$ ] h<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre as cianobactérias, *Geitlerinema* sp. foi a que mais fixou carbono (0,06 g C [mg Chl  $a^{-1}$ ] h<sup>-1</sup>); as outras espécies fixaram em torno de 0,03 g C [mg Chl  $a^{-1}$ ] h<sup>-1</sup>.



**Figura 10.** Fixação teórica de carbono (g C [mg Chl  $a^{-1}$ ] h<sup>-1</sup>) para cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

## DISCUSSÃO

### *Crescimento e Composição Bioquímica*

Os presentes resultados mostraram que o sistema PBR cilíndrico utilizado para as culturas de microalgas foi altamente eficiente, mantendo um crescimento saudável e organismos de diferentes grupos taxonômicos. Assim, consideramos um PBR de destaque para culturas de microalgas em laboratório, de fácil manuseio e controle de importantes parâmetros ambientais como pH, luz e borbulhamento de CO<sub>2</sub>.

Nas condições de cultivo deste trabalho, *N. gaditana* cresceu a uma taxa de 0,4 d<sup>-1</sup>, 43% maior do que a mesma espécie cultivada em um reator plano com 2,5 L de meio de cultura por 10 dias, conforme relatado em Sung et al. (2017). Eles obtiveram uma taxa de crescimento de 0,28 d<sup>-1</sup>. A taxa de crescimento de *M. indicum* (0,7 d<sup>-1</sup>), na presente

pesquisa, foi superior a relatada em Guerrero-Cabrera et al. (2014) para *Monoraphidium* sp. ( $0,16 \text{ d}^{-1}$ ) mantidos em PBR cilíndrico com cultura de 1,5 L durante 20 dias. Obtivemos maior taxa de crescimento de *K. aperta* ( $0,63 \text{ d}^{-1}$ ) em comparação com *K. comuta* ( $0,25 \text{ d}^{-1}$ ) em PBR com 1 L de meio de cultura e 20% de  $\text{CO}_2$  (SWARNALATHA et al., 2015). No entanto, *A. densus* (nesta pesquisa) cresceu a uma taxa de  $0,66 \text{ d}^{-1}$ , 1,5 vez menor que a observada por Griffiths; Van Hille; Harrison (2012) para *A. falcatus* ( $0,99 \text{ d}^{-1}$ ) após 14 dias em biorreator de transporte aéreo de 3,2 L. Porém, a maior taxa de crescimento não refletiu em maior biomassa, uma vez que  $1,1 \text{ g L}^{-1}$  foi obtido pelos autores contra  $\sim 2,0 \text{ g L}^{-1}$  em nosso estudo para *A. densus*. A taxa de crescimento de *T. gracilis* foi de  $\sim 1,0 \text{ d}^{-1}$ , resultado semelhante aos reportados por Raes et al. (2014) ao cultivar *T. gracilis* em PBR cilíndrico de 40 L.

As taxas de crescimento, geralmente altas, obtidas para as microalgas verdes na presente pesquisa podem estar associadas ao fato de as espécies terem sido mantidas em sua intensidade de saturação de luz específica (Ek), além do controle de pH e suplementação de  $\text{CO}_2$ . Manter a intensidade luminosa interna diariamente, garantiu que as culturas não tivessem limitação por luz.

Considerando as cianobactérias, as taxas de crescimento que obtivemos estão de acordo com a literatura. Para *Nostoc* sp. (esta pesquisa,  $0,35 \text{ d}^{-1}$ ), Johnson; Kumar; Das (2014) relataram taxa de crescimento de  $0,32 \text{ d}^{-1}$  cultivando-o em fotobiorreator *air-lift*. *P. mucicola* (este estudo) foi semelhante ao observado por Khazi; Demirel; Dalay (2018) para *Phormidium* sp. ( $0,23 \text{ d}^{-1}$ ). No entanto, *Geitlerinema* sp. (neste estudo), teve taxa de crescimento inferior à observada por Sánchez-Alejandro; Del Pilar Sánchez-Saavedra (2015) para *G. lemmermannii*, cuja taxa de crescimento foi de  $1,2 \text{ d}^{-1}$ .

A variação no rendimento de biomassa ( $1,6 - 2,4 \text{ g L}^{-1}$ ) para 5 (*A. densus*, *T. gracilis*, *N. gaditana*, *M. indicum* e *D. spinosus*) das 12 espécies em 10 dias de cultivo é maior que normalmente relatado na literatura e confirma a excelência do PBR utilizado. De Moraes; Costa (2007) obtiveram rendimentos de biomassa de cerca de  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  em 12 dias de crescimento de *Scenedesmus obliquus* em um biorreator cilíndrico fechado. Liang et al. (2013) cultivaram *Chlorella* sp. e obtiveram rendimento de biomassa de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  em um reator circular aberto com 1 L de cultura. A biomassa que obtivemos para *T. gracilis* foi cerca de 2 vezes maior a obtida por Yao et al. (2012) que cultivaram *Tetraselmis subcordiformis* em fotobiorreator com coluna de bolha de ar por 8 dias, em 500 mL de meio e obteve  $\sim 1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Bresaola et al. (2019) obtiveram um rendimento de biomassa de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  quando *Ankistrodesmus braunii* foi cultivada com 20 mM de

NaNO<sub>3</sub> em um reator tubular de *air-lift* com 3,5 L de cultura após 7 dias de cultivo (0,21 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Este valor é ligeiramente superior ao obtido no presente trabalho para *A. densus*, com rendimento de biomassa de 1,8 g L<sup>-1</sup> em 10 dias (0,18 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).

Quanto ao rendimento de biomassa para as cianobactérias e diatomácea do presente estudo, são comparáveis ao usualmente relatado na literatura. Obtivemos 0,57 g L<sup>-1</sup> para *Geitlerinema* sp. e 0,64 g L<sup>-1</sup> para *Nostoc* sp., mas a produção de biomassa foi aproximadamente 10 vezes menor para *S. brasiliense* e *P. mucicola*. Singh; Kumar (2021) relataram biomassa máxima de *Leptolyngbya foveolarum* em torno de 0,45 g L<sup>-1</sup>, enquanto Yadav et al. (2021) obtiveram para *Phormidium* sp. e *Oscillatoria* sp. ~ 0,3 e ~ 0,4 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca, respectivamente, em 10 dias de cultivo. A biomassa seca para a Diatomácea CCMA-UFSCar293 foi de 0,13 g L<sup>-1</sup>, semelhante ao relatado em Gérin et al. (2020) para outras diatomáceas (*Sellaphora minima*, 0,06 g L<sup>-1</sup> e *Nitzschia palea*, 0,15 g L<sup>-1</sup>) em cultura de 14 dias. De acordo com Gérin et al. (2020), o baixo rendimento de biomassa pode estar associado ao meio WC de Guillard e Lorenzen devido as baixas concentração de macronutrientes.

A partir de nossos resultados, observamos uma relação funcional entre taxa de crescimento e biomassa seca com a correlação positiva de 0,723, sendo uma demonstração das condições adequadas fornecidas pelo sistema PBR. No entanto, essa relação pode não se aplicar a todas as espécies. Hulatt; Thomas (2011) mostraram que taxas de crescimento mais altas não promoveram mais biomassa seca; eles cultivaram *Dunaliella tertiolecta* e *Chlorella vulgaris* em PBRs de coluna de bolha sob diferentes condições de cultivo e observaram que a taxa de crescimento intermediária produziu a maior biomassa seca para *D. tertiolecta*, enquanto *C. vulgaris* produziu a maior biomassa seca na maior taxa de crescimento.

Em um exercício de comparação, usamos alguns dados da literatura para simular o coeficiente de correlação para taxa de crescimento e biomassa seca, e obtivemos 0,592 com dados de Hulatt; Thomas (2011), além de 0,828 para microalgas eucarióticas e 0,98 para cianobactérias com dados de Perendeci et al. (2019). Isso sugere que a correlação entre taxa de crescimento e biomassa é mais bem descrita para organismos do mesmo grupo. Sugerimos que mais estudos são necessários para melhor compreender e avaliar até que ponto as taxas de crescimento e a biomassa seca estão relacionadas. A racionalização dessa biomassa seca é influenciada pelo acúmulo de biomoléculas. Certamente, informações interessantes para quem busca a produção de microalgas poderiam ser obtidas a partir dessa abordagem.

O controle de pH e CO<sub>2</sub> em nossas culturas apoiam a correlação que detectamos para as taxas de crescimento *versus* biomassa seca. Isso é corroborado pelos resultados de Liu et al. (2016). Eles mostraram que o controle do pH entre 7,0-8,0 foi essencial para o crescimento de várias espécies de microalgas, reforçando que o pH afeta a absorção de nitrato e a especiação de micronutrientes e CO<sub>2</sub> no meio de cultura. Qiu et al. (2017) avaliaram o crescimento de *Chlorella vulgaris* em cinco diferentes pH (5,8, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) e observaram que a maior taxa de crescimento específico foi obtida em pH 7,0, enquanto a menor em pH 9. O pH é a condição ambiental mais crítica no cultivo de microalgas devido à sua influência direta e significativa no metabolismo das microalgas (CHEN; DURBIN, 1994) por meio da especiação de elementos nutricionais.

O carbono inorgânico dissolvido é outro aspecto importante a ser considerado. É encontrado principalmente em três formas, incluindo dióxido de carbono aquoso (CO<sub>2</sub> (aq)), bicarbonato (HCO<sup>3-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), onde CO<sub>2</sub> (aq) e HCO<sup>3-</sup> podem ser utilizados pela maioria das microalgas para fotossíntese (DE FARIAS SILVA; SFORZA; BERTUCCO, 2017). Em pH 9, a forma predominante é HCO<sup>3-</sup>, enquanto CO<sub>2</sub> (aq) e HCO<sup>3-</sup> estão igualmente presentes em pH 6. À medida que as algas crescem, o carbono inorgânico total dissolvido diminui e o pH aumenta gradualmente. A adição de CO<sub>2</sub> durante o cultivo permitiu que todas as espécies tivessem CO<sub>2</sub> (aq) e HCO<sup>3-</sup> disponíveis como fontes de carbono. Assim, pelo controle do pH da cultura que se baseia em set points de pH e borbulhamento de CO<sub>2</sub> conectado ao PBR garantimos as boas condições para os organismos.

A luz e o pH não afetam apenas o acúmulo de biomassa profundamente, mas também influenciam sua composição bioquímica (QIU et al., 2017). Em nosso estudo, o conteúdo de proteínas totais para as diferentes espécies variou de 2 a 25 µg mL<sup>-1</sup>. *N. gaditana* e *K. aperta* foram as espécies que mais produziram proteínas, sendo espécies promissoras para suporte nutricional. Santhakumaran; Kookal; Ray (2018) estudaram 14 espécies de microalgas e mostraram que *K. lunaris* apresentou a maior concentração de proteínas. Chua; Schenk (2017) Safi et al. (2014) e Schulze et al. (2014) mostraram que *Nannochloropsis* é um gênero potencial para produção de proteínas com esta biomolécula abrangendo 58% de seu peso seco. Nossos resultados relacionados à proteínas são superiores aos observados por Baracho; Silva; Lombardi (2019). Investigando um processo de manipulação bioquímica, eles obtiveram um máximo de 7,4 µg mL<sup>-1</sup> de proteínas em *Chlorolobion braunii*. Em geral, não observamos uma correlação significativa entre as taxas de crescimento e as proteínas, denotando que outras proteínas

além das estruturais foram responsáveis pelos valores obtidos. Em qualquer caso, o alto teor de proteína pode selecionar microalgas para aplicações nutricionais como superalimento, porque geralmente carregam outros compostos importantes também.

A maior concentração de carboidratos detectada em *K. aperta* está de acordo com Derakhshandeh; Atici; Tezcan Un (2021). Os autores observaram que *K. lunaris* foi a espécie que mais produziu carboidratos (72% do peso seco) entre as 20 espécies investigadas. Sabe-se que o gênero *Kirchneriella* produz copiosas quantidades de carboidratos necessários para formar sua bainha mucilaginosa, composta principalmente por exopolissacarídeos (OERTEL et al., 2004), que contribui para os altos valores de carboidratos. Os valores obtidos para as outras espécies foram entre 2 a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  valores 10 vezes maior do que o observado para *Botryococcus braunii*, conforme relatado em Ranga Rao; Ravishankar; Sarada (2012).

A razão Proteínas/Carboidratos pode ser interpretada como um índice do estado de saúde das microalgas (GANF; STONE; OLIVER, 1986; KILHAM et al., 1997). As razões P/C obtidas na presente pesquisa são superiores as relatadas na literatura a maioria das nossas amostras apresentaram razão P/C acima de 3,0, exceto *K. aperta* e *Nostoc* sp. Isso confirma a excelência do PBR para o crescimento de microalgas de diferentes espécies e grupos taxonômicos. A baixa razão P/C obtida para *K. aperta* (1,0) e *Nostoc* sp. (1,3) têm explicações. No caso de *K. aperta*, a alta produção de carboidratos é responsável pela diminuição da proporção, e não a baixa produção de proteínas. Isso se deve a quantidade de bainha mucilaginosa em *K. aperta* que, mesmo sendo excretada, é detectada com a digestão celular envolvida na determinação de carboidratos totais. Para *Nostoc* sp., a baixa razão P/C pode estar relacionada a um problema metodológico, pois pode ter ocorrido digestão celular incompleta na determinação de proteínas. A literatura mostra que geralmente mais do que o dobro de proteínas em relação aos carboidratos estão presentes em Chlorophyta. Rocha et al. (2014) obtiveram relação P/C de ~5,2 para *Scenedesmus quadricauda* em condições saudáveis, mas diminuiu em situações não ideais. Silva; Echeveste; Lombardi (2018) relataram razão P/C de 1,8 para *S. quadricauda*; Polat; Yüksel; Altınbaş (2020) observaram a razão P/C variando de 0,9 a 2,1 para *Auxenochlorella protothecoides*. Assim, é importante ser cauteloso ao analisar as razões P/C porque carboidratos elevados diminuirão a razão, mas não necessariamente isso significa células não saudáveis, o caso de *K. aperta*.

Considerando os pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e carotenoides totais em 10 dias de crescimento, *T. gracilis* e *D. spinosus* foram organismos de destaque,

apresentando teores superiores aos normalmente relatados na literatura. Ferreira et al. (2019) cultivaram seis microalgas e após 21 dias a concentração de clorofila *a* foi em torno de 14  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Chlorella vulgaris*, *Chlorella* sp. e *Desmodesmus brasiliensis*, mas a maior concentração foi de 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Desmodesmus* sp. Isso é  $\sim 3$  vezes menor que o teor de clorofila *a* para *D. spinosus*, na presente pesquisa. George et al. (2014) observaram que *A. facultus* acumulou 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  quando cultivada em meio BG-11, semelhante ao obtido no presente estudo para *A. densus*. Ressaltamos que em ambos os estudos, a intensidade luminosa de cultivo foi similar de 150  $\mu\text{mol de fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Assim, o cultivo de microalgas próximo ao  $E_k$  pode ser uma via para obtenção de pigmentos.

Observamos que correlações inversas para intensidade de luz e conteúdo de clorofila *a* em microalgas foram documentadas na literatura e ocorrem porque a luz excessiva (não o valor  $E_k$ ), foto-oxida o pigmento danificando as células das microalgas e levando à decomposição do cloroplasto (LICHTENTHALER; BABANI, 2007). He et al. (2015) cultivaram *Chlorella* sp. e *Monoraphidium dybowskii* sob três diferentes intensidades luminosa (40, 200 e 400  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e observaram que a maior concentração de clorofila *a* foi obtido sob a menor intensidade de luz. É possível que, para as cepas utilizadas pelos autores, 200 e 400  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fossem excessivos e danificaram as células. Isso apoia a importância de cultivar espécies de microalgas próximas aos seus respectivos valores de  $E_k$  para manter a homeostase celular.

A clorofila *a* é essencial para o processo fotossintético e está relacionada ao acúmulo de massa seca nas microalgas. Em nosso estudo isso mostrou um coeficiente de correlação de 0,715. Segundo Costa et al. (2018), isso era esperado uma vez que a produção de clorofila pelas microalgas faz parte do seu metabolismo primário, e assim está diretamente relacionada à produção de biomassa. A clorofila é um composto rico em nitrogênio e suporta o crescimento celular e a produção de biomassa em relação à acessibilidade do nitrogênio no meio de cultura (MOHAN SINGH et al., 2020).

Os carotenoides são uma classe de pigmentos acessórios com valor comercial, devido a sua capacidade em diminuir o estresse oxidativo, tanto em algas quanto em humanos. A partir de nossos resultados, *D. spinosus* (30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *M. indicum* (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) podem ser indicadas como potenciais espécies a produzir carotenoides. Orosa et al. (2005), para obter aumento de carotenoide, induziram estresse limitando nitrato e aumentando a intensidade da luz e observaram que *Scenedesmus vacuolatus* sintetizou 0,19  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *Scotiellopsis oocystiformis* produziu 0,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e *Chlorella zofingiensis*

0,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do pigmento, enquanto *Protosiphon botryoides* acumulou 0,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , após 24 dias de cultivo. Os valores que obtivemos mantendo as células sob seus respectivos Ek e fornecendo todos os nutrientes que elas precisam para crescer resultaram em pelo menos ~ 50 vezes mais carotenoides em *D. spinosus* e *M. indicum* em relação ao que foi reportado por Orosa et al. (2005) e Pancha et al. (2015). Nossos resultados sugerem que a intensidade de luz adequada, como o crescimento das células próximas ao seu Ek, pode ser mais eficaz do que estressores químicos/físicos para o acúmulo de carotenoides em algas.

Os carotenoides são pigmentos importantes para manter a fisiologia das algas, protegendo as células contra danos causados pelo excesso de luz. A este respeito, o estado foto-oxidativo em microalgas pode ser avaliado pela razão carotenoides/clorofila *a* (SOLOVCHENKO et al., 2009), em que valor próximo a 1,0 ou superior representa estresse fisiológico. Considerando que para as 12 espécies cultivadas na presente investigação a razão carotenoides/clorofila variou entre 0,10 - 0,47, confirmamos que as células estavam em condições fisiológicas saudáveis. Isso novamente apoia a importância e os benefícios do crescimento das células em seus respectivos valores Ek.

Considerando a ficocianina, um pigmento de cianobactérias pertencente à família das ficobiliproteínas de interesse comercial, nosso estudo mostrou que *Geitlerinema* sp. tem alto potencial para sua produção, acumulando 0,4  $\text{mg L}^{-1}$  durante a fase de crescimento exponencial. D'Alessandro et al. (2019) mostraram que *Geitlerinema amphibium* além da ficocianina tem potencial para produzir óleos e pigmentos como astaxantina e luteína. Patel et al. (2018) observaram que *Geitlerinema* sp. H8DM apresentou atividade antioxidante elevada e teor de ficocianina de 0,15 a 0,18  $\text{mg L}^{-1}$ . Em comparação, *Nostoc* sp., *P. mucicola* e *S. brasiliense* produziram 0,06  $\text{mg L}^{-1}$ , quase 7 vezes menos. Esses resultados estão de acordo com Basheva et al. (2018) que estudaram 18 espécies de cianobactérias e mostraram que *Nostoc* produziu a menor quantidade de ficocianina, variando de 0,8 a 1,2  $\text{mg L}^{-1}$  após 14 dias.

Os resultados do ensaio de DPPH aqui apresentados mostraram que a Chlorophyta *K. aperta* (69%), *C. guanense* (41%) e *A. densus* (36%) são espécies promissoras para atividade antioxidante. *A. densus* apresentou quase 4 vezes mais potencial antioxidante que a cepa cultivada por Cao et al. (2020), que obtiveram 10% de potencial antioxidante em extrato à base de etanol de *Ankistrodesmus* sp. Santhakumaran; Ayyappan; Ray (2020) observaram que apenas *Kirchneriella lunaris* mostrou atividade de eliminação de radicais DPPH para os cinco extratos de solventes diferentes testados (etanol, água,

clorofórmio, metanol e hexano) e entre as diferentes algas testadas, enfatizando o potencial do gênero *Kirchneriella* para o potencial antioxidante. Safafar et al. (2015) analisaram o potencial antioxidante de várias microalgas e relataram que *Phaeodactylum tricorutum*, uma diatomácea marinha, tinha a propriedade antioxidante mais pobre em comparação com *Nannochloropsis*, *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. e *Desmodesmus* sp.

Em nosso estudo, a diatomácea não exibiu atividade sequestradora de radicais DPPH; *T. gracilis* exibiu 7% e *N. gaditana*, 11%. Estes são menores se comparados ao observado por Maadane et al. (2015), no qual observaram potencial antioxidante acima de 80% para *Tetraselmis* sp. e *N. gaditana* em extrato etanólico. Bulut et al. (2019) analisaram o potencial antioxidante de *Scenedesmus quadricauda* em quatro solventes (etanol/água, acetato de etila, hexano e água) e obtiveram que a atividade antioxidante variou de 8% em água a 52% em acetato de etila. Considerando que os compostos antioxidantes podem ter diferentes polaridades, a capacidade antioxidante das microalgas é fortemente influenciada pelo solvente extrator (CHOOCHOTE; SUKLAMPOO; OCHAIKUL, 2014; SANTHAKUMARAN; AYYAPPAN; RAY, 2020).

A atividade antioxidante indica um sistema de defesa inerente em microalgas e sua bioatividade (BHATTACHARJYA et al., 2020), e diferentes espécies exibem diferentes níveis de atividades antioxidantes (NATRAH et al., 2007).

### *Análises da fotossíntese*

A aplicação da fluorimetria PAM pode ser usada como auxiliar ao monitoramento da produção de biomassa algal e de seus produtos na indústria de biotecnologia de algas, como sugerido por White; Anandraj; Bux (2011), informando sobre o estado fisiológico das células. Neste estudo, os resultados dos parâmetros fotossintéticos confirmaram que as células não estavam sob condições de estresse de cultivo, quando cultivadas nas respectivas intensidades de luz saturante ( $E_K$ ). O fotossistema II (PSII) estava em funcionamento ideal, uma vez que os rendimentos quânticos máximos fotossintéticos, para as microalgas verdes e diatomácea, foram superiores a 0,7 (LOMBARDI; MALDONADO, 2011).

No caso das cianobactérias os valores de rendimento quântico máximo são mais baixos e estão de acordo com a literatura (SCHUURMANS et al., 2015). Essa diferença no rendimento quântico entre os diferentes grupos de fotoautótrofos já foi estudada e os

baixos valores em cianobactérias foram atribuídos principalmente à interferência de fluorescência emitida pelas antenas de captação de luz dos ficobilissomos (SCHUURMANS et al., 2015). Tais características fazem com que as cianobactérias corram o risco de serem incorretamente marcadas como menos eficientes (DEBLOIS; MARCHAND; JUNEAU, 2013). Assim, os valores de rendimento quântico do PSII como tal, não é uma medida correta para comparação da eficiência fotossintética geral de diferentes grupos fotoautotróficos. Apesar disso, o uso do método PAM pode servir muito bem para o gerenciamento de cultura em massa de algas e cianobactérias, desde que os dados sejam usados para comparação qualitativa do desempenho de crescimento para cada cepa individualmente (SCHUURMANS et al., 2015).

A dissipação de energia detectada pelo PhytoPAM também reflete o estado fisiológico das células. A dissipação fotoquímica (qP), que em nosso estudo manteve-se elevada, corrobora que as células estavam saudáveis, mostrando a capacidade das células em direcionar energia luminosa para a fotoquímica (JUNEAU; HARRISON, 2005). A dissipação não fotoquímica (NPQ), em geral baixa ( $<0.2$ ), reflete processo fotossintético ótimo, sinalizando pouca perda de energia por dissipação térmica (DEWEZ et al., 2005). Aumento de NPQ seria esperado em situação de estresse, pois ajudaria a proteger o aparelho fotossintético dos danos causados por excesso de energia luminosa (JUNEAU; HARRISON, 2005). Neste estudo não foi necessário o uso deste mecanismo pelas algas, comprovando as condições ótimas dada pelo cultivo nos PBR de alto desempenho.

A curva rápida de luz e seus parâmetros refletem as características de saturação do transporte de elétrons, bem como o desempenho fotossintético da microalga (MASOJÍDEK et al., 2001). Nossos resultados mostram que as diferenças entre grupos de microalgas indicam claramente variações no processo de fotoaclimação, assim como foi observado por Deblois et al. (2013). Esses autores cultivaram 12 espécies de microalgas e observaram um padrão similar a este trabalho. A RLC com maior amplitude, observada para as algas verdes, indica melhor adaptação à luz, enquanto as curvas mais restritas, como observada na diatomácea e cianobactérias, indicam que a fotoquímica satura em intensidades de luz mais baixas (Henley, 1993).

A irradiância saturante ( $E_k$ ) é um indicador conveniente do estado de fotoaclimação das células de microalgas. A manutenção do valor de  $E_k$  durante o cultivo sinaliza que não houve aclimação fisiológica do aparato fotossintético que pode ocorrer em função de variação de luz, nutrientes e temperatura (ESCOUBAS et al., 1995). Para a maioria das espécies cultivadas na presente pesquisa não houve variação, no

entanto, foi observado aumento do valor do  $E_k$  para as cianobactérias *P. mucicola* e *S. brasilienses*, o que pode indicar o processo de fotoaclimação. As estratégias de aclimação parecem ter causas biológicas moleculares comuns que são sinalizadas pelo *status* redox de elementos específicos na cadeia fotossintética de transporte de elétrons. Durante esse processo, a microalga se esforça para manter o equilíbrio entre as reações dependentes e independentes da luz na fotossíntese, ou seja, entre a taxa de absorção de fótons pelo PSII e a taxa de transporte de elétrons da água até as reações de escuro, onde se dá a fixação do  $CO_2$ . Esse ajuste é realizado em função da intensidade da irradiância recebida, o que faz com a célula mude o seu  $E_k$  para baixo ou para cima (SAKSHAUG et al., 1997).

Em relação à fixação de carbono, e convertendo nosso resultado para  $g L^{-1} d^{-1}$ , a taxa fixada de carbono variou de 0,025 a 1,21  $g L^{-1} d^{-1}$ , sendo *P. mucicola* a que menos fixou carbono e *Geitlerinema* sp. a que mais fixou. Destacamos que entre as microalgas verdes *A. densus* (0,68  $g L^{-1} d^{-1}$ ), *K. aperta* (0,66  $g L^{-1} d^{-1}$ ) e *T. gracilis* (0,88  $g L^{-1} d^{-1}$ ) foram as que mais fixaram carbono, apresentando taxas superiores a alguns trabalhos da literatura. Ho et al. (2017) relataram que *Scenedesmus obliquus* fixou 0,3  $g L^{-1} d^{-1}$  de carbono inorgânico no verão e 0,2  $g L^{-1} d^{-1}$  no inverno. Sydney et al. (2010) observaram que *S. platensis* fixou carbono a uma taxa de 0,3  $g L^{-1} d^{-1}$ . Estas discrepâncias são aceitáveis, uma vez que são consequência das condições que as microalgas são cultivadas e do procedimento utilizado para calcular este parâmetro (CAMARGO et al., 2021).

## CONCLUSÕES

O fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho descrito neste estudo é uma opção para pesquisa de microalgas, produzindo biomassa saudável e em quantidade suficiente para análises fisiológicas e bioquímicas. Além disso, o fotobiorreator usado suportou o crescimento saudável de microalgas pertencentes a diferentes grupos (Cyanobacteria, Chlorophyta e Ochrophyta). Com simplicidade, três aspectos importantes da fisiologia das algas como intensidade de luz, concentração de  $CO_2$  e pH durante o crescimento populacional foram controlados no FBR. A possibilidade de controlar essas variáveis permitiu a obtenção de grande quantidade de biomassa, utilizando microrganismos fotossintéticos cultivados em condições de fácil reprodução.

Com base nos presentes resultados, sugerimos que o cultivo de microalgas em condições de manutenção de fase exponencial de crescimento, incluindo intensidade de luz onde a fotossíntese satura ( $E_k$ ), pode ser uma boa estratégia para produzir pigmentos e biomassa rica em proteínas. Os resultados dos parâmetros fotossintéticos mostram que todas as espécies estavam em condições ótimas de cultivo.

Todas as 12 espécies investigadas podem ser consideradas fontes potenciais de biomoléculas, mas *Kirchneriella aperta* foi a espécie mais promissora para a produção de carboidratos e potencial antioxidante. *Tetraselmis gracilis*, *Desmodesmus spinosus* e *Monoraphidium indicum* foram boas produtoras dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e carotenoides totais, e *D. spinosus* se destacou em biomassa seca. A cianobactéria *Geitlerinema* sp. é um organismo com potencial para produzir ficocianina.

### 3. Capítulo 2- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, termogravimetria e ácidos graxos na bioprospecção de microalgas

#### RESUMO

Os compostos sintetizados pelas microalgas têm sido destaque para aplicações nutraceuticas, farmacêuticas e no setor energético. Os ácidos graxos são um dos principais metabólitos das microalgas, que podem ser aplicados tanto como alimentos quanto em combustíveis. Portanto, a caracterização bioquímica das espécies de microalgas é essencial para categorizar suas aplicações. O objetivo deste estudo foi caracterizar a composição bioquímica de 10 espécies de microalgas e cianobactérias, apresentando o perfil de ácidos graxos e, por meio das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TG), contribuir com informações ao setor energético. Para isso, as microalgas e cianobactérias foram cultivadas em fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho sob condições controladas e a biomassa seca obtida foi analisada. Os resultados relacionados aos espectros de FTIR mostraram que *Kirchneriella aperta* apresentou a banda mais intensa para a carboidratos e *Nannochloropsis gaditana* para lipídios. A análise de decomposição de massa apresentou 3 estágios para todas as espécies, sendo a *Ankistrodesmus densus* e *Geitlerinema* sp. as espécies que perderam a maior biomassa (90%) e a Diatomacea293 a espécie que menos perdeu massa 65%. Em relação ao perfil de ácidos graxos *N. gaditana* destacou-se pela produção de ácido eicosapentaenóico EPA (11%) e *Monoraphidium indicum* pelo ácido linoleico (18%). De modo geral, a síntese de ácidos graxos monoinsaturados foram os mais produzidos pelas algas. A caracterização da composição bioquímica da biomassa, por diferentes análises, mostrou que todas as espécies de microalgas e cianobactérias deste estudo possuem biomoléculas de interesse.

Palavras-chave: Metabólitos; Caracterização Bioquímica, PUFA; MUFA; SFA

## INTRODUÇÃO

As microalgas são uma fonte potencial de compostos bioativos com perspectivas para a indústria farmacêutica e nutracêuticas, e de compostos energéticos para o setor de energia como biocombustíveis, sejam eles oleaginosos (biodiesel) ou etanólico (SAHU et al, 2013). Mas, a caracterização bioquímica da biomassa algal demanda tempo e, repleta de detalhes, fez com que técnicas de caracterização de materiais já bastante usadas em outras áreas como a química orgânica e de materiais, tal qual a espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria (TG) fossem também aplicadas à biomassa algal. São técnicas que não fornecem informações muito detalhadas como a caracterização bioquímica espectrofotométrica ou cromatográfica, mas sim informação de caráter mais geral, podendo ser importante na rápida seleção para cepas promissoras.

A espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem como vantagem não necessitar de solventes, muitas vezes tóxicos (STEHFEST et al., 2004) e provou ser uma técnica sensível para estudar mudanças espécie-específicas na composição molecular de microalgas (DE MORAES; VIEIRA, 2014). Na espectroscopia do infravermelho as absorções de radiação por diferentes grupos funcionais dentro da amostra são plotadas em função do comprimento de onda, normalmente apresentado em unidades de números de onda ou  $\text{cm}^{-1}$  (MURDOCK; WETZEL, 2009). É uma ferramenta útil para identificar grupos funcionais (proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos) de amostras biológicas como biomassa de microalgas e metabólitos intra e extracelulares (ARIF et al., 2021).

A termogravimetria (TG) é uma técnica termoanalítica comumente usada para estudos de características térmicas de um material, que com alto controle de temperatura, efetua sua degradação térmica gradual aferindo continuamente a massa restante e os eventos de perda de massa são registrados (ARIF et al., 2021). Tendo-se a curva TG e sua derivada (DTG), que tem por finalidade salientar os eventos de perda de massa, algumas propriedades físicas e químicas das amostras são identificadas (MARCILLA et al., 2009; YAHIAOUI et al., 2015).

A TG tem sido usada para realizar análise aproximada da biomassa (SALDARRIAGA et al., 2015) e descobrir o comportamento térmico das microalgas, como combustão (BACH; CHEN, 2017; ROSSI et al., 2018) e gaseificação (SANCHEZ-SILVA et al., 2013).

Entre as moléculas sintetizadas, o teor de lipídios desempenha um papel importante na bioprospecção de microalgas. Diferenças quantitativas e qualitativas no teor de lipídios das microalgas afetam o uso de seu óleo. Tradicionalmente, os lipídios de microalgas têm sido utilizados como fonte alimentar e componentes essenciais para o crescimento de animais em aquicultura, sendo a concentração e a composição de ácidos graxos os aspectos centrais na seleção das espécies de microalgas para comércio e uso (HUERLIMANN; DE NYS; HEIMANN, 2010).

A literatura é repleta de informações sobre o perfil de ácidos graxos de microalgas, que incluem ácidos graxos saturados (SFAs) e insaturados (ácidos graxos mono e poli-insaturados) (MORI et al., 2018). As microalgas contêm muitas das principais classes lipídicas e ácidos graxos encontrados em outros organismos, a importante diferença é a produção dos polinsaturados, sendo elas as principais responsáveis por sua produção no planeta. De particular interesse é o ácido docosahexaenóico (DHA), com alto poder anti-inflamatório e, o que é pouco divulgado, é seu uso em fórmulas para bebês. A incorporação de DHA nessas fórmulas aumenta sua semelhança ao leite materno humano (BEHRENS; KYLE, 1996). Isso é um exemplo da importância das microalgas como fonte de biomoléculas de interesse industrial. Conhecer o conteúdo de lipídios e o perfil de ácidos graxos de microalgas contribui para selecionar espécies que combinam altos níveis lipídios e perfis de ácidos graxos adequados para a produção de nutracêuticos ou mesmo almejando a produção de lipídios saturados para produção de biocombustível (HUERLIMANN; DE NYS; HEIMANN, 2010).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a biomassa e acúmulo de lipídios em dez espécies de microalgas e cianobactérias: *Ankistrodesmus densus*, *Chlorolobion guanense*, *Desmodesmus spinosus*, *Kirchneriella aperta*, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis gracilis*, *Geitlerinema* sp. e *Nostoc* sp. e *Diatomacea293* com a finalidade de indicar espécies promissoras para aplicações comerciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Condições de cultivo*

As microalgas *Ankistrodesmus densus*, *Chlorolobion guanense*, *Desmodesmus spinosus*, *Kirchneriella aperta*, *Diatomácea*CCMA293, *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis gracilis* e as cianobactérias *Geitlerinema* sp. e *Nostoc* sp. foram cultivadas em meio BG11 em fotobiorreator cilíndrico de alto desempenho (PBR) contendo 2 L de meio de cultura em triplicatas.

As culturas foram mantidas sob aeração constante, em pH 6,8 - 7,0 por adição automática de CO<sub>2</sub> (15% v/v) em mistura com argônio (85% v/v), sob temperatura de 25 °C ± 1 com fotoperíodo 12:12 claro/escuro. As espécies foram iluminadas com intensidade de luz de acordo com os respectivos valores de Ek. Esta informação foi obtida antes dos experimentos por meio de curvas rápidas de luz (PhytoPAM) e nessa intensidade de luz foram mantidas durante todo o período de estudo. Durante o cultivo, a monoespecificidade das culturas foi verificada periodicamente por observação em microscópio óptico e nenhuma evidência de contaminação foi encontrada.

### *Biomassa*

A biomassa obtida nos cultivos de *A. densus*, *C. guanense*, *D. spinosus*, *K. aperta*, *N. gaditana*, *T. gracilis*, *Geitlerinema* sp., *Nostoc* sp. e *Diatomácea* CCMA-UFSCar293 foram coletadas no último dia de cultivo (10° dia), na fase exponencial, exceto *T. gracilis* que foi coletada no 6° dia. Aproximadamente 1,5 L da cultura de cada reator foram centrifugados a 4000 rpm por 10 min em centrífuga refrigerada (Legend XTR; Thermo Scientific, EUA). O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi liofilizada (Solab - Brasil). A biomassa liofilizada foi mantida em ultrafreezer -80 °C (Haier Biomedical - China) até o momento da análise. Os cultivos foram realizados com 3 réplicas.

A biomassa oriunda dos cultivos foi analisada qualitativamente por FTIR (Perkin Elmer Model Spectrum Two) entre 4000 cm<sup>-1</sup> e 400 cm<sup>-1</sup> por refletância total atenuada (ATR) seguindo o protocolo descrito em ANDRADE et al. (2019).

Para a análise termogravimétrica (TG) utilizou-se um equipamento PerkinElmer Model Pyris 1 TGA (Estados Unidos). Cerca de 5,0 mg de amostra foi submetida à rampa de aquecimento com taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> com amplitude de temperatura de 25–900 °C, sob fluxo de nitrogênio de 20 mL min<sup>-1</sup> (JESUS et al., 2018).

O perfil de ácidos graxos foi feito por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/FID) com coluna DB-FFAP 30m x 0,25 mm x 0,25 µm. A composição de ácidos graxos foi obtida por transmetilação com trifluoreto de boro hexano e identificada por meio de tempo de retenção cromatográfico contra uma solução de padrão FAME (C4 – C24, 189-19-AMP, Sigma-Aldrich) em equipamento Clarus 680 (Perkin Elmer, USA). A temperatura do injetor foi 250 °C e o detector com temperatura de 280 °C. A temperatura do forno foi programada para aumentar 25 °C min<sup>-1</sup> até 194 °C, mantida por 1 minuto, posteriormente aumentou 5 °C min<sup>-1</sup> até o valor de 235 °C onde se manteve por mais 1 minuto. As injeções foram realizadas no volume de 1 µL, no modo split (1:50), em duplicata de análise. As áreas dos picos cromatográficos foram determinadas utilizando o software Clarus Chromatography para normalização do percentual das áreas de ácidos graxos totais, segundo método proposto por Souza et al. (2020).

#### *Análises de dados*

As representações gráficas foram realizadas no software Igor Pro versão 5.4. A análise estatística (ANOVA *one-way*) foi realizada no software Minitab versão 17.

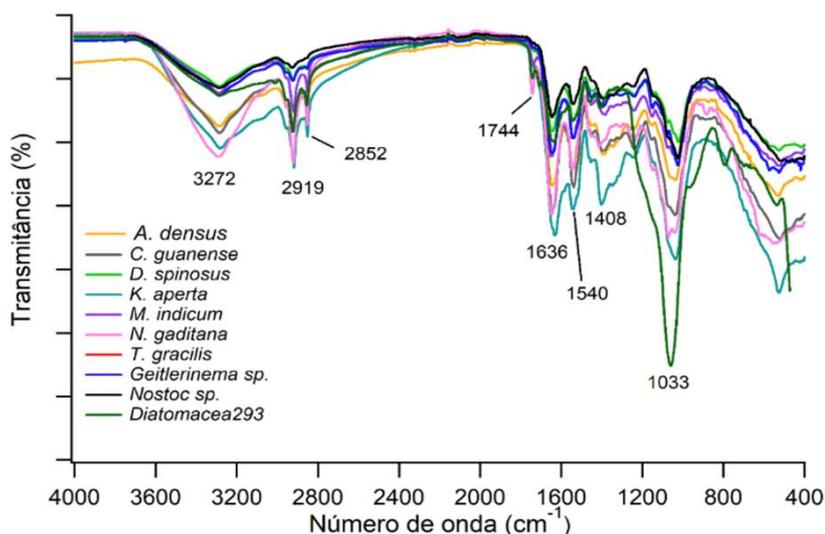
## RESULTADOS

O espectro FTIR da biomassa resultante dos cultivos é apresentado na Figura 1. Bandas de absorção na faixa de número de onda 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>, que correspondem à carboidratos, proteínas e lipídios foram detectadas. De modo geral, observamos um padrão similar para todas as espécies analisadas, mas com intensidades diferentes. A região de 3272 cm<sup>-1</sup> do espectro corresponde a grupos de proteínas (ligações N – H) e água (ligações O – H) e estão presentes em todas as amostras. Na região de 3000 a 2800 cm<sup>-1</sup> observamos trechos assimétricos e simétricos de hidrocarbonetos, correspondente às ligações CH<sub>2</sub>, denotando lipídios. As bandas 2919 e 2852 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) referem-se aos grupos metileno de lipídios e ácidos graxos, que foram evidenciadas nas espécies *N. gaditana*, *K. aperta*, *M. indicum*, *C. guanense* e *A. densus*. A banda 1744 cm<sup>-1</sup> (C = O de ésteres) está relacionada à carbonila de ésteres de ácidos graxos, principalmente de triacilglicerídeos e, neste caso, a banda foi mais pronunciada para *N. gaditana*.

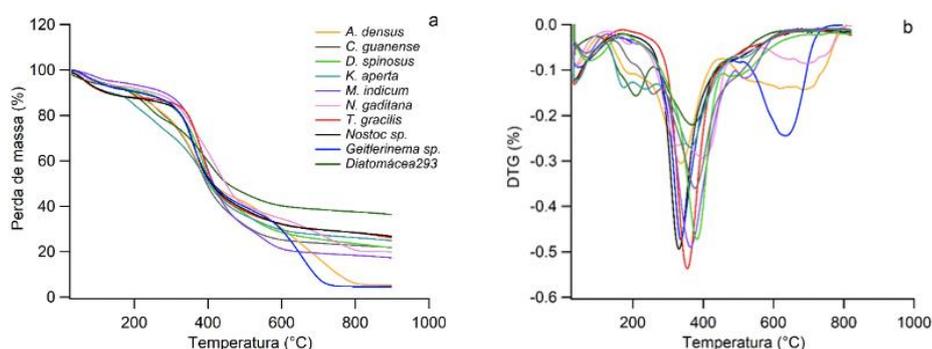
Seguindo o espectro, duas bandas características dos grupos amida em cadeias proteicas, amida I em 1636, relacionando às ligações C=O e amida II em 1540  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a vibração C – N, são evidenciadas nas microalgas *K. aperta*, *N. gaditana* e *A. densus*. A banda 1408  $\text{cm}^{-1}$  (C – O), que representa ácido carboxílico, foi destaque para *K. aperta*, *C. guanense* e *A. densus*. A região de 1200 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às ligações C – O – C, C – O e P=O e está relacionada a trechos de polissacarídeos, trechos de fosfolipídios e ácidos nucleicos, sendo evidente para todas as espécies, mas bem caracterizada na *Diatomácea CCMA-UFSCar293*, *K. aperta*, *N. gaditana*, *C. guanense*, *A. densus* e *Geitlerinema* sp. A predominância da banda 1033  $\text{cm}^{-1}$  para a *Diatomácea CCMA-UFSCar293* se atribui à sílica.

A curva termogravimétrica (TG) e sua derivada (DTG) obtidas para as biomassas algais são mostradas na Figura 2. De forma geral, as curvas TG apresentaram 3 estágios para praticamente todas as espécies. O primeiro estágio foi da temperatura ambiente até 300 °C, o segundo estágio de 300 a 600 °C e o último estágio de 600 a 900 °C. A microalga *A. densus* e a cianobactéria *Geitlerinema* sp. foram as espécies que tiveram a decomposição da biomassa mais rápida em função da temperatura, apresentando perda de 95%, enquanto a *Diatomácea CCMAUFSCar-293* foi a espécie que apresentou a decomposição mais lenta, apresentando cerca de 64% de perda. Para as outras espécies, a perda de biomassa foi de 80%.

A derivada da curva de TG (Fig. 2b) apresentou três eventos de perda de massa para a maioria das microalgas, exceto em *A. densus*, *Geitlerinema* sp. e *N. gaditana*, em que 4 desses eventos foram registrados conforme aumento de temperatura. O primeiro evento ocorreu entre 100 e 250 °C, o segundo entre 300 e 400 °C e o terceiro evento, presente no intervalo de 600 a 800 °C. No segundo evento ocorreu a maior perda de massa, com decomposição térmica de cerca de 70% da massa da maioria das espécies, exceto para *N. gaditana*, *K. aperta* e *Diatomácea CCMAUFSCar-293*, que diferentemente das outras espécies, tiveram uma parcela significativa de decomposição no terceiro evento.



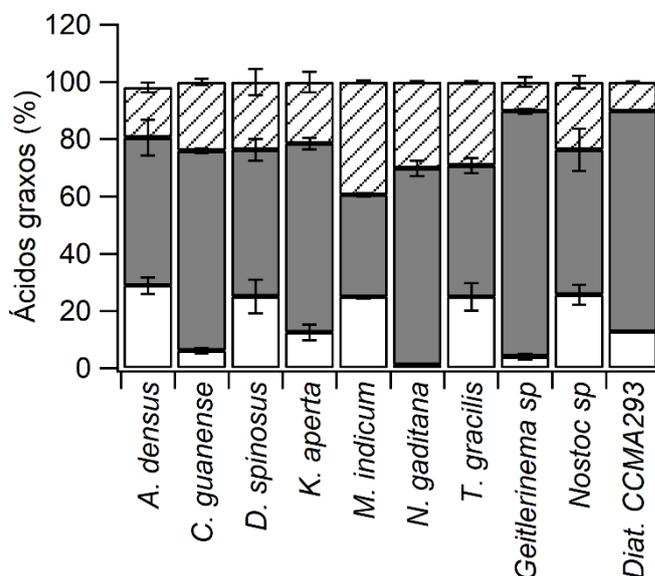
**Figura 1.** Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das espécies de microalgas e cianobactéria cultivadas em fotobiorreator cilíndrico.



**Figura 2.** Comportamento térmico das biomassas, curvas de TG - termogravimétrica (a) e DTG – derivada da TG (b) das espécies microalgais e cianobactérias cultivadas em fotobiorreator cilíndrico com injeção de CO<sub>2</sub>.

A Figura 3 mostra a composição dos ácidos graxos presentes nas microalgas. Os dominantes foram os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) que variaram de 35% a 87%, já os ácidos graxos saturados (SFA) variaram de 1,00 a 29%, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de 10 a ~ 40%. Entre as espécies, a microalga *M. indicum* apresentou a maior concentração de PUFA ( $39,45 \pm 0,51\%$ ), *Geitlerinema* sp. a maior concentração de MUFA ( $85,74 \pm 2,02\%$ ) e *A. densus* foi a que mais sintetizou SFA ( $64,61 \pm 16,21\%$ ). Além disso, *Geitlerinema* sp. e *DiatomáceaUFSCar-293* foram as espécies que sintetizaram menos PUFA, cerca de 10% cada microalga, seguido por *K. aperta* ( $21,55 \pm 3,63\%$ ). As espécies *M. indicum* ( $35,60 \pm 0,60\%$ ) e *T. gracilis* ( $45,79 \pm$

2,66%) foram as que sintetizaram menos MUFA, enquanto *N. gaditana* ( $1,25 \pm 0,34\%$ ) e *C. guanense* ( $6,12\% \pm 0,98$ ) sintetizaram menos ácidos graxos saturados.



**Figura 3.** Porcentagem de ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) das microalgas. Barras brancas: SFA; barras cinzas: MUFA e barras listradas: PUFA. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

Na Tabela 1 apresenta-se o perfil dos ácidos graxos das espécies de microalgas e cianobactérias. De maneira geral, todas as espécies apresentaram ampla variedade e concentrações de ácidos graxos. Os ácidos miristoleico (C14:1 $\omega$ 5), palmitoléico (C16:1 $\omega$ 7), linolelaídico (C18:2 $\omega$ 6t) e  $\gamma$ -linolênico (C18:3 $\omega$ 6) foram observados para todas as espécies estudadas, sendo o palmitoléico o majoritário para as espécies Diatomácea *UFSCar-293* (75,40%), *C. guanense* (66,59%), *K. aperta* (64,31%), *A. densus* *Geitlerinema sp.* (62,69%) e *N. gaditana* (59,55%) e o ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9), o minoritário, presente apenas em *T. gracilis* (12,59%). A síntese de ácido linolelaídico (C18:2 $\omega$ 6t) destacou-se nas espécies *M. indicum* (23,34%), *T. gracilis* (16,65%), *K. aperta* (14,63%) e *D. spinosus* (12,12%). O ácido araquídico (C20:0) foi destaque em *Nostoc sp.* (25,63%), *A. densus* (19,43%), *T. gracilis* (19,24%), *D. spinosus* (17,71%) e *M. indicum* (19,55%). A maior síntese de ácido  $\gamma$ -linoleico (C18:3 $\omega$ 6) foi observada para *M. indicum* (15,31%). Algumas espécies destacaram-se na síntese de ácido araquidônico

(C20:0), *Nostoc* sp (25%), *A. densus* (19%), *M. indicum* (19%) e *D. spinosus* (17%). Enquanto, a maior concentração de ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5 $\omega$ 3) foi observada em *N. gaditana* (15,84%).

**Tabela 1.** Composição de ácidos graxos das microalgas e cianobactérias (%) cultivadas em fotobiorreator. Abreviações: PUFA, ácidos graxos poliinsaturados; MUFA, ácidos graxos monoinsaturados; SFA, ácidos graxos saturados.

Ácidos graxos	<i>Espécies microalgais</i>									
	<i>A. densus</i>	<i>C. guanense</i>	<i>D. spinosus</i>	<i>K. aperta</i>	<i>M. indicum</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>Geitlerinema</i> sp.	<i>Nostoc</i> sp	<i>Diatomacea</i>
C14:0	4,57 (0,39)	6,12 (0,16)	1,88 (0,46)	1,61 (0,00)	1,43 (0,02)	0,93 (0,00)	3,35 (0,59)	1,20 (0,20)	-	2,38 (0,02)
C14:1 $\omega$ 5	2,44 (0,21)	3,20 (0,021)	0,98 (0,34)	1,58 (0,11)	0,86 (0,03)	9,06 (0,12)	4,62 (1,56)	23,04 (0,32)	2,51 (0,53)	1,58 (0,01)
C16:0	1,90 (0,16)	-	0,46 (0,08)	-	2,32 (0,06)	0,31 (0,00)	-	1,98 (0,01)	-	0,91 (0,01)
C16:1 $\omega$ 7	49,22 (5,52)	66,59 (0,47)	50,30 (2,66)	63,31 (1,66)	34,73 (0,24)	59,55 (0,04)	28,57 (0,42)	62,69 (0,54)	48,19 (6,21)	75,40 (0,00)
C18:0	4,89 (0,42)	-	4,94 (0,18)	2,58 (0,11)	1,63 (0,08)	-	2,39 (0,94)	0,88 (0,20)	-	9,00 (0,06)
C18:1 $\omega$ 9c	-	-	-	-	-	-	12,59 (0,87)	-	-	-
C18:2 $\omega$ 6c	0,65 (0,05)	1,63 (0,13)	0,93 (0,23)	-	-	0,41 (0,03)	3,13 (0,11)	2,31 (0,20)	-	2,10 (0,10)
C18:2 $\omega$ 6t	8,24 (0,71)	7,15 (0,65)	12,12 (2,34)	14,63 (1,03)	23,34 (0,13)	9,09 (0,06)	16,65 (0,25)	4,40 (0,83)	9,32 (0,96)	5,38 (0,03)
C18:3 $\omega$ 6	8,61 (0,74)	3,48 (0,05)	10,64 (1,61)	6,91 (0,13)	15,31 (0,29)	4,78 (0,05)	9,42 (0,08)	3,45 (0,80)	14,33 (1,19)	2,75 (0,02)
C20:0	19,43 (1,7)	-	17,71 (3,41)	8,35 (0,67)	19,55 (0,21)	-	19,24 (1,23)	-	25,63 (3,55)	-
C20:5 $\omega$ 3 (EPA)	-	11,79 (0,13)	-	-	0,79 (0,01)	15,84 (0,24)	-	-	-	-
C22:6 $\omega$ 3 (DHA)	-	-	-	7,8 (2,48)	0,95 (0,06)	-	-	-	-	1,56 (0,00)
PUFA	17,51 (1,65)	24,07 (1,04)	23,69 (4,52)	21,55 (3,63)	39,45 (0,51)	30,13 (0,38)	29,21 (0,45)	10,18 (1,65)	23,65 (2,15)	10,25 (0,12)
MUFA	51,66 (6,30)	69,79 (0,86)	51,29 (3,71)	65,89 (2,02)	24,94 (0,60)	68,61 (0,11)	45,79 (2,66)	85,74 (0,80)	50,71 (7,31)	76,99 (0,16)
SFA	28,90 (2,87)	6,12 (0,98)	25,00 (5,93)	12,55 (2,74)	35,60 (0,49)	1,25 (0,34)	24,99 (4,83)	4,076 (1,01)	25,63 (3,55)	12,73 (0,25)

## DISCUSSÃO

Os resultados relativos à análise FTIR para as espécies deste estudo vão de encontro ao que foi observado por GRACE et al. (2020) que obtiveram os mesmos grupos funcionais de moléculas para *Monoraphidium contortum*, *Pseudomuriella* sp. e *Chlamydomonas* sp. Algas verdes, diatomáceas e cianobactérias possuem composição química distinta. Normalmente, as algas verdes têm um teor relativamente alto de amido e celulose (paredes celulares e produtos de armazenamento de energia) detectadas em bandas de  $\sim 1200$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , as diatomáceas têm uma absorção distinta de silicato na amplitude de  $\sim 1100\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 800\text{ cm}^{-1}$  devido à frústula de sílica (parede celular) (MURDOCK; WETZEL, 2009). Os espectros FTIR de cianobactérias são dominados por proteínas e lipídios com carboidratos menos abundantes em relação às algas verdes (BENNING et al., 2004). No entanto, as proporções desses compostos podem variar substancialmente entre as espécies dentro de um mesmo grupo e com a disponibilidade de nutrientes (GIORDANO et al., 2001), neste trabalho, as algas verdes se destacaram para todos os grupos de moléculas.

Apesar das curvas FTIR das microalgas serem similares, a intensidade das bandas variou entre as espécies, e isso pode estar associado ao metabolismo celular de cada espécie e ao acúmulo de moléculas durante o cultivo (GRACE et al., 2020). A análise de FTIR destacou que *N. gaditana* é uma espécie promissora para a produção de lipídios, principalmente de TAGs, já que apresentou a banda mais intensa na região dessa molécula. Esse resultado está de acordo com ZHANG et al. (2021), que observaram para *N. oceânica* banda de absorção que representam triglicerídeos. O destaque de *K. aperta* para a região de bandas de absorção de grupos de carboidratos é corroborado pela síntese de mucilagem, característica da espécie. Isso indica que essa cepa pode ser aplicada para a produção de bioetanol.

As curvas de termogravimetria (TG e DTG) apresentaram 3 estágios comum para a maioria das espécies; a DTG salienta os eventos térmicos registrados pela curva TG. A primeira perda refere-se à desidratação de água das células e água externa limitada pela tensão superficial. Em seguida, no estágio 2, ocorre a liberação da maioria das substâncias orgânicas, incluindo proteínas, carboidratos e lipídios. A terceira e última

perda de massa se deve principalmente à decomposição lenta de materiais carbonáceos no resíduo sólido. Os três estágios observados para as espécies estudadas estão de acordo com o que foi observado por RIZZO et al. (2013). Esses autores viram que para *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp. o primeiro estágio aconteceu até 100 °C, o segundo para *Chlorella* sp. ocorreu entre 400 e 650 °C, enquanto para *Nannochloropsis* sp. foi de 400 a 700 °C e o terceiro de 650 a 800 °C. A faixa de temperatura onde ocorreu a maior perda de biomassa está de acordo com MATA et al. (2020), que observaram que *Spirulina* sp. apresentou 3 estágios e a maior decomposição ocorreu entre 331 e 341 °C. Além disso, similar ao que foi observado para *Geitlerinema* sp. (neste estudo) que apresentou um pico de decomposição em 630 °C, diferentemente das outras espécies estudadas, esses mesmos autores observaram que *Spirulina* sp. apresentou um pico em 609 °C. Rossi et al. (2018) detectou um único evento de perda de massa entre 700 e 800 °C em *Chlorella vulgaris* com cerca de 60% de cinzas (conteúdo inorgânico na biomassa algal). Sabe-se que quanto menor for a temperatura de pirólise, tanto mais facilmente a reação de pirólise pode ocorrer (CHAIWONG et al., 2013). Como a maior perda de massa ocorreu em temperatura relativamente baixa, as espécies estudadas seriam indicadas para o processo de pirolise.

A menor perda de massa (e maior resíduo de cinzas) foi observado para a diatomácea, o que pode estar relacionado à sílica da parede celular. Com o objetivo de remoção da frústula da diatomácea *Pinnularia* sp., Van Eynde et al. (2014) concluíram que a frústula de sílica é responsável por quase metade do peso da célula.

A análise do perfil de ácidos graxos mostrou uma dominância dos ácidos C16 e C18 para todas as espécies estudadas, com predomínio dos MUFA, o que está de acordo com LEE et al. (2010), SAHU et al. (2013) e parcialmente com os resultados de Chia et al. (2013). Sahu et al. (2013) encontraram uma concentração de ácidos graxos similar ao apresentado neste trabalho, mas para cultivos com 14 a 20 dias, possivelmente com células já fora da exponencial de crescimento. Sabe-se que em células em fase estacionária ou por algum motivo estressadas há uma redução de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e aumento de SFA e MUFA, como demonstrado em Chia et al. (2013). Neste estudo, as 12 espécies apresentaram maior concentração de MUFA (22 a 83%), seguido de SAFA (9 a 49%) e PUFA (7 a 28%). De acordo com Borowitzka (1988), os SFA e MUFA compreendem a fração lipídica de armazenamento, enquanto PUFA compreendem em grande parte a fração lipídica estrutural. Explicamos que nossas amostras para ácidos graxos foram obtidas no décimo dia de cultivo e, mesmo que ainda

não houvesse manifestação de fase estacionária (ver Figura 1a, capítulo 2), poderia estar havendo algum tipo de limitação nutricional (concentração de nutrientes não foi mantida constante, apenas intensidade de luz e pH). Isso pode ter sinalizado para as células maior produção de lipídios de reserva. Análises de lipidômica e transcriptômica seriam capazes de confirmar (ou não) essa hipótese e, assim fica aqui a sugestão de, para estudos futuros, utilizar-se da ferramenta *ômica* para detalhamento do metabolismo lipídico.

Pensando na aplicação desses compostos no setor energético, como a produção de biodiesel, as microalgas com alto teor de SFAs e MUFAs são as mais promissoras para a produção deste biocombustível (MALTSEV; MALTSEVA, 2021) e nesse caso, a microalga *A. densus* e *D. spinosus* poderiam ser indicadas para essa finalidade. De acordo com a literatura (Lombardi e Wangersky 1991; Chia et al., 2013), as classes de reserva, como triacilgliceróis, MUFA e SFA, podem ser aumentadas mediante estresse algal.

O perfil de ácidos graxos apresentado para as Chlorophyta estudadas está de acordo com o que foi observado por Nascimento et al. (2013). Os autores observaram que as algas *A. falcatus*, *A. fusiformis*, *K. lunaris* e *D. brasiliensis* apresentaram ácidos graxos similares aos observados para as espécies de mesmo gênero deste estudo. Esses autores relataram que o ácido palmítico (C16:0) foi predominante para essas espécies, no entanto, nossos resultados mostraram que o ácido palmitoleico (C16:1  $\omega$ 7) foi o mais presente para *A. densus*, *K. aperta* e *D. spinosus*.

A concentração do ácido palmitoleico (C16:1 $\omega$ 7) foi predominante para as cianobactérias *Geitlerinema* sp. (62%) e *Nostoc* sp. (48%). Gong; Miao (2019) observaram que a cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7942 sintetizou 38%; Gugger et al. (2002) relataram que 25% dos ácidos graxos de *Nostoc* sp estavam relacionados ao ácido palmitoléico (C16:1 $\omega$ 7).

O ácido palmitoleico é um dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), que recebeu crescente interesse devido ao seu valor na dieta, como nutracêuticos, e também na indústria farmacêutica (WU; LI; HILDEBRAND, 2012). Estudos indicam que o ácido palmitoleico apresenta inúmeros benefícios, como aumento da fluidez da membrana celular, redução da inflamação, proteção do sistema cardiovascular e inibição da oncogênese (MAEDLER et al., 2003; MOZAFFARIAN et al., 2010; WELTERS et al., 2006). Além das funções biológicas, de acordo com suas propriedades de cadeia média de carbono e uma dupla ligação, esse ácido graxo também apresenta fluidez a baixa temperatura e boa estabilidade oxidativa, o que o torna atrativo na produção de biodiesel (WU; LI; HILDEBRAND, 2012).

O ácido araquídico (C20:0), observado para algumas espécies deste trabalho, foi observado por Shanmugam et al. (2020) para *Scenedesmus* sp. na concentração de 31,72%.

O ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3 $\omega$ 6) tem atraído a atenção devido às suas propriedades anti-inflamatórias e, por isso, servindo como auxiliar no tratamento de diversas doenças (SERGEANT; RAHBAR; CHILTON, 2016). A microalga *M. indicum*, com 15% de concentração do ácido  $\gamma$ -linolênico, mostra-se uma espécie promissora para sua produção. A cianobactéria *Spirulina* sp. é considerada uma fonte de C18:3 $\omega$ 6, e apresenta de 12 a 29% de ácido  $\gamma$ -linolênico, dependendo da condição de cultivo (MÜHLING; BELAY; WHITTON, 2005). Os ácidos graxos da *Diatomácea* CCMA-UFSCar293, estão de acordo com os observados por Dunstan et al. (1993) e Pasquet et al. (2014) que estudaram 14 espécies de diatomáceas e *Odontella aurita*, respectivamente. No entanto, diferente desses autores não observamos a presença de ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5 $\omega$ 3) para a diatomácea estudada. EPA (15%) foi observado em *N. gaditana*, o que está de acordo com Figueiredo et al. (2019). Várias espécies de *Nannochloropsis* são comumente usadas como organismos alimentares de alta qualidade devido ao seu alto teor de EPA (MA et al., 2016).

As microalgas que sintetizam lipídios em grandes quantidades são consideradas uma matéria-prima natural promissora para a produção de biocombustíveis de terceira geração (CHISTI, 2007), produção de alimentos e como suplemento alimentar, rações para aquicultura, produtos farmacêuticos e cosméticos (BOROWITZKA, 2013; PULZ; GROSS, 2004). Em muitos aspectos, o uso direcionado de lipídios sintetizados por microalgas é determinado pela composição dos ácidos graxos que os formam. Entre todos os ácidos graxos presentes nas microalgas, alguns das famílias ômega -3 ( $\omega$ 3) e ômega-6 ( $\omega$ 6) são de particular interesse, principalmente, devido aos seus benefícios para a saúde humana, com atividade anti-inflamatória, atuando na prevenção de doenças cardiovasculares e promovendo a saúde do cérebro e da visão (MALTSEV; MALTSEVA, 2021), e nesse sentido, foram destaques a microalga *M. indicum* e *N. gaditana*.

## CONCLUSÕES

A análise de FTIR e perfil de ácidos graxos mostraram que *N. gaditana* produz lipídios que podem ter alto interesse comercial, enquanto *K. aperta* destacou-se na produção de carboidratos. A microalga *N. gaditana* se destacou pela produção de EPA e *M. indicum* pela presença de ácido  $\gamma$ -linoleico. Ácidos graxos importantes como DHA, EPA, e ácidos do grupo dos  $\omega$ 3 foram detectados em maior ou menor quantidade nas microalgas investigadas.

#### 4. Capítulo 3- O uso de diferentes qualidades de luz e cobre para o aumento de biocompostos na microalga *Kirchneriella aperta*

##### RESUMO

As microalgas têm sido utilizadas comercialmente como matéria-prima para a produção de compostos de alto valor em diversos setores industriais. Estratégias que envolvem a manipulação de parâmetros físico-químicos têm sido propostas como meio para promover alterações na composição bioquímica da biomassa de algas. O cultivo em diferentes qualidades de luz e mudanças nutricionais fazem parte dessas estratégias. Neste estudo buscou-se avaliar os efeitos do cobre e de diferentes qualidades de luz (LED azul e vermelho), de forma isolada e em combinação com o cobre, na fisiologia e síntese de compostos bioativos em *Kirchneriella aperta*. A alga foi cultivada em fotobiorreator com iluminação interna e exposta à uma concentração de cobre livre ( $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ), à luz azul e vermelha e a  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  em combinação com luz azul e  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  com luz vermelha e ao controle (luz branca sem alterar a concentração de cobre). Durante os experimentos foram avaliadas as taxas de crescimento, produção de biomassa, pigmentos (clorofila *a* e carotenoides totais), biomoléculas (carboidratos, proteínas, lipídios) e atividade antioxidante. Os resultados mostraram que não houve diferença na taxa de crescimento nos diferentes tratamentos. O maior rendimento de biomassa seca ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) foi obtido no tratamento com luz azul. A concentração de clorofila *a* foi maior na luz azul (aumento de 3 vezes em relação ao controle), no entanto, os carotenoides totais não diferiram entre os tratamentos. A produtividade específica de proteínas totais aumentou 43% no tratamento  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul, já os carboidratos aumentaram 87% sob a concentração de  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ . Enquanto, a atividade antioxidante aumentou sob luz vermelha, já a maior concentração de lipídios (21% peso seco) foi obtida no tratamento com cobre. Em relação aos parâmetros fotossintéticos, apesar de  $F_v/F_m$  mostrar que os cultivos estavam saudáveis, as curvas rápidas de luz e seus parâmetros mostram mudanças significativas no aparato fotossintético. A escolha do tratamento para a manipulação bioquímica em *K. aperta*, depende da molécula de interesse, visto que todos os tratamentos proporcionaram uma alteração nas moléculas, exceto para carotenoides.

Palavras-chave: Luz azul, Luz vermelha, proteínas, atividade antioxidantes, manipulação bioquímica

## INTRODUÇÃO

As microalgas reagem às mudanças do ambiente externo alterando compostos celulares que resultam de uma tentativa de se proteger e/ou se aclimatar às mudanças. Assim, modificações nas condições de cultivo podem estimular a biossíntese de compostos intracelulares específicos. O estresse abiótico, como qualidade (cor) da luz, mostrou influenciar tanto o crescimento quanto a bioquímica das microalgas (SCHULZE et al., 2014) e tem sido proposto como um meio de manipulação de biomassa para aumento de compostos específicos (CHEN et al., 2017; MARKOU; NERANTZIS, 2013).

Os diodos emissores de luz (LEDs) podem ser usados para a produção de microalgas (OLLE; VIRŠILE, 2013). Os LEDs são fontes de luz artificial de longa duração (50.000 h) que emitem luz quase monocromática em vários comprimentos de onda (OLLE; VIRŠILE, 2013). Portanto, os LEDs também podem ser aplicados para ajustar a composição bioquímica da biomassa de microalgas por meio de comprimentos de onda específicos em diferentes intensidades ou frequências de luz (ZHAO et al., 2013) e.g., cor da luz de exposição.

As algas podem capturar fótons em vários comprimentos de onda, para azul e vermelho. De acordo com Keeling (2013), as microalgas crescem melhor sob luz vermelha (660 nm) ou azul (420-470 nm). Foi demonstrado que em muitas microalgas, a luz vermelha induz altas taxas de crescimento e células menores, acelerando o ciclo celular (BLANKEN et al., 2013), enquanto a luz azul influencia a expressão gênica e várias vias metabólicas (RUYTERS, 1984).

De forma análoga ao estresse físico efetuado por diferentes cores e/ou intensidades de luz, estressores químicos como metais (por exemplo o micronutriente cobre) podem ser usados para manipulação bioquímica em microalgas (CHIA; LOMBARDI; MELÃO, 2013; EINICKER-LAMAS et al., 2002; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018b).

Em concentrações acima das usualmente requeridas, o micronutriente cobre pode induzir o aumento da concentração de lipídios, proteínas e carboidratos em algumas microalgas, mas dependendo da concentração dos íons, o aumento de biomoléculas ocorre em detrimento da taxa de crescimento (GUSCHINA; HARWOOD, 2006; MARKOU; NERANTZIS, 2013; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018).

O processo de manipulação bioquímica envolvendo metais deve considerar que o elemento escolhido pode ser tóxico e, portanto, prejudicial à alga e ao meio ambiente. Por

isso, mantê-lo o mais baixo possível na tecnologia de manipulação é fundamental. Chia et al. (2015) mostraram que a combinação de baixo teor de nitrato ou fosfato e cádmio podem atuar sinergicamente e favorecer grande acúmulo de biomoléculas, chegando a atingir a concentração de 300 vezes mais do que as amostras controle. Boussiba; Vonshak (1991); Lamers et al. (2010) mostraram que a combinação de estresses, incluindo a exposição ao cobre mesmo em concentrações ambientalmente relevantes, e cores claras de luz podem intensificar substancialmente o acúmulo intracelular de biomoléculas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do cobre e diferentes qualidades de luz, LED azul e LED vermelho, isolados e em combinação com o metal cobre na fisiologia e produção de algumas biomoléculas na microalga Chlorophyta *Kirchneriella aperta*. Analisamos as taxas de crescimento, produção de biomassa seca, pigmentos (clorofila *a* e carotenoides totais), biomoléculas (carboidratos e proteínas), atividade antioxidante e os parâmetros fotossintéticos (rendimento quântico máximo e efetivo, dissipação da fluorescência, curva de luz e seus parâmetros).

A microalga *Kirchneriella aperta* foi selecionada para o estudo da manipulação bioquímica devido à sua maior atividade antioxidante, maior teor de carboidratos, maior produtividade proteica e maior taxa de biofixação de carbono em relação às demais espécies. Esta escolha teve como base os resultados do capítulo 1.

## MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Kirchneriella aperta* foi cultivada em meio BG-11 autoclavado, em fotobiorreator cilíndrico modelo *air-lift*, sob intensidade luminosa de 200  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As culturas foram mantidas em pH 6,8 - 7,0 por borbulhamento automático de  $\text{CO}_2$  (15% v/v) em mistura com argônio (85% v/v), em 25 °C  $\pm$  1 com fotoperíodo 12:12 h claro/escuro.

### *Manipulação*

A manipulação bioquímica consistiu em expor a microalga para uma concentração de cobre (previamente definida) e diferentes cores de luz na intensidade luminosa de 200  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A concentração de cobre livre selecionada ( $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi

definida após experimento preliminar em que *K. aperta* foi exposta a 7 concentrações de cobre nominal, variando de  $8 \times 10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Os íons de cobre-livre foram determinados de acordo com a metodologia descrita em Lombardi et al. (2007).

Com duração de 8 dias, o experimento constou de 5 tratamentos além do controle. O controle constou de culturas expostas à luz de LED branca e concentração de cobre original presente no meio BG11. Os tratamentos da manipulação constaram de culturas expostas às condições descritas a seguir e foram feitos com 3 réplicas experimentais.

- Controle: luz de LED branca (cobre original BG-11)
- luz de LED azul 445 nm (cobre original BG-11)
- luz de LED vermelha 652 nm (cobre original BG-11)
- concentração de cobre livre  $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> com luz de LED branca
- concentração de cobre livre  $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> com luz de LED azul
- concentração de cobre livre  $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> com luz de LED vermelha

#### *Crescimento e determinação da biomassa seca*

As culturas foram monitoradas diariamente por contagem de células por meio de um citômetro de fluxo (MUSE®, Millipore - EUA). As taxas de crescimento foram determinadas por regressão linear do logaritmo natural das células mL<sup>-1</sup> *versus* tempo (dias) na fase de crescimento exponencial. A regressão linear e a confecção dos gráficos foram realizadas no software Igor Pro (Wavemetrics, EUA).

Para a determinação da biomassa seca, alíquotas de 5mL das amostras foram filtradas em filtro de acetato de celulose previamente pesados em balança microanalítica com precisão de 1 µg (Metler Toledo - Suíça).

#### *Composição bioquímica e atividade antioxidante*

Amostras dos cultivos em fase exponencial foram coletadas para a determinação das concentrações intracelulares totais de carboidratos, proteínas, clorofila *a*, carotenoides, lipídios.

Todos os parâmetros de fisiologia e composição bioquímica seguiram as mesmas metodologias apresentadas no capítulo 1, exceto para a determinação de proteínas que

seguiu o protocolo estabelecido por Slocombe et al. (2013) modificado (10% TCA a 95 °C, junto com extração subsequente com o reagente Lowry D a 80 °C por 60 min.). Este método tem como base o uso de ácido tricloroacético 10% como extrator e o reagente Lowry D para determinação e quantificação do conteúdo proteico. As proteínas totais foram determinadas em função de uma curva de calibração feita com padrão de albumina bovina.

Lipídios totais foram determinados por gravimetria. Para tanto, 50 mL de cultura foram filtrados em filtros de fibra de vidro previamente calcinados a 400 °C por 8 h. Os filtros foram mantidos em frascos de vidro contendo 2 mL de clorofórmio e mantidos em ultrafreezer -80 °C até o momento da análise. A extração de lipídios foi realizada usando o método de Folch modificado, em que se usou clorofórmio:metanol (2:1) como descrito em Parrish (1999). O extrato foi concentrado em rotaevaporador (IKA- Alemanha). Para quantificação uma alíquota do extrato (400 µL) foi colocada em um cadinho de alumínio previamente calcinado e evaporado sob nitrogênio, e pesado em balança analítica (Mettler Toledo, 1 µg precisão). Após o processo de secagem da amostra, o cadinho foi novamente pesado e a diferença entre as massas dos cadinhos foi relacionado com o peso seco da biomassa. Os dados são reportados em porcentagem de lipídios na biomassa seca (% DW).

A produtividade das biomoléculas foi quantificada multiplicando a concentração de cada biomolécula pela taxa de crescimento.

No último dia de cultivo, fase estacionária de crescimento, amostras foram centrifugadas e liofilizadas, produzindo assim biomassa seca. Esta foi usada para fazer extratos em etanol 70% que por sua vez foi usado para a determinação do potencial antioxidante por meio do ensaio DPPH.

#### *Parâmetros fotossintéticos*

A atividade fotossintética de *K. aperta* foi analisada por meio do rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e efetivo ( $\Phi'_M$ ), dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica da fluorescência (NPQ), além de curva rápida de luz (RLC) usando-se um equipamento PhytoPAM (Heinz Walz, Alemanha). O ajuste matemático da RLC foi feito de acordo com Platt; Gallegos; Harrison (1980) para obter o valor da inclinação inicial das curvas ( $\alpha$ ), onde apenas a luz é um fator limitante da fotossíntese, a taxa máxima (relativa) de

transporte de elétrons (maxETR). As equações usadas para os cálculos dos parâmetros fotossintéticos são descritas a seguir.

$$\Phi_M = (F_M - F_o) / F_M \quad (1)$$

$$\Phi'_M = (F'_M - F'_s) / F'_M \quad (2)$$

$$qP = (F'_M - F'_s) / (F'_M - F'_o) \quad (3)$$

$$NPQ = [F_M - F'_M] / F'_M \quad (4)$$

$$E_k = ETR_{max} / \alpha \quad (5)$$

Onde,  $F_M$ : Fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro;  $F_o$ : fluorescência inicial de adaptação ao escuro;  $F'_M$ : fluorescência máxima adaptada ao claro;  $F'_o$ : é o rendimento mínimo de fluorescência da clorofila na presença de centros de reação abertos do fotossistema II.

#### *Análise de dados*

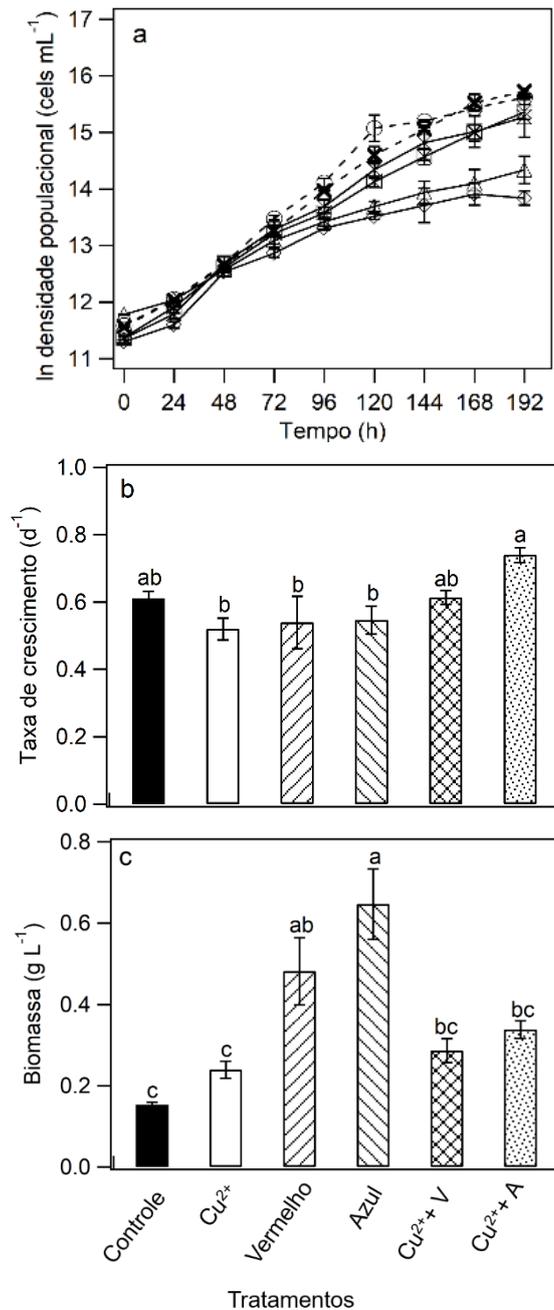
O programa IGOR Pro 5.04 foi utilizado para a preparação dos gráficos e para o ajuste da RLC. As análises estatísticas (ANOVA *Two-way*) foram realizadas usando o Minitab 17.

## RESULTADOS

Os parâmetros de crescimento obtidos para os diferentes tratamentos são mostrados na Figura 1. Em (a), o logaritmo natural (ln) da densidade populacional (célula  $\text{mL}^{-1}$ ), em (b), as taxas de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) e em (c), a biomassa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ).

As curvas de crescimento mostraram uma maior densidade final nos tratamentos luz azul e luz vermelha e quando houve combinação do cobre com as diferentes qualidades de luz, em comparação ao controle (Fig. 1a). A taxa de crescimento calculada para a fase exponencial (24 até 72 h) manteve-se constante independente do tratamento

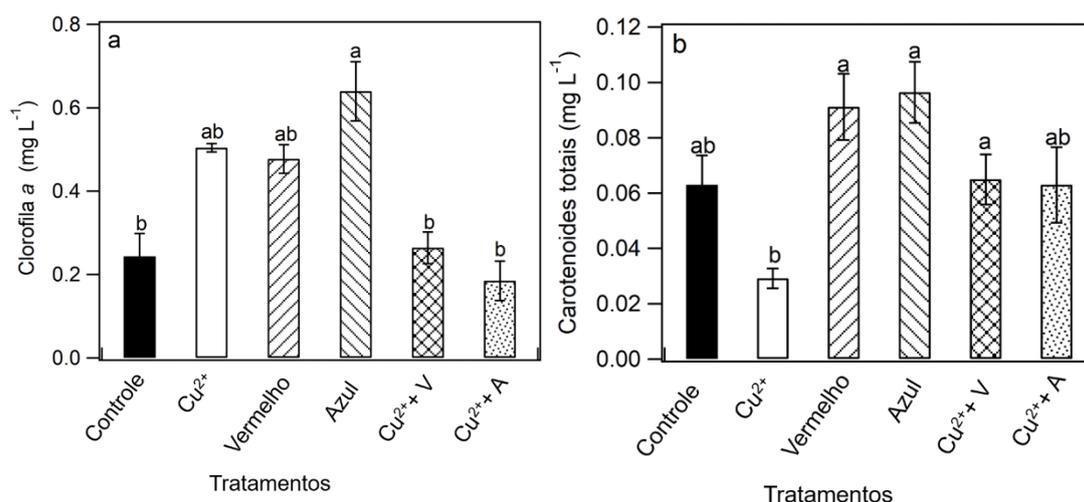
( $p > 0,05$ , Fig. 1b), no entanto, houve uma redução aparente da densidade populacional a partir de 120 h de cultivo nos tratamentos com luz branca (controle e com  $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> cobre). Isso fica claro conforme analisamos a Figura 1c. O rendimento de biomassa seca no tratamento com LED azul ( $0,6$  g L<sup>-1</sup>) foi 3 vezes maior em relação ao controle ( $p < 0,05$ , Fig. 1c).



**Figura 1.** Parâmetros de crescimento. (a) Ln de densidade celular (cel. mL<sup>-1</sup>) em função do tempo experimental (h); (b) taxa de crescimento (d<sup>-1</sup>) e (c) biomassa

seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) para os diferentes tratamentos. Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; círculo aberto e linha tracejada: luz azul; cruz e linha tracejada: luz vermelha; ampulheta aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul; gravata aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha. Barra preta: controle; barra branca:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  com luz vermelha; barra com pontos:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

Os resultados relacionados à síntese de pigmentos para cada tratamento são mostrados na Figura 2, que apresenta os dados de concentração de clorofila *a* ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e de carotenoides totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Observamos que a concentração de clorofila *a* (Fig. 2a) aumentou 200% sob luz azul em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A concentração de carotenoides totais não diferiu do controle ( $p > 0,05$ ; Fig. 2b).



**Figura 2.** Composição dos pigmentos. (a) Clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); (b) Carotenoides totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para cada tratamento. Barra preta: controle; barra branca:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  com luz vermelha; barra com pontos:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

As concentrações de proteínas totais, carboidratos totais, suas produtividades, a atividade antioxidante e lipídios totais de *K. aperta* estão descritas na Tabela 1. Nessa Tabela não é apresentada a produtividade lipídica pois os resultados dessa biomolécula são apresentados como % em base biomassa seca (% DW).

Observamos que não houve diferença significativa na síntese de proteínas totais em relação ao controle ( $p>0,05$ ). No entanto, a maior produtividade específica foi observada para o tratamento em que houve a combinação do cobre com a luz azul ( $p<0,05$ ), sendo 43% maior do que controle.

A maior concentração de carboidratos totais ( $5,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi observada no tratamento apenas com cobre adicional. *K. aperta* sintetizou 87% mais carboidratos que o tratamento controle ( $p<0,05$ ), o que se relaciona com a produtividade específica, que foi a maior nesse mesmo tratamento ( $p<0,05$ ). Os outros tratamentos não diferiram do controle em relação à síntese e produtividade específica de carboidratos totais ( $p>0,05$ ).

Em relação à atividade antioxidante da biomassa algal, o tratamento com a luz vermelha foi o que mais apresentou atividade antioxidante (59%), sendo 40% maior que o controle (42%) ( $p<0,05$ ). Os outros tratamentos apresentaram atividade similar ao controle ( $p>0,05$ ).

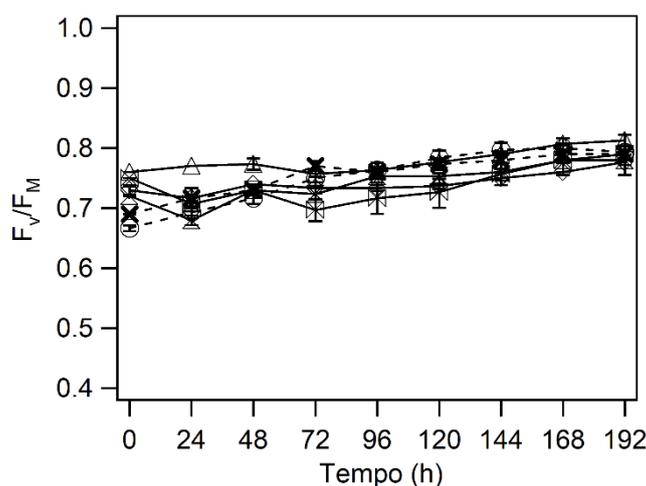
O aumento da concentração de cobre estimulou a síntese de lipídios em comparação ao controle ( $p<0,05$ ). A biomassa apresentou 21% de lipídios enquanto o controle 7%, um aumento de 200%. Os outros tratamentos apresentaram concentração de 9 a 15% de lipídios, não diferindo do controle ( $p>0,05$ ).

**Tabela 1** – Biomoléculas em *K. aperta* para os diferentes tratamentos em 48 h de exposição. Proteínas e Carboidratos totais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), produtividade específica de proteínas e carboidratos ( $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), potencial antioxidante (DPPH, %) e lipídios totais (%).  $\text{Cu}^{2+}$ : concentração de cobre  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ . Os números entre parênteses indicam o desvio padrão da média (n=3).

Tratamentos	Proteínas	Produtividade Proteínas	Carboidratos	Produtividade Carboidratos	DPPH	Lipídios
Controle	17.73 (0.32) <sup>abc</sup>	10.81 (0.66) <sup>bc</sup>	2.70 (0.14) <sup>b</sup>	1.65 (0.08) <sup>b</sup>	42 (0.46) <sup>b</sup>	7 (1,30) <sup>c</sup>
$3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$	17.63 (0.46) <sup>abc</sup>	9.16 (0.50) <sup>bcd</sup>	5.06 (0.60) <sup>a</sup>	2.65 (0.48) <sup>a</sup>	51 (3.5) <sup>ab</sup>	21(1,91) <sup>a</sup>
Luz vermelha	16.26 (1.20) <sup>bc</sup>	8.74 (1.01) <sup>cd</sup>	2.95 (0.075) <sup>b</sup>	1.60 (0.18) <sup>b</sup>	59 (6.2) <sup>a</sup>	15 (4,17) <sup>ab</sup>
Luz azul	13.74 (1.53) <sup>c</sup>	7.56 (1.35) <sup>d</sup>	3.35 (0.45) <sup>b</sup>	1.82 (0.20) <sup>b</sup>	53 (1.5) <sup>ab</sup>	11 (0,43) <sup>bc</sup>
Luz vermelha com $\text{Cu}^{2+}$	18.11 (0.49) <sup>ab</sup>	11.07 (1.37) <sup>b</sup>	2.78 (0.28) <sup>b</sup>	1.78 (0.13) <sup>b</sup>	48 (1.5) <sup>ab</sup>	10 (0,97) <sup>bc</sup>
Luz azul com $\text{Cu}^{2+}$	21.00 (0.98) <sup>a</sup>	15.50 (0.72) <sup>a</sup>	3.20 (0.11) <sup>b</sup>	2.40 (0.18) <sup>ab</sup>	47 (2.8) <sup>b</sup>	9 (0,80) <sup>bc</sup>

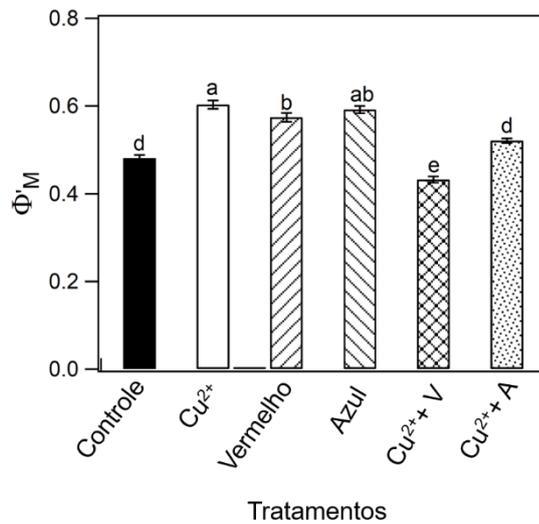
### Parâmetros fotossintéticos

O rendimento quântico máximo é mostrado na Figura 3 em função do tempo experimental. Este parâmetro variou de ~ 0,7 a 0,8, sem diferença entre os tratamentos, condição de células saudáveis.



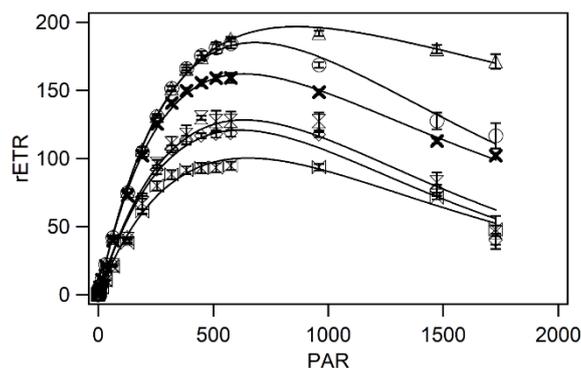
**Figura 3.** Rendimento quântico fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) em unidades de fluorescência relativa (R.U.) em função do tempo experimental. Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; círculo aberto e linha tracejada: luz azul; cruz e linha tracejada: luz vermelha; ampulheta aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul; gravata aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

A Figura 4 reporta os rendimentos quânticos efetivo do PSII ( $\Phi'_M$ ) para células em crescimento exponencial para cada tratamento. A combinação de luz vermelha com  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre apresentou o menor  $\Phi'_M$  (0,43) em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ), enquanto o tratamento com  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre (luz branca) apresentou o maior  $\Phi'_M$  (0,60) ( $p < 0,05$ ). Apesar das diferenças observadas nos  $\Phi'_M$ , a dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Os valores de qP foram ~1,0 e de NPQ ~0,2.



**Figura 4.** Rendimento quântico efetivo ( $\Phi_M$ ) do PSII para cada tratamento. Barra preta: controle; barra branca:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  com luz vermelha; barra com pontos:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

As curvas rápidas de luz (RLC) representadas pelo rETR *versus* radiação fotossinteticamente ativa (PAR) são mostradas na Figura 5. A taxa de transporte de elétrons (rETR) foi mais elevada no tratamento  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  de cobre no meio (luz branca). Observamos para os tratamentos com luz azul e luz vermelha, sem adição extra de cobre, que acima de  $500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  há uma tendência de redução na taxa de transporte de elétrons (rETR) em *K. aperta*. Para os tratamentos combinados luz azul e adição de cobre, e luz vermelha com adição de cobre houve um declínio da rETR quando comparada com os outros tratamentos, a menor rETR foi reportada no tratamento cobre com luz vermelha. Isso mostra um efeito negativo sobre a fotossíntese mediante a interação dos fatores qualidade de luz e cobre.



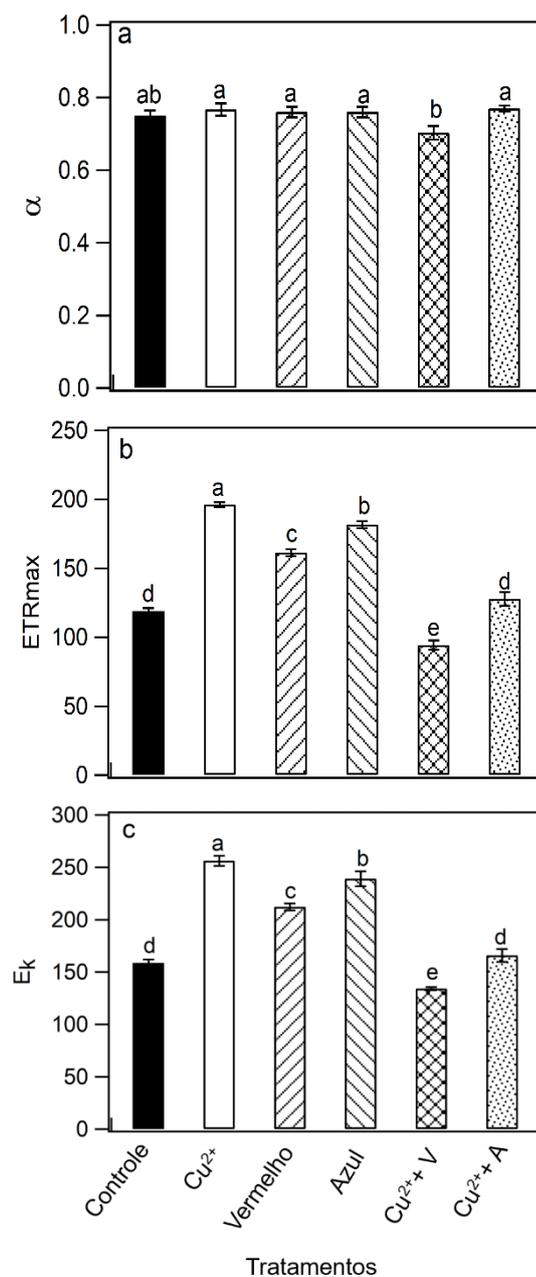
**Figura 5.** Curvas rápidas de luz (RLC) em culturas de fase exponencial representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Símbolos: losango aberto: controle; triângulo aberto:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; círculo aberto: luz azul; cruz: luz vermelha; ampulheta aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul; gravata aberta:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

Os parâmetros da curva de luz são destacados na Figura 6. O coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ), na Fig. 6a mostra que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). A eficiência de absorção de luz, que é dada pelo coeficiente  $\alpha$  da RLC, manteve-se em torno de 80%.

A taxa máxima de transporte de elétrons (ETRmax) e a irradiância saturante ( $E_k$ ) são reportadas nas Figuras 6b e 6c, respectivamente. Para os tratamentos testados, observamos que quando *K. aperta* foi cultivada com o aumento de cobre no meio e exposta à luz vermelha simultaneamente apresentou a menor ETRmax,  $94 \mu\text{mol}$  elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o menor valor de  $E_k$ ,  $134 \mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, os tratamentos em que houve adição de cobre no meio ( $196 \mu\text{mol}$  elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $256 \mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), luz azul ( $239 \mu\text{mol}$  elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $181 \mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e luz vermelha ( $161 \mu\text{mol}$  elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $212 \mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tiveram aumento desses parâmetros em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O cobre promoveu o aumento de 64% na ETRmax, enquanto a luz azul 52 e vermelha 32%. Para a irradiância saturante o aumento foi de 62% quando houve adição de cobre, e de 51% para a luz azul e 34% para a luz vermelha.

Quando exposta ao cobre com luz azul, *K. aperta* não apresentou mudanças nas taxas de transporte elétrons e na irradiância saturante em comparação ao controle ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6.** Parâmetros fotossintéticos obtidos após o ajuste RLC de acordo com Platt et al. (1980) para os diferentes tratamentos. (a)  $\alpha$  (mg C. mg Chl  $a^{-1}$  [ $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]), (b)  $E_k$  ( $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (c) rETRmax ( $\mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Barra preta: controle; barra branca:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ; barra listras na diagonal esquerda: luz vermelha; barra listras na diagonal direita: luz azul; barra listras cruzadas:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz vermelha; barra com pontos:  $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  com luz azul. As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

## DISCUSSÃO

As diferentes cores de luz LED foram capazes de alterar algumas respostas fisiológicas de *K. aperta*. O estímulo no crescimento da microalga quando exposta à luz de LED vermelha e azul em comparação com a luz branca concorda com a literatura. Baba et al. (2012) reportaram que *Botryococcus braunii* atingiu alta densidade celular quando exposta ao LED azul em comparação com LED vermelho e verde. Em culturas de *Nannochloropsis* sp., a exposição ao LED azul resultou em melhor crescimento em comparação aos espectros vermelho e branco (Das et al., 2011). Kim et al. (2014) reportou que *Chlorella vulgaris* apresentou a maior densidade celular sob luz vermelha.

O comportamento de crescimento populacional em função da qualidade de luz irradiada parece ser espécie-específico, e isso pode estar relacionado aos diferentes mecanismos intracelulares de captação de luz dos organismos fotossintéticos. Isso permite a tais organismos utilizar apenas certos comprimentos de onda ou uma faixa específica de comprimentos de onda, mesmo dentro da região PAR (BAER et al., 2016; VADIVELLOO et al., 2015). Assim, os comprimentos de onda emitidos pela luz azul e luz vermelha podem ser mais eficientes para o cultivo de microalgas (CHOI et al., 2015), o que é corroborado pelos resultados desta pesquisa.

O maior rendimento de biomassa seca observada para *K. aperta* sob luz azul está de acordo com Yuan et al. (2020). Cultivando *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis oculata* em diferentes qualidades de luz, esses autores obtiveram os maiores rendimentos de biomassa na luz azul. No entanto, o nosso resultado difere no quesito exposição à luz azul, mas concorda quanto à luz vermelha em relação àquilo que foi apresentado por Wang; Fu; Liu (2007), que estudaram o crescimento de *Spirulina platensis* submetida à várias cores de LEDs. Os autores encontraram maior produtividade de biomassa seca sob luz vermelha, em comparação com as luzes verde, azul, amarela e branca. Similar ao nosso estudo, Yan et al. (2013) observaram que quando exposta à luz vermelha *Chlorella vulgaris* apresentou o maior rendimento de biomassa em comparação com outras qualidades de luz. Segundo a literatura, o crescimento sob luz azul dá-se por estímulo na divisão celular e aumento de velocidade do ciclo celular, resultando em células menores (RUYTERS, 1984). Entretanto, ao analisarmos o volume celular médio fornecido pelo citômetro *Muse* não observamos qualquer alteração nas culturas sob luz azul em comparação com os outros tratamentos. Quanto à luz vermelha, a literatura propõe que

sob esse comprimento de onda ocorre o aumento da divisão celular e o acúmulo de carboidratos, devido a maior absorção de energia (AGUILERA et al., 2000).

Os pigmentos clorofila *a* e carotenoides foram influenciados pelas cores de luz e pelo cobre, mas não pela combinação desses fatores. Destacou-se a luz azul quanto ao aumento da concentração de clorofila *a* em *K. aperta*, resultado que é corroborado por McGee et al. (2020). Esses autores observaram aumento de 2 vezes no teor de clorofila *a* para *K. aperta* quando cultivada sob luz azul ( $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Para *K. aperta*, deste estudo, o aumento foi de 3 vezes. Yuan et al. (2020) observaram que *Chlorella* sp. sintetizou a maior concentração de clorofila *a* quando exposta à luz azul. Esses autores associaram o aumento a uma possível fotoaclimatação cromática.

Nesta pesquisa, a presença do cobre ( $3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) levou a uma diminuição da concentração de carotenoides, e diferentemente do que é reportado na literatura quanto à influência das cores de luz, não observamos aumento na concentração de carotenoides totais. No entanto, tem sido sugerido que a luz desempenha um papel fundamental na biossíntese de carotenoides levando ao seu aumento (LAMERS et al., 2010). Esse aumento pode estar relacionado à maior energia oriunda da luz azul, que pode estimular mecanismos de fotoproteção celular. De acordo com Minhas et al. (2016), o aumento da intensidade e qualidade da luz pode trazer mudanças significativas na composição química das microalgas levando ao aumento da produção de carotenoides. Além disso, segundo Schulze et al. (2014), a luz azul, provavelmente via fotorreceptores como as fototropinas, parece induzir o acúmulo de pigmento. Quanto à luz vermelha, o acúmulo de carotenoides em luz vermelha pode estar relacionado aos fótons da luz vermelha que regulam positivamente a biossíntese e acúmulo subsequente de carotenoides através de um aumento no pool de antioxidantes para reduzir a taxa de formação de espécies reativas de oxigênio (HARVEY; BEN-AMOTZ, 2020).

Ao contrário do que foi observado por Bossuyt; Janssen (2004) para *Pseudokirchneriella subcapitata*, não observamos estímulo na síntese de carotenoides em função da concentração de cobre testada. No entanto, nossos resultados estão de acordo com o que foi observado por Baracho et al. (2019) para *Chlorolobion braunii*, que mostraram não haver aumento desse pigmento em função do cobre no meio de cultura. O aumento da concentração de carotenoides na presença de exposição o cobre poderia ocorrer caso a concentração do metal tivesse ocasionado estresse oxidativo na microalga (MALLICK, 2004). Considerando que usamos uma concentração ambiental do metal, que não alterou a taxa de crescimento e nem tampouco a concentração de clorofila *a*,

confirmamos que a microalga se encontrava em condição de saúde celular, não de estresse induzido pelo metal.

Em relação às proteínas totais, nossos resultados estão de acordo com o observado por Abiusi et al. (2014); Vadiveloo et al. (2015); Yuan et al. (2020). Esses autores mostraram não haver diferença nas concentrações de proteínas quando as microalgas *T. suecica*; *Nannochloropsis* sp; *Chlorella* e *N. oculata*, respectivamente, foram expostas à diferentes espectros de luzes.

O tratamento cobre com a luz azul aumentou a produtividade de proteínas totais. A literatura reporta aumento dessa biomolécula quando as concentrações de cobre são elevadas. Como foi reportado por Sabatini et al. (2009); eles viram que quando *Scenedesmus vacuolatus* foi exposta a uma concentração de  $4 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, houve um aumento de 3 vezes em relação ao controle. Silva; Echeveste; Lombardi (2018) reportaram aumento de ~4 vezes no teor de proteínas em *Scenedesmus quadricauda* quando as células foram expostas a uma concentração de cobre acima de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. No entanto, a concentração de cobre usada neste trabalho foi  $3 \times 10^{-9}$  mol L e, de modo isolado, não houve aumento de proteínas.

Atribuímos o aumento da produtividade dessa biomolécula à interação dos fatores (cobre e luz). Podemos pensar que, pelo fato da concentração de cobre ser em nível ambiental e não ter afetado a taxa de crescimento, o aumento de proteínas obtido na combinação do cobre com luz azul pode ser devido às proteínas constitutivas e não proteínas ligadoras de metal, como por exemplo as fitoquelatinas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Ao combinar cádmio, na concentração  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e  $2,9 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> nitrogênio (N) Chia et al. (2015) obtiveram aumento de 4,6 vezes na concentração de proteínas para *C. vulgaris*, mas diferentemente deste estudo, os autores obtiveram redução na taxa de crescimento e, por isso não consideraram como aumento de proteínas constitutivas e sim ligadoras de metal.

O aumento de carboidratos com o aumento de cobre no meio, observado para *K. aperta*, está de acordo com o reportado na literatura para outras espécies de microalgas (ALHO et al., 2020; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018). O aumento dessa biomolécula pode estar relacionado com mecanismos de defesa. *K. aperta* é circundada por uma cápsula de mucilagem de exopolissacarídeos que se ligam a íons metálicos, dentre eles o cobre (LOMBARDI; VIEIRA; SARTORI 2002). Isso pode promover a redução de dos íons na forma livre e, conseqüentemente, a toxicidade. Mesmo em concentração baixa, o metal ( $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> cobre livre) pode ter estimulado a síntese da

biomolécula. Aoyagi (2021) obteve resultado similar ao investigar *K. contorta* submetida aos efeitos do cobre e cores de luz azul e vermelha.

O acúmulo de lipídios em *K. aperta* foi influenciado pela presença do cobre, mas não por sua interação com a luz, qualquer que tenha sido a cor usada. Nossos resultados, que mostraram 200% no aumento lipídios, e vão de encontro aos obtidos por Baracho et al. (2019). Os autores reportaram aumento de 364% de lipídios na concentração  $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  ( $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) para *C. braunii*. Entretanto, em concentração de cobre 5 mil vezes maior, Yang et al. (2015) relataram um aumento de lipídios de apenas 18% para *C. minutissima* UTEX2341. A literatura relata que o cobre pode aumentar a concentração de lipídios nas células microalgais devido a possíveis estresses oxidativos causados pelo metal, mas este aumento varia com a concentração do metal e com a espécie algal (ALHO et al., 2020; CHIA et al., 2015; SABATINI et al., 2009; SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018). No caso de aumento de biomoléculas por estresse induzido pelo metal, normalmente observa-se redução da taxa de crescimento (CHIA et al., 2015), mas quando o aumento se dá por estímulo como no presente estudo e em Aoyagi (2021), a taxa de crescimento é mantida.

Diferentemente do que tem sido relatado na literatura (ATTA et al., 2013; YUAN et al., 2020), a concentração de lipídios não aumentou em *K. aperta* quando foi cultivada sob diferentes qualidades de luz. O acúmulo de lipídios tende a acontecer sob condições ambientais extremas, principalmente quando se trata de estresse físico, tal qual o induzido por cor ou intensidade de luz (HE et al., 2015; SHU et al., 2012). Sob condições favoráveis de crescimento, as microalgas produzem quantidade limitada de lipídios e carboidratos (BEHERA et al., 2021) para a manutenção da sua homeostase. Os resultados obtidos sugerem que até 48 h de cultivo as luzes vermelha e azul não foram estressantes ao ponto de aumentar a síntese lipídica de *K. aperta*.

O potencial antioxidante em *K. aperta* foi estimulado pela luz vermelha após 192 h de cultivo, sugerindo algum estresse celular, o que é corroborado por Amaro et al. (2020). Esses autores observaram aumento da atividade antioxidante de *Scenedesmus obliquus* M2-1 quando foi exposta à luz vermelha e na combinação 50% luz azul e 50% luz vermelha. Os autores associaram o aumento a possíveis estresses ocasionados pela luz. Pagels et al. (2020) investigaram *Cyanobium* sp. e observaram que a maior atividade antioxidante ocorreu sob a suplementação de luz vermelha. Esse aumento de atividade antioxidante foi relacionado pelos autores ao sistema de defesa antioxidante não enzimático da cianobactéria. De acordo com Danouche et al. (2020), o aumento da

capacidade antioxidante pode estar relacionado ao aumento da atividade de componentes biológicos envolvidos nos mecanismos de defesa contra os radicais livres oxidativos. No caso deste estudo, o aumento da atividade biológica pode estar relacionado à intensa síntese de mucilagem durante o cultivo na luz vermelha.

Em relação aos parâmetros fotossintéticos,  $F_v/F_m$  é uma estimativa da eficiência de conversão fotoquímica de PSII e valores mais altos indicam maior eficiência de utilização de luz. Os tratamentos experimentais não ocasionaram efeitos negativos ou positivos sobre esse parâmetro, que também não variou com o tempo experimental. Esses resultados são corroborados pela eficiência de absorção de luz ( $\alpha$ ), que também foi constante, cerca de 70%, para todos os tratamentos. De acordo com Lombardi; Maldonado (2011) valores na faixa de 0,7 a 0,8 podem ser indicativos de que as células algais encontram-se em situação saudável de crescimento.

O rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi'_M$ ), que indica a proporção de energia absorvida usada em reações fotoquímicas e  $ETR_{max}$  foram maiores nos tratamentos isolados,  $3 \times 10^{-9}$  mol  $L^{-1}$  cobre, luz azul e luz vermelha. Sabe-se que o cobre é um microelemento essencial para a fotossíntese, pois é um importante constituinte da plastocianina, carreador móvel que transporta elétrons do PSII para o PSI (DROPPA; HORVÁTH, 1990). O aumento do  $\Phi'_M$  e da taxa de transporte de elétrons pode estar relacionado à regulação da plastocianina. De acordo com Hippmann et al. (2017) seu acúmulo é regulado pela concentração de  $Cu^{2+}$  no meio, de modo que baixas concentrações do metal tendem a reduzir suas concentrações, assim afetando a ETR. Nesse sentido, podemos inferir que a concentração  $3 \times 10^{-9}$  mol  $L^{-1}$   $Cu^{2+}$  contribuiu com o funcionamento pleno da plastocianina e dessa forma a ETR não foi afetada. O fato de a ETR no tratamento com cobre ter sido maior que a ETR do controle pode sugerir que o meio BG-11 seria ainda melhor se contivesse em sua composição um pouco mais de cobre. Isso pode, de fato, ocorrer devido à alta concentração de EDTA ( $1,89 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ ) presente nesse meio de cultura, deixando apenas uma pequena fração do cobre adicionado na forma livre ( $\sim 10^{-13}$  mol  $L^{-1}$  cobre livre – Aoyagi, 2021), que pode ser usado pelas microalgas.

O aumento do rendimento efetivo, e conseqüentemente da  $ETR_{max}$ , em *K. aperta* sob luz azul está de acordo com o que foi observado por Yuan et al. (2020). Esses autores reportaram que a rETR (equivalente à  $ETR_{max}$  desta pesquisa) de *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis oculata* foram maiores quando cultivadas sob luz azul em comparação

com outros espectros de luz testados (verde, branco e vermelho). Segundo Teo et al. (2014) aumento de ETR pode ocorrer por aumento da atividade da enzima Rubisco, que em nosso experimento teria sido ocasionada pelos fótons da luz azul e da luz vermelha. Por serem comprimentos de onda específicos e de alta absorção pela clorofila, isso resulta em maior estímulo das reações fotossintéticas na cadeia de transferência de elétrons e um aumento na atividade fotossintética, representada pela ETR<sub>max</sub> e pelo  $\Phi'_M$ . Isso pode acontecer porque a luz azul ou vermelha ativa o PSII das células de microalgas de forma mais eficaz quando comparado com outros espectros (YUAN et al., 2020). Ainda, de acordo com Abomohra et al. (2019) a luz vermelha é absorvida de forma mais eficiente pelas moléculas de clorofilas *a* em comparação com outros espectros de luz.

Os valores de  $E_k$  são comumente usados como indicador do estado de fotoaclimação de microalgas (SERÔDIO et al., 2005). A variação observada para os valores de  $E_k$ , que acompanhou os de ETR<sub>max</sub> e manutenção do  $\alpha$ , indicam que as células adaptaram-se às condições de cultivo, quais sejam, cobre, luz azul e luz vermelha. A variação do  $E_k$  ocorre para que as células possam manter um equilíbrio entre a captura de energia fotossintética e a capacidade do sistema fotossintético em processar essa energia (FALKOWSKI; RAVEN, 1997).

## CONCLUSÕES

Do presente estudo, concluímos que para *Kirchneriella aperta* a luz azul promoveu maior rendimento de biomassa seca, clorofila *a* e produtividade específica de proteínas, enquanto a luz vermelha aumentou a atividade antioxidante. O cobre, na concentração de  $3 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>, estimulou a síntese de carboidratos e de lipídios.

De todos os tratamentos, o maior rendimento de biomassa algal foi obtido na luz azul, seguido pela luz vermelha, mesmo a taxa de crescimento em fase exponencial tendo sido similar em todos os tratamentos.

Em relação aos parâmetros fotossintéticos, os tratamentos isolados, cobre, luz azul e luz vermelha em geral, aumentaram a taxa de transporte de elétrons máxima e a irradiância saturante, além do rendimento quântico efetivo. A eficiência de absorção de luz e eficiência de conversão da energia fotossintética, que juntos são representados pelo coeficiente de inclinação da RLC ( $\alpha$ ) manteve-se constante independente das condições às quais *K. aperta* foi submetida.

Finalizamos que as estratégias de manipulação bioquímica em microalgas, como estímulo por metais e/ou qualidades de luz juntamente com a compreensão das respostas fisiológicas e bioquímicas podem ser usadas para redirecionar o metabolismo com foco na produção de biocompostos de interesse.

## 5. Capítulo 4- Cultivo de *Chlorella fusca* em escala ampliada: caracterização fotossintética e bioquímica.

### RESUMO

As microalgas, que geralmente são cultivadas em biorreatores, podem sintetizar biomoléculas de alto valor agregado para diversos setores produtivos. Para poder aumentar a biomassa e a produção de compostos bioativos em fotobiorreatores é necessário entender e aumentar a eficiência fotossintética e absorção de luz em microalgas. Nosso objetivo foi avaliar a fotofisiologia e a composição bioquímica de *Chlorella fusca* cultivada em reator tipo *raceway* de 250 L montado em casa de vegetação. O cultivo, em meio BBM, durou 120 h e a atividade fotossintética foi monitorada continuamente em condições de casa de vegetação (irradiância natural), bem como por medidas discretas a cada 24 h em laboratório tendo luz vermelha como luz actínica. Os teores de proteínas, carboidratos, lipídios, carotenoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante foram medidos a cada 24 horas. Os resultados mostraram que o rendimento de biomassa algal foi de 0,45 g L<sup>-1</sup> em 120 h. A taxa de transporte de elétrons (ETR) aumentou até 48 h, mas diminuiu drasticamente após 72 h. Não foram encontradas correlações entre a capacidade fotossintética das células com base na ETR relativa estimada sem o uso do coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ) e biocompostos. No entanto, quando a ETR foi calculada considerando o coeficiente de absorção que aumentou com o tempo de cultivo, a fotossíntese foi positivamente correlacionada com densidade celular, biomassa, biocompostos e atividade antioxidante. O monitoramento contínuo da fotossíntese no *raceway* mostrou que os valores máximos de ETR, por volume, sob radiação solar são maiores (10-160  $\mu\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ) do que sob condições de laboratório em laboratório (5-45  $\mu\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ). Considerando o acúmulo de biomoléculas, o maior teor de proteínas, carboidratos e lipídios foi encontrado na fase estacionária. Os carotenoides totais aumentaram ~3 vezes na fase estacionária, uma condição em que a clorofila *a* diminuiu. Além disso, os compostos fenólicos e a atividade antioxidante foram correlacionados positivamente e apresentaram alto rendimento com aumento de 200% em relação ao primeiro dia de cultivo. Demonstramos a importância de considerar a absorção de luz para expressar a capacidade fotossintética. Nossos resultados mostraram que *C. fusca* pode produzir em curto prazo compostos bioativos interessantes como polifenóis, proteínas e lipídios diretamente correlacionados às condições fotossintéticas.

Palavras-chave: Compostos bioativos; Cultivo larga escala; Biotecnologia; Microalga

## INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos promissores para a produção de biocompostos com diversas propriedades. O gênero *Chlorella* (Chlorophyta) é excepcional porque além de sua robustez, apresenta alta taxa fotossintética e produtividade de biomassa. Seu uso para alimentos, rações, cosméticos, biocombustíveis, bioenergia e bioprodutos já foi proposto (ASHOKKUMAR; RENGASAMY, 2012; DEMIRBAS, 2011; MASOJÍDEK et al., 2011).

A biomassa de microalgas é rica em proteínas, minerais, pigmentos, enzimas, açúcares, lipídios com ácidos graxos valiosos, esteróis, vitaminas ( $\beta$ -caroteno, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, biotina, ácido fólico) antioxidantes e compostos fenólicos (ARIEDE et al., 2017; OLAIZOLA, 2000). Todas essas características metabólicas desempenham um papel crescente como fonte biotecnológica de produtos farmacêuticos e cosméticos (moléculas bioativas com novos modos de ação), nutracêuticos (alimentos funcionais, probióticos, antioxidantes) e biocombustíveis (NIEMCZYK et al., 2018).

As microalgas são conhecidas por terem alta eficiência fotossintética, crescimento rápido e tolerância a condições ambientais variadas (MUJTABA et al., 2012). A medição do desempenho fotossintético de microalgas é de grande importância e permite a compreensão detalhada da produção de biomassa em microalgas. Nesse contexto, a fluorometria modulada em amplitude de pulso (PAM) é uma técnica bem estabelecida para esse fim (SCHREIBER, 2007; SURESH KUMAR et al., 2014). Com base na fluorescência variável da clorofila *a in vivo* emitida principalmente pelo fotossistema II (PSII), a fluorometria PAM é um método rápido, sensível e não invasivo de detecção fisiológica de células (CAMARGO et al., 2021; LOMBARDI; MALDONADO, 2011).

A capacidade fotossintética é estimada a partir da fluorescência da clorofila *a in vivo* como taxa de transporte de elétrons (ETR). Na literatura, pode ser expresso como taxa de transporte relativa (rETR) sem a consideração da absorção de luz ou como taxa absoluta de transporte de elétrons (aETR) ou simplesmente ETR. Anteriormente, havia sido documentado que tanto em microalgas quanto em macroalgas, que seria importante expressar a taxa de transporte de elétrons usando o coeficiente de absorção de luz (FIGUEROA; CONDE-ÁLVAREZ; GÓMEZ, 2003; JEREZ et al., 2016a) para relacionar ao carbono assimilado (KROMKAMP et al., 2008; KROMKAMP; FORSTER, 2003) e a produtividade de biomassa (JEREZ et al., 2016b). Neste estudo, comparamos a

rETR quanto para aETR para inferir sobre o melhor estimador de capacidade fotossintética. Também comparamos a ETR sob condição *ex situ* (medições dentro do laboratório) com a medição discreta sob condição de laboratório usando luz artificial com a ETR medida na cultura *in situ* (casa de vegetação ou campo) (FIGUEROA et al., 2021; JEREZ et al., 2016b).

Utilizamos a microalga *Chlorella fusca* (Chlorophyta), um gênero de particular interesse em biotecnologia, pois sua biomassa possui alto teor de proteína com excelentes proporções de aminoácidos essenciais e compostos bioativos (BASHAN et al., 2016; KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015), além de sua robustez relacionada ao sucesso de cultivo do gênero em fotobiorreatores abertos como *thin-layer* e tanques *raceway* (JEREZ et al., 2016b; MASOJÍDEK et al., 2011, 2021). Na produção em larga escala é necessário conseguir biomassa suficiente tanto para obter biomoléculas úteis quanto para obter ótimo custo/benefício para o sistema de produção (ARIEDE et al., 2017).

Biorreatores tipo *raceway* são utilizados para tal finalidade devido ao seu baixo custo (PULZ; GROSS, 2004), porém não são os melhores produtores de biomassa. Assim, aumentar sua produtividade de biomassa é essencial. Isso exige melhoria na eficiência fotossintética e absorção de luz. Neste estudo, discutimos e comparamos medidas relacionadas à fotossíntese (rendimento fotossintético e ETR) da cultura, em tempo real, com dados de laboratório para culturas de *Chlorella fusca*. Além disso, o rendimento de biomassa, parâmetros fotossintéticos, pigmentos, lipídios, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e atividade antioxidante foram analisados durante o crescimento das algas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Condições de cultura*

A microalga *Chlorella fusca* (BEA1005B, da Coleção Espanhola de Algas — BEA) foi mantida na unidade de cultura do laboratório de Fotobiologia e Biotecnologia de Organismos Aquáticos (Universidade de Málaga, Espanha).

A manutenção da cultura foi realizada em Meio Basal de Bold (BBM) (BOLD, 1949; BISCHOFF; BOLD 1963) modificado pela adição de 3 vezes mais  $\text{NaNO}_3$  do que a composição original. No laboratório, as culturas foram cultivadas em frascos de vidro de 10 L (Nalgene, EUA) contendo 10 L de meio de cultura. A cultura foi mantida sob  $150 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , e ciclo claro/escuro (12:12 h) e com borbulhamento de ar. A cultura em fase exponencial de crescimento foi transferida para um frasco, na casa de vegetação, com 60 L de meio e dele para um reator tipo *raceway* com capacidade de 780 L contendo 250 L de meio de cultura. As células foram inoculadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Os experimentos foram conduzidos por 120 h em casa de vegetação.

### *Crescimento e determinação de biomassa*

As culturas foram monitoradas diariamente por contagens de células (célula  $\text{mL}^{-1}$ ) em câmara de contagem de células Neubauer sob microscópio óptico (Lecia CME). A taxa de crescimento foi determinada por regressão linear do logaritmo natural da densidade celular *versus* tempo (dias) para o crescimento exponencial fase, com a inclinação correspondente à taxa de crescimento específica. Todos os cálculos matemáticos e plotagem dos dados foram realizados usando o software Igor Pro (Wavemetrics, EUA).

A determinação do peso seco foi feita imediatamente após a inoculação (0 h), às 24 h, às 72 h e na fase de crescimento estacionário (120 h). A produtividade da biomassa foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Produtividade da Biomassa} = \frac{B_f - B_i}{t_f - t_i} \quad (1)$$

Onde,  $B_f$  e  $B_i$  significam biomassa final e inicial, respectivamente;  $t_f$  e  $t_i$  correspondem ao tempo final e inicial, respectivamente.

### *Determinação da fotossíntese usando fluorescência da clorofila a in vivo*

A secção transversal de absorção espectral de Chl *in vivo* das células de microalgas foi medida de acordo com Shibata et al. (1954) por um espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu UV-2600) utilizando cubetas de 1 cm em meio BBM fresco para obter uma densidade óptica entre 0,1 e 0,8. Para minimizar o impacto do efeito de dispersão da luz das superfícies das células das algas, a cubeta foi colocada perto da janela do detector do fotomultiplicador e um difusor de luz foi colocado entre ela e a cubeta. As seções transversais de absorção específica da suspensão [ $a(\lambda)$ ,  $\text{m}^{-1}$ ] foram calculadas a partir das medições de absorção espectral (400-750 nm) de acordo com a seguinte equação.

$$a(\lambda) = 2.303 \times \text{OD}(\lambda) \times 100 \quad (2)$$

O rendimento quântico máximo (Fv/Fm) foi determinado de acordo com SCHREIBER; SCHLIWA; BILGER (1986) usando o fluorômetro Mini-PAM (Walz GmbH, Alemanha). Uma alíquota de 3 mL foi retirada das culturas e exposição a 15 min para aclimação ao escuro; curvas rápidas de luz (RLC) foram realizadas. Após uma medição inicial quase escura ( $\sim 1,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para fornecer estimativas de fluorescência mínima (Fo), um flash de saturação de 0,8 s com intensidade de  $4000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi aplicado para obter fluorescência máxima a partir de centros de reação PSII (Fm) totalmente reduzidos, e Fv/Fm foi obtido, usando a equação:

$$Fv = Fm - Fo \quad (3)$$

O rendimento quântico efetivo de PSII [Y(II)] de algas sob diferentes luzes act\u00ednicas foi calculado pela equação (4) de acordo com Genty; Briantais; Baker (1989), que \u00e9 equivalente a  $\Delta F/Fm'$  (KROMKAMP; FORSTER, 2003).

$$Y(II) = Fm'Ft/Fm' \quad (4)$$

Onde Fm' \u00e9 a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima na luz induzida por um pulso de saturação e Ft, a fluoresc\u00eancia sob luz act\u00ednica.

O fluor\u00f4metro Junior PAM (Walz GmbH, Alemanha) foi usado para medições *in situ/on-line*, ou seja, medidas dentro da cultura. Os dados da fluoresc\u00eancia da clorofila *a*

*in vivo* foram registrados a cada 15 minutos ao longo do dia usando análise de pulso de saturação de dissipação da fluorescência. A fibra óptica plástica (100 cm, 1,5 mm de diâmetro) foi submersa nos primeiros 5 mm da coluna de água na superfície da cultura, juntamente com um sensor quântico PAR esférico (US-SQS, Walz GmbH, Alemanha). Esses dois sensores forneceram simultaneamente medições de fluorescência da clorofila *a in vivo* e irradiância de PAR, respectivamente, conforme descrito anteriormente (JEREZ et al., 2016; MASOJÍDEK et al., 2021). A luz actínica e o pulso de saturação de luz foram fornecidos por diodos emissores de luz azul.

Além disso,  $Y(II)$  foi determinado de modo *ex-situ* (em laboratório) usando a luz actínica vermelha fornecida por Water PAM (Walz GmbH, Alemanha).  $Y(II)$  foi usado para calcular a taxa relativa de transporte de elétrons de PSII [ $ETR(II)$ ], conforme mostrado na equação (5).

$$rETR(II) = Y(II) \times E_{PAR} (\mu\text{mol elétrons } m^{-2} s^{-1}) \quad (5)$$

sendo  $E_{PAR}$  a irradiância incidente de PAR (radiação fotossinteticamente ativa,  $\lambda=400-700$  nm).

As curvas rápidas de luz (RLC) foram obtidas em laboratório a partir de culturas de 24, 48, 72, 96 e 120 h usando o fluorômetro MiniPAM. (Walz GmbH, Alemanha) Para isso, irradiâncias crescentes de radiação actínica fotossinteticamente ativa (PAR) foram aplicadas às amostras em intervalos regulares (30 s). As curvas foram ajustadas de acordo com o modelo matemático proposto em Eilers; Peeters (1988). Os seguintes parâmetros foram determinados: (1) Eficiência fotossintética representado pela inclinação inicial da função  $ETR$  versus irradiância ( $\alpha ETR$ ), irradiância de saturação ( $E_k$ ), e taxa de transporte de elétrons máxima ( $ETR_{max}$ ).

#### *Análise elementar*

Os conteúdos intracelulares de carbono e nitrogênio foram determinados com um analisador elementar LECO CHNS 932, através da combustão da amostra.

### *Análises bioquímicas*

Os carboidratos, proteínas, lipídios totais, pigmentos, atividade antioxidante e compostos fenólicos foram determinados 24, 48, 72, 96 e 120 h. As biomoléculas foram determinadas como descrito abaixo.

#### *Carboidratos totais*

Os carboidratos totais na biomassa de algas foram determinados de acordo com Dubois et al. (1956). É baseado no método fenol-ácido sulfúrico com glicose como padrão para a curva de calibração. As amostras de cultura (5 mg) foram pesadas; foi adicionado ácido sulfúrico e mantido em banho-maria a 100°C por 1 hora; depois foi adicionado fenol e os carboidratos foram determinados a 490 nm usando um espectrofotômetro (UVMini-1240 Shimadzu, Columbia, EUA).

#### *Proteínas solúveis*

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) foi usado para determinação de proteínas na biomassa de *C. fusca*. As amostras de cultura (20 mg) foram pesadas. A extração da proteína foi realizada pela adição de tampão fosfato 0,1 M na biomassa e foi mantida refrigerada por 24 horas.

Uma alíquota de 50 µL desta amostra digerida reagiu com 780 µL de tampão fosfato e 200 µL de Coomassie Brilliant Blue. Um espectrofotômetro (UVMini-1240 Shimadzu, Columbia, USA) foi utilizado para a medição da absorbância em 595 nm; o teor de proteína foi determinado contra uma curva de calibração feita com padrão de albumina bovina (Sigma).

#### *Lipídios*

Os lipídios totais foram determinados seguindo a metodologia descrita em Folch; Lees; Stanley (1957), na qual clorofórmio: metanol (2:1) com 0,01% de BHT foi adicionado a 50 mg de biomassa seca. Após o procedimento de extração, foi adicionado 2 mL de KCl. As amostras foram centrifugadas, os resíduos orgânicos foram removidos e as amostras foram transferidas para um tubo previamente seco e pesado, em seguida as

amostras foram secas com nitrogênio; após o processo, o tubo foi pesado e os lipídios totais foram determinados pela equação:

$$\%lipídios = g \text{ lipídios } /g \text{ amostra } *100 \quad (5)$$

### *Pigmentos*

A concentração de clorofila *a* e carotenoides totais foram determinados de acordo com Wellburn (1994). As amostras foram filtradas em membranas de vidro, na qual foram colocadas em frascos com 3 mL de acetona. Os pigmentos foram determinados em 480, 663 e 646 nm usando um espectrofotômetro (UVMini-1240 Shimadzu, Columbia, EUA).

### *Atividade antioxidante (ABTS) e compostos fenólicos*

Extratos alcalinos da biomassa foram feitos para extrair compostos fenólicos e para a atividade antioxidante. Os extratos foram preparados a uma concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> na qual foi adicionado carbonato de sódio à água, utilizada como solvente. As amostras foram mantidas em banho-maria por 1:30 horas a 85°C. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 2000 rpm por 10 min; o sobrenadante foi separado e os compostos fenólicos e a atividade antioxidante foram determinados.

Os compostos fenólicos foram determinados pelo método de Folin; Ciocalteau (1927). A concentração dos compostos fenólicos foi determinada por uma curva de calibração feita com equivalentes de floroglucinol (PGE). Os compostos fenólicos foram determinados a 760 nm usando um espectrofotômetro.

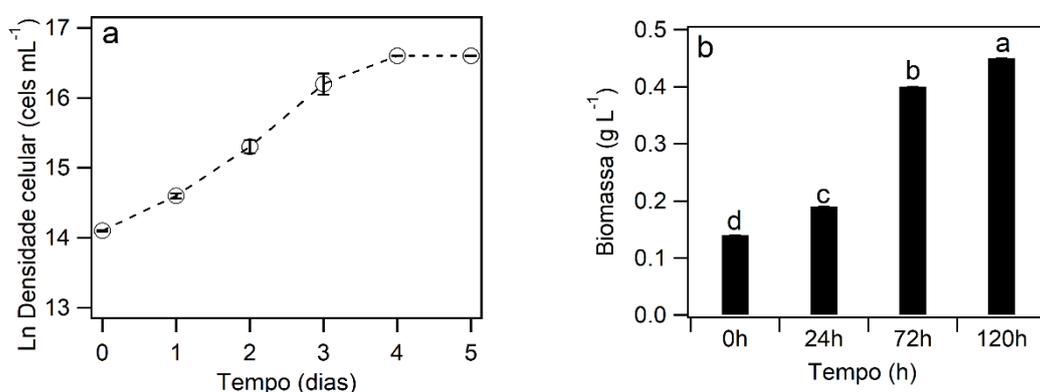
A atividade antioxidante foi determinada pelo radical ABTS, seguindo o método descrito por RE et al. (1999). 50 µL de amostra foram adicionados a 10 µL de ABTS e 940 µL de tampão fosfato e analisados a 727 nm usando um espectrofotômetro (UVMini-1240 Shimadzu, Columbia, EUA).

### *Análise estatística*

O programa IGOR Pro 5.04 foi usado para a representação gráfica; para ajustar as RLC foi usado o software Solver Excel. As análises estatísticas (*one-way* ANOVA) foram realizadas usando o Minitab 17. A análise de correlação foi feita seguindo a correlação de Pearson.

## RESULTADOS

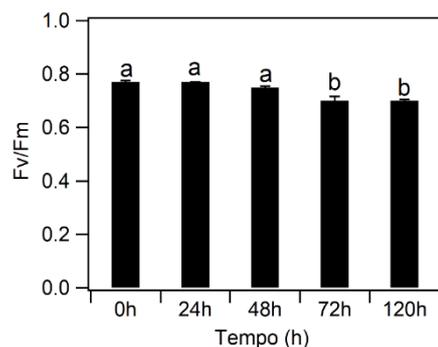
Os parâmetros de crescimento obtidos para *Chlorella fusca* são mostrados na Figura 1. Observamos que o crescimento da fase estacionária começou após quatro dias (96 h) (Fig. 1a) e atingiu  $\sim 1,6 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e dobrou sua biomassa seca ( $\sim 0,45 \text{ g L}^{-1}$ ) em relação ao inicial ( $p < 0,05$ ; Fig. 1b). A taxa de crescimento foi de  $0,72 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$  e a produtividade de biomassa durante os 5 dias de cultivo foi de  $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 1.** Parâmetros de crescimento de *Chlorella fusca*. a Ln densidade celular (células  $\text{mL}^{-1}$ ) em função do tempo experimental (dias); b. Peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ) como tempo (h). As barras de erro representam o desvio padrão da média ( $n = 3$ ).

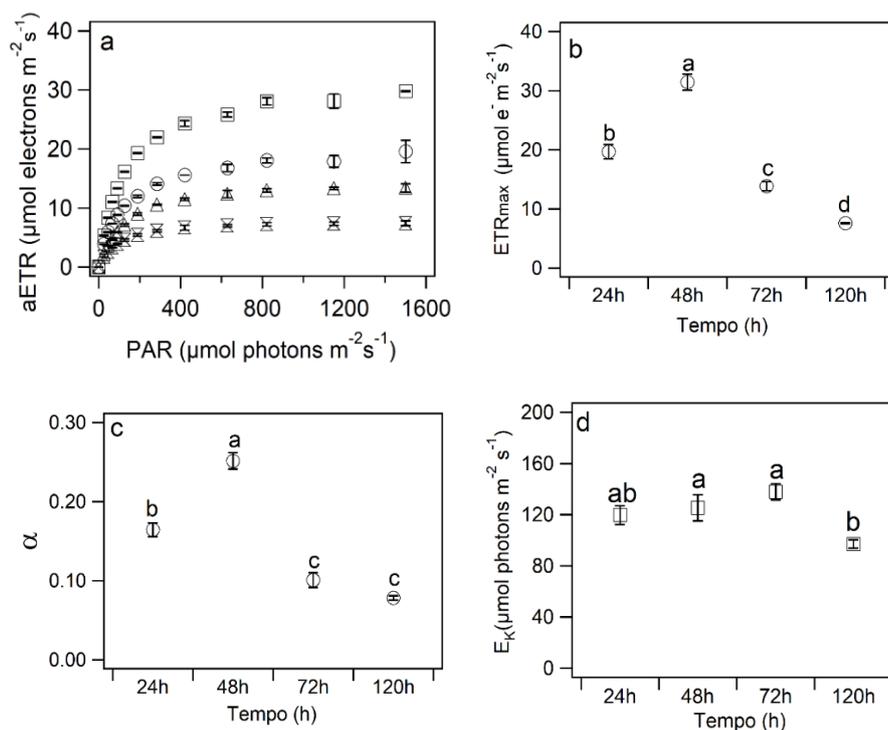
A Figura 2 mostra que o rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) variou de  $\sim 0,77$  a  $0,70$ . O menor valor de  $F_v/F_m$  ocorreu na fase estacionária ( $p < 0,05$ ), o que pode estar relacionado ao fechamento dos centros de reação do PSII, pois foi detectada uma diminuição na taxa relativa de transporte de elétrons (Fig. 3a).

A Tabela 2 mostra as correlações dos parâmetros investigados. Aqui destacamos que  $F_v/F_m$  apresentou correlação negativa com a densidade celular ( $r_2 = -0,917$ ).



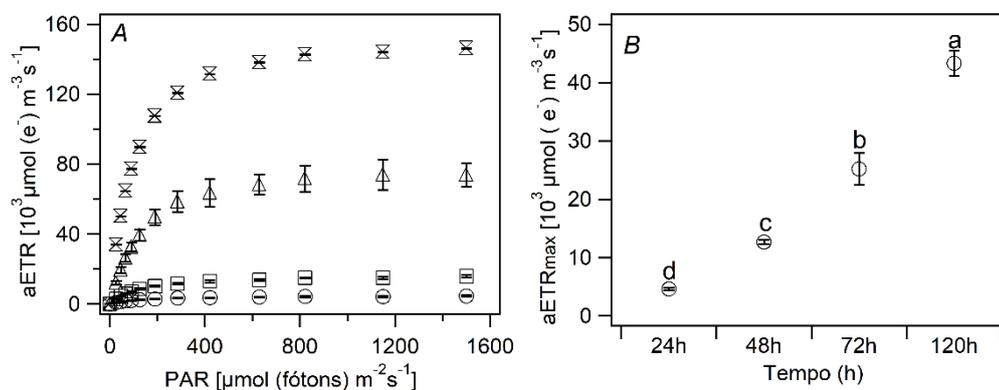
**Figura 2.** Rendimento quântico máximo de *Chlorella fusca* em função do tempo experimental.

Na Figura 3, o rETR máximo é apresentado. Ela variou ao longo do tempo de cultivo, com maior valor em 48 h (Fig. 3a, 3b) e menor em 120 h ( $p < 0,05$ ). A mesma tendência observada para rETRmax esteve presente na eficiência fotossintética (ETR), conforme mostrado na Fig. 3c. A irradiância de saturação ( $E_k$ ) foi semelhante de 24 a 72 h de cultivo ( $120\text{-}130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), mas diminuiu em 120 h de cultivo (Fig. 3d,  $p < 0,05$ ).



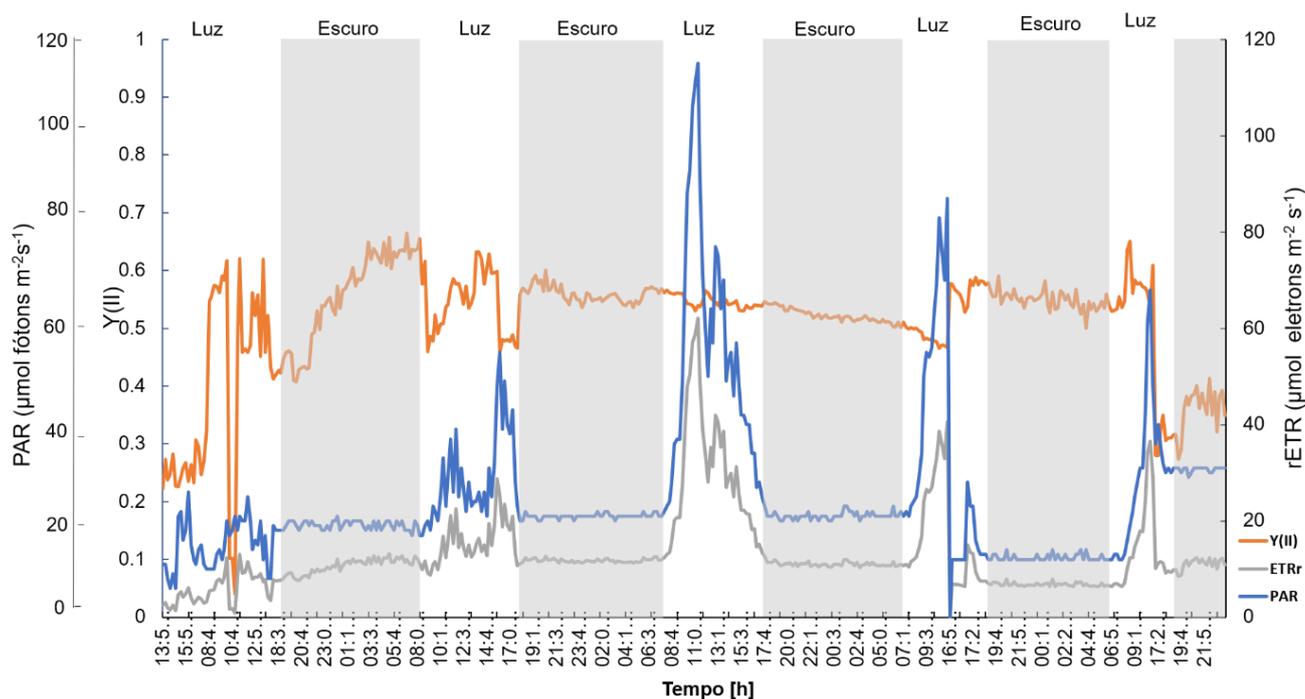
**Figura 3.** a. Curvas rápida de luz (RLC) em culturas de 24 h (círculo aberto), 48 h (quadrado aberto), 72 h (triângulo aberto) e 120 h (ampulheta aberta) representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) em função de fotossinteticamente radiação ativa (PAR); b. ETRmax (elétrons  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); c. ( $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$ ); d.  $E_k$  em função do tempo experimental.

A Figura 4 mostra RLC e ETR para a mesma cultura, mas agora considerando a absorção de luz para estimativa de ETRmax. Diferentemente dos dados apresentados na Fig. 3, o ETR máximo aumentou ao longo do tempo de cultivo (Fig. 4a, b), variando de 4,6 a  $146 \times 10^3 \mu\text{mol fótons m}^{-3} \text{s}^{-1}$  (Fig. 4b). Esse comportamento pode estar relacionado à densidade celular, pois há uma correlação positiva de 0,952 ( $p < 0,05$ ; Tabela 2) entre esse parâmetro e a densidade celular.



**Figura. 4.** (a) Curvas rápida de luz (RLC) em culturas de 24 h (círculo aberto), 48 h (quadrado aberto), 72 h (triângulo aberto) e 120 h (ampulheta aberta) representadas como taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR); (b) ETRmax ( $10^3 \mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ) em função do tempo experimental.

Os ciclos diários de ETR calculados usando os valores de rendimento quântico efetivo *in situ* (YII) e irradiância *in situ* (PAR) dentro da cultura são relatados na Figura 5. A medição em tempo real mostrou que PAR e ETR correlacionaram-se positivamente, uma vez que o aumento da intensidade da luz resultou em aumento da ETR. Além disso, o PAR máximo foi de  $115 \mu\text{mol} \text{fótons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto o rETR atingiu  $60 \mu\text{mol}$  de elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e Y(II) variou de 0,2 a 0,5 (Fig. 4).



**Figura 5.** Variação diária do rendimento quântico efetivo (YII), taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) expressa como  $\mu\text{mol de elétrons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e Irradiância fotossintética ativa (PAR) expressa como  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  em *Chlorella fusca* crescendo em *raceway* em condições de casa de vegetação.

A composição bioquímica e a análise elementar são mostradas na Tabela 1. Observamos que para as células em crescimento exponencial (24 h a 72 h), a concentração de compostos bioquímicos foi quase constante, mas aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em 120 h (crescimento estacionário). Sem crescimento ativo, as células acumularam biomoléculas. As proteínas triplicaram, enquanto os carboidratos totais aumentaram  $\sim 2,5$  vezes e os lipídios totais  $\sim 4$  vezes em comparação com células em crescimento ativo.

Durante a fase de crescimento exponencial, a concentração de compostos fenólicos foi constante em cerca de  $\sim 5\text{ mg PGE g DW}^{-1}$ , mas aumentou significativamente para  $13\text{ mg PGE g DW}^{-1}$ , na fase estacionária ( $\sim 3$  vezes maior,  $p < 0,05$ ). Considerando a atividade antioxidante, ela aumentou à medida que a cultura envelheceu. Em comparação ao controle, foi 1,5 vezes maior às 72 h e 3 vezes maior às 120 h ( $p < 0,05$ ).

Os compostos fenólicos e a atividade antioxidante estão fortemente correlacionados, conforme mostrado na Tabela 2.

A composição elementar mudou em função do tempo experimental. O teor de carbono aumentou cerca de 54% na biomassa de *C. fusca* em 120 h de cultivo, enquanto o nitrogênio diminuiu cerca de 24% no mesmo período.

Em relação aos pigmentos, a maior concentração de clorofila *a* foi obtida em 72 h de cultivo ( $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), diminuindo 46% a partir de então ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, os carotenoides totais aumentaram ~3 vezes ( $p < 0,05$ ) em 120 h. A concentração de clorofila *a* foi inversamente proporcional às proteínas totais, carboidratos, lipídios, compostos fenólicos e atividade antioxidante, enquanto os carotenoides totais se correlacionaram positivamente com esses compostos, mas não com a clorofila *a*, conforme mostrado na Tabela 2.

A Tabela 2 mostra a análise de correlação múltipla. Foi obtida uma correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre densidade celular e biomassa com o conteúdo da maioria dos parâmetros bioquímicos como carotenoides, carboidratos, lipídios, compostos fenólicos, proteínas e atividade antioxidante. A correlação entre os parâmetros de fluorescência como rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ),  $\alpha$ ,  $E_k$  e os compostos bioquímicos foi negativa, porém  $ETR_{max}$  máxima e tais compostos foram correlacionados positivamente (Tabela 2). Assim, densidade celular, biomassa, carotenoides, carboidratos, lipídios, compostos fenólicos e atividade antioxidante foram correlacionados negativamente com  $F_v/F_m$  e eficiência fotossintética ( $\alpha$ ). Densidade celular, biomassa, compostos fenólicos, lipídios, atividade antioxidante foram correlacionados positivamente com  $ETR_{max}$ . Por fim, carboidratos, proteínas, compostos fenólicos, lipídios e atividade antioxidante foram negativamente correlacionados com  $E_k$ . A atividade antioxidante foi positivamente correlacionada com todas as biomoléculas, exceto clorofila *a* (Tabela 2).

**Tabela 1-** Composição bioquímica de *Chlorella fusca* em diferentes tempos experimentais.

Parâmetros	0 h	24h	72h	120h
Proteínas totais ( $\mu\text{g mg DW}^{-1}$ )	112.26 $\pm$ 15.30 <sup>b</sup>	127.31 $\pm$ 38.75 <sup>b</sup>	137.22 $\pm$ 36.67 <sup>b</sup>	365.93 $\pm$ 25.43 <sup>a</sup>
Carboidratos totais ( $\mu\text{g mg DW}^{-1}$ )	10.14 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	8.32 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>	11.83 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	22.32 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
Lípidios totais (% DW)	3.30 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	3.83 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	4.62 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	11.96 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>
Clorofila <i>a</i> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	9.0 $\pm$ 0.107 <sup>b</sup>	9.4 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	13.64 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	7.25 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>
Carotenoides totais ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2.70 $\pm$ 1.37 <sup>c</sup>	2.32 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	4.34 $\pm$ 1.55 <sup>ab</sup>	7.0 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
Atividade antioxidante ( $\text{mg Trolox g DW}^{-1}$ )	2.33 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	2.77 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	3.87 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	6.30 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>
Compostos fenólicos ( $\text{mg PGE g DW}^{-1}$ )	4.48 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5.84 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	5.80 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	13.01 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>
Nitrogenio (%)	-	7.05 $\pm$ 0.32	5.08 $\pm$ 0.15	5.30 $\pm$ 0.42
Carbono (%)	-	15.30 $\pm$ 0.94	17.52 $\pm$ 0.21	33.42 $\pm$ 2.7

**Tabela 2-** Matriz de correlação para os parâmetros estudados de *Chlorella fusca*. Símbolos: Fv/Fm: rendimento quântico máximo; Ek: irradiância de saturação; ETRmax: taxa relativa máxima de transporte de elétrons;  $\alpha$ : eficiência fotossintética.

	Clorofila <i>a</i>	Densidade celular	Carotenoides	Carboidratos	Proteínas	Compostos fenolicos	Atividade antioxidante	Lipídios	Biomassa	Fv/Fm	ETRmax	EK
Densidade Celular	0.049 0.879											
Carotenoides	0.212 0.508	<b>0.833</b> <b>0.001</b>										
Carboidratos	-0.302 0.340	<b>0.871</b> <b>0.000</b>	<b>0.841</b> <b>0.001</b>									
Proteínas	-0.232 0.468	<b>0.806</b> <b>0.002</b>	<b>0.805</b> <b>0.002</b>	<b>0.919</b> <b>0.000</b>								
Compostos Fenolicos	-0.263 0.410	<b>0.823</b> <b>0.001</b>	<b>0.758</b> <b>0.004</b>	<b>0.914</b> <b>0.000</b>	<b>0.955</b> <b>0.000</b>							
Atividade antioxidante	-0.121 0.708	<b>0.956</b> <b>0.000</b>	<b>0.822</b> <b>0.001</b>	<b>0.923</b> <b>0.000</b>	<b>0.892</b> <b>0.012</b>	<b>0.902</b> <b>0.000</b>						
Lipídios	-0.279 0.380	<b>0.847</b> <b>0.001</b>	<b>0.786</b> <b>0.002</b>	<b>0.926</b> <b>0.000</b>	<b>0.900</b> <b>0.004</b>	<b>0.900</b> <b>0.000</b>	<b>0.950</b> <b>0.000</b>					
Biomassa	0.159 0.622	<b>0.968</b> <b>0.000</b>	<b>0.754</b> <b>0.005</b>	<b>0.765</b> <b>0.004</b>	<b>0.700</b> <b>0.011</b>	<b>0.722</b> <b>0.008</b>	<b>0.885</b> <b>0.000</b>	<b>0.745</b> <b>0.005</b>				
Fv/Fm	-0.298 0.347	<b>-0.917</b> <b>0.000</b>	<b>-0.648</b> <b>0.023</b>	<b>-0.647</b> <b>0.023</b>	-0.565 0.055	<b>-0.626</b> <b>0.054</b>	<b>-0.840</b> <b>0.001</b>	<b>-0.690</b> <b>0.013</b>	<b>-0.965</b> <b>0.000</b>			
ETRmax	-0.022 0.946	<b>0.952</b> <b>0.000</b>	<b>0.791</b> <b>0.002</b>	<b>0.876</b> <b>0.000</b>	<b>0.870</b> <b>0.000</b>	<b>0.882</b> <b>0.001</b>	<b>0.965</b> <b>0.000</b>	<b>0.893</b> <b>0.000</b>	<b>0.939</b> <b>0.000</b>	<b>0.602</b> <b>0.038</b>		
Ek	0.497 0.100	-0.441 0.151	-0.565 0.055	<b>-0.749</b> <b>0.005</b>	<b>-0.760</b> <b>0.004</b>	<b>-0.722</b> <b>0.008</b>	<b>-0.635</b> <b>0.026</b>	<b>-0.711</b> <b>0.010</b>	-0.252 0.430	0.154 0.634	0.431 0.162	
$\alpha$	-0.243 0.447	<b>-0.832</b> <b>0.001</b>	<b>-0.687</b> <b>0.430</b>	<b>-0.742</b> <b>0.006</b>	-0.585 0.046	-0.564 0.056	<b>-0.721</b> <b>0.008</b>	-0.580 0.048	<b>-0.814</b> <b>0.002</b>	<b>0.732</b> <b>0.007</b>	<b>0.930</b> <b>0.000</b>	0.252 0.430

## DISCUSSÃO

As microalgas têm despertado muito interesse para a produção de alimentos, compostos bioativos, biocombustíveis, cosméticos, fixação biológica de CO<sub>2</sub>, tratamento de efluentes, e para a aquicultura (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010), neste contexto, o cultivo de microalgas em larga escala tem sido cuidadosamente estudado principalmente em reatores tipo *raceway* para aplicação industrial devido à sua facilidade de operação e construção (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008). Atualmente, a produção fotoautotrófica tem sido visto como uma técnica economicamente viável para a produção em larga escala de biomassa de algas (BOROWITZKA, 2013). Neste estudo, obtivemos a concentração de biomassa de 0,45 g L<sup>-1</sup> em 5 dias, enquanto De Bhowmick et al. (2014) obtiveram 0,37 g L<sup>-1</sup> ao longo de 12 dias, e 1,1 g L<sup>-1</sup> após 20 dias quando cultivaram *Chlorella variabilis* em 150 L em reator *raceway*; Ramírez-López; Perales-Vela; Fernández-Linares (2019) cultivando *Chlorella vulgaris* UTEX 26, em *raceway*, observaram a maior concentração de biomassa de 0,34 g L<sup>-1</sup>, no oitavo dia de cultivo da microalga.

A taxa de crescimento específico (d<sup>-1</sup>) influenciou na biomassa seca obtida. Observamos que *C. fusca* apresentou taxa de crescimento de 0,72 d<sup>-1</sup>, superior ao observado por De Bhowmick et al. (2014) que mostraram uma taxa de crescimento específica de 0,04 a 0,43 d<sup>-1</sup> para *C. variabilis* que variou em função da temperatura e da estação de cultivo.

A produtividade de biomassa para *C. fusca* foi inferior à observada por Tang et al. (2011) esses autores relataram produtividade máxima de biomassa de 0,144 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *C. pyrenoidosa* SJTU-2 quando cultivada sob 10% CO<sub>2</sub> em 14 dias. Ho; Chen; Chang (2012) relataram que a produtividade de biomassa de seis linhagens de *S. obliquus* testadas variou de 0,217 a 0,441 ± 0,016 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> sob iluminação contínua. Nesses experimentos, o CO<sub>2</sub> foi introduzido continuamente nas culturas de algas, o que pode ter contribuído para a maior produtividade.

Em relação ao perfil bioquímico (lipídios, proteínas e carboidratos), observamos que independente do dia da cultura, não houve diferença no conteúdo das biomoléculas durante a fase exponencial de crescimento (0-72 h), mas aumentaram na fase estacionária (120 h).

Para proteínas, *C. fusca*, no presente estudo, apresentou 36% em relação ao peso seco. Freitas et al. (2017) reportaram que *C. minutissima* apresentou 19% de proteínas,

na fase estacionária, quando cultivada em reator tipo *raceway*. *Chlorella* é considerada uma fonte de proteínas e seu conteúdo tem sido reportado variando de 20 a 70% (BECKER, 2007). Os diferentes valores podem estar relacionados as condições de crescimento em associação com a plasticidade fisiológica das microalgas.

O aumento do teor de carboidratos na fase estacionária pode estar relacionado à limitação de nutrientes, em particular à carência de nitrogênio (DRAGONE et al., 2011). Em nosso estudo, a redução de 24% de nitrogênio na biomassa de 24 a 120 h pode ter contribuído para aumento de 2 vezes de carboidratos em 120 h. O teor de carboidratos de *C. fusca* está de acordo com o observado por Hanifzadeh; Garcia; Viamajala (2018). Esses autores observaram que *C. sorokiniana* produziu a maior concentração de carboidratos (20 mg DW<sup>-1</sup>) sob limitação de nitrogênio. De acordo com a literatura, depleção de nitrogênio leva ao aumento acentuado no teor de lipídios ou carboidratos das microalgas. Isso tem sugerido que a limitação de nitrogênio favorece a transformação de proteínas ou peptídeos em lipídios ou carboidratos (HO et al., 2013; SIAUT et al., 2011).

*Chlorella fusca* produziu 6 vezes mais lipídios que o observado por De Bhowmick et al. (2014) para *Chlorella variabilis*. Esses autores mostraram que a biomassa apresentou 2% (DW) de lipídios em 5 dias de cultivo em *raceway*. O acúmulo de lipídios está relacionado a condições estressantes como limitação de nutrientes (CHIA et al., 2015; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991), temperatura (BOHNENBERGER; CROSSETTI, 2014), estresse por luz (SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012) ou estresse por metal (CHIA et al., 2015) e redução da atividade do PSII (HE et al., 2015; XIA et al., 2015).

Assim, dois fatores podem explicar o aumento de lipídios em *C. fusca* na presente pesquisa, menor % de N e menor atividade de PSII (menor ETR e Ek em células em fase estacionária). Isso é corroborado pelos coeficientes de correlação de 0,154-0,690 (Fv/Fm vs Ek) e -0,711 (lipídios vs Ek).

A síntese de pigmentos como carotenoides e clorofilas são afetados pela intensidade da luz (LICHTENTHALER; BABANI, 2007), durante o nosso cultivo, registramos grande variação na intensidade da luz dentro da cultura e na duração do dia. A quantidade de clorofila *a* acumulada em 72 h (~13 mg L<sup>-1</sup>) é superior à obtida por Ashokkumar; Rengasamy (2012) para *Botryococcus braunii* (~1,5 mg L<sup>-1</sup>) cultivado em *raceway* durante 72 h. Embora se espere que o aumento da clorofila *a* ocorra sob menor intensidade de luz (DA SILVA FERREIRA; SANT'ANNA, 2017), o inverso foi detectado na presente pesquisa. Isso pode estar relacionado à redução da duração do dia

que foi muito menor do que os dias anteriores. Seyfabadi; Ramezanzpour; Khoeyi (2011) relatou sobre o efeito da duração do dia no acúmulo de pigmento e mostrou o conteúdo máximo de clorofila *a* (13,25 mg L<sup>-1</sup>) foi atingido em 37,5 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16:8 h e quantidade mínima (7,4 μg mL<sup>-1</sup>) a 100 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 16:8 h. O menor teor de pigmento observado na fase estacionária pode estar relacionado à limitação de nutrientes, que sabidamente levou à diminuição dos pigmentos fotossintéticos. Embora tenhamos observado um declínio de 46% na clorofila *a* na fase estacionária (24% menos nitrogênio do que no início), precisaríamos de um período maior de limitação de nutrientes para relacionar a clorofila *a* esse declínio. Zhao et al. (2017) relataram a redução de 39% no teor de clorofila *a* após 20 dias de cultivo sem nitrogênio para *Porphyridium cruentum*.

O aumento de carotenoides totais em detrimento da clorofila *a* durante a fase estacionária pode estar relacionado a um mecanismo de defesa à captação de luz para o processo de fotossíntese devido às condições de cultivo, onde a intensidade da luz era baixa e, provavelmente, ocorreu auto-sombreamento. A maioria dos carotenoides está ligado a proteínas integrais de membrana, associadas a complexos coletores de luz (LHCs), onde absorvem a luz em uma faixa mais ampla da região espectral e transferem a energia para a clorofila, iniciando os eventos fotoquímicos da fotossíntese (POLÍVKA; FRANK, 2010). Portanto, nossos resultados sugerem que diminuir a luz durante o cultivo pode aumentar os carotenoides intracelulares.

A microalga *Chlorella fusca* produziu quase 6,0 mg L<sup>-1</sup>, enquanto Ashokkumar; Rengasamy (2012) observaram que *B. braunii* produziu ~2,0 mg L<sup>-1</sup> após 6 dias de cultivo; Millán-Oropeza; Fernández-Linares (2017) relataram que *Nannochloropsis oculata* sintetizou 2 mg L<sup>-1</sup> quando foi cultivado em *raceway* de 200 L sob condições de casa de vegetação; El-Sheekh et al. (2019) cultivaram *Chlorella vulgaris* sob condição de estresse em 1000 L e obtiveram 1,2 mg L<sup>-1</sup> de carotenoides totais. Nossos resultados mostram que *C. fusca* pode ser uma espécie promissora para a produção de carotenoides em cultivo em larga escala.

Reforçamos aqui que, devido às condições naturais em que a cultura foi mantida, a duração do dia e a intensidade da luz variaram simultaneamente e é necessária uma investigação mais detalhada sobre a duração do dia e a composição bioquímica das microalgas para atribuir o comportamento a uma variável ou outra e entender a variação da qualidade da biomassa em culturas de larga escala.

De acordo com a literatura, a capacidade antioxidante da biomassa das microalgas variam entre as espécies e o tipo de solvente utilizado durante a extração (BULUT et al., 2019), e extração alcalinas podem ser uma alternativa para melhorá-la. *Chlorella fusca* apresentou 6 mg DW<sup>-1</sup> de atividade antioxidante, enquanto Li et al. (2007) observaram que as capacidades antioxidantes do extrato da fração de água de cepas de *Chlorella* variaram de 0,01 a 7,49 µmol Trolox g<sup>-1</sup>; *C. fusca* pode ser uma cepa promissora como fonte de antioxidantes.

A análise dos compostos fenólicos de *C. fusca* (0,45 a 1,3 g PGE / 100g DW<sup>-1</sup>) concorda com a literatura. Agregán et al. (2018) observaram que *Chlorella vulgaris* apresentou 0,35 e 0,34 g PGE/100g DW<sup>-1</sup>. Investigando *Chlorella vulgaris*, Hajimahmoodi et al. (2010) e Goiris et al. (2012), mostraram que a maior concentração de conteúdo fenólico foi obtida em extratos aquosos, o que sugere que a água seja um solvente mais eficiente para essa finalidade.

A alta correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico que obtivemos ( $r^2=0,920$ ) concorda com Jiménez-Escrig et al. (2001); eles observaram uma correlação significativa entre a atividade antioxidante e compostos fenólicos para espécies de algas marinhas. Similarmente, Hajimahmoodi et al. (2010) concluíram que os compostos fenólicos foram um dos principais contribuintes para as capacidades antioxidantes das microalgas. Contudo, nossos resultados vão na direção oposta de Li et al. (2007). Esses autores mostraram que a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico total de microalgas selecionadas (água como solvente) tiveram um coeficiente de correlação de 0,359. Com base em seu estudo, eles concluíram que os compostos fenólicos não foram os principais contribuintes para a capacidade antioxidante das microalgas. Ainda não está claro até que ponto os compostos fenólicos desempenham um papel na capacidade antioxidante. Mais estudos precisam ser realizados para validar a correlação entre compostos fenólicos e capacidade antioxidante em microalgas.

Além disso, as propriedades antioxidantes do extrato de *C. fusca* pode estar relacionado aos carotenoides como mostrado pela correlação de 0,822.

Informações em tempo real obtidas por monitoramento *in situ* sobre fotossíntese, como rendimento quântico efetivo, taxa máxima de transporte de elétrons e irradiância, em culturas são importantes para avaliar a fisiologia celular e prever o desempenho da cultura nos dias seguintes (JEREZ et al., 2016b). Como indicador do estado fisiológico das células (LOMBARDI; MALDONADO, 2011; PERALTA; JEREZ; FIGUEROA, 2019), o rendimento quântico máximo de *C. fusca* sempre acima de 0,6 confirmou sua

condição saudável. No entanto, sua diminuição em 120 h sugere desequilíbrio do aparelho fotossintético, confirmado ainda pela rETR<sub>max</sub>. Os parâmetros RLC ajudam a analisar os ajustes de curto prazo no funcionamento do aparelho fotossintético, incluindo a operação de mecanismos fotoprotetores e a incidência de fotoinibição (SERÔDIO et al., 2006). Com maior densidade celular em 120 h, é provável que tenha ocorrido auto-sombreamento na cultura e o aparato fotossintético se ajustou a essa nova condição, pois obteve-se uma correlação de 0,930 entre o coeficiente de absorção de luz ( $\alpha$ ) e rETR<sub>max</sub>. No entanto, o teor de nitrogênio (25% inferior ao inicial) também diminuiu às 120 h. De acordo com Behrenfeld et al. (2004) e Lefebvre et al. (2012), mudanças acopladas em ETR<sub>max</sub> e  $\alpha$  são independentes da fotoaclimação e provavelmente estão relacionadas a pigmentos, disponibilidade de nutrientes ou espécies.

Por outro lado, se ETR<sub>max</sub> é expresso considerando a absorção de luz e a fração de luz absorvida pelo fotossistema II, aETR<sub>max</sub> aumentou com o tempo de cultivo, resultando em aumento na absorção de luz e YII. O padrão contrastante para rETR e aETR é um aspecto importante a ser considerado. Vários autores estimam a capacidade fotossintética de microalgas como rETR, mas nossos resultados confirmam que este pode não ser o melhor estimador. Este tópico foi investigado por Jerez et al. (2016) e Figueroa et al. (2021) que concluíram que o aETR pode ser mais apropriado. A literatura mostra que a rETR foi negativamente correlacionada com a densidade celular em contraste com a aETR, que foi relacionada ao crescimento (CELIS-PLÁ et al., 2021; JEREZ et al., 2016b; MASOJÍDEK et al., 2021; REARTE et al., 2021).

A constância em Ek ao longo do tempo pode estar relacionado à fotoaclimação que pode ocorrer quando as células de algas estão sob condições ambientais subótimas, como disponibilidade de luz (SAKSHAUG et al., 1997).

#### *In situ vs Ex situ ETR*

Foram observadas diferenças marcantes entre rETR *in situ* e *ex situ*. Lembramos aqui que *in situ* rETR significa que foi determinada sob condições externas (luz solar natural), enquanto a determinação *ex-situ* rETR ocorreu sob condições controladas de laboratório tendo luz vermelha como luz actínica. Semelhante aos nossos resultados, Jerez et al. (2016) obtiveram rETR *in situ* 2 vezes maior que os valores *ex situ*, com forte

coeficiente de correlação ( $r^2 = 0,97$ ) para *Chlorella fusca*. Longstaf et al. (2002) apresentaram valores determinados de ETR *in situ* duas vezes maiores quando comparados com os *ex situ*.

A diferença pode ser explicada pela qualidade espectral durante as medições de fluorescência *in vivo*, uma vez que a radiação solar apresenta espectros completos com qualidade de luz incluindo azul, verde, amarelo, vermelho e vermelho distante, enquanto na medição *ex situ*, as microalgas são expostas a uma luz vermelha, espectros fornecidos pelo fluorômetro durante a determinação de RLC. Sob radiação solar, não apenas a clorofila *a*, mas também os pigmentos acessórios são excitados e transferem fótons para as moléculas de clorofila *a* em maior extensão do que sob luz artificial actínica vermelha. Além disso, os resultados observados podem ser explicados por diferenças nos espectros de pulso de saturação que podem contribuir de forma diferente para afetar o fluxo de elétrons dos carotenoides para a clorofila *a*. Isso porque na medição *ex situ* a luz de saturação era vermelha enquanto na medição *in situ* era azul (CELIS-PLÁ et al., 2021; FIGUEROA et al., 2021).

Apesar de suas vantagens, como medidas não intrusivas sob as condições de crescimento, o monitoramento *in situ* da fluorescência de Chl *a in vivo* (FIGUEROA et al., 2014) ainda não é uma prática comum, uma vez que medidas laboratoriais ainda prevalecem em culturas de microalgas. No presente estudo, a comparação da determinação *in situ* e *ex situ* ou off-line da rETR confirma a relativização dos valores da ETR e a cautela com que ela deve ser utilizada.

## CONCLUSÕES

A microalga *Chlorella fusca* mostrou-se adaptável às condições ambientais externas e revelou-se uma linhagem promissora para cultivo em larga escala. Entre os parâmetros relacionados à fotossíntese analisados,  $F_v/F_M$  é importante para a detecção precoce de nuances fisiológicas, mas a informação mais sensível foi coletada de RLC, que refletiu alterações precoces nos centros de reação. Além disso, independentemente do período dentro da fase de crescimento exponencial, o conteúdo bioquímico não variou durante essa fase. Uma exceção a esse comportamento foi o pigmento clorofila *a* com maior concentração ( $13,64 \text{ mg L}^{-1}$ ) em 72 h. Considerando proteínas, carboidratos, lipídios, carotenoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante, a maior

produção foi detectada na fase de crescimento estacionário. *C. fusca* apresentou compostos fenólicos e antioxidantes expressivos sendo aqui indicada como uma boa espécie para a produção de compostos fotoprotetores.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioprospecção de microalgas torna-se uma ferramenta importante na busca de espécies como fonte de compostos interesses comerciais como carboidratos, proteínas, lipídios, pigmentos e outros compostos bioativos.

No entanto, a produção de biomassa algal apresenta grandes desafios, implicando na elaboração de fotobiorreatores, como o proposto neste trabalho, para otimizar a produção e ampliar o cultivo de diferentes espécies. Fotobiorreator este que mostrou-se eficiente para o cultivo e produção de microalgas de diferentes espécies.

Verificamos que é possível estimular a produção de compostos de interesse por meio da manipulação bioquímica utilizando-se de agentes físicos e químicos.

O cultivo em larga escala exige que a espécie seja robusta para suportar as variações das condições ambientais durante o cultivo.

Além disso, análises fotossintéticas realizadas em tempo real fornecem informações que podem ser úteis para prever o desempenho da cultura.

Os presentes resultados fornecem informações relevantes sobre a fisiologia, fotossíntese e caracterização bioquímica de diferentes microalgas e destacam espécies potenciais para prosseguir sob investigação com objetivo de aplicações comerciais. Desse modo, este trabalho contribui significativamente com informações para a fisiologia e biotecnologia de microalgas.

## 7. REFERENCIAS

- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 1–12, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x.
- ABIUSI, Fabian; SAMPIETRO, Giacomo; MARTURANO, Giovanni; BIONDI, Natascia; RODOLFI, Liliana; D’OTTAVIO, Massimo; TREDICI, Mario R. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 956–964, 2014. DOI: 10.1002/bit.25014.
- AGREGÁN, Rubén; MUNEKATA, Paulo; FRANCO, Daniel; CARBALLO, Javier; BARBA, Francisco; LORENZO, José. Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) Assisted by Ultrasound. **Medicines**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 33, 2018. DOI: 10.3390/medicines5020033.
- AGUILERA, José; GORDILLO, Francisco J. L.; KARSTEN, Ulf; FIGUEROA, Félix L.; NIELL, F. Xavier. Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 86–92, 2000. DOI: 10.1016/S0176-1617(00)80140-6.
- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.04.072. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>.
- ALHO, Lays de Oliveira Gonçalves; SOUZA, Jaqueline Pérola; ROCHA, Giseli Swerts; MANSANO, Adrislaine da Silva; LOMBARDI, Ana Teresa; SARMENTO, Hugo; MELÃO, Mariada Graça Gama. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 265, 2020. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114856.
- AMARO, Helena M.; GUEDES, A. Catarina; MALCATA, F. Xavier. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 3402–3410, 2011. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>.
- AMARO, Helena M.; PAGELS, Fernando; AZEVEDO, Isabel C.; AZEVEDO, Joana; SOUSA PINTO, I.; MALCATA, F. Xavier; GUEDES, A. Catarina. Light-emitting diodes—a plus on microalgae biomass and high-value metabolite production. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 3605–3618, 2020. DOI: 10.1007/s10811-020-02212-2.
- ANDRADE, Bianca Bomfim; CARDOSO, Lucas Guimarães; ASSIS, Denilson de Jesus; COSTA, Jorge Alberto Vieira; DRUZIAN, Janice Izabel; DA CUNHA LIMA, Suzana Telles. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk’s medium in a raceway-type bioreactor. **Bioresource Technology**, [S.

*l.*], v. 284, n. March, p. 340–348, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.144.

ARIEDE, Maíra Bueno; CANDIDO, Thalita Marcílio; JACOME, Ana Lucia Morocho; VELASCO, Maria Valéria Robles; DE CARVALHO, João Carlos M.; BABY, André Rolim. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, [*S. l.*], v. 25, n. May, p. 483–487, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>.

ARIF, Muhammad; LI, Yuxi; EL-DALATONY, Marwa M.; ZHANG, Chunjiang; LI, Xiangkai; SALAMA, El Sayed. A complete characterization of microalgal biomass through FTIR/TGA/CHNS analysis: An approach for biofuel generation and nutrients removal. **Renewable Energy**, [*S. l.*], v. 163, p. 1973–1982, 2021. DOI: 10.1016/j.renene.2020.10.066. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.066>.

ASHOKKUMAR, Veeramuthu; RENGASAMY, Ramasamy. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 104, p. 394–399, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.093. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.093>.

ATTA, Madiha; IDRIS, Ani; BUKHARI, Atallah; WAHIDIN, Suzana. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 148, p. 373–378, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.162.

AZEVEDO, Maria Teresa; SANT' ANNA, Célia L. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. **Algological Studies**, [*S. l.*], v. 109, n. 1, p. 79–92, 2009. DOI: 10.1127/1864-1318/2003/0109-0079.

BABA, Masato; KIKUTA, Fumie; SUZUKI, Iwane; WATANABE, Makoto M.; SHIRAIWA, Yoshihiro. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 109, p. 266–270, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.059. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059>.

BACH, Quang Vu; CHEN, Wei Hsin. Pyrolysis characteristics and kinetics of microalgae via thermogravimetric analysis (TGA): A state-of-the-art review. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 246, p. 88–100, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.087. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.087>.

BAER, Sascha; HEINING, Martin; SCHWERNA, Philipp; BUCHHOLZ, Rainer; HÜBNER, Holger. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. **Algal Research**, [*S. l.*], v. 14, p. 109–115, 2016. DOI: 10.1016/j.algal.2016.01.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.011>.

BARACHO, Douglas H.; SILVA, Jaqueline C.; LOMBARDI, Ana T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. **Journal of Phycology**, [*S. l.*], v. 55, n. 6, p. 1335–1347, 2019. DOI: 10.1111/jpy.12914.

BASHAN, Yoav; LOPEZ, Blanca R.; HUSS, Volker A. R.; AMAVIZCA, Edgar; DE-BASHAN, Luz E. *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 113–121, 2016. DOI: 10.1007/s10811-015-0571-z.

BASHEVA, Diyana; MOTEN, Dzhemal; STOYANOV, Plamen; BELKINOVA, Detelina; MLADENOV, Rumen; TENEVA, Ivanka. Content of phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains: Applications. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 861–866, 2018. DOI: 10.1002/elsc.201800035.

BAUDELET, Paul-Hubert; RICOCHON, Guillaume; LINDER, Michel; MUNIGLIA, Lionel. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, [S. l.], v. 25, p. 333–371, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.04.008.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.

BEHERA, Bunushree; UNPAPROM, Yuwalee; RAMARAJ, Rameshprabu; MANIAM, Gaanty Pragas; GOVINDAN, Natanamurugaraj; PARAMASIVAN, Balasubramanian. Integrated biomolecular and bioprocess engineering strategies for enhancing the lipid yield from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 148, n. October 2020, p. 111270, 2021. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111270. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111270>.

BEHRENFELD, Michael J.; PRASIL, Ondrej; BABIN, Marcel; BRUYANT, Flavienne. In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 4–25, 2004. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2004.03083.x.

BEHRENS, Paul W.; KYLE, David J. Microalgae as a source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 259–272, 1996.

BENNING, Liane G.; PHOENIX, V. R.; YEE, N.; TOBIN, M. J. Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 729–741, 2004. DOI: 10.1016/S0016-7037(03)00489-7.

BHADURY, Punyasloke; WRIGHT, Phillip C. Exploitation of marine algae: Biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, [S. l.], v. 219, n. 4, p. 561–578, 2004. DOI: 10.1007/s00425-004-1307-5.

BHATTACHARJYA, Raya; KIRAN MARELLA, Thomas; TIWARI, Archana; SAXENA, Abhishek; KUMAR SINGH, Pankaj; MISHRA, Bharti. Bioprospecting of marine diatoms *Thalassiosira*, *Skeletonema* and *Chaetoceros* for lipids and other value-added products. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 318, n. August, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124073.

BLANKEN, Ward; CUARESMA, Maria; WIJFFELS, René H.; JANSSEN, Marcel. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. **Algal Research**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 333–340, 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>.

BOHNENBERGER, Juliana E.; CROSSETTI, Luciane O. Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 1239–1248, 2014. DOI: 10.1590/0001-3765201420130136.

BOLD, Harold C. The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. Author (s): Harold C. Bold Source: Bulletin of the Torrey Botanical Club, Vol. 76, No. 2 (Mar. - Apr., 1949), pp. 101- Published by: Torrey Botanical Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3072011>. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 101–108, 1949.

BOONE, David R.; CASTENHOLZ, Richard W.; GARRITY, George M. **Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-68489-5>.

BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.

BOROWITZKA, Michael A.; EDITORS, John A. Raven. **The Physiology of Microalgae**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2.

BOSSUYT, Bart T. A.; JANSSEN, Colin R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: Changes in tolerance and physiology. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 61–74, 2004. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.02.005.

BOUSSIBA, Sammy; VONSHAK, Avigad. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Plant and Cell Physiology**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 1077–1082, 1991. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BRESAOLA, Marcello Dapievi; MOROCHO-JÁCOME, Ana Lucía; MATSUDO, Marcelo Chuei; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro. Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 2197–2205, 2019. DOI: 10.1007/s10811-019-01774-0.

BULUT, Onur; AKIN, Dilan; SÖNMEZ, Çağla; ÖKTEM, Ayşegül; YÜCEL, Meral; ÖKTEM, Hüseyin Avni. Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 1675–1683, 2019. DOI: 10.1007/s10811-018-1726-5.

CAMARGO, Eduardo Caffagni; ROSSI, Raquel Andrade; SILVA, Jaqueline Carmo; MIWA, Adriana Cristina Poli; PRÁŠIL, Ondřej; CALIJURI, Maria do Carmo; LOMBARDI, Ana Teresa. Comparing pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry with radiocarbon technique for determination of inorganic carbon fixation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1080/09670262.2021.1885065. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2021.1885065>.

CANDIDO, Camila; LOMBARDI, Ana Teresa. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1007/s11274-020-2802-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2802-y>.

CAO, Meng; WANG, Shenglin; GAO, Yumei; PAN, Xiaoyan; WANG, Xiuhai; DENG, Ruru; LIU, Pinghuai. Study on physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Desmodesmus armatus*. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1111/jfbc.13243.

CELIS-PLÁ, Paula S. M. et al. A new approach for cultivating the cyanobacterium *Nostoc calcicola* (MACC-612) to produce biomass and bioactive compounds using a thin-layer raceway pond. **Algal Research**, [S. l.], v. 59, n. July, 2021. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102421.

CHAIWONG, K.; KIATSIRIROAT, T.; VORAYOS, N.; THARARAX, C. Study of bio-oil and bio-char production from algae by slow pyrolysis. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 56, p. 600–606, 2013. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.05.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.035>.

CHEN, Bailing; WAN, Chun; MEHMOOD, Muhammad Aamer; CHANG, Jo Shu; BAI, Fengwu; ZHAO, Xinqing. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 244, n. May, p. 1198–1206, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.170. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.170>.

CHEN, C. Y.; DURBIN, E. G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 83–94, 1994. DOI: 10.3354/meps109083.

CHIA, Mathias Ahii; LOMBARDI, Ana T.; MELÃO, Maria da Graça G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 1427–1438, 2013. DOI: 10.1590/0001-3765201393312.

CHIA, Mathias Ahii; LOMBARDI, Ana Teresa; DA GRAÇA GAMA MELÃO, Maria; PARRISH, Christopher C. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 160, p. 87–95, 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.01.002.

CHIA, Mathias Ahii; LOMBARDI, Ana Teresa; MELÃO, Maria Da Graça Gama; PARRISH, Christopher C. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of**

**Phycology**, [*S. l.*], v. 48, n. 1, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1080/09670262.2012.750687. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670262.2012.750687>.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [*S. l.*], v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

CHOCHOIS, Vincent; DAUVILLÉE, David; BEYLY, Audrey; TOLLETER, Dimitri; CUINÉ, Stéphane; TIMPANO, Hélène; BALL, Steven; CURNAC, Laurent; PELTIER, Gilles. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. **Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 151, n. 2, p. 631–640, 2009. DOI: 10.1104/pp.109.144576.

CHOI, Yong Keun et al. LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [*S. l.*], v. 145, p. 245–253, 2015. DOI: 10.1016/j.saa.2015.03.035.

CHOOCHOTE, Weena; SUKLAMPOO, Linchong; OCHAIKUL, Duangjai. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, [*S. l.*], v. 26, n. 1, p. 43–48, 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0084-6.

CHUA, Elvis T.; SCHENK, Peer M. A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 244, p. 1416–1424, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.124. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.124>.

COBBETT, Christopher; GOLDSBROUGH, Peter. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, [*S. l.*], v. 53, n. 1, p. 159–182, 2002. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154. Disponível em: <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154%5Cnpapers3://publication/uuid/BE95AD65-9F2C-4A2F-8CDB-66B85AF4A2E2%5Cnhttp://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>.

COLLET, Pierre; HÉLIAS ARNAUD, A.; LARDON, Laurent; RAS, Monique; GOY, Romy Alice; STEYER, Jean Philippe. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 102, n. 1, p. 207–214, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.154. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.154>.

COMAS, A G. Nuevas e interesantes Chlorococcales (Chlorophyceae) de Cuba. *Acta Botanica Cubana* 2: 1-18. 1980.

COSTA, Samantha Serra; MIRANDA, Andréa Lobo; ANDRADE, Bianca Bomfim; ASSIS, Denilson de Jesus; SOUZA, Carolina Oliveira; DE MORAIS, Michele Greque; COSTA, Jorge Alberto Vieira; DRUZIAN, Janice Izabel. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 116, p. 552–562, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064.

D’ALESSANDRO, Emmanuel Bezerra; SOARES, Aline Terra; DE OLIVEIRA

D'ALESSANDRO, Natália Cristina; ANTONIOSI FILHO, Nelson Roberto. Potential use of a thermal water cyanobacterium as raw material to produce biodiesel and pigments. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 42, n. 12, p. 2015–2022, 2019. DOI: 10.1007/s00449-019-02196-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02196-5>.

DA SILVA FERREIRA, Veronica; SANT'ANNA, Celso. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1007/s11274-016-2181-6.

DAHMS, Hans Uwe; YING, Xu; PFEIFFER, Cornelia. Antifouling potential of cyanobacteria: A mini-review. **Biofouling**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 317–327, 2006. DOI: 10.1080/08927010600967261.

DAS, Probir; LEI, Wang; AZIZ, Siti Sarah; OBBARD, Jeffrey Philip. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 3883–3887, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.102. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>.

DE BHOWMICK, Goldy; SUBRAMANIAN, Ganeshan; MISHRA, Sandhya; SEN, Ramkrishna. Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study. **Algal Research**, [S. l.], v. 6, n. PB, p. 201–209, 2014. DOI: 10.1016/j.algal.2014.07.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.07.005>.

DE FARIAS SILVA, Carlos Eduardo; SFORZA, Eleonora; BERTUCCO, Alberto. Effects of pH and Carbon Source on Synechococcus PCC 7002 Cultivation: Biomass and Carbohydrate Production with Different Strategies for pH Control. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 181, n. 2, p. 682–698, 2017. DOI: 10.1007/s12010-016-2241-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2241-2>.

DE MORAES, Guilherme Pavan; VIEIRA, Armando Augusto Henriques. Fourier transform infrared with attenuated total reflectance applied to the discrimination of freshwater planktonic coccoid green microalgae. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0114458.

DE MORAIS, Michele Greque; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 439–445, 2007. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.009.

DE REVIERS, Bruno. **Biologia e filogenia das algas**. Artmed Editora, 2006.

DE SOUZA, Maiara P.; HOELTZ, Michele; GRESSLER, Pablo D.; BENITEZ, Lisianne B.; SCHNEIDER, Rosana C. S. Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 2139–2156, 2019. DOI: 10.1007/s12649-018-0253-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0253-6>.

- DEBLOIS, Charles P.; MARCHAND, Axelle; JUNEAU, Philippe. Comparison of Photoacclimation in Twelve Freshwater Photoautotrophs (Chlorophyte, Bacillariophyte, Cryptophyte and Cyanophyte) Isolated from a Natural Community. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057139.
- DEMIRBAS, M. Fatih. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 3473–3480, 2011. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.01.059. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>.
- DERAKHSHANDEH, Masoud; ATICI, Tahir; TEZCAN UN, Umran. Evaluation of Wild-Type Microalgae Species Biomass as Carbon Dioxide Sink and Renewable Energy Resource. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 105–121, 2021. DOI: 10.1007/s12649-020-00969-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00969-8>.
- DEWEZ, David; GEOFFROY, Laure; VERNET, Guy; POPOVIC, Radovan. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 150–159, 2005. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.05.007.
- DODDS, Walter K.; GUDDER, Dolly A.; MOLLENHAUER, Dieter. The Ecology of *Nostoc*. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 2–18, 1995. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1995.00002.x.
- DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: Potential productivity. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 111–117, 2009. DOI: 10.1007/s10811-008-9336-2.
- DRAGONE, Giuliano; FERNANDES, Bruno D.; ABREU, Ana P.; VICENTE, António A.; TEIXEIRA, José A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.03.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>.
- DROPPA, Magdolna; HORVÁTH, Gábor. The role of copper in photosynthesis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 111–123, 1990. DOI: 10.1080/07352689009382284. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689009382284>.
- DUBOIS, A. B.; BOTELHO, S. Y.; BEDELL, G. N.; MARSHALL, R.; COMROE, J. H. A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume: a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 322–326, 1956. DOI: 10.1172/JCI103281.
- DUNSTAN, Graeme A.; VOLKMAN, John K.; BARRETT, Stephanie M.; LEROI, Jeannie Marie; JEFFREY, S. W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). **Phytochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 155–161, 1993. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)90525-9.
- EILERS, P. H. C.; PEETERS, J. C. H. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. **Ecological Modelling**, [S. l.],

v. 42, n. 3–4, p. 199–215, 1988. DOI: 10.1016/0304-3800(88)90057-9.

EINICKER-LAMAS, Marcelo; ANTUNES MEZIAN, Gustavo; BENEVIDES FERNANDES, Thiago; SILVA, Fabio Leandro S.; GUERRA, Flávio; MIRANDA, Kildare; ATTIAS, Marcia; OLIVEIRA, Mecia M. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 779–786, 2002. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00170-7.

EL-SHEEKH, Mostafa M.; GHEDA, Saly F.; EL-SAYED, Abo El Khair B.; ABO SHADY, Atef M.; EL-SHEIKH, Mai E.; SCHAGERL, Michael. Outdoor cultivation of the green microalga *Chlorella vulgaris* under stress conditions as a feedstock for biofuel. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 26, n. 18, p. 18520–18532, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-05108-y.

EVENS, Terence J.; CHAPMAN, David J.; ROBBINS, Rebecca A.; D'ASARO, Eric A. An analytical flat-plate photobioreactor with a spectrally attenuated light source for the incubation of phytoplankton under dynamic light regimes. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 434, p. 55–62, 2000. DOI: 10.1023/A:1004069808148.

FERREIRA, Gabriela F.; RÍOS PINTO, Luisa F.; CARVALHO, Patrícia O.; COELHO, Mirela B.; EBERLIN, Marcos N.; MACIEL FILHO, Rubens; FREGOLENTE, Leonardo V. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], n. 1, 2019. DOI: 10.1007/s13399-019-00566-3.

FIGUEIREDO, Ana R. P.; DA COSTA, Elisabete; SILVA, Joana; DOMINGUES, M. Rosário; DOMINGUES, Pedro. The effects of different extraction methods of lipids from *Nannochloropsis oceanica* on the contents of omega-3 fatty acids. **Algal Research**, [S. l.], v. 41, n. May, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101556.

FIGUEROA, F. L.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; BONOMI BARUFI, J.; CELIS-PLÁ, P. S.; FLORES, P.; MALTA, E. J.; STENGEL, D. B.; MEYERHOFF, O.; PÉREZ-RUZAFÁ, A. Continuous monitoring of in vivo chlorophyll a fluorescence in *Ulva rigida* (Chlorophyta) submitted to different CO<sub>2</sub>, nutrient and temperature regimes. **Aquatic Biology**, [S. l.], v. 22, p. 195–212, 2014. DOI: 10.3354/ab00593.

FIGUEROA, Felix L. et al. Short-term effects of increased CO<sub>2</sub>, nitrate and temperature on photosynthetic activity in *Ulva rigida* (Chlorophyta) estimated by different pulse amplitude modulated fluorometers and oxygen evolution. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 491–509, 2021. DOI: 10.1093/jxb/eraa473.

FIGUEROA, Félix L.; CONDE-ÁLVAREZ, Rafael; GÓMEZ, Iván. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 259–275, 2003. DOI: 10.1023/A:1023936313544.

FIGUEROA, Félix L.; JEREZ, Celia G.; KORBEE, Nathalie. Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. **Latin American Journal of Aquatic Research**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 801–819, 2013. DOI: 10.3856/vol41-issue5-fulltext-1. Disponível em: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-)

560X2013000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=en.

FOLIN, Otto; CIOCALTEAU, Vintila. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

FRANCESCHINI, Iara Maria et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2009.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 238, p. 248–253, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.031>.

GANF, George G.; STONE, J. L.; OLIVER, Roderick L. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton.pdf. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, [S. l.], v. 37, n. Healey 1975, p. 183–197, 1986. DOI: 10.1071/MF9860183.

GARRIDO, Marie; CECCHI, Philippe; VAQUER, André; PASQUALINI, Vanina. Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry. **Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, [S. l.], v. 71, p. 38–48, 2013. DOI: 10.1016/j.dsr.2012.09.004.

GENTY, Bernard; BRIANTAIS, Jean-Marie; BAKER, Neil R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989. DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416589800169>.

GEORGE, Basil; PANCHA, Imran; DESAI, Chahana; CHOKSHI, Kaumeel; PALIWAL, Chetan; GHOSH, Tonmoy; MISHRA, Sandhya. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 171, p. 367–374, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.08.086. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>.

GÉRIN, Stéphanie; DELHEZ, Thomas; CORATO, Amélie; REMACLE, Claire; FRANCK, Fabrice. A novel culture medium for freshwater diatoms promotes efficient photoautotrophic batch production of biomass, fucoxanthin, and eicosapentaenoic acid. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 1581–1596, 2020. DOI: 10.1007/s10811-020-02097-1.

GIORDANO, Mario et al. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY AS A NOVEL TOOL TO INVESTIGATE CHANGES IN INTRACELLULAR MACROMOLECULAR POOLS IN THE MARINE MICROALGA *CHAETOCEROS MUELLERII* (BACILLARIOPHYCEAE) 1 Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy was used to study. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 271–279, 2001.

GOIRIS, Koen; MUYLAERT, Koenraad; FRAEYE, Ilse; FOUBERT, Imogen; DE

- BRABANTER, Jos; DE COOMAN, Luc. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1477–1486, 2012. DOI: 10.1007/s10811-012-9804-6.
- GONG, Yi; MIAO, Xiaoling. Short chain fatty acid biosynthesis in microalgae *synechococcus* sp. PCC 7942. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/md17050255.
- GRACE, C. Esther Elizabeth; LAKSHMI, P. Kiruthika; MEENAKSHI, S.; SEETHARAMAN, Vaidyanathan; SRISUDHA, S.; MARY, M. Briget. Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 224, p. 117382, 2020. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117382. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117382>.
- GRIFFITHS, Melinda J.; VAN HILLE, Robert P.; HARRISON, Susan T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 989–1001, 2012. DOI: 10.1007/s10811-011-9723-y.
- GUERRERO-CABRERA, Luis; RUEDA, José A.; GARCÍA-LOZANO, Hiram; NAVARRO, A. Karin. Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in Batch culture using Nile tilapia effluent. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 161, p. 455–460, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.127. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.127>.
- GUGGER, Muriel; LYRA, Christina; SUOMINEN, Irmgard; TSITKO, Irina; HUMBERT, Jean François; SALKINOJA-SALONEN, Mirja S.; SIVONEN, Kaarina. Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 1007–1015, 2002. DOI: 10.1099/ijs.0.01917-0.
- GUILLARD, Robert R. L.; LORENZEN, Carl J. **Yellow-Green Algae With Chlorophyllide C1,2** **Journal of Phycology**, 1972. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1972.00010.x.
- GUSCHINA, Irina A.; HARWOOD, John L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 160–186, 2006. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.001.
- HAJIMAHMOODI, Mannan; FARAMARZI, Mohammad Ali; MOHAMMADI, Najmeh; SOLTANI, Neda; OVEISI, Mohammad Reza; NAFISSI-VARCHEH, Nastaran. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 43–50, 2010. DOI: 10.1007/s10811-009-9424-y.
- HALSEY, Kimberly H.; MILLIGAN, Allen J.; BEHRENFELD, Michael J. Physiological optimization underlies growth rate-independent chlorophyll-specific gross and net primary production. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 125–137, 2010. DOI: 10.1007/s11120-009-9526-z.
- HANIFZADEH, Mohammad Matin; GARCIA, Elena Cerdan; VIAMAJALA, Sridhar.

Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 127, p. 989–997, 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2018.05.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.012>.

HARUN, Razif; DANQUAH, Michael K.; FORDE, Gareth M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 199–203, 2010. DOI: 10.1002/jctb.2287.

HARVEY, Patricia J.; BEN-AMOTZ, Ami. Towards a sustainable Dunaliella salina microalgal biorefinery for 9-cis  $\beta$ -carotene production. **Algal Research**, [S. l.], v. 50, n. February, p. 102002, 2020. DOI: 10.1016/j.algal.2020.102002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102002>.

HE, Qiaoning; YANG, Haijian; WU, Lei; HU, Chunxiang. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 191, p. 219–228, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.05.021.

HENLEY, William J. **Measurement and Interpretation of Photosynthetic Light-Response Curves in Algae in the Context of Photoinhibition and Diel Changes**. *Journal of Phycology*, 1993.

HO, Shih Hsin; CHEN, Chun Yen; CHANG, Jo Shu. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 113, p. 244–252, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.133. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>.

HO, Shih Hsin; CHEN, Yi Di; CHANG, Ching Yu; LAI, Yen Ying; CHEN, Chun Yen; KONDO, Akihiko; REN, Nan Qi; CHANG, Jo Shu. Feasibility of CO<sub>2</sub> mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: Effects of seasonal changes. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s13068-017-0712-5.

HO, Shih Hsin; HUANG, Shu Wen; CHEN, Chun Yen; HASUNUMA, Tomohisa; KONDO, Akihiko; CHANG, Jo Shu. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 135, p. 157–165, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.100. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>.

HUERLIMANN, Roger; DE NYS, Rocky; HEIMANN, Kirsten. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 245–257, 2010. DOI: 10.1002/bit.22809.

HULATT, Chris J.; THOMAS, David N. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 10, p. 5775–5787, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.025.

JEREZ, Celia G.; GARCÍA, Carolina B.; REARTE, Agustín; FIGUEROA, Félix L. Relation between light absorption measured by the quantitative filter technique and

attenuation of *Chlorella fusca* cultures of different cell densities: application to estimate the absolute electron transport rate (ETR). **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 1635–1648, 2016. a. DOI: 10.1007/s10811-015-0685-3.

JEREZ, Celia G.; MALAPASCUA, José R.; SERGEJEVOVÁ, Magda; MASOJÍDEK, Jiří; FIGUEROA, Félix L. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: Estimation of biomass productivity by in-vivo chlorophyll a fluorescence monitoring. **Algal Research**, [S. l.], v. 17, p. 21–30, 2016. b. DOI: 10.1016/j.algal.2016.04.010.

JIMÉNEZ-ESCRIG, Antonio; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, Isabel; PULIDO, Raquel; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 530–534, 2001. DOI: 10.1002/jsfa.842.

JOHN, Rojan P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; PANDEY, Ashok. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.139.

JOHNSON, Eldin M.; KUMAR, Kanhaiya; DAS, Debabrata. Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 166, p. 541–547, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.097. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.097>.

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**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002. DOI: 10.1007/s00244-001-0027-0.

JUNEAU, P.; HARRISON, P. J. Comparison by PAM fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. **Photochemistry and photobiology**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 649–653, 2005. DOI: 10.1562/2005-01-13-RA-414.

KEELING, Patrick J. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 64, p. 583–607, 2013. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120144.

KHAZI, Mahammed Ilyas; DEMIREL, Zeliha; DALAY, Meltem Conk. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 1513–1523, 2018. DOI: 10.1007/s10811-018-1398-1.

KILHAM, S. S.; KREGER, D. a.; GOULDEN, C. E.; LYNN, S. G. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. **Freshwater Biology**, [S. l.], v. 38, p. 639–647, 1997. DOI: 10.1046/j.1365-2427.1997.00232.x.

KIM, Dae Geun; LEE, Changsu; PARK, Seung Moon; CHOI, Yoon E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 159, p. 240–248, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.078. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078>.

KOLLER, Martin; MUHR, Alexander; BRAUNEGG, Gerhart. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, [S. l.], v. 6, n. PA, p. 52–63, 2014. DOI: 10.1016/j.algal.2014.09.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>.

KOTRBÁČEK, Václav; DOUBEK, Jaroslav; DOUCHA, Jiří. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 2173–2180, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0516-y.

KROMKAMP, Jacco C.; DIJKMAN, Nicole A.; PEENE, Jan; SIMIS, Stefan G. H.; GONS, Herman J. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 327–344, 2008. DOI: 10.1080/09670260802080895. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670260802080895>.

KROMKAMP, Jacco C.; FORSTER, Rodney 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**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 103–112, 2003. DOI: 10.1080/0967026031000094094. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0967026031000094094>.

KUMAR, Kanhaiya; DASGUPTA, Chitralakha Nag; NAYAK, Bikram; LINDBLAD, Peter; DAS, Debabrata. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 8, p. 4945–4953, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.01.054. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>.

KUMAR, Kanhaiya; MISHRA, Sanjiv K.; SHRIVASTAV, Anupama; PARK, Min S.; YANG, Ji Won. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 51, p. 875–885, 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.06.033.

LAMERS, Packo P.; VAN DE LAAK, Carlien C. W.; KAASENBROOD, Petrouchka S.; LORIER, Jeroen; JANSSEN, Marcel; DE VOS, Ric C. H.; BINO, Raoul J.; WIJFFELS, René H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 106, n. 4, p. 638–648, 2010. DOI: 10.1002/bit.22725.

LEE, Jae Yon; YOO, Chan; JUN, So Young; AHN, Chi Yong; OH, Hee Mock. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 1 SUPPL., p. 2009–2011, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.058.

LEFEBVRE, Sébastien; CLAQUIN, Pascal; ORVAIN, Francis; VÉRON, Benoît; CHARPY, Loïc. Spatial and temporal dynamics of size-structured photosynthetic parameters (PAM) and primary production (13C) of pico- and nano-phytoplankton in an atoll lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 65, n. 10–12, p. 478–489, 2012. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.04.011.

LI, Hua-Bin; CHENG, Ka-Wing; WONG, Chi-Chun; FAN, King-Wai; CHEN, Feng; JIANG, Yue. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 102, p. 771–776, 2007.

LIANG, Fang; WEN, Xiaobin; GENG, Yahong; OUYANG, Zhengrong; LUO, Liming; LI, Yeguang. Growth rate and biomass productivity of *Chlorella* as affected by culture depth and cell density in an open circular photobioreactor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 539–544, 2013. DOI: 10.4014/jmb.1209.09047.

LICHTENTHALER, Hartmut K.; BABANI, Fatbardha. Light Adaptation and Senescence of the Photosynthetic Apparatus. Changes in Pigment Composition, Chlorophyll Fluorescence Parameters and Photosynthetic Activity. **Chlorophyll a Fluorescence**, [S. l.], n. January, p. 713–736, 2007. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9\_28.

LIU, Na; YANG, Yixuan; LI, Feng; GE, Fei; KUANG, Yangduo. Importance of controlling pH-depended dissolved inorganic carbon to prevent algal bloom outbreaks. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 220, p. 246–252, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.059. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.059>.

LOMBARDI, Ana T.; MALDONADO, Maria T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011. DOI: 10.1007/s11120-011-9655-z.

LOMBARDI, Ana T.; VIEIRA, Armando A. H.; SARTORI, Luiz A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal Phycology**, [S. l.], v. 337, n. November 2001, p. 332–337, 2002.

LOMBARDI, AT; WANGERSKY, PJ. Influence of phosphorus and silicon on lipia class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 77, n. 1987, p. 39–47, 1991. DOI: 10.3354/meps077039.

MA, Xiao Nian; CHEN, Tian Peng; YANG, Bo; LIU, Jin; CHEN, Feng. Lipid production from *Nannochloropsis*. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 14, n. 4, 2016. DOI: 10.3390/md14040061.

MAADANE, Amal; MERGHOUB, Nawal; AINANE, Tarik; EL ARROUSSI, Hicham; BENHIMA, Redouane; AMZAZI, Saaid; BAKRI, Youssef; WAHBY, Imane. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 215, p. 13–19, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.400. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>.

MAEDLER, Kathrin; OBERHOLZER, José; BUCHER, Pascal; SPINAS, Giatgen A.; DONATH, Marc Y. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic  $\beta$ -cell turnover and function. **Diabetes**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 726–733, 2003. DOI: 10.2337/diabetes.52.3.726.

MALLICK, Nirupama. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga

*Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. **Journal of plant physiology**, [S. l.], v. 161, n. 5, p. 591–7, 2004. DOI: 10.1078/0176-1617-01230. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15202716>.

MALTSEV, Yevhen; MALTSEVA, Kateryna. **Fatty acids of microalgae: diversity and applications**. [s.l.] : Springer Netherlands, 2021. v. 20 DOI: 10.1007/s11157-021-09571-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>.

MANIRAFASHA, Emmanuel; NDIKUBWIMANA, Theoneste; ZENG, Xianhai; LU, Yinghua; JING, Keju. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 109, p. 282–296, 2016. DOI: 10.1016/j.bej.2016.01.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>.

MARKOU, Giorgos; NERANTZIS, Elias. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>.

MARTIGNIER, Agathe; FILELLA, Montserrat; POLLOK, Kilian; MELKONIAN, Michael; BENSIMON, Michael; BARJA, François; LANGENHORST, Falko; JAQUET, Jean Michel; ARIZTEGUI, Daniel. Marine and freshwater micropearls: Biomineralization producing strontium-rich amorphous calcium carbonate inclusions is widespread in the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta). **Biogeosciences**, [S. l.], v. 15, n. 21, p. 6591–6605, 2018. DOI: 10.5194/bg-15-6591-2018.

MARTIN-CREUZBURG, Dominik; ELERT, Eric Von. Ecological Significance of Sterols in Aquatic Food Webs BT - Lipids in Aquatic Ecosystems. **Lipids in Aquatic Ecosystems**, [S. l.], n. Chapter 3, p. 43–64, 2009. Disponível em: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-89366-2\\_3%5Cnpapers2://publication/doi/10.1007/978-0-387-89366-2\\_3](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-89366-2_3%5Cnpapers2://publication/doi/10.1007/978-0-387-89366-2_3).

MASOJÍDEK, Jiří et al. Changes in photosynthesis, growth and biomass composition in outdoor *Chlorella g120* culture during the metabolic shift from heterotrophic to phototrophic cultivation regime. **Algal Research**, [S. l.], v. 56, n. December 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102303.

MASOJÍDEK, Jiří; GROBBELAAR, Johan U.; PECHAR, Libor; KOBLÍŽEK, Michal. Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. **Journal of Plankton Research**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 57–66, 2001. DOI: 10.1093/plankt/23.1.57.

MASOJÍDEK, Jiří; KOPECKÝ, Jiří; GIANNELLI, Luca; TORZILLO, Giuseppe. Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 307–317, 2011. DOI: 10.1007/s10295-010-0774-x.

MATA, Saulo Nascimento; DE SOUZA SANTOS, Thaís; CARDOSO, Lucas Guimarães; ANDRADE, Bianca Bomfim; DUARTE, Jessica Hartwig; COSTA, Jorge Alberto Vieira; OLIVEIRA DE SOUZA, Carolina; DRUZIAN, Janice Izabel. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v.

311, n. May, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123495.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020.

MCGEE, Dónal; ARCHER, Lorraine; FLEMING, Gerard T. A.; GILLESPIE, Eoin; TOUZET, Nicolas. Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 143, n. 1, p. 67–80, 2020. DOI: 10.1007/s11120-019-00686-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00686-x>.

MILLÁN-OROPEZA, Aarón; FERNÁNDEZ-LINARES, Luis. Biomass and lipid production from *Nannochloropsis oculata* growth in raceway ponds operated in sequential batch mode under greenhouse conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 33, p. 25618–25626, 2017. DOI: 10.1007/s11356-016-7013-6.

MOHAN SINGH, Har; TYAGI, V. V.; KOTHARI, Richa; AZAM, Rifat; SINGH SLATHIA, Parvez; SINGH, Bhaskar. Bioprocessing of cultivated *Chlorella pyrenoidosa* on poultry excreta leachate to enhance algal biomolecule profile for resource recovery. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 316, n. May, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123850.

MORENO-GARRIDO, Ignacio. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 99, n. 10, p. 3949–3964, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.040.

MORI, Cilene Cristina; BAGATINI, Inessa Lacativa; GARCIA DA SILVA, Thais; PARRISH, Christopher Charles; HENRIQUES VIEIRA, Armando Augusto. Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). **Phytochemistry**, [S. l.], v. 151, p. 9–16, 2018. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.03.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.03.011>.

MORRIS, E. P.; FORSTER, R. M.; PEENE, J.; KROMKAMP, J. C. Coupling between Photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. **Aquatic Microbial Ecology**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 301–311, 2008. DOI: 10.3354/ame01175.

MOZAFFARIAN, Dariush; CAO, Haiming; KING, Irena B.; LEMAITRE, Rozenn N.; SONG, Xiaoling; SISCOVICK, David S.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 92, n. 6, p. 1350–1358, 2010. DOI: 10.3945/ajcn.110.003970.

MÜHLING, Martin; BELAY, Amha; WHITTON, Brian A. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 137–146, 2005. DOI: 10.1007/s10811-005-7213-9.

MUJTABA, Ghulam; CHOI, Wookjin; LEE, Choul Gyun; LEE, Kisay. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 123, p. 279–283, 2012. DOI:

10.1016/j.biortech.2012.07.057. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.057>.

MURDOCK, Justin N.; WETZEL, David L. FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 335–361, 2009. DOI: 10.1080/05704920902907440.

NATRAH, F. M. I.; YUSOFF, F. M.; SHARIFF, M.; ABAS, F.; MARIANA, N. S. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 711–718, 2007. DOI: 10.1007/s10811-007-9192-5.

OERTEL, Anke; AICHINGER, Nicole; HOCHREITER, Romana; THALHAMER, Josef; LÜTZ-MEINDL, Ursula. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micrasterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 711–720, 2004. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2004.03222.x.

OLAIZOLA, Miguel. Commercial production of astaxanthin from. **Growth (Lakeland)**, [S. l.], p. 499–506, 2000.

OLLE, Margit; VIRŠILE, Akvile. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and Food Science**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 223–234, 2013. DOI: 10.23986/afsci.7897.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 373–378, 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.

PAGELS, Fernando; BONOMI-BARUFI, José; VEGA, Julia; ABDALA-DÍAZ, Roberto; VASCONCELOS, Vitor; GUEDES, A. Catarina; FIGUEROA, Félix L. Light quality triggers biochemical modulation of *Cyanobium* sp.—photobiology as tool for biotechnological optimization. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 2851–2861, 2020. DOI: 10.1007/s10811-020-02179-0.

PANCHA, Imran; CHOKSHI, Kaumeel; MAURYA, Rahul Kumar; TRIVEDI, Khanjan; PATIDAR, Shailesh Kumar; GHOSH, Arup; MISHRA, Sandhya. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 189, p. 341–348, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.017. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>.

PARRISH, Christopher C. Determination-of-total-lipid.-lipid-classes-and-fatty-acids-in-aquatic-samples. In: **Lipids in Freshwater Ecosystems**. [s.l: s.n.]. p. 4–20.

PASQUET, Virginie et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 59–67, 2011. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.07.009. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>.

PASQUET, Virginie; ULMANN, Lionel; MIMOUNI, Virginie; GUIHÉNEUF, Freddy; JACQUETTE, Boris; MORANT-MANCEAU, Annick; TREMBLIN, Gérard. Fatty acids profile and temperature in the cultured marine diatom *Odontella aurita*. **Journal of**

**Applied Phycology**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 2265–2271, 2014. DOI: 10.1007/s10811-014-0252-3.

PATEL, Hiral M.; RASTOGI, Rajesh P.; TRIVEDI, Ujjval; MADAMWAR, Datta. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. **Algal Research**, [S. l.], v. 32, n. April, p. 372–383, 2018. DOI: 10.1016/j.algal.2018.04.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.024>.

PERALTA, Eduardo; JEREZ, Celia G.; FIGUEROA, Félix L. Centrate grown *Chlorella fusca* (Chlorophyta): Potential for biomass production and centrate bioremediation. **Algal Research**, [S. l.], v. 39, n. March, p. 101458, 2019. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101458. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101458>.

PERENDECI, N. A.; YILMAZ, V.; ERTIT TAŞTAN, B.; GÖKGÖL, S.; FARDINPOOR, M.; NAMLI, A.; STEYER, J. P. Correlations between biochemical composition and biogas production during anaerobic digestion of microalgae and cyanobacteria isolated from different sources of Turkey. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 281, n. December 2018, p. 209–216, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.086.

PIRES, Janaína; TORRES, Priscila B.; SANTOS, Déborah Y. A. C. Dos; CHOW, Fungyi. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, [S. l.], p. 6, 2017. Disponível em: [http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=72&tmpl=component&format=raw&Itemid=98](http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=72&tmpl=component&format=raw&Itemid=98).

PLATT, T.; GALLEGOS, C.; HARRISON, W. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal Marine Research**, [S. l.], 1980.

POLAT, Ece; YÜKSEL, Ebubekir; ALTINBAŞ, Mahmut. Effect of different iron sources on sustainable microalgae-based biodiesel production using *Auxenochlorella protothecoides*. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 162, p. 1970–1978, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2020.09.030.

POLÍVKA, Tomáš; FRANK, Harry A. Light Harvesting by Carotenoids. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 1125–1134, 2010.

PROVASOLI, L.; YAMASU T.; MANTON I. Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. **Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom**. 48: 465-479. 1968.

PULZ, O. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 287–293, 2001. DOI: 10.1007/s002530100702.

PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x.

QIU, Renhe; GAO, Song; LOPEZ, Paola A.; OGDEN, Kimberly L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*.

**Algal Research**, [S. l.], v. 28, n. May, p. 192–199, 2017. DOI: 10.1016/j.algal.2017.11.004.

RAES, E. J.; ISDEPSKY, A.; MUYLAERT, K.; BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 247–255, 2014. DOI: 10.1007/s10811-013-0077-5.

RAHMAN, A.; MILLER, C. D. **Microalgae as a Source of Bioplastics**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2017. DOI: 10.1016/B978-0-444-63784-0.00006-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00006-0>.

RALPH, Peter J.; GADEMANN, Rolf. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 222–237, 2005. DOI: 10.1016/j.aquabot.2005.02.006.

RAMANNA, Luveshan; RAWAT, Ismail; BUX, Faizal. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 80, n. June 2016, p. 765–773, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.202. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.202>.

RAMÍREZ-LÓPEZ, Citlally; PERALES-VELA, Hugo Virgilio; FERNÁNDEZ-LINARES, Luis. Biomass and lipid production from *Chlorella vulgaris* UTEX 26 cultivated in 2 m<sup>3</sup> raceway ponds under semicontinuous mode during the spring season. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 274, n. October 2018, p. 252–260, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.096. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.096>.

RANGA RAO, A.; RAVISHANKAR, G. A.; SARADA, R. Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 123, p. 528–533, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.009>.

RAUSCH, Thomas. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 78, p. 237–251, 1981.

RE, Roberta; PELLEGRINI, Anna Protégente; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, [S. l.], v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REARTE, Tomás Agustín et al. Photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* R117 mass culture is moderated by diurnal oxygen gradients in an outdoor thin layer cascade. **Algal Research**, [S. l.], v. 54, n. March 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.algal.2020.102176.

RIZZO, Andrea Maria; PRUSSI, Matteo; BETTUCCI, Lorenzo; LIBELLI, Ilaria Marsili; CHIARAMONTI, David. Characterization of microalga *Chlorella* as a fuel and its thermogravimetric behavior. **Applied Energy**, [S. l.], v. 102, p. 24–31, 2013. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.08.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.039>.

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**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 171–178, 2014. DOI: 10.1007/s10811-014-0320-8.

ROCHA, Giseli S.; LOMBARDI, Ana T.; MELÃO, Maria da Graça G. Influence of phosphorus on copper toxicity to *Selenastrum gracile* (Reinsch) Korshikov. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 128, p. 30–35, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.007>.

SABATINI, Sebastián E.; JUÁREZ, Ángela B.; EPPIS, Maria R.; BIANCHI, Laura; LUQUET, Carlos M.; RÍOS DE MOLINA, María del Carmen. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 1200–1206, 2009. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.01.003.

SAFAFAR, Hamed; WAGENEN, Jonathan Van; MØLLER, Per; JACOBSEN, Charlotte. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015. DOI: 10.3390/md13127069.

SAFI, Carl; URSU, Alina Violeta; LAROCHE, Céline; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 61–65, 2014. a. DOI: 10.1016/j.algal.2013.12.004.

SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 35, p. 265–278, 2014. b. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.

SAHU, Abhishek; PANCHA, Imran; JAIN, Deepti; PALIWAL, Chetan; GHOSH, Tonmoy; PATIDAR, Shailesh; BHATTACHARYA, Sourish; MISHRA, Sandhya. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 89, p. 53–58, 2013. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.02.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.001>.

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**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1637–1670, 1997. DOI: 10.1093/plankt/19.11.1637.

SALDARRIAGA, Juan F.; AGUADO, Roberto; PABLOS, Aitor; AMUTIO, Mairer; OLAZAR, Martin; BILBAO, Javier. Fast characterization of biomass fuels by thermogravimetric analysis (TGA). **Fuel**, [S. l.], v. 140, p. 744–751, 2015. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.10.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.024>.

SÁNCHEZ-ALEJANDRO, Flor; DEL PILAR SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. Characterization of the growth, biochemical composition, and nutrient utilization of the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 1177–1184, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0416-1.

SANCHEZ-SILVA, L.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; GARCIA-MINGUILLAN, A. M.; VALVERDE, J. L. Pyrolysis, combustion and gasification characteristics of *Nannochloropsis gaditana* microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 130, p. 321–331, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.002>.

SANTHAKUMARAN, Prasanthkumar; AYYAPPAN, Sunil Meppath; RAY, Joseph George. Nutraceutical applications of twenty-five species of rapid-growing green-microalgae as indicated by their antibacterial, antioxidant and mineral content. **Algal Research**, [S. l.], v. 47, n. November 2019, p. 101878, 2020. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101878. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101878>.

SANTHAKUMARAN, Prasanthkumar; KOOKAL, Santhosh Kumar; RAY, Joseph George. Biomass yield and biochemical profile of fourteen species of fast-growing green algae from eutrophic bloomed freshwaters of Kerala, South India. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 119, n. September, p. 155–165, 2018. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.09.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.021>.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 10, n. 1–2, p. 51–62, 1986. DOI: 10.1007/BF00024185.

SCHREIBER, Ulrich. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. In: **Chlorophyll a Fluorescence**. [s.l.] : Springer Netherlands, 2007. p. 279–319. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9\_11.

SCHULZE, Peter S. C.; BARREIRA, Luísa A.; PEREIRA, Hugo G. C.; PERALES, José A.; VARELA, João C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.06.001.

SCHUURMANS, R. Milou; VAN ALPHEN, Pascal; SCHUURMANS, J. Merijn; MATTHIJS, Hans C. P.; HELLINGWERF, Klaas J. Comparison of the photosynthetic yield of cyanobacteria and green algae: Different methods give different answers. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–17, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0139061.

SEKAR, Narendran; RAMASAMY, Ramaraja P. Recent advances in photosynthetic energy conversion. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S. l.], v. 22, p. 19–33, 2015. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.004>.

SERGEANT, Susan; RAHBAR, Elaheh; CHILTON, Floyd H. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 785, p. 77–86, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.04.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.020>.

SERÔDIO, J.; VIEIRA, S.; CRUZ, S.; BARROSO, F. Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence. **Marine Biology**, [S. l.], v. 146, n. 5, p. 903–914,

2005. DOI: 10.1007/s00227-004-1504-6.

SERÓDIO, João; VIEIRA, Sónia; CRUZ, Sónia; COELHO, Helena. Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: Relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 29–43, 2006. DOI: 10.1007/s11120-006-9105-5.

SEYFABADI, Jafar; RAMEZANPOUR, Zohreh; KHOEYI, Zahra Amini. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 721–726, 2011. DOI: 10.1007/s10811-010-9569-8.

SHANMUGAM, Sabarathinam; MATHIMANI, Thangavel; ANTO, Susaimanickam; SUDHAKAR, M. P.; KUMAR, Smita S.; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Cell density, Lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 304, n. December 2019, p. 123061, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123061. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123061>.

SHARMA, Kalpesh K.; SCHUHMANN, Holger; SCHENK, Peer M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012. DOI: 10.3390/en5051532.

SHOW, Kuan Yeow; LEE, Duu Jong; CHANG, Jo Shu. Bioreactor and process design for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 18, p. 8524–8533, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055>.

SHU, Chin Hang; TSAI, Chieh Chung; LIAO, Wei Hsiu; CHEN, Kun Yan; HUANG, Hao Chen. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 87, n. 5, p. 601–607, 2012. DOI: 10.1002/jctb.2750.

SIAUT, Magali et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 7, 2011. DOI: 10.1186/1472-6750-11-7. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/7>.

SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 161, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.059.

SILVA, Jaqueline Carmo; ECHEVESTE, Pedro; LOMBARDI, Ana Teresa. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 161, n. May, p. 57–63, 2018. b. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.059. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.059>.

SIMUTIS, Rimvydas; LÜBBERT, Andreas. Bioreactor control improves bioprocess performance. **Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1115–1130, 2015. DOI:

10.1002/biot.201500016.

SINGH, Preeti; KUMAR, Dhananjay. Biomass and Lipid Productivities of Cyanobacteria- *Leptolyngbya foveolarum* HNBGU001. **Bioenergy Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 278–291, 2021. DOI: 10.1007/s12155-020-10170-3.

SOLOVCHENKO, A. E.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; MERZLYAK, M. N. Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 361–366, 2009. DOI: 10.1007/s10811-008-9377-6.

STEHFEST, Katja; BOESE, Matthias; KERNS, Gerhard; PIRY, Alexander; WILHELM, Christian. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. **Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 161, n. 2, p. 151–156, 2004. DOI: 10.1078/0176-1617-01099.

SUNG, Min Gyu; LEE, Bongsoo; KIM, Chul Woong; NAM, Kibok; CHANG, Yong Keun. Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in *Nannochloropsis gaditana*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 229, p. 20–25, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.100.

SURESH KUMAR, K.; DAHMS, Hans Uwe; LEE, Jae Seong; KIM, Hyung Chul; LEE, Won Chan; SHIN, Kyung Hoon. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 104, n. 1, p. 51–71, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.042.

SWARNALATHA, G. V.; HEGDE, Namratha S.; CHAUHAN, Vikas S.; SARADA, R. The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae. **Algal Research**, [S. l.], v. 9, p. 151–159, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.02.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.014>.

SYDNEY, Eduardo Bittencourt; STURM, Wilerson; DE CARVALHO, Julio Cesar; THOMAZ-SOCCOL, Vanete; LARROCHE, Christian; PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos Ricardo. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 15, p. 5892–5896, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.088. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.088>.

TANG, Dahai; HAN, Wei; LI, Penglin; MIAO, Xiaoling; ZHONG, Jianjiang. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.047.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.046.

VADIVELLOO, Ashiwin; MOHEIMANI, Navid R.; COSGROVE, Jeffrey J.; BAHRI, Parisa A.; PARLEVLIET, David. Effect of different light spectra on the growth and productivity of acclimated *nannochloropsis* sp. (eustigmatophyceae). **Algal Research**,

- [*S. l.*], v. 8, p. 121–127, 2015. DOI: 10.1016/j.algal.2015.02.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.001>.
- VAN EYNDE, Erik; LENAERTS, Britt; TYTGAT, Tom; VERBRUGGEN, Sammy W.; HAUCHECORNE, Birger; BLUST, Ronny; LENAERTS, Silvia. Effect of pretreatment and temperature on the properties of *Pinnularia biosilica* frustules. **RSC Advances**, [*S. l.*], v. 4, n. 99, p. 56200–56206, 2014. DOI: 10.1039/c4ra09305d.
- WANG, Bei; LI, Yanqun; WU, Nan; LAN, Christopher Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*S. l.*], v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1518-y.
- WANG, Chih Yu; FU, Chun Chong; LIU, Yung Chuan. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, [*S. l.*], v. 37, n. 1, p. 21–25, 2007. DOI: 10.1016/j.bej.2007.03.004.
- WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- WELTERS, Hannah J.; DIAKOGIANNAKI, Eleftheria; MORDUE, J. Mark; TADAYYON, Moh; SMITH, Stephen A.; MORGAN, Noel G. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic  $\beta$ -cells exposed to palmitate. **Apoptosis**, [*S. l.*], v. 11, n. 7, p. 1231–1238, 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-7450-7.
- WHITE, Anthony J.; CRITCHLEY, Christa. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research**, [*S. l.*], v. 59, n. 1, p. 63–72, 1999. DOI: 10.1023/A:1006188004189.
- WHITE, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. **Bioresource Technology**, [*S. l.*], v. 102, n. 2, p. 1675–1682, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.097. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.097>.
- WHITTON, Brian A.; POTTS, Malcolm. The Ecology of Cyanobacteria. **The Ecology of Cyanobacteria**, [*S. l.*], n. January 2002, 2002. DOI: 10.1007/0-306-46855-7.
- WU, Yongmei; LI, Runzhi; HILDEBRAND, David F. Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. **Progress in Lipid Research**, [*S. l.*], v. 54, p. 340–349, 2012.
- XIA, Ling; YANG, Haijian; HE, Qiaoning; HU, Chunxiang. Physiological responses of freshwater oleaginous microalgae *Desmodesmus* sp. NMX451 under nitrogen deficiency and alkaline pH-induced lipid accumulation. **Journal of Applied Phycology**, [*S. l.*], v. 27, n. 2, p. 649–659, 2015. DOI: 10.1007/s10811-014-0371-x.
- YADAV, Geetanjali; SEKAR, Manigandan; KIM, Sang Hyoun; GEO, V. Edwin; BHATIA, Shashi Kant; SABIR, Jamal S. M.; CHI, Nguyen Thuy Lan; BRINDHADEVI, Kathirvel; PUGAZHENDHI, Arivalagan. Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing

cyanobacterial strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 325, n. November 2020, p. 124654, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124654. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124654>.

YAHIAOUI, Meriem; HADOUN, Hocine; TOUMERT, Idir; HASSANI, Aicha. Determination of kinetic parameters of *Phloimia bovei* de Noé using thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 196, p. 441–447, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.07.082. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.082>.

YAN, Cheng; ZHAO, Yongjun; ZHENG, Zheng; LUO, Xingzhang. Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. **Biodegradation**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 721–732, 2013. DOI: 10.1007/s10532-013-9620-y.

YANG, Jin Shui; CAO, Jing; XING, Guan Lan; YUAN, Hong Li. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 175, p. 537–544, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.124.

YAO, Changhong; AI, Jiangning; CAO, Xupeng; XUE, Song; ZHANG, Wei. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 118, p. 438–444, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.030.

YE, Zhi Wei; JIANG, Jian Guo; WU, Guang Hong. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 352–360, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.03.004.

YÉPRÉMIAN, Claude; CATHERINE, Arnaud; BERNARD, Cécile; CONGESTRI, Roberta; ELERSEK, Tina; PILKAITYTE, Renata. Phycocyanin Extraction and Determination. **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**, [S. l.], p. 335–338, 2017. DOI: 10.1002/9781119068761.ch35.

YUAN, Hao; ZHANG, Xinru; JIANG, Zeyi; WANG, Xinyu; WANG, Yi; CAO, Limei; ZHANG, Xinxin. Effect of light spectra on microalgal biofilm: Cell growth, photosynthetic property, and main organic composition. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 157, p. 83–89, 2020. DOI: 10.1016/j.renene.2020.04.109. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.109>.

YUKESH KANNAH, R.; KAVITHA, S.; PARTHIBA KARTHIKEYAN, Obulisamy; RENE, Eldon R.; KUMAR, Gopalakrishnan; RAJESH BANU, J. A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 332, n. February, p. 125055, 2021. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125055. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125055>.

ZHANG, Dongmei; LI, Qijun; YAN, Chenghu; CONG, Wei. Determination of intracellular lipid and main fatty acids of *Nannochloropsis oceanica* by ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], p. 343–352, 2021. DOI: 10.1007/s10811-021-02607-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02607-9>.

ZHAO, Long Sheng et al. Nitrogen Starvation Impacts the Photosynthetic Performance of *Porphyridium cruentum* as Revealed by Chlorophyll a Fluorescence. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-08428-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08428-6>.

ZHAO, Yongjun; WANG, Juan; ZHANG, Hui; YAN, Cheng; ZHANG, Yuejin. Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 136, p. 461–468, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.051. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.051>.