



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS NO CULTIVO DE MICROALGAS:  
UTILIZAÇÃO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) E ÁGUA SALOBRA

JESSICA HARTWIG DUARTE

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS NO CULTIVO DE MICROALGAS: UTILIZAÇÃO  
DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) E ÁGUA SALOBRA

JESSICA HARTWIG DUARTE

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutora em Engenharia e Ciência de  
Alimentos

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador

RIO GRANDE, RS

2019

### Ficha catalográfica

D812a Duarte, Jessica Hartwig.

Alternativas sustentáveis no cultivo de microalgas: utilização de diodos emissores de luz (LEDS) e água salobra / Jessica Hartwig Duarte. – 2019.

130 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

1. Alimentos 2. Biocombustíveis 3. Fonte de Água 4. Fonte de Luz 5. *Spirulina* 6. *Synechococcus* I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Título.

CDU 639.64

## APROVAÇÃO

Tese defendida por Jessica Hartwig Duarte aprovada em 15 de fevereiro de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



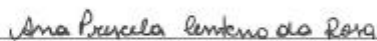
---

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa - FURG



---

Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes - UFSC



---

Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa – FURG



---

Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG



Dedico este trabalho aos meus pais, Elimar (*in memoriam*) e Lauret, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida, tornando possível a realização de mais esta etapa.



## **AGRADECIMENTOS**

**Família**, base de tudo, sem vocês nada disso seria possível! Amo vocês!

**FURG**, minha Universidade amada, tanto orgulho carrego no peito por fazer parte desta Instituição que me acolhe desde a graduação.

**CAPES**, pelo auxílio financeiro.

**LEB**, minha segunda casa, que orgulho de ter feito parte desta equipe por estes 7 anos!

**Jorge**, obrigada pela oportunidade que tu me deste de começar a trabalhar no LEB lá em 2012, foi onde me encontrei e fui muito feliz trabalhando com as microalgas. Obrigada pela orientação, pela confiança em mim, pelas oportunidades que tu me deste e por todo ensinamento repassado!

**UFBA**, Instituição que me acolheu por 4 meses durante meu doutorado, agradeço aos colegas do grupo LAPESCA pela receptividade, ajuda e pelo aprendizado repassado! Em especial ao Lucas, meu companheiro de bancada, por toda ajuda, pelas caronas, pelos “passeios” em Salvador atrás de material para nossos cultivos, enfim, por toda a parceria!

**Janice**, obrigada por toda a ajuda no tempo que estive em Salvador, pelo aprendizado repassado e pelas oportunidades!

As **professoras** da FURG que tanto contribuíram para minha formação: Aninha, Lucielen, Michele Morais, Du, Michele Andrade e, em especial, a minha irmã Susan, que é um grande exemplo de profissional para mim. Obrigada por toda a ajuda!!

Aos **membros das bancas de qualificação e de defesa**, pela disponibilidade, correções e ensinamentos repassados!

**Roque**, nosso técnico, sempre pronto para ajudar no que for preciso! Obrigada por tudo!

**Técnicos e professores da EQA**, que disponibilizaram seus laboratórios para a realização de algumas etapas deste trabalho.

Aos **amigos do LEB/MIBI**, pelas ajudas, cafés, comidas, conversas e risadas! Vou sentir falta da nossa convivência diária.

**As amigas da pós Jana e Thaís**, pelas jantas e momentos de descontração que foram muito importantes ao longo destes anos.

A amiga **Kricelle**, por todo companheirismo e por me fazer dar sempre muitas risadas!

A **Letícia**, que começou sendo minha iniciante científica no mestrado e se tornou uma grande amiga. Obrigada por todo companheirismo e por ter sido sempre tão prestativa me auxiliando desde o meu mestrado.

A **Bárbara Franco**, minha “migles”. Obrigada pelos momentos compartilhados ao longo do doutorado. Sabes que tenho muita admiração por ti!

**Bruno**, que entrou na minha vida na metade do doutorado e foi um baita companheiro sempre! Que topou morar uns meses comigo na Bahia, que me aturou estressada com o doutorado, que me ajuda no inglês dos meus artigos, que me ensina sempre e que aceitou dividir a vida comigo! Obrigada! Eu te amo muito! Agradeço a **tua família** também, que sempre me acolheu tão bem!

Aos meus **amigos de fora** da FURG, por entenderem minhas ausências em muitos eventos em função do doutorado e por estarem sempre comigo. Vocês são muito importantes para mim! E, em especial, a minha amiga-irmã **Júlia** (*in memoriam*), que tive que me despedir tão cedo! Dividia comigo as angústias da pós-graduação e sempre me incentivava. Ela sempre foi um grande exemplo de pessoa e profissional para mim, a quem eu tenho muito orgulho e me espelho sempre.

Por fim, não tem como não agradecer a minha cadela **Úrsula**!! Que me recebeu com festa e amor em casa todos os dias depois da FURG, mesmo quando eu não dava muita bola para ela pois estava cansada demais! Como nos faz bem e nos energiza este amor puro dos animais!

***Receita para realizar sonhos:***

*Comece onde você está.*

*Use o que você tem.*

*Faça o que você pode.*

*Arthur Robert Ashe – Tenista norte-americano*



## RESUMO

As microalgas vêm sendo extensivamente estudadas nos últimos anos como alternativa de alimento e energia, visando atender a demanda crescente por estes recursos naturais. Apesar das inúmeras vantagens na utilização das microalgas, alguns parâmetros importantes de seus cultivos necessitam de modificação, a fim de tornar a obtenção de bioprodutos a partir destes micro-organismos mais corretos ecologicamente. Os principais impasses na sustentabilidade do cultivo de microalgas são as fontes de luz artificiais comumente utilizadas e a quantidade de água necessária para cultivos em grande escala. Deste modo, a presente Tese teve como objetivo avaliar a aplicação de diodos emissores de luz (LEDs) como fonte energética e água salobra como fonte hídrica e nutricional nos cultivos de microalgas, visando a sustentabilidade ambiental. No primeiro artigo, diferentes intensidades de LEDs azuis foram avaliados como fonte energética nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. Os LEDs azuis aumentaram em 80% a velocidade específica máxima de crescimento em cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115 e proporcionaram maior acúmulo lipídico em *Chlorella fusca* LEB 111, quando comparado à fonte de luz tradicional (fluorescente). Quando a intensidade dos LEDs azuis aumentou de 50 para 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a biomassa acumulou até 4,5 e 2,4 vezes mais clorofilas e carotenoides, respectivamente. No segundo artigo, diferentes faixas espectrais de LEDs foram avaliados nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115. Os maiores resultados foram obtidos com LEDs rosas, obtendo-se velocidade específica máxima de crescimento de  $0,62 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ , cerca de 2,63 vezes maior a velocidade do cultivo com lâmpadas fluorescentes. A ordem dos LEDs com maiores resultados de crescimento foi: rosa > verde > amarelo > vermelho > azul. A produção de proteínas também foi fotoestimulada cerca de 13,1%, quando LEDs rosas foram utilizados como fonte energética. O terceiro artigo avaliou a utilização de 100% de água salobra com suplementação de diferentes concentrações de nutrientes presentes no meio Zarrouk em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18. Os melhores resultados foram obtidos nos cultivos utilizando 100% de água salobra e apenas 25% de nutrientes do meio Zarrouk. As concentrações de carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados na biomassa aumentaram até 4 e 3,3 vezes, respectivamente, quando água salobra foi utilizada nos cultivos. O perfil lipídico da biomassa cultivada com água salobra demonstrou potencial para aplicação na produção de biodiesel. No quarto artigo, as melhores condições obtidas no artigo 3 foram avaliadas no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em escala ampliada. Ao comparar com o ensaio controle, o cultivo com água salobra em escala ampliada apresentou redução de apenas 8% na concentração de biomassa máxima. A composição da biomassa apresentou aumento no teor de carboidratos e redução na concentração de proteínas. Os elevados teores obtidos de ambas as biomoléculas,  $29,48 \pm 0,75\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ) e  $53,07 \pm 0,98\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ), demonstram a possibilidade da aplicação desta biomassa para a produção de bioetanol e para a suplementação alimentar humana e animal, respectivamente. A utilização de LEDs como fonte energética nos cultivos, além de sustentável ambientalmente, mostrou-se promissora na produção de biomassa microalgal e de metabólitos de interesse. A água salobra apresentou potencial como fonte hídrica e nutricional nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18. Sendo assim, além de sustentável, a utilização de água salobra pode reduzir custos dos cultivos, produzir biomassa para fins energéticos e alimentares, além da possibilidade de geração de água dessalinizada para aplicação agrícola, animal e humana.

Palavras-chave: Alimentos. Biocombustíveis. Fonte de água. Fonte de luz. *Spirulina*. *Synechococcus*.



# SUSTAINABLE ALTERNATIVES IN MICROALGAE CULTIVATIONS: UTILIZATION OF LIGHT EMITTING DIODES (LEDs) AND BRACKISH WATER

## ABSTRACT

Microalgae have been extensively studied in recent years as food and energy alternatives, aiming to meet a growing demand for these natural resources. In spite of the numerous advantages in the use of microalgae, some important parameters of their cultures need modification, in order to make the obtaining of their bioproducts from these micro-organisms more correct ecologically. The main bottlenecks in the sustainability of microalgae cultivation are the artificial energy sources used and the amount of water required for large-scale cultivations. In this context, the objective of this Thesis was to evaluate the possibility of applying light emitting diodes (LEDs) as energy source and brackish water as a hydric and nutritional source in microalgae cultivations, aiming at environmental sustainability. In the first manuscript, different intensities of blue LEDs were evaluated as energy source in the cultures of *Chlorella fusca* LEB 111 and *Synechococcus nidulans* LEB 115. Blue LEDs increased the specific growth rate in *Synechococcus nidulans* LEB 115 cultures by 80% and also induced lipid accumulation in *Chlorella fusca* LEB 111. When the intensity of the blue LEDs was increased from 50 to 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , the biomass accumulated up to 4.5 and 2.4 times more chlorophylls and carotenoids, respectively. In the second manuscript, different LEDs spectral ranges were evaluated in the cultures of *Synechococcus nidulans* LEB 115. The best results were obtained with pink LEDs, with a specific growth rate of  $0.62 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ , 2.63 times greater than cultivations with fluorescent lamps. The order of the LEDs with the best growth results was: pink > green > yellow > red > blue. Protein production was also photo-stimulated around 13.1% when pink LEDs were used as an energy source. The third manuscript evaluated the use of 100% brackish groundwater with the supplementation of different nutrient sources present in the Zarrouk medium in cultures of *Spirulina* sp. LEB 18. The best growth parameter results were obtained in the assay using 100% brackish groundwater and only 25% of Zarrouk nutrients. The concentrations of carbohydrates and polyunsaturated fatty acids were increased by as much as 4- and 3.3-fold, respectively, when brackish water was used in the cultures. The lipid profile demonstrated that the biomass had the potential for use in biodiesel production. In the last manuscript, the best conditions obtained in the manuscript 3 were repeated in cultures of *Spirulina* sp. LEB 18 on an enlarged scale and under uncontrolled conditions. Comparing with the control assay, the brackish water cultivation on an enlarged scale and under uncontrolled conditions showed a reduction of only 8% in the maximum biomass concentration. The biomass composition had an increase in the carbohydrate content and reduction in the protein concentration. The high concentrations obtained from both biomolecules,  $29.48 \pm 0.75\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ) and  $53.07 \pm 0.98\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ), point out the possibility of applying this biomass to the production of bioethanol and to human and animal food supplementation, respectively. The use of LEDs as an energy source in cultivations, besides being environmentally sustainable, has shown to be promising in the production of microalgal biomass and compounds of interest. Brackish water showed potential as a water and nutritional source in *Spirulina* sp. LEB 18 cultivations. In addition to being sustainable, the use of brackish groundwater can reduce cultivation costs, produce biomass for energy and food purposes, and the possibility of desalinated water generation for agricultural, animal and human applications.

KEY WORDS: Food. Biofuels. Water source. Light source. *Spirulina*. *Synechococcus*.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Microfotografia de <i>Chlorella vulgaris</i> .....                                      | 30 |
| <b>Figura 2</b> – Microfotografia de <i>Spirulina platensis</i> .....                                     | 31 |
| <b>Figura 3</b> – Microfotografia de <i>Synechococcus elongatus</i> .....                                 | 32 |
| <b>Figura 4</b> – Espectros de absorção energética de diferentes pigmentos encontrados em microalgas..... | 33 |

### CAPÍTULO III

#### ARTIGO 1 - DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) AZUIS COMO FONTE DE ENERGIA EM CULTIVOS DE *Chlorella fusca* E *Synechococcus nidulans*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Suporte com LEDs utilizado durante os ensaios.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 50 |
| <b>Figura 2</b> – Curvas de concentração de biomassa ao longo do tempo nos cultivos com LEDs azuis nas seguintes condições: <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 nas intensidades luminosas de ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ) 50, ( $\square$ ) 100 e ( $\circ$ ) 150; <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 nas intensidades luminosas de ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) 50, ( $\blacksquare$ ) 100 e ( $\bullet$ ) 150..... | 53 |
| <b>Figura 3</b> – Concentrações de pigmentos fotossintéticos durante os cultivos com LEDs azuis sob diferentes condições: (a) e (c): <i>Chlorella fusca</i> LEB 111; (b) e (d): <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 55 |

#### ARTIGO 2 - DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) EM CULTIVOS DE *Synechococcus nidulans*: EFEITO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA

|                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Curvas de concentração de biomassa de <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 ao longo do tempo de cultivo. A cor de cada curva corresponde a faixa espectral utilizada dos LEDs e a cor preta corresponde ao ensaio controle..... | 68 |
| <b>Figura 2</b> – Curvas de concentração de biomassa de <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 ao longo dos tempos de cultivo .....                                                                                                                 | 68 |

#### ARTIGO 3 - ÁGUA SALOBRA EM CULTIVOS DE *Spirulina*: POTENCIAL ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CARBOIDRATOS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Fotobiorreatores dispostos no interior da estufa com os cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em água salobra.....                                                                                                                                                                                              | 81 |
| <b>Figura 2</b> – 2º d de cultivo - Experimento de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com 100% de água salobra e sem suplementação de nutrientes do meio Zarrouk.....                                                                                                                                                                      | 84 |
| <b>Figura 3</b> – Curvas de concentração de biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 ao longo do tempo nos cultivos com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk: (O) Controle; ( $\Delta$ ) 25%; (+) 50%; ( $\diamond$ ) 75% e ( $\nabla$ ) 100%.....                               | 85 |
| <b>Figura 4</b> – Composição da biomassa (em base seca) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. Letras iguais, para cada biomolécula, indicam que não houve diferença estatística a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ )..... | 86 |

#### **ARTIGO 4 - CULTIVO DE *Spirulina* SOB CONDIÇÕES NÃO CONTROLADAS UTILIZANDO ÁGUA SALOBRA**

|                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1</b> – a) Vista geral da planta dessalinizadora de água salobra (Mandassaia II - Riachão do Jacuípe, Brasil); b) Caixa d'água com água salobra armazenada .....         | 100 |
| <b>Figura 2</b> – Fotobiorreatores <i>raceway</i> dispostos no interior da estufa com os cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em água salobra (a) e o cultivo controle (b)..... | 101 |
| <b>Figura 3</b> – Curvas de concentração de biomassa ao longo do tempo nos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com água salobra e controle.....                                | 104 |
| <b>Figura 4</b> – Curvas de pH (a) e temperatura (b) ao longo dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com água salobra e controle.....                                         | 105 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1** – Fontes de energia e carbono para as diferentes condições de cultivo microalgal..36

### CAPÍTULO III

**ARTIGO 1** - DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) AZUIS COMO FONTE DE ENERGIA EM CULTIVOS DE *Chlorella fusca* E *Synechococcus nidulans*

**Tabela 1** – Concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ , g L<sup>-1</sup>), produtividade máxima de biomassa ( $P_{\text{máx}}$ , mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) e concentração de lipídios (% m m<sup>-1</sup>) nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 em diferentes intensidades luminosas de LEDs azuis.....53

**ARTIGO 2** - DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) EM CULTIVOS DE *Synechococcus nidulans*: EFEITO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA

**Tabela 1** – Parâmetros de crescimento obtidos nos ensaios com *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando diferentes faixas espectrais (cores) de LEDs. ....66

**Tabela 2** – Parâmetros de crescimento e composição bioquímica (base seca) da biomassa dos ensaios de *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando como fontes energéticas LEDs rosas e lâmpadas fluorescentes. ....67

**Tabela 3** – Composição bioquímica (base seca) da biomassa de *Synechococcus nidulans* LEB 115 cultivada utilizando diferentes faixas espectrais (cores) de LEDs. ....69

**ARTIGO 3** - ÁGUA SALOBRA EM CULTIVOS DE *Spirulina*: POTENCIAL ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CARBOIDRATOS

**Tabela 1** – Composição da água salobra proveniente do sertão nordestino brasileiro (Mandassaia II, Riachão do Jacuípe, Bahia, Brasil). ....80

**Tabela 2** – Concentração de biomassa máxima, produtividade máxima e velocidade específica máxima de crescimento celular obtidas nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk.....84

**Tabela 3** – Perfil de ácidos graxos (mg g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. ....89

**ARTIGO 4** - CULTIVO DE *Spirulina* SOB CONDIÇÕES NÃO CONTROLADAS UTILIZANDO ÁGUA SALOBRA

**Tabela 1** – Resultados de parâmetros de crescimento e composição da biomassa dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra e controle. ....104



## SUMÁRIO

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                                  | 11 |
| ABSTRACT .....                                                               | 13 |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                        | 15 |
| LISTA DE TABELAS.....                                                        | 17 |
| <br>                                                                         |    |
| CAPÍTULO I .....                                                             | 21 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                          | 23 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                           | 25 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                                     | 25 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                              | 25 |
| <br>                                                                         |    |
| CAPÍTULO II.....                                                             | 27 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                               | 29 |
| 3.1 MICROALGAS .....                                                         | 29 |
| 3.1.1 <i>Chlorella</i> .....                                                 | 30 |
| 3.1.2 <i>Spirulina</i> .....                                                 | 31 |
| 3.1.3 <i>Synechococcus</i> .....                                             | 32 |
| 3.2 FONTE DE LUZ NOS CULTIVOS DE MICROALGAS .....                            | 33 |
| 3.2.1 Diodos emissores de luz (LEDs) em cultivo de microalgas.....           | 34 |
| 3.3 MEIO DE CULTIVO MICROALGAL.....                                          | 36 |
| 3.3.1 Água salobra em cultivo de microalgas.....                             | 37 |
| 3.4 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO .....                                           | 38 |
| <br>                                                                         |    |
| CAPÍTULO III .....                                                           | 41 |
| 4. DESENVOLVIMENTO DA TESE.....                                              | 43 |
| ARTIGO 1.....                                                                | 45 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                           | 49 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                   | 50 |
| 2.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO .....                                 | 50 |
| 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....                                               | 50 |
| 2.3 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E pH .....                                      | 51 |
| 2.4 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO .....                                          | 51 |
| 2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA, DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS E DE<br>PIGMENTOS..... | 51 |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                | 52 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                               | 52 |
| 4 CONCLUSÃO.....                                                             | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                             | 56 |
| ARTIGO 2.....                                                                | 59 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                           | 63 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                   | 64 |
| 2.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....                              | 64 |
| 2.2 DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA E pH.....                    | 65 |
| 2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO .....                                          | 65 |
| 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA.....                                              | 65 |
| 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                | 66 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                               | 66 |

|                                                                       |                |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                                              | <b>70</b>      |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                               | <b>71</b>      |
| <b>ARTIGO 3 .....</b>                                                 | <b>75</b>      |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                             | <b>79</b>      |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                      | <b>80</b>      |
| 2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO.....                            | 80             |
| 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....                                        | 81             |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH .....             | 82             |
| 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA .....                                      | 82             |
| 2.5 CONVERSÃO TEÓRICA DOS CARBOIDRATOS DA BIOMASSA EM BIOETANOL ..... | 83             |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                          | 83             |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                 | <b>83</b>      |
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                                              | <b>89</b>      |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                               | <b>90</b>      |
| <b>ARTIGO 4 .....</b>                                                 | <b>95</b>      |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                             | <b>99</b>      |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                      | <b>100</b>     |
| 2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO.....                            | 100            |
| 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....                                        | 101            |
| 2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA .....         | 102            |
| 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA .....                                      | 102            |
| 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                          | 103            |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                 | <b>103</b>     |
| <b>4 CONCLUSÃO .....</b>                                              | <b>107</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                               | <b>108</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO IV .....</b>                                          | <br><b>111</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO GERAL.....</b>                                        | <b>113</b>     |
| <b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>                       | <b>115</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO V.....</b>                                            | <br><b>117</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                               | <b>119</b>     |

## **CAPÍTULO I**



## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são alternativas à escassez de alimentos, sendo sua biomassa rica em nutrientes importantes na dieta humana, como proteínas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas, pigmentos antioxidantes, entre outros compostos (RIZWAN et al., 2018). As microalgas *Chlorella* e *Spirulina* possuem certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizadas como alimento, sem fornecer riscos à saúde (NABAVI; SILVA, 2019). As microalgas podem ser consideradas também como alternativa promissora na produção de combustíveis renováveis. Estes micro-organismos fotossintéticos produzem biomassa que pode ser utilizada na obtenção de biodiesel, bioetanol, entre outros biocombustíveis (CHEN et al., 2018; NAGARAJAN et al., 2017; SILVA; BERTUCCO, 2016). Paralelamente, a partir da fotossíntese, estes micro-organismos são capazes de realizar a mitigação biológica de CO<sub>2</sub> (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016), o principal gás causador do efeito estufa.

Apesar dos inúmeros benefícios das microalgas, seus cultivos ainda têm alguns impasses ambientais que necessitam ser melhorados do ponto de vista da sustentabilidade. Por exemplo, em cultivos de microalgas sob condições controladas, para obtenção de produtos de alto valor agregado, há um grande gasto energético proveniente das fontes de luz artificiais utilizadas, geralmente lâmpadas fluorescentes (SCHULZE et al., 2014). Por outro lado, em cultivos em grande escala, o principal inconveniente é o gasto com água, que alcança cerca de 1 ton métrica para a produção de 1 kg de biomassa (GUIEYSSE; BÉCHET; SHILTON, 2013; MURPHY; ALLEN, 2011).

A substituição de lâmpadas fluorescentes por diodos emissores de luz (LEDs) em cultivos de microalgas tem sido avaliada nos últimos anos em diferentes pesquisas (IZADPANAH et al., 2018; PRATES et al., 2018; SIRISUK et al., 2018). LEDs são considerados fontes de luz ambientalmente corretos, pois apresentam gasto energético reduzido, maior durabilidade e ausência de materiais tóxicos em sua composição (ATTA et al., 2013; CARVALHO et al., 2011). Além disso, sua luz é monocromática, o que pode aumentar a eficiência de captação energética pelos pigmentos fotossintéticos presentes nas microalgas, influenciando nas produtividades de biomassa e de metabólitos de interesse (SCHULZE et al., 2014). Aplicações de LEDs em cultivos de microalgas são relativamente recentes e ainda existem lacunas a serem pesquisadas. Dentre elas, não é encontrada na literatura a utilização de LEDs em cultivos de espécies como *Chlorella fusca* e *Synechococcus nidulans*.

A fim de contornar o problema da quantidade de água doce gasta nos cultivos, muitas pesquisas têm avaliado a utilização de águas alternativas, como as residuais e as salinas (ARORA et al., 2019; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Água salobra subterrânea, abundante na região Nordeste brasileira, não foi estudada como fonte hídrica nos cultivos microalgais. A utilização desta água nos cultivos de microalgas é uma alternativa promissora, pois, além de fonte hídrica, a água salobra pode ser também fonte de nutrientes importantes ao metabolismo microalgal ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nitrogênio, fósforo, etc). Desta forma, custos com nutrientes durante o cultivo podem ser reduzidos. Paralelamente, a partir do consumo de sais presentes no meio, as microalgas podem ser capazes de dessalinizar a água salobra e torná-la disponível para aplicação na agricultura ou para o consumo animal ou humano (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

Dentro do contexto abordado, visando a sustentabilidade, a presente Tese teve como objetivo avaliar a utilização de LEDs como fonte energética e água salobra como fonte hídrica e nutricional em cultivos de microalgas. Nas pesquisas com LEDs foram avaliadas 2 cepas de microalgas, 5 faixas espectrais e diferentes intensidades luminosas. Nos ensaios com água salobra, uma cepa de microalga foi utilizada e diferentes suplementações de nutrientes no meio foram avaliadas. Além disso, foram realizados cultivos utilizando água salobra em escala ampliada e sob condições não controladas. As principais respostas avaliadas nas pesquisas foram os parâmetros de crescimento e a composição da biomassa produzida.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de LEDs como fonte energética e água salobra como fonte hídrica e nutricional nos cultivos de microalgas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de diferentes intensidades luminosas de LEDs azuis nos parâmetros de crescimento dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, bem como na composição bioquímica das biomassas produzidas;

Avaliar o efeito da aplicação de diferentes faixas espectrais de LEDs nos parâmetros de crescimento dos cultivos e na composição bioquímica das biomassas produzidas de *Synechococcus nidulans* LEB 115;

Definir a melhor concentração de suplementação nutricional em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra, com base nos parâmetros de crescimento e na composição bioquímica das biomassas produzidas;

Cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando água salobra na melhor condição de suplementação nutricional obtida, em escala ampliada e sob condições não controladas, avaliando os parâmetros de crescimento e a composição bioquímica das biomassas produzidas.



## **CAPÍTULO II**



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 MICROALGAS

As microalgas são micro-organismos (1 a 10 µm de tamanho) fotossintéticos, com grande diversidade de espécies, distinguindo-se entre si principalmente em aspectos de pigmentação e estrutura celular. Estes seres podem ser divididos, basicamente, em procariontes (*Cyanophyta* e *Prochlorophyta*) e eucariontes (*Chlorophyta*, *Euglenophyta* e *Rhodophyta*), entre outras divisões taxonômicas. As microalgas podem habitar os ecossistemas mais diversos, mas a maioria é encontrada em ambientes aquáticos (TOMASELLI, 2004).

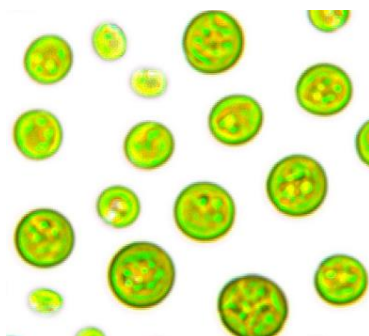
Com base em registros fósseis, as microalgas do grupo das cianobactérias são consideradas os organismos mais antigos da Terra, tendo sua origem estimada em 3,5 a 2,7 bilhões de anos A.C. Acredita-se que estes micro-organismos desempenharam papel determinante na evolução da atmosfera oxidante do planeta (SCHOPF; POSTGATE; WALTER, 2000). O primeiro cultivo unialgal foi realizado por Beijerinck em 1890 com *Chlorella vulgaris* (LOURENÇO, 2006). O cultivo em grande escala começou a ser estudado entre 1948 a 1950, em Stanford, na Califórnia, com intuito de utilizar técnicas laboratoriais para o cultivo em escala comercial (BOROWITZKA, 1999). O cultivo de microalgas em grande escala iniciou nos anos 1960, no Japão, com cultivo de *Chlorella* e, em seguida, nos anos 1970 – 1990, a microalga *Spirulina* começou a ser cultivada no México, Estados Unidos e China (LOURENÇO, 2006). Nos últimos 30 anos a indústria de microalgas apresentou grandes avanços biotecnológicos.

As microalgas podem apresentar composição relevante em proteínas, ácidos graxos e aminoácidos essenciais, pigmentos, minerais e vitaminas (KAY, 1991). Além disso, sob diferentes condições de cultivo, certas espécies podem ser induzidas a acumular maior quantidade de algumas destas biomoléculas de interesse, apresentando, desta maneira, vasta aplicabilidade industrial e comercial (PRATES et al., 2018; SUN et al., 2018). As principais vantagens em cultivar microalgas para obtenção de diferentes produtos são sua elevada produção de biomassa por área, utilização de locais inóspitos para o cultivo, não competindo com áreas destinadas à agricultura, cultivo não segue regime de safra, com a possibilidade de produção de biomassa o ano todo, utilização de águas residuais como meio de cultivo, entre outras (MANIRAFASHA et al., 2016).

### 3.1.1 *Chlorella*

O gênero *Chlorella* (Figura 1) é pertencente ao grupo das clorófitas, conhecidas como “algas verdes”, podendo ser encontrado em diversos habitats, como ambientes salobros e marinhos, porém, a grande maioria ocorre em águas doces. Esta microalga é caracterizada por ser eucarionte, unicelular microscópica, de formato esférico, globular ou elipsoidal, com diâmetro que varia de 2,0 a 8,0  $\mu\text{m}$ . A reprodução de *Chlorella* pode ser por divisão binária ou esporos assexuais. As células são desprovidas de flagelos e contêm um núcleo localizado centralmente (KAY, 1991).

**Figura 1** – Microfotografia de *Chlorella vulgaris*



FONTE: [www.algomed.de](http://www.algomed.de)

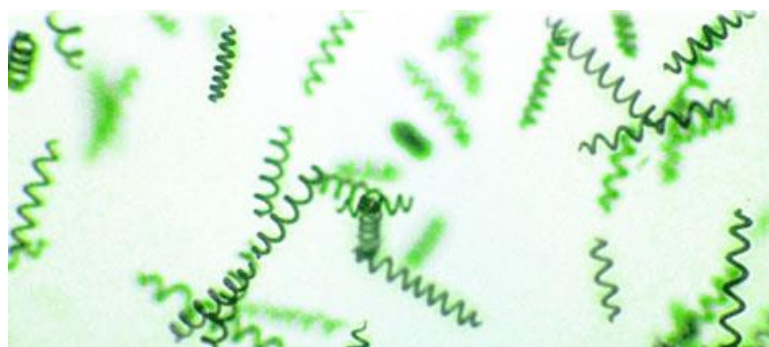
Devido ao elevado teor proteico e a presença de carotenoides, vitaminas e minerais em sua biomassa, *Chlorella* tem sido amplamente produzida como fonte de alimentos saudáveis na Alemanha, China, Japão e vários outros países. Esta microalga possui certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento, atendendo os padrões de higiene, sem apresentar risco à saúde (NABAVI; SILVA, 2019). Estudos comprovam que a suplementação da dieta humana com biomassa de *Chlorella* reduz níveis de pressão alta e colesterol, além de auxiliar no combate de outras doenças (MERCHANT; ANDRÉ, 2001).

Devido à crise energética e ao interesse público em combustíveis renováveis, *Chlorella* também tem sido descrita como potencial gênero na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (LEE; OH; LEE, 2015; MATHIMANI et al., 2017). Outras possibilidades de aplicação desta microalga são para biofixação de  $\text{CO}_2$  (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; ROSA; MORAIS; COSTA, 2018), produção de polihidroxibutirato (PHB) (CASSURIAGA et al., 2018), biorremediação (ZNAD et al., 2018), entre outras.

### 3.1.2 *Spirulina*

O gênero *Spirulina* (Figura 2) é pertencente ao grupo das cianobactérias, conhecidas como “algas verde-azuladas”. As espécies deste gênero apresentam organização celular procariótica, são filamentosas, com diâmetro entre 6 e 12  $\mu\text{m}$  e comprimento entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ , e se dispõem na forma espiralada (VONSHAK, 1997). As células são individualizadas e a reprodução ocorre por divisão binária (TOMASELLI, 1997).

**Figura 2** – Microfotografia de *Spirulina platensis*



FONTE: [www.earthrise.com](http://www.earthrise.com)

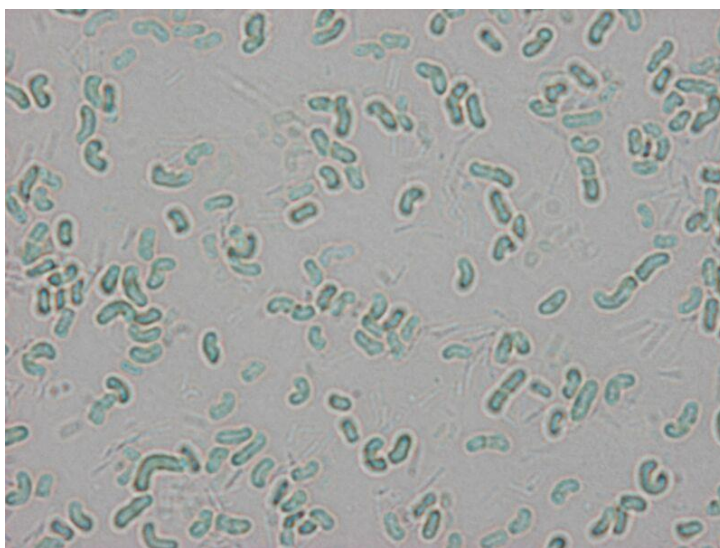
A microalga *Spirulina*, assim como *Chlorella*, pode ser utilizada como suplemento alimentar humano e animal, sem fornecer riscos à saúde, possuindo certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*). *Spirulina* é considerada um alimento completo, apresentando proteínas (60-70%), carboidratos (20%), lipídios (8%), além de minerais (ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco), vitaminas (provitamina A, vitamina C, vitamina E), pigmentos (clorofila a, ficocianina e carotenoides), compostos fenólicos, ácido  $\gamma$ -linolênico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY et al., 2008; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Além da utilização como suplemento alimentar, *Spirulina* pode ser aplicada na produção de cosméticos (REBOLEIRA et al., 2019; SAHIN, 2018), medicamentos (HOSSEINI; KHOSRAV; MOZAFARI, 2013; SZUBERT; WIGLUSZ; MARZEC, 2018) e biocombustíveis (BRAGA et al., 2019; RAJAK; VERMA, 2018). Estudos também comprovam o potencial de utilização desta microalga no tratamento de águas residuais (SANKARAN; PREMALATHA, 2018; ZHOU et al., 2017b) e na biofixação de  $\text{CO}_2$  antropogênico (CARDIAS; MORAIS; COSTA, 2018; DUARTE et al., 2017).

### 3.1.3 *Synechococcus*

O gênero *Synechococcus* (Figura 3) também é pertencente ao grupo das cianobactérias. As espécies deste gênero apresentam organização celular procariótica, formato cocóide, são unicelulares, com tamanho variando de 0,8 a 1,5  $\mu\text{m}$ . A reprodução de *Synechococcus* é assexuada, por fissão binária, semelhante à das bactérias (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001).

**Figura 3** – Microfotografia de *Synechococcus elongatus*



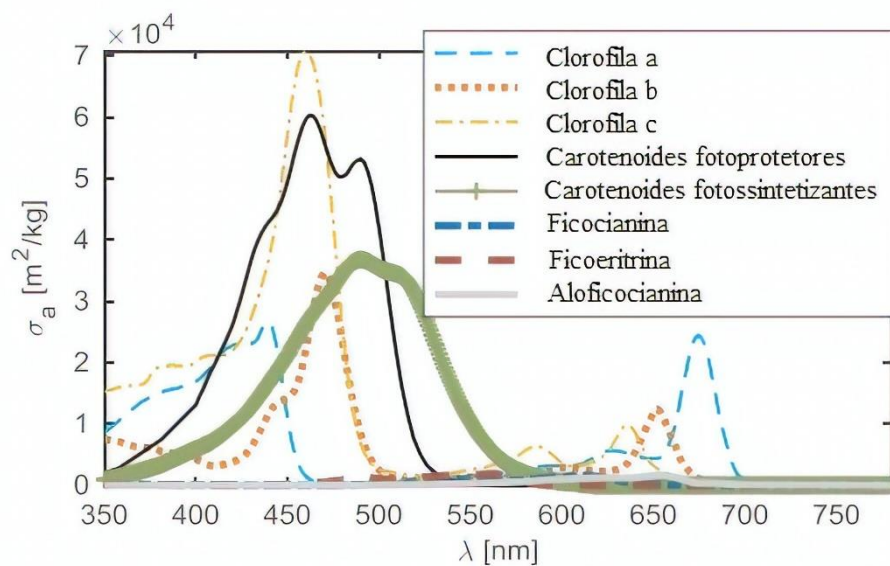
FONTE: [www.ecotox.ibot.cas.cz](http://www.ecotox.ibot.cas.cz)

As microalgas do gênero *Synechococcus* são importantes contribuintes para a produção primária nos oceanos do mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 39% da produção primária planctônica total (MOISAN; BLATTNER; MAKINEN, 2010). *Synechococcus* apresenta em sua composição cerca de 60% de proteínas, 15% de lipídios e 10% de carboidratos (DUARTE et al., 2017). Os pigmentos presentes nesta microalga (carotenoides, clorofila *a* e ficobiliproteínas) podem ter aplicações em indústrias cosméticas e farmacêuticas (CHEW et al., 2017). Estudos têm demonstrado o potencial da aplicação desta microalga na produção de biodiesel (MASHAYEKHI et al., 2017; SILVA et al., 2014), bioetanol (CHOW et al., 2014), tratamento de águas residuais (SRIMONGKOL et al., 2019) e na mitigação biológica de CO<sub>2</sub> oriundo da queima de carvão mineral para geração de energia (DUARTE et al., 2017; RADMANN et al., 2011; TAVAKOLI; YEGANI; MORTEZAEIKIA, 2016).

### 3.2 FONTE DE LUZ NOS CULTIVOS DE MICROALGAS

A luz é um dos parâmetros mais importantes para a atividade fotossintética em micro-organismos fototróficos, fotoheterotróficos e mixotróficos. A luz utilizada pelas microalgas como fonte energética encontra-se na faixa espectral da radiação solar de 400 a 700 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (PAR). A luz é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes, classificados em clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, sendo que cada um difere em sua composição química e apresenta diferente capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda (Figura 4) (LEHMUSKERO; CHAUTON; BOSTROM, 2018; SUH; LEE, 2003).

**Figura 4** – Espectros de absorção energética de diferentes pigmentos encontrados em microalgas



FONTE: Adaptada de Lehmuskero, Chauton e Bostrom (2018)

Sob condições *outdoor*, luz solar é geralmente a fonte energética utilizada nos cultivos de microalgas. As principais vantagens desta fonte luminosa são sua abundância e custo reduzido. Em contrapartida, os principais inconvenientes são a variância em sua intensidade, dependência do clima e da estação do ano. Em dias chuvosos, a intensidade luminosa pode ser insuficiente para os cultivos, enquanto que em dias ensolarados de verão, por exemplo, pode haver excesso de luz e, conseqüentemente, ocasionar fotoinibição celular (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007). Na obtenção de produtos de alto valor agregado geralmente são utilizadas luzes artificiais, com melhor controle do fluxo de fótons e, conseqüentemente, maior

produtividade do produto de interesse (BLANKEN et al., 2013). As principais fontes de luz artificiais utilizadas em cultivos de microalgas são lâmpadas fluorescentes, incandescentes e, mais recentemente, de diodos emissores de luz (LEDs) (SCHULZE et al., 2014).

### **3.2.1 Diodos emissores de luz (LEDs) em cultivo de microalgas**

O primeiro LED foi criado em 1927, porém, apenas a partir da década de 1960 que esta fonte luminosa começou a ser utilizada, principalmente em aparelhos eletrônicos. A partir de 2012, aproximadamente, os LEDs tornaram-se uma alternativa economicamente viável de iluminação e passaram a ser utilizados em diversos setores, tornando-se uma das fontes de luz mais importantes no mundo (SCHULZE et al., 2014). A comunidade científica tem avaliado, nos últimos anos, a aplicação dos LEDs como fonte energética também em cultivos de microalgas. Esta fonte de luz é composta por semicondutores que, quando energizados, emitem luz visível monocromática, produzida pelas interações energéticas do elétron (SCHULZE et al., 2014).

As principais vantagens dos LEDs são sua durabilidade (~ 50.000 h), cerca de 941% superior às fontes tradicionais, consumo energético reduzido, ausência de metais pesados na composição e a leveza e tamanho reduzido, ideal para inserção dentro de fotobiorreatores (ATTA et al., 2013; CARVALHO et al., 2011; LEE; PALSON, 1994). A monocromaticidade é outro aspecto positivo dos LEDs, pois, deste modo, há um melhor controle do fluxo de fótons, o que pode interferir quantitativamente e qualitativamente as biomassas de microalgas (SCHULZE et al., 2014).

Os principais parâmetros dos LEDs avaliados nos cultivos de microalgas são comprimento de onda, intensidade luminosa e fotoperíodo. Os comprimentos de onda utilizados nos cultivos compreendem as faixas espectrais do amarelo (~ 590 nm), azul (~ 470 nm), verde (~ 525 nm), vermelho (~ 660 nm) e rosa (~ 440 nm) (MARKOU, 2014). O comprimento de onda ideal para os cultivos depende da composição de pigmentos de cada espécie (SCHULZE et al., 2014). A partir da Figura 4, por exemplo, observa-se que para as espécies que possuem clorofila a os comprimentos de onda mais importantes são em torno de 440 e 660 nm (rosa e vermelho, respectivamente), enquanto que para carotenoides o melhor comprimento de onda está na faixa de 470 nm (azul). Em cianobactérias, por exemplo, que possuem ficobiliproteínas, os comprimentos de onda importantes estão na faixa de 620 nm (ficocianina), 650 nm (aloficocianina) e 565 nm (ficoeritrina) (YAMANAKA; GLAZER; WILLIAMS, 1978). Deste

modo, para estes pigmentos a faixa espectral ideal está entre o amarelo, verde e vermelho (SCHULZE et al., 2014).

A intensidade luminosa ideal dos LEDs aplicada nos cultivos varia entre as diferentes espécies e, quando fornecida na quantidade adequada, proporciona um crescimento celular ótimo (MOHSENPOUR; RICHARDS; WILLOUGHBY, 2012). Quando a intensidade de luz é excessiva, pode ocorrer fenômenos de fotooxidação e fotoinibição, prejudicando, assim, a produtividade de biomassa dos cultivos. Por outro lado, intensidade de luz abaixo do nível ideal para os cultivos também limita a multiplicação celular (LOERA-QUEZADA; ANGELES; OLGUÍN, 2011). De modo geral, a faixa de intensidade de luz utilizada na maioria dos cultivos de microalgas situa-se na faixa de 50 a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ATTA et al., 2013; RA et al., 2016; WENSEL et al., 2014). Os fotoperíodos, periodicidade do suprimento de luz, também influenciam a produção de biomassa, sendo os mais estudados 12h claro/12h escuro, 18h claro/6h escuro e 24h claro/0h escuro (PRATES et al., 2018; SIRISUK et al., 2018; TEO et al., 2014).

LEDs amarelos aumentaram a produção de clorofila e de biomassa em cultivos de *Spirulina* e *Chlorella*, respectivamente (CHEN et al., 2010; HULTBERG et al., 2014). Em pesquisas utilizando LEDs azuis como fonte energética em cultivos de microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Nannochloropsis* e *Tetraselmis* foi observado aumento na produção de biomassa e no teor lipídico (IZADPANAHI et al., 2018; RA et al., 2016; TEO et al., 2014). Além disso, a aplicação de LEDs azuis proporcionou acúmulo de carotenoides em gêneros de *Dunaliella* e *Haematococcus* (FU et al., 2013; KATSUDA et al., 2004). LEDs azuis são bastante energéticos e, geralmente, esta energia é maior do que a necessária para a realização da fotossíntese, o que pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) prejudiciais às células. Deste modo, visando a proteção celular, as microalgas podem acumular pigmentos fotoprotetores, como os carotenoides (FU et al., 2013; JAHNS; HOLZWARTH, 2012).

LEDs verdes têm sido relacionados com o aumento lipídico em cultivos de microalgas dos gêneros *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis* e *Phaeodactylum* (RA et al., 2016; SIRISUK et al., 2018). Além disso, Prates et al. (2018) reportou que a utilização de LEDs verdes em cultivos de *Spirulina* aumentou a concentração de ficocianina cerca de 2,8 vezes. LEDs vermelhos em cultivos de diferentes espécies da microalga do gênero *Nannochloropsis* aumentaram a produção de biomassa e de lipídios (KIM et al., 2014; MA et al., 2018a; SIRISUK et al., 2018). Na microalga *Spirulina*, LEDs vermelhos e rosas proporcionaram aumento de biomassa (MARKOU, 2014; PRATES et al., 2018).

Nos últimos anos, as pesquisas utilizando LEDs em cultivos de microalgas aumentaram consideravelmente. No entanto, ainda existem muitas lacunas neste tema. Apesar de haver estudos com algumas espécies de *Chlorella*, utilizando *Chlorella fusca* não foram encontrados relatos. A aplicação de LEDs em cultivos de microalga do gênero *Synechococcus* não foi encontrada na literatura. Pesquisas com aplicação de LEDs rosas, faixa espectral importante para a captação energética por clorofila a, são escassos também e necessitam ser investigados.

### 3.3 MEIO DE CULTIVO MICROALGAL

Durante o cultivo de microalgas, para o crescimento celular ótimo, uma série de nutrientes são necessários. Entre as espécies, ocorrem variações relacionadas principalmente à quantidade destes nutrientes que devem estar presentes no meio de cultivo (LOURENÇO, 2006). De acordo com as fontes de energia e carbono utilizadas, os cultivos podem ser classificados em fototróficos, heterotróficos, fotoheterotróficos ou mixotróficos (Tabela 1) (YEH; CHANG, 2012).

**Tabela 1** – Fontes de energia e carbono para as diferentes condições de cultivo microalgal.

| Condições de cultivo | Fonte de energia       | Fonte de carbono              |
|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Fototrófico          | Luz                    | Carbono inorgânico            |
| Heterotrófico        | Carbono orgânico       | Carbono orgânico              |
| Fotoheterotrófico    | Luz                    | Carbono orgânico              |
| Mixotrófico          | Luz e carbono orgânico | Carbono inorgânico e orgânico |

FONTE: Adaptada de Yeh e Chang (2012)

Os nutrientes requeridos em maior quantidade são carbono, nitrogênio e fósforo. A fonte de carbono é essencial para o cultivo de microalgas, utilizada pelas células para a produção de ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios, proteínas e vitaminas, representando cerca de 50% da biomassa seca (LOURENÇO, 2006). O nitrogênio é componente de substâncias estruturais da célula, como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobiliproteínas), representando cerca de 7% da biomassa seca. O fósforo tem como funções fundamentais nas células transferir energia e constituir moléculas estruturais, como ATP, açúcares, fosfatos, ácidos nucleicos e fosfoenzimas, representando cerca de 1% da biomassa seca (GROBBELAAR, 2004; LOURENÇO, 2006).

Além dos elementos citados, outros macronutrientes são requeridos durante os cultivos, como oxigênio, hidrogênio, cálcio, magnésio, enxofre, potássio e sódio. Micronutrientes como ferro, manganês, molibdênio e cobalto também são necessários no cultivo de algumas espécies e têm como principal função participar das estruturas e de atividades enzimáticas, como síntese de ácidos graxos, fixação do nitrogênio, respiração e fotossíntese. Algumas espécies necessitam também de quantidades pequenas de certas vitaminas (LOURENÇO, 2006). O meio de cultivo pode ser sintético, com composição qualitativa e quantitativa definida, ou complexo, com composição variada e custo reduzido (geralmente resíduos industriais) (PLEISSNER et al., 2015; SIBI, 2015).

### 3.3.1 Água salobra em cultivo de microalgas

O Semiárido Brasileiro, que engloba praticamente todo o Nordeste, possui uma grande área de manancial de água salobra subterrânea, com salinidade intermédia entre as águas salgada e doce (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). A água salobra é originada a partir da água de chuvas que, ao percolarem entre rochas e fissuras, carregam seus sais minerais, originando aquíferos subterrâneos com águas inaptas ao consumo humano e à agricultura (CIRILO; MONTENEGRO; CAMPOS, 2010).

Considerando a problemática da falta de água adequada para o consumo humano no semiárido brasileiro e a abundância de água salobra nesta região, o governo brasileiro lançou um programa em 2004, denominado “água doce”, em vigor até os dias atuais. O objetivo principal do programa é instalar usinas dessalinizadoras em várias regiões do Nordeste, tornando água salobra adequada ao consumo humano (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004). Apesar do êxito do programa, a tecnologia aplicada tem como principal inconveniente o alto custo de implantação e manutenção. Além disso, a partir deste processo, geram-se grandes quantidades de concentrados salinos residuais que, sem um destino adequado, tornam-se um problema ambiental (VOLKMANN et al., 2007).

A água salobra apresenta em sua composição sais minerais ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), nitrogênio, fósforo, entre outros elementos traços ( $\text{Si}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ). A utilização desta água como fonte hídrica nos cultivos de microalgas pode ser uma alternativa ambientalmente sustentável e, ao mesmo tempo, fonte de nutrientes importantes para o metabolismo celular (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). Sendo assim, ao utilizar esta água nos cultivos, as microalgas podem ser capazes de consumir seus nutrientes e, em contrapartida, dessalinizar a água, tornando-a disponível para aplicação na agricultura, no consumo animal ou até mesmo

para o consumo humano. Paralelamente, biomassa de microalga pode ser produzida para aplicação em diversos fins biotecnológicos, com possibilidade de geração de renda à comunidade local. Deste modo, considerando também que a dessalinização a partir de cultivo de microalgas não gera resíduo salino, este processo pode ser uma alternativa viável tanto economicamente, como ambientalmente (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

Na literatura, apesar de haver publicações utilizando água salina em cultivos de microalgas (ARORA et al., 2019; MEHTA et al., 2018), a aplicação de água salobra e, mais especificamente, água salobra do Nordeste brasileiro não foi ainda relatada. Estudos avaliaram a utilização de água residual do processo de dessalinização da água salobra (concentrado salino - CS), proveniente do semiárido brasileiro, no cultivo de algumas espécies microalgais. A espécie *Spirulina platensis* cultivada com substituição de 50% do meio de cultivo padrão por CS apresentou concentração de biomassa máxima cerca de 91,5% vezes maior ao ensaio controle (100% de meio de cultivo padrão Paoletti). Além disso, a biomassa obtida neste cultivo apresentou 56,2% de proteínas e entre os aminoácidos quantificados, 57,60% foram identificados como essenciais (VOLKMANN et al., 2007). O cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* apresentou concentração de biomassa máxima 1,4 vezes maior no cultivo com 75% de CS e 25% de meio de cultivo F/2, quando comparado ao cultivo controle (100% de meio padrão F/2). Além disso, verificou-se que as concentrações lipídicas e de ácidos graxos saturados aumentaram proporcionalmente com a concentração de CS utilizada no meio (MATOS et al., 2015a). Cultivos de *Chlorella vulgaris* utilizando 25% de CS e 75% de meio de cultivo BBM apresentaram parâmetros de crescimento semelhantes ao cultivo controle (100% de meio padrão BBM). Neste mesmo estudo, os autores observaram redução na concentração de proteínas de 51,6% para 15,7% quando a concentração de CS aumentou de 25% para 55% nos cultivos (MATOS et al., 2015b).

### 3.4 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) trabalha, desde 1996, com a linha de pesquisa voltada a cultivo de microalgas. Desde então, mais de 200 artigos nacionais e internacionais foram publicados pela equipe com temas relacionados a microalgas. Entre os projetos que já foram desenvolvidos ou que ainda estão em desenvolvimento, destacam-se os de produção de alimentos enriquecidos com *Spirulina*, biofixação de CO<sub>2</sub> oriundo de termelétrica à carvão, aplicação de campos magnéticos nos cultivos, síntese de biopolímeros, produção de biodiesel, nanoencapsulação de hidrolisados

proteicos de biomassa, obtenção de biosurfactante e compostos funcionais, fotoestimulação de metabólitos de interesse, entre outros.

O estudo da aplicação de LEDs em cultivos de microalgas foi iniciado no laboratório em 2008 a partir de um projeto de pesquisa aprovado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O projeto intitulado “Fotoestimulação da produção do biocorante ficocianina” fez parte de temas de pesquisa de diferentes bolsistas de pós-doutorado e de 1 tese de doutorado, gerando artigos científicos em revistas internacionais e trabalhos em congressos nacionais e internacionais. Nestes trabalhos, a principal microalga avaliada foi *Spirulina* sp. LEB 18. Diferentes faixas espectrais, intensidades de luz e fotoperíodos dos LEDs foram avaliados nos cultivos. Entre as principais respostas já estudadas para a microalga citada, tem-se os parâmetros de crescimento, composição bioquímica e o teor de ficocianina.

O estudo da utilização de água salobra no cultivo de microalgas é recente no laboratório e faz parte de uma parceria com a Universidade Federal da Bahia (UFBA). Considerando a problemática da seca e da fome no Sertão Nordestino Brasileiro, a parceria tem como principais objetivos: 1) dessalinizar a água salobra a partir do cultivo de microalgas, tornando-a apta para o consumo na região e 2) produzir biomassa para ser utilizada como suplemento alimentar pela população nordestina. Estudos preliminares comparativos dos grupos de pesquisa (MCTI – SECIS, Inclusão Social CGAP, Processo 01200.005005/2014-49), demonstram que a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, nativa do Rio Grande do Sul, cultivada nas condições climáticas do Nordeste, resulta em alto teor proteico e de ficocianina, um pigmento azul de alto valor comercial (JESUS et al., 2018).



### **CAPÍTULO III**



#### 4. DESENVOLVIMENTO DA TESE

A presente tese foi desenvolvida em 2 etapas e dividida em 4 artigos científicos. Os primeiros 2 artigos, referentes a aplicação de LEDs em cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, foram desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande (FURG – Rio Grande – Brasil). Os 2 últimos artigos foram desenvolvidos na Universidade Federal da Bahia (UFBA – Salvador – Brasil) e avaliaram a utilização de água salobra no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18.

O primeiro artigo, intitulado “Diodos emissores de luz (LEDs) azuis como fonte de energia em cultivos de *Chlorella fusca* e *Synechococcus nidulans*” foi publicado na revista Bioresource Technology, em 23 de setembro de 2017 (volume 247, páginas 1242-1245). Neste estudo preliminar, diferentes intensidades luminosas de LEDs azuis foram avaliadas nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. As respostas obtidas nos ensaios foram parâmetros de crescimento e os teores de lipídios, clorofilas e carotenoides.

O segundo artigo tem como título “Diodos emissores de luz (LEDs) em cultivo de *Synechococcus nidulans*: efeito no crescimento e na composição bioquímica” e parte dos resultados foi aceito para publicação na revista Bioresource Technology em 2019 (DOI: 10.1016/j.biortech.2019.02.009). Neste estudo, diferentes faixas espectrais (compreendidas nas cores amarela, azul, verde, vermelha e rosa) foram avaliadas nos cultivos da microalga *Synechococcus nidulans*. As principais respostas obtidas nos ensaios foram parâmetros de crescimento e os teores de proteínas, carboidratos e lipídios.

O terceiro artigo tem como título “Água salobra em cultivos de *Spirulina*: potencial alternativa na produção de biomassa e carboidratos”. Neste estudo, avaliou-se a utilização de água salobra como fonte de água e de nutrientes no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Deste modo, utilizou-se 100% de água salobra nos cultivos, com suplementação de diferentes concentrações dos nutrientes do meio de cultivo padrão comumente utilizado para esta microalga. As respostas avaliadas foram parâmetros de crescimento e teores de proteínas, carboidratos, cinzas, lipídios e ácidos graxos.

No quarto artigo, “Cultivo de *Spirulina* sob condições não controladas utilizando água salobra”, os melhores resultados obtidos no terceiro artigo foram reproduzidos em escala ampliada, utilizando *raceway* de 200 L, sob condições não controladas de cultivo. As respostas avaliadas foram parâmetros de crescimento e teores de proteínas, carboidratos, cinzas e lipídios.



## **ARTIGO 1**

DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) AZUIS COMO FONTE DE ENERGIA EM  
CULTIVOS DE *Chlorella fusca* E *Synechococcus nidulans*



DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) AZUIS COMO FONTE DE ENERGIA EM  
CULTIVOS DE *Chlorella fusca* E *Synechococcus nidulans*

**RESUMO**

Os diodos emissores de luz (LEDs) possuem bandas estreitas de comprimento de onda que podem influenciar quantitativamente e qualitativamente a produção de biomassa durante o cultivo de microalgas. Este estudo foi pioneiro na avaliação de LEDs azuis como fonte energética nos cultivos de *Chlorella fusca* e *Synechococcus nidulans*. LEDs azuis aumentaram em 80% a velocidade específica máxima de crescimento celular em cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115, quando comparados com a fonte luminosa comumente aplicada nos cultivos (fluorescente). Além disso, LEDs azuis proporcionaram acúmulo lipídico em células de *Chlorella fusca* LEB 111, obtendo-se concentrações de até 23% ( $\text{m m}^{-1}$ ) desta biomolécula. Clorofilas e carotenoides foram fotoestimulados proporcionalmente ao aumento da intensidade luminosa dos LEDs. Quando a intensidade dos LEDs azuis aumentou de 50 para 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a biomassa acumulou até 4,5 e 2,4 vezes mais clorofilas e carotenoides, respectivamente. A partir deste estudo, foi demonstrado o potencial dos LEDs azuis como fonte de luz ambientalmente correta para estimular a produção de biomassa microalgal e de seus metabólitos de interesse.

Palavras-chave: Clorófitas. Cianobactérias. Clorofilas. Carotenoides. Intensidade luminosa. Lipídios.



## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido amplamente estudadas e comercializadas nos últimos anos devido aos seus reconhecidos benefícios. A fração lipídica da biomassa de microalgas contém ácidos graxos essenciais que desempenham papel importante na dieta humana (DIÁZ et al., 2017). Além disso, essas biomoléculas podem ser convertidas em biodiesel (HO et al., 2013; ZHOU et al., 2017a). As microalgas podem apresentar três classes de pigmentos naturais: carotenoides, clorofilas e ficobiliproteínas. Entre as possíveis aplicações desses pigmentos, destaca-se a utilização em indústrias alimentícias, biotecnológicas, cosméticas e farmacêuticas (CHEW et al., 2017).

A intensificação do fenômeno de efeito estufa tem levado pesquisadores a buscar alternativas para reduzir a emissão de gases poluentes para a atmosfera. Considerando que a produção de energia a partir da queima de combustíveis fósseis é uma das principais causas de emissão de gases de efeito estufa para a atmosfera, a eficiência energética desempenha um papel importante na problemática das mudanças climáticas (SUN et al., 2017). Neste contexto, as lâmpadas de luz convencionais estão sendo substituídas por diodos emissores de luz (LEDs), em diferentes setores, devido ao reduzido consumo energético, o que torna essa fonte de iluminação ecologicamente correta. Além disso, outras vantagens dos LEDs são sua durabilidade (~ 50.000 h) e a ausência de compostos tóxicos, como o mercúrio, em sua composição (ATTA et al., 2013; CARVALHO et al., 2011).

No cultivo de microalgas sob condições controladas, luz fluorescente é comumente utilizada como fonte de energia. No entanto, nos últimos anos, pesquisas na área avaliaram a substituição desta fonte de luz por LEDs (ANBALAGAN; SCHWEDE; NEHRENHEIM, 2016; RA et al., 2016; TEO et al., 2014). Além das vantagens mencionadas anteriormente, a aplicação de LEDs nos cultivos de microalgas pode interferir diretamente na quantidade e na qualidade de biomassa produzida, principalmente devido à monocromaticidade de sua luz, o que promove um melhor controle do fluxo de fótons fotossintéticos (SCHULZE et al., 2014). A aplicação de LEDs azuis como fonte de energia em cultivos de diferentes microalgas fotoestimulou a produção de biomassa e de metabólitos de interesse (ATTA et al., 2013; TEO et al., 2014). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação de LEDs azuis como fonte energética alternativa nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, avaliando como respostas os parâmetros de crescimento de crescimento e a produção de metabólitos de interesse.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO

As microalgas estudadas neste artigo foram *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; DUARTE et al., 2017). Ambos os micro-organismos foram isolados de lagoas de decantação de cinzas na Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), na cidade de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil (latitude 24°36'13"S e longitude 52°32'43"W). O meio de cultivo BG 11 (RIPPKA et al., 1979) foi utilizado nos ensaios.

### 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os experimentos foram realizados em duplicata, com concentração de biomassa inicial de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ , até a fase estacionária de crescimento celular. Os fotobiorreatores utilizados foram do tipo *Erlenmeyer*, com volume útil de 800 mL. Os cultivos foram mantidos a 30 °C e a agitação foi realizada em agitador orbital a 120 rpm (New Brunswick Shaker, USA). A fonte de luz utilizada nos ensaios foram os LEDs azuis, dispostos em uma fita, acoplados em um suporte ao redor dos fotobiorreatores (Figura 1). Diferentes intensidades luminosas foram avaliadas nos cultivos ( $50, 100 \text{ e } 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Um ensaio controle foi realizado nas mesmas condições de cultivo, porém sem aplicação de LEDs (CHEN et al., 2010).

**Figura 1** – Suporte com LEDs utilizado durante os ensaios



### 2.3 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E pH

A concentração de biomassa e o pH foram determinados a cada 24h ao longo dos cultivos. A concentração de biomassa foi obtida a partir da densidade ótica dos cultivos, utilizando-se comprimento de onda de 670 nm, com auxílio de um espectrofotômetro digital (Shimadzu UV/VIS UVmin-1240, Japão). Para obtenção da concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), previamente a realização dos ensaios, curvas padrões de ambas as microalgas foram construídas, correlacionando a densidade ótica dos cultivos com a massa de biomassa seca (COSTA et al., 2002). O pH dos cultivos foi medido utilizando um pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça).

### 2.4 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A produtividade de biomassa nos cultivos foi determinada de acordo com a Equação  $P_X = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , sendo  $X_t$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t_0$  (d). A velocidade específica máxima foi obtida a partir de regressão linear aplicada na fase logarítmica de crescimento celular dos cultivos.

### 2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA, DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS E DE PIGMENTOS

Ao final dos ensaios, a biomassa foi recuperada do meio líquido a partir de centrifugação (HITACHI HIMAC CR-GIII, Tóquio - Japão), a 15,000 g por 15 min. Para remoção dos sais provenientes do meio de cultivo, a biomassa foi lavada com água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. Após estes procedimentos, a biomassa foi liofilizada. O teor lipídico foi determinado pela metodologia proposta por Marsh e Weinstein (1966). As determinações das concentrações de clorofila a, b e carotenoides na biomassa foram realizadas a cada 24h. Nestas análises, 1 mL de amostra foi retirada dos cultivos, repassada para um microtubo, centrifugada e o sobrenadante descartado. Após, 1 mL de metanol foi adicionado ao microtubo contendo a biomassa, que permaneceu em contato com o solvente por 24h. Posteriormente, a biomassa foi centrifugada novamente e o sobrenadante, contendo os pigmentos, foi lido em espectrofotômetro digital (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil) nos comprimentos de onda de 652,4, 665,2 e 470 nm,

correspondentes a clorofila a, clorofila b e carotenoides, respectivamente (LIECHTENTHALER, 1987).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância, seguida de teste de Tukey, para comparação entre as médias, com nível de 95% de confiança.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maiores ( $p < 0,05$ ) valores de concentração de biomassa, produtividade e velocidade específica máxima de crescimento celular foram obtidos nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115, utilizando a maior intensidade luminosa testada, de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabela 1). Não há relatos na literatura da aplicação de LEDs em cultivos de espécies de *Synechococcus*. No entanto, comparando os resultados obtidos aos de Duarte et al. (2017), que utilizaram a mesma cepa, porém com luz fluorescente como fonte energética, verifica-se que houve um aumento de 80% na velocidade específica máxima de crescimento celular nos cultivos com LEDs azuis. Além disso, a velocidade específica máxima de crescimento celular obtida no cultivo de *Synechococcus nidulans* LEB 115 foi cerca de 3,3 vezes maior que a velocidade específica máxima obtida no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111.

Apenas os cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115 com intensidades luminosas de 100 e  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram aumento acentuado de concentração de biomassa ao longo do tempo (Figura 2). No restante dos ensaios, a produção de biomassa ao longo dos cultivos foi lenta, atingindo produtividades máximas em torno de  $9,21\text{-}44,16 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Entre as microalgas, a diferença nos resultados obtidos pode estar relacionada principalmente com a composição de pigmentos de cada uma delas. Em cianobactérias, como *Synechococcus nidulans* LEB 115, as células apresentam pigmentos acessórios, denominados ficobiliproteínas, que não são encontrados em células de clorófitas, como *Chlorella fusca* LEB 111. Estes pigmentos absorvem energia na faixa espectral do azul (COWARD et al., 2016). Deste modo, a presença destes pigmentos pode ter aumentado a eficiência de captação energética pelas células de *Synechococcus nidulans* LEB 115, o que justifica os maiores resultados de parâmetros de crescimento terem sido obtidos com esta microalga. Zhao et al. (2015) cultivaram *Chlorella vulgaris* também utilizando LEDs azuis, na intensidade luminosa de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e obtiveram resultados de produtividade máxima de biomassa e velocidade

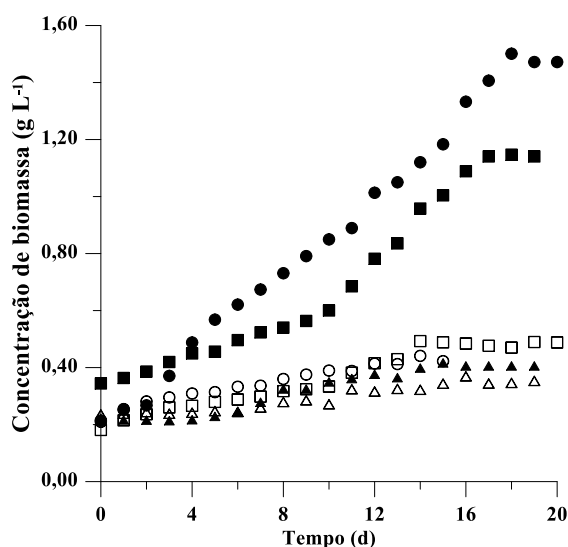
específica máxima de crescimento celular semelhantes ao presente estudo com as mesmas condições de cultivo ( $23,0 \pm 2,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $0,174 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente).

**Tabela 1** – Concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ), produtividade máxima de biomassa ( $P_{\text{máx}}$ ,  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $\text{d}^{-1}$ ) e concentração de lipídios (%  $\text{m m}^{-1}$ ) nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 em diferentes intensidades luminosas de LEDs azuis.

| Intensidade<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | $X_{\text{máx}}$<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | $P_{\text{máx}}$<br>( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) | $\mu_{\text{máx}}$<br>( $\text{d}^{-1}$ ) | Lipídios*<br>(%, $\text{m m}^{-1}$ ) |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Chlorella fusca</i> LEB 111                           |                                           |                                                           |                                           |                                      |
| 50                                                       | $0,38^{b,A} \pm 0,02$                     | $9,21^{b,B} \pm 1,33$                                     | $0,05^{b,A} \pm <0,01$                    | $19,12^{b,A} \pm 1,55$               |
| 100                                                      | $0,50^{a,B} \pm 0,02$                     | $34,82^{a,B} \pm 6,49$                                    | $0,14^{a,A} \pm <0,01$                    | $23,00^{a,A} \pm 1,30$               |
| 150                                                      | $0,44^{a,b,B} \pm 0,03$                   | $44,16^{a,B} \pm 7,88$                                    | $0,06^{b,B} \pm <0,01$                    | $22,97^{a,A} \pm 0,76$               |
| <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115                    |                                           |                                                           |                                           |                                      |
| 50                                                       | $0,41^{c,A} \pm <0,01$                    | $14,25^{c,A} \pm 0,62$                                    | $0,07^{b,A} \pm 0,04$                     | $15,20^{b,B} \pm 0,28$               |
| 100                                                      | $1,15^{b,A} \pm <0,01$                    | $47,80^{b,A} \pm <0,01$                                   | $0,12^{a,b,A} \pm <0,01$                  | $18,24^{a,B} \pm 0,92$               |
| 150                                                      | $1,51^{a,A} \pm 0,06$                     | $78,75^{a,A} \pm 12,07$                                   | $0,20^{a,A} \pm <0,01$                    | $15,06^{b,B} \pm 0,60$               |

Média  $\pm$  desvio padrão. A mesma letra minúscula na mesma coluna, para cada microalga analisada separadamente, indica que não houve diferença entre as diferentes intensidades luminosas utilizadas nos cultivos, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ). Comparando as microalgas entre si: A mesma letra maiúscula, para cada intensidade luminosa, na mesma coluna, indica que não houve diferença entre as respostas avaliadas, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ). \*Base seca.

**Figura 2** – Curvas de concentração de biomassa ao longo do tempo nos cultivos com LEDs azuis nas seguintes condições: *Chlorella fusca* LEB 111 nas intensidades luminosas de ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ) 50, ( $\square$ ) 100 e ( $\circ$ ) 150; *Synechococcus nidulans* LEB 115 nas intensidades luminosas de ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) 50, ( $\blacksquare$ ) 100 e ( $\bullet$ ) 150



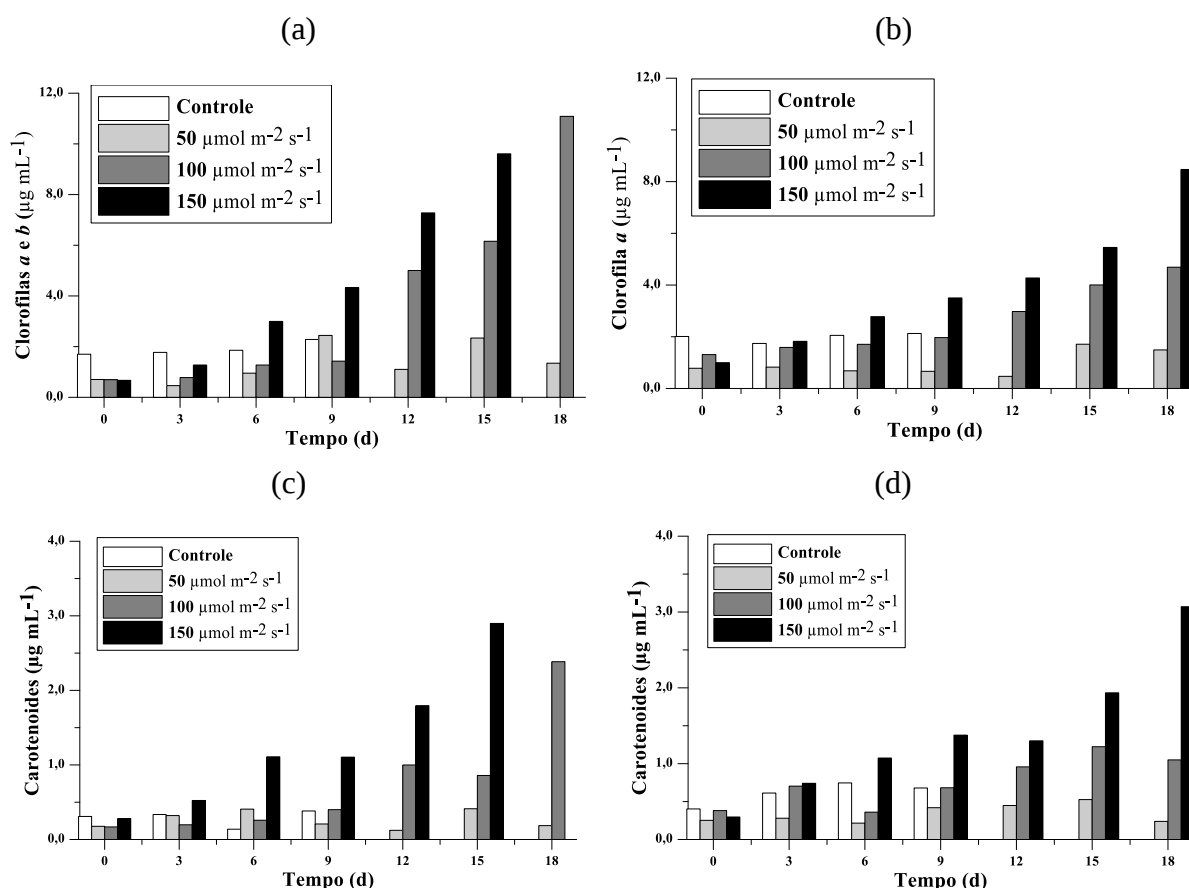
Todos os ensaios foram realizados até a fase estacionária de crescimento celular dos cultivos. Apenas os ensaios utilizando a menor intensidade luminosa ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) apresentaram fase de adaptação fisiológica (Figura 2). Os ensaios controles, sem aplicação de LEDs, não apresentaram crescimento celular ao longo dos dias de cultivo. Deste modo, comprovou-se que o crescimento celular foi proveniente apenas da utilização de LEDs como fonte energética. Os parâmetros de crescimento dos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115 aumentaram proporcionalmente com a elevação da intensidade luminosa dos LEDs. Nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111, as concentrações de biomassa e as produtividades também aumentaram proporcionalmente com a intensidade de luz aplicada. No entanto, o maior ( $p < 0,05$ ) resultado de velocidade específica máxima de crescimento celular foi obtido quando foram aplicados LEDs azuis na intensidade de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O pH, monitorado diariamente, variou entre 9,00-12,00 em cultivos utilizando as maiores intensidades luminosas (100 e  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e 9,00-10,00 em cultivos utilizando intensidade luminosa de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações de lipídios foram obtidas para a cepa de *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando LEDs azuis nas intensidades luminosas de 100 e  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabela 1). Estes resultados foram cerca de 53% maiores aos obtidos por Duarte, Fanka e Costa (2016) para a mesma cepa, em cultivos com luz fluorescente como fonte energética. Atta et al. (2013) cultivaram *Chlorella vulgaris* com LEDs azuis e também observaram aumento no teor lipídico das biomassas, quando comparado com luz fluorescente. Sob condições ótimas de cultivo, as microalgas tendem a utilizar a energia disponível para multiplicação celular. No entanto, em condições desfavoráveis de cultivo, as células tendem a desviar o metabolismo para produção de biomoléculas de reserva energética, como os lipídios (SUBHASH et al., 2014). Os parâmetros de crescimento obtidos dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram valores reduzidos (Tabela 1). Deste modo, a aplicação de LEDs azuis pode ter ocasionado estresse celular, resultando em desvio do metabolismo para acúmulo de lipídios.

Por outro lado, os cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115 obtiveram resultados de parâmetros de crescimento elevados, indicando que a utilização de LEDs azuis como fonte energética não ocasionou estresse celular e, conseqüentemente, o desvio metabólico não foi desviado para a produção de biomoléculas de reserva, que está de acordo com a concentração lipídica obtida para esta cepa. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por Duarte et al. (2017) utilizando a mesma cepa, sob condições ótimas de cultivo. Entre as diferentes intensidades de luz avaliadas nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115, a utilização de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi a que proporcionou o maior ( $p < 0,05$ ) acúmulo lipídico em sua biomassa.

As concentrações de pigmentos fotossintéticos na biomassa permaneceram constantes ao longo do cultivo controle. No entanto, quando LEDs azuis foram utilizados como fonte energética, as concentrações de clorofilas e carotenoides aumentaram ao longo dos cultivos (Figura 3). Além disso, observa-se que quanto maior a intensidade luminosa aplicada nos cultivos, maiores foram as concentrações destes pigmentos nas biomassas. Quando a intensidade de luz foi aumentada de 50 para  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , as concentrações de clorofilas aumentaram cerca de 10 vezes, considerando o último dia de cultivo.

**Figura 3** – Concentrações de pigmentos fotossintéticos durante os cultivos com LEDs azuis sob diferentes condições: (a) e (c): *Chlorella fusca* LEB 111; (b) e (d): *Synechococcus nidulans* LEB 115



Para os carotenoides, o mesmo comportamento foi observado, com aumento de cerca de 6 vezes a concentração deste pigmento quando a intensidade de luz foi aumentada de 50 para  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cheirsilp e Torpee (2012) e Chen et al. (2010) também observaram aumento nas concentrações de pigmentos fotossintéticos de acordo com a elevação da intensidade luminosa aplicada nos cultivos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis*. A aplicação

de LEDs azuis como fonte energética nos cultivos proporcionou aumento cerca de 5 e 3 vezes nos teores de clorofilas e carotenoides, respectivamente, comparado ao cultivo controle.

#### 4 CONCLUSÃO

Os melhores resultados de parâmetros de crescimento nos cultivos utilizando LEDs azuis como fonte energética foram obtidos com a cepa *Synechococcus nidulans* LEB 115, com velocidade específica máxima de crescimento celular de  $0,20 \pm < 0,01 \text{ d}^{-1}$ . A cepa *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com LEDs azuis acumulou até 50% mais lipídios na biomassa do que outros estudos utilizando luz fluorescente. O aumento da intensidade luminosa de 50 para  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , acumulou em até 4,5 e 2,4 vezes mais clorofilas e carotenoides, respectivamente. Além de ser uma fonte energética ambientalmente correta, os LEDs azuis apresentaram potencial na produção de biomassa e de metabólitos de interesse pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBALAGAN, A.; SCHWEDE, S.; NEHRENHEIM, E. Influence of light emitting diodes on indigenous microalgae cultivation in municipal wastewater. **Energy Procedia**, v. 75, p. 786-792, 2016.

ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373-378, 2013.

CARVALHO, A. P.; SILVA, S. O.; BAPTISTA, J. M.; MALCATA, F. X. Light requirements in microalgae photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1275-1288, 2011.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

CHEN, H. B.; WU, J. Y.; WANG, C. F.; LIU, Y. C. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 52-56, 2010.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

COWARD, T.; FUENTES-GRUNEWALD, C.; SILKINA, A.; OATLEY-RADCLIFFE, D. L.; LLEWELLYN, G.; LOVITT, R. W. Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 607-615, 2016.

DÍAZ, M. T.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, C. I.; LAUZURICA, S.; CAÑEQUE, V.; GONZÁLEZ, C.; FUENTE, J. Feeding microalgae increases omega 3 fatty acids of fat deposits and muscles in light lambs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 115-123, 2017.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159-165, 2016.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO<sub>2</sub> mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v.135, p. 191-198, 2013.

LIECHTENTHALER, H. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 239-260, 1987.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipid. **The Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 574-576, 1966.

RA, C. H.; KANG, C. H.; JUNG, J. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 254-261, 2016.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of general microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 422-430, 2014.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789-793, 2014.

SUN, B.; FAN, X.; YE, H.; FAN, H.; QIAN, C.; DRIEL, W. V.; ZHANG, G. A novel lifetime prediction for integrated LED lamps by electronic-thermal simulation. **Reliability Engineering & System Safety**, v. 163, p. 14-21, 2017.

TEO, C. L.; ATTA, M.; BUKHARI, A.; TAISIR, M.; YUSUF, A. M.; IDRIS, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 34-44, 2014.

ZHAO, Y.; SUN, S.; HU, C.; ZANG, H.; XU, J.; PING, L. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various mixed light-emitting diode light wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 338-345, 2015.

ZHOU, D.; QIAO, B.; LI, G.; XUE, S.; YIN, J. Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 609-615, 2017a.

## **ARTIGO 2**

**DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) EM CULTIVO DE *Synechococcus nidulans*:  
EFEITO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA**



DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) EM CULTIVO DE *Synechococcus nidulans*:  
EFEITO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA

**RESUMO**

Diodos emissores de luz (LEDs) têm sido reportados na literatura como potenciais fontes energéticas ecológicas nos cultivos de diferentes microalgas, fotoestimulando a produção de biomassa e de biomoléculas de interesse. Este estudo foi pioneiro na avaliação de diferentes faixas espectrais de LEDs (amarelo, azul, verde, vermelho e rosa) no cultivo de *Synechococcus nidulans*. A maior velocidade específica de crescimento celular foi obtida no cultivo utilizando LEDs rosas como fonte energética ( $0,62 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ ) e foi cerca de 2,63 vezes maior ao cultivo com lâmpadas fluorescentes. Neste cultivo com LEDs rosas, a produção de proteínas foi fotoestimulada cerca de 13,1%, obtendo-se concentração de  $70,41 \pm 0,45\% (\text{m m}^{-1})$ . A ordem decrescente dos resultados de parâmetros de crescimento obtidos em diferentes faixas espectrais de LEDs foi: rosa > verde > amarelo > vermelho > azul. Neste trabalho foi demonstrada a potencialidade da aplicação de LEDs como alternativa energética nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 15, com aumento na produção de biomassa e maior eficiência energética quando comparada a luz fluorescente.

Palavras-chave: Carboidratos. Fonte de luz. Lipídios. Microalgas. Parâmetros de crescimento. Proteínas.



## 1 INTRODUÇÃO

A busca por recursos sustentáveis a fim de atender a demanda crescente da população mundial por alimentos e energia tem recebido crescente atenção da comunidade científica. As microalgas vêm sendo amplamente estudadas para aplicação na alimentação, na produção de biocombustíveis, obtenção de pigmentos, entre outros (BAUER et al., 2017; LUCAS et al., 2018). Entre os fatores que influenciam o crescimento de microalgas, a fonte de luz desempenha um papel importante e é responsável por fornecer energia aos pigmentos fotossintéticos (IZADPANAHA et al., 2018). Em cultivos de microalgas sob condições controladas, geralmente luz fluorescente é utilizada como fonte luminosa. No entanto, esta luz tem como principal desvantagem a baixa eficiência energética, o que pode afetar negativamente a produção de biomassa e de metabólitos de interesse durante os cultivos (SCHULZE et al., 2016).

Os diodos emissores de luz (LEDs) vêm sendo avaliados nos cultivos de microalgas (DUARTE; COSTA, 2018; MA et al., 2018a; TEO et al., 2014). A principal característica desta fonte de luz é a sua faixa espectral estreita, que pode levar a uma maior eficiência de captação energética pelas microalgas e, assim, aumentar a produtividade de biomassa e de seus metabólitos (SCHULZE et al., 2014). Além disso, LEDs possuem outras vantagens adicionais, como durabilidade, tamanho reduzido, não aquecem e não possuem materiais tóxicos em sua composição (GLEMSER et al., 2016).

Pesquisas recentes têm reportado o efeito positivo da utilização de LEDs em cultivos de diferentes microalgas. LEDs amarelos mostraram fotoestimar a produção de clorofila e de biomassa em cultivos de *Spirulina* e *Chlorella*, respectivamente (CHEN et al., 2010; HULTBERG et al., 2014). Pesquisas com LEDs azuis em cultivos de microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Nannochloropsis* e *Tetraselmis* mostraram fotoestimar a produção de biomassa e de lipídios (IZADPANAHA et al., 2018; RA et al., 2016; TEO et al., 2014). LEDs verdes têm sido relacionados com o aumento lipídico em cultivos de microalgas dos gêneros *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis* e *Phaeodactylum* (RA et al., 2016; SIRISUK et al., 2018). Na microalga *Spirulina*, LEDs vermelhos e rosas proporcionaram aumento da concentração de biomassa (MARKOU, 2014; PRATES et al., 2018).

Deste modo, em vista dos benefícios já reportados dos LEDs nos cultivos de microalgas, considerando-se a escassez de estudos avaliando esta fonte de luz nos cultivos de espécies do gênero *Synechococcus*, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes faixas espectrais de LEDs nos parâmetros de crescimento e na composição bioquímica da cepa

*Synechococcus nidulans* LEB 115.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A microalga *Synechococcus nidulans* LEB 115 avaliada no presente trabalho foi isolada de lagoas de decantação de cinzas próximas a uma usina (Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota, Brasil - latitude 24°36'13"S e longitude 52°32'43"W) (DUARTE et al., 2017) e é pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O meio de cultivo BG 11 (RIPPKA et al., 1979) foi utilizado durante os cultivos.

LEDs nas faixas espectrais do amarelo (~ 590 nm), azul (~ 470 nm), verde (~ 525 nm), vermelho (~ 660 nm) e rosa (~ 440 nm) foram avaliados como fontes energéticas nos cultivos. A intensidade luminosa foi constante e fixada em  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante todos os ensaios. Os LEDs foram dispostos em fitas, em um suporte, distante cerca de 50 mm dos fotobiorreatores. Cultivo controle foi realizado, nas mesmas condições, sem aplicação de LEDs.

Os ensaios foram realizados em duplicata, com concentração inicial de biomassa de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  durante 10 d. Fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* foram utilizados para os cultivos, com volume útil de 0,8 L. Os cultivos foram mantidos no interior de um agitador orbital (New Brunswick Shaker, EUA), a 120 rpm de agitação, em temperatura controlada a 30 °C (DUARTE; COSTA, 2018).

Ensaio com lâmpadas fluorescentes também foram realizados para comparação com os LEDs, nas mesmas condições de cultivo descritas acima, com exceção da forma de agitação dos cultivos. Devido à dificuldade da inserção deste tipo de lâmpada em agitadores orbitais, os experimentos foram conduzidos em estufa termostaticada, utilizando aeração (~ 0,3 vvm) como forma de agitação dos cultivos. Deste modo, para tornar possível a comparação entre as fontes de luz, a melhor condição da faixa espectral obtida nos ensaios com LEDs em agitador orbital foi reproduzida nas mesmas condições aplicadas nos cultivos com lâmpadas fluorescentes. Previamente a injeção nos cultivos, o ar foi filtrado em lã de vidro para remoção de contaminantes. Diariamente, anteriormente a retirada de amostra dos experimentos, a água evaporada dos cultivos foi completada ao volume inicial a partir da adição de água destilada estéril.

## 2.2 DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA E pH

Previamente a realização dos ensaios, uma curva padrão foi construída utilizando o inóculo de *Synechococcus nidulans* LEB 115, relacionando a densidade ótica dos cultivos com a massa seca de biomassa. Deste modo, diariamente ao longo dos ensaios, a partir da leitura da densidade ótica dos cultivos a 670 nm (Shimadzu UV/VIS UVmin-1240, Japão), foi possível calcular a concentração de biomassa em  $\text{g L}^{-1}$  (COSTA et al., 2002). Os valores de pH dos ensaios foram monitorados diariamente, com auxílio de um pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça).

## 2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A produtividade de biomassa nos cultivos foi determinada de acordo com a Equação  $P_X = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , sendo  $X_t$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t_0$  (d). A velocidade específica máxima foi obtida a partir de regressão linear aplicada na fase logarítmica de crescimento celular dos cultivos.

## 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

A composição da biomassa foi determinada ao final dos cultivos. Para a realização das análises de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa, a microalga foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI HIMAC CR-GIII, Toquio - Japão), a 15,000  $g$  por 15 min. Após, a biomassa foi lavada com água destilada, para remoção dos nutrientes aderidos à microalga e, então, centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. Após estes procedimentos, a biomassa foi congelada em ultrafreezer ( $-70^\circ\text{C}$ ) e liofilizada para a realização de suas caracterizações. Previamente as análises de proteínas e carboidratos, a biomassa foi tratada em sonda ultrassônica a fim de romper a parede da microalga e liberar seu material intracelular. Deste modo, um extrato foi obtido, contendo 5 mg de biomassa juntamente com 10 mL de água destilada. Os extratos preparados foram sonicados utilizando 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s desligado. As proteínas foram determinadas por Lowry (LOWRY et al., 1951), com prévia hidrólise alcalina, utilizando-se como padrão albumina de soro bovino. Para determinação de carboidratos, o método de Dubois et al. (1956) foi utilizado, com curva padrão de glicose. O teor lipídico foi determinado pela metodologia proposta por

Folch, Lees e Stanley (1957). Para a obtenção dos resultados de composição em base seca, realizou-se a determinação de umidade, seguindo a metodologia proposta pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância, seguida de teste de Tukey, com nível de 95% de confiança.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração de biomassa máxima obtidos nos ensaios de *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando diferentes faixas espectrais de LEDs como fonte energética foram iguais ( $p > 0,05$ ) entre si, com exceção dos LEDs azuis em que foram obtidos resultados inferiores ( $p < 0,05$ ) comparado aos demais (Tabela 1). As maiores ( $p < 0,05$ ) produtividades máximas de biomassa foram obtidas nos ensaios com aplicação de LEDs verdes e rosas. No entanto, os LEDs rosas apresentaram a maior ( $p < 0,05$ ) velocidade específica máxima de crescimento celular, cerca de 2,6 vezes superior aos cultivos com LEDs verdes. O comprimento de onda dos LEDs rosas compreende a faixa espectral da clorofila a, principal pigmento fotossintético encontrado nas microalgas, o que pode justificar a maior velocidade específica ter sido obtida com esta fonte energética.

**Tabela 1** – Parâmetros obtidos nos ensaios com *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando diferentes faixas espectrais (cores) de LEDs.

| Cor      | $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> ) | $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Amarela  | 0,99 <sup>a</sup> ± 0,06              | 0,13 <sup>b</sup> ± < 0,01                            | 0,28 <sup>b</sup> ± 0,01              |
| Azul     | 0,59 <sup>b</sup> ± 0,01              | 0,02 <sup>c</sup> ± < 0,01                            | 0,07 <sup>d</sup> ± < 0,01            |
| Verde    | 0,92 <sup>a</sup> ± 0,02              | 0,23 <sup>a</sup> ± 0,04                              | 0,24 <sup>b</sup> ± 0,04              |
| Vermelha | 0,93 <sup>a</sup> ± 0,06              | 0,12 <sup>b</sup> ± 0,01                              | 0,13 <sup>c</sup> ± 0,01              |
| Rosa     | 1,06 <sup>a</sup> ± 0,01              | 0,22 <sup>a</sup> ± 0,03                              | 0,62 <sup>a</sup> ± 0,04              |

Média ± desvio padrão. A mesma letra na mesma coluna indica que não houve diferença entre as respostas obtidas nos cultivos, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Markou (2014) ao cultivar uma outra cianobactéria (*Arthrospira platensis*) com diferentes faixas espectrais de LEDs, também obteve os menores parâmetros de crescimento

com LEDs azuis e os melhores resultados com LEDs rosas. LEDs azuis são bastante energéticos e, geralmente, esta energia é maior do que a necessária para a realização da fotossíntese, o que pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) prejudiciais às células, acarretando em redução de biomassa nos cultivos, em alguns casos (FU et al., 2013). De modo geral, observando os valores de parâmetros de crescimento obtidos, pode-se ordenar os melhores resultados dos LEDs na sequência: rosa > verde > amarelo > vermelho > azul.

Com objetivo de comparar os LEDs às fontes energéticas tradicionais, repetiu-se o ensaio com melhor resultado obtido (LEDs rosas), aplicando as mesmas condições de cultivo que o ensaio em que foi utilizada luz fluorescente como fonte energética. Os resultados de parâmetros de crescimento (Tabela 2) demonstram a potencialidade de aplicação dos LEDs rosas como fonte energética nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115. A concentração de biomassa máxima nos ensaios com LEDs rosas foi cerca de 42,2% maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao cultivo com lâmpadas fluorescentes. Apesar dos valores de produtividade máxima de biomassa terem sido iguais ( $p > 0,05$ ) em ambos os ensaios, a velocidade específica máxima de crescimento celular no ensaio com LEDs rosas foi 62% maior ao valor obtido no ensaio utilizando as lâmpadas tradicionais. Os LEDs têm bandas estreitas de comprimento de onda, ao contrário da luz fluorescente (SCHULZE et al., 2014). Assim, a aplicação dessa luz monocromática nos cultivos de *Synechococcus nidulans* pode ter levado a um maior aproveitamento energético pelas células e, conseqüentemente, maiores produções de biomassa e velocidades de crescimento.

**Tabela 2** – Parâmetros e composição bioquímica (base seca) das biomassas dos ensaios de *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando como fontes energéticas LEDs rosas e lâmpadas fluorescentes.

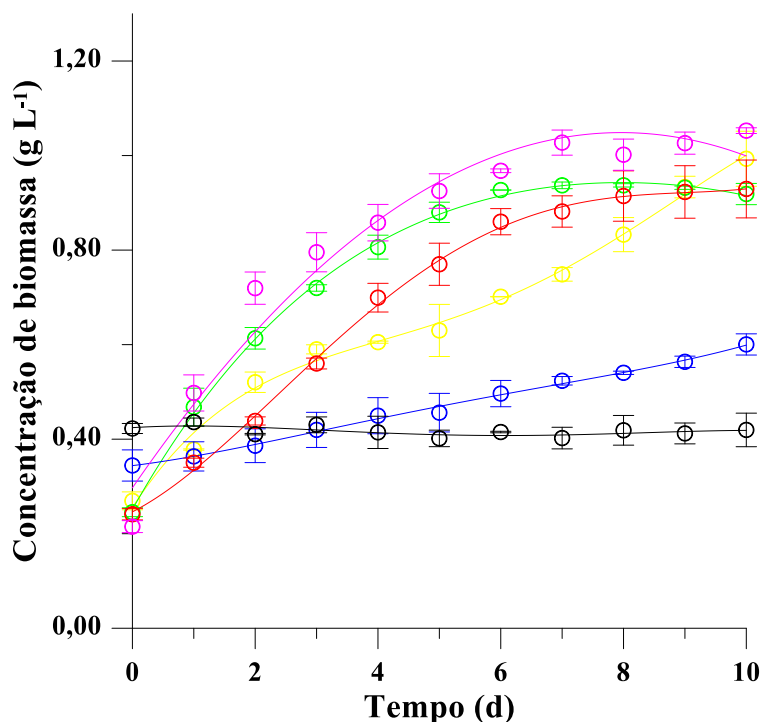
| Respostas                                             | LEDs rosas                | Lâmpadas fluorescentes    |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                 | 0,83 <sup>a</sup> ± 0,04  | 0,48 <sup>b</sup> ± 0,01  |
| $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 0,06 <sup>a</sup> ± 0,01  | 0,08 <sup>a</sup> ± <0,01 |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                 | 0,21 <sup>a</sup> ± <0,01 | 0,08 <sup>b</sup> ± <0,01 |
| Proteínas (% m m <sup>-1</sup> )                      | 65,45 <sup>a</sup> ± 2,56 | 56,90 <sup>b</sup> ± 1,83 |
| Carboidratos (% m m <sup>-1</sup> )                   | 9,40 <sup>b</sup> ± 0,18  | 16,89 <sup>a</sup> ± 0,64 |
| Lipídios (% m m <sup>-1</sup> )                       | 14,42 <sup>a</sup> ± 1,59 | 11,28 <sup>a</sup> ± 3,41 |

Média ± desvio padrão. A mesma letra na mesma linha indica que não houve diferença entre as respostas obtidas nos cultivos, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Nas Figuras 1 e 2, observa-se que em todos os ensaios com LEDs não houve fase de adaptação fisiológica, com exceção do cultivo com LEDs azuis que apresentou curta fase

lag de 2 d. Os cultivos com LEDs amarelos e azuis foram finalizados ainda na fase exponencial de crescimento celular. No entanto, os cultivos com LEDs verdes, vermelhos e rosas apresentaram tendência a entrar na fase estacionária de crescimento celular ao final dos 10 d de ensaio. O cultivo controle, sem aplicação de LEDs, não apresentou aumento de biomassa ao longo do tempo, comprovando o crescimento celular exclusivo da utilização de LEDs como fonte energética durante os ensaios. As faixas de pH foram semelhantes (9,0 -12,0) ao longo dos cultivos com LEDs e estão próximo do valor considerado ótimo para a cepa (~ pH 10,0) (DUARTE et al., 2017).

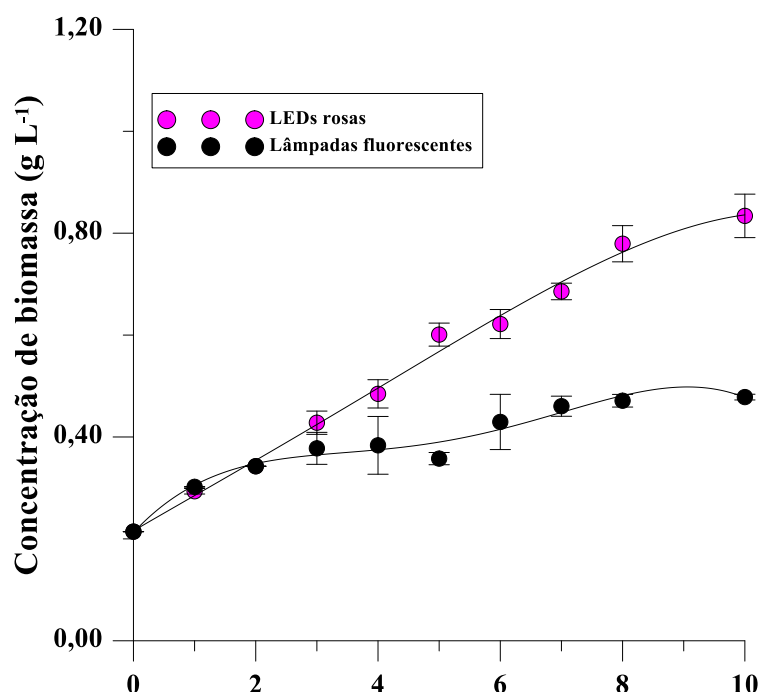
**Figura 1** – Curvas de concentração de biomassa de *Synechococcus nidulans* LEB 115 ao longo do tempo de cultivo. A cor de cada curva corresponde a faixa espectral utilizada dos LEDs e a cor preta corresponde ao ensaio controle



A biomassa de *Synechococcus nidulans* LEB 115 apresentou alterações nas composições bioquímicas quando diferentes faixas espectrais de LEDs foram aplicadas como fontes energéticas nos cultivos (Tabela 3). Os maiores ( $p < 0,05$ ) teores de proteínas foram obtidos nos cultivos com LEDs azuis, verdes e rosas. No entanto, todos ensaios com LEDs apresentaram elevadas concentrações desta biomolécula, com variações entre  $60,35 \pm 0,69\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ) e  $70,41 \pm 0,45\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ). Comparando os ensaios utilizando diferentes tipos de fontes de luz (Tabela 2), observa-se que cultivos com LEDs rosas aumentaram a produção proteica em cerca de 13,1%, em comparação com as lâmpadas fluorescentes. Prates et al. (2018) também

verificaram aumento no teor de proteínas em cultivos utilizando diferentes faixas espectrais de LEDs, em comparação com lâmpadas fluorescentes. Em condições ótimas de cultivo, as microalgas tendem a utilizar a via metabólica de produção de proteínas visando a multiplicação celular (SOLOMON; BERG.; MARTIN, 1999). As proteínas provenientes de biomassas de *Synechococcus nidulans* LEB 115 podem ter aplicabilidade em áreas farmacêuticas, na produção de biofilmes e emulsificantes, entre outras possíveis utilizações (SINGH et al., 2017; YE et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

**Figura 2** – Curvas de concentração de biomassa de *Synechococcus nidulans* LEB 115 ao longo do tempo de cultivo



**Tabela 3** – Composição bioquímica (base seca) das biomassas de *Synechococcus nidulans* LEB 115 cultivadas utilizando diferentes faixas espectrais (cores) de LEDs.

| Cor      | Proteínas (% m m <sup>-1</sup> ) | Carboidratos (% m m <sup>-1</sup> ) | Lipídios (% m m <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Amarela  | 62,94 <sup>b,c</sup> ± 0,33      | 12,30 <sup>a</sup> ± 0,40           | 12,76 <sup>a,b</sup> ± 0,12     |
| Azul     | 64,16 <sup>a,b,c</sup> ± 5,44    | 9,65 <sup>b</sup> ± 1,36            | 8,58 <sup>c</sup> ± 0,48        |
| Verde    | 67,96 <sup>a,b</sup> ± 0,13      | 12,30 <sup>a</sup> ± 0,49           | 10,68 <sup>b,c</sup> ± 1,32     |
| Vermelha | 60,35 <sup>c</sup> ± 0,69        | 9,77 <sup>b</sup> ± 0,16            | 13,65 <sup>a</sup> ± 0,11       |
| Rosa     | 70,41 <sup>a</sup> ± 0,45        | 9,40 <sup>b</sup> ± 0,18            | 12,92 <sup>a,b</sup> ± 0,53     |

Média ± desvio padrão. A mesma letra na mesma coluna indica que não houve diferença entre as respostas obtidas nos cultivos, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Em condições de estresse celular, as microalgas podem desviar o metabolismo e acumular maior quantidade de biomoléculas de reserva energética, como carboidratos e lipídios (SUBHASH et al., 2014). Apesar dos cultivos com LEDs azuis apresentarem parâmetros de crescimento reduzidos, em comparação com o restante dos ensaios, os carboidratos e lipídios não aumentaram em sua biomassa (Tabela 3), indicando que possivelmente não ocorreu estresse celular nestes ensaios. As maiores ( $p < 0,05$ ) concentrações de carboidratos foram obtidas nos cultivos com LEDs amarelos e verdes, enquanto que os maiores ( $p < 0,05$ ) teores lipídicos foram obtidos nos ensaios com LEDs amarelos, vermelhos e rosas.

Em cultivos utilizando LEDs rosas, como já mencionado, houve um aumento na produção de proteínas e, em contrapartida, a produção de carboidratos reduziu cerca de 44,3%, quando comparados com os cultivos utilizando lâmpadas fluorescentes. Os teores lipídicos nas biomassas foram iguais ( $p > 0,05$ ) em ambos os ensaios utilizando diferentes fontes de luz (Tabela 2). Os resultados lipídicos estão de acordo com Duarte et al. (2017) ao cultivarem *Synechococcus nidulans* LEB 115 sob condições ideais, utilizando luz fluorescente como fonte energética ( $14,19 \pm 1,02\%$ ,  $\text{m m}^{-1}$ ). As frações de carboidratos e lipídios presentes na biomassa de *Synechococcus nidulans* LEB 115 podem ser utilizadas para produção de biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel, respectivamente. A principal vantagem na utilização de biomassa de microalgas para a obtenção de biocombustíveis é a facilidade de hidrólise de seus carboidratos, quando comparada com outras fontes de biomassa (SINGH; OLSEN, 2011).

#### 4 CONCLUSÃO

Os melhores resultados de parâmetros de crescimento foram obtidos na seguinte ordem de LEDs: rosa > verde > amarelo > vermelho > azul. Os melhores resultados, quanto aos parâmetros de crescimento, foram obtidos nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115 utilizando LEDs rosas como fonte energética. LEDs rosas proporcionaram aumento de 42,2% na concentração de biomassa máxima e de 61,9% na velocidade específica dos cultivos, quando comparados com as lâmpadas fluorescentes. Os cultivos com LEDs fotoestimularam, principalmente, a produção proteica pelas células, obtendo-se concentrações desta biomolécula de até  $70,41 \pm 0,45\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ). Os LEDs apresentam potencialidade como fonte de luz nos cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115, tornando a obtenção de biomassa e de bioprodutos a partir de microalgas mais sustentáveis ambientalmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Official Methods of Analysis of the association of analytical chemists international** (16th ed.), Virgínia: AOAC International, 1995.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; DA ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425-1432, 2017.

CHEN, H. B.; WU, J. Y.; WANG, C. F.; FU, C. C.; SHIEH, C. J.; CHEN, C. I.; WANG, C. Y.; LIU, Y. C. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 52-56, 2010.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures, **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1242-1245, 2018.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO<sub>2</sub> mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FU, W.; GUDMUNDSSON, O.; PAGLIA, G.; HERJÓLFSSON, G.; ANDRÉSSON, O. S.; PALSSON, B. O.; BRYNJÓLFSSON, S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2395-2403, 2013.

GLEMSER, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRUCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1077-1088, 2016.

HULTBERG, M.; JONSSON, H. L.; BERGSTRAND, K. J.; CARLSSON, A. S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 465-467, 2014.

- IZADPANA, M.; GHESHLAGHI, R.; MAHDAVI, M. A.; ELKAMEL, A. Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. **Algal Research**, v. 29, p. 154-158, 2018.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT**, v. 90, p. 270-276, 2018.
- MA, Y.; GAO, Z.; WANG, Q.; LIU, Y. Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 631-641, 2018b.
- MARKOU, G. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2758-2768, 2014.
- PRATES, D. F.; RADMANN, E. M.; DUARTE, J. H.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 34-43, 2018.
- RA, C. H.; KANG, C. H.; JUNG, J. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 254-261, 2016.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of general microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 422-430, 2014.
- SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H. G. C.; SANTOS, T. F. C.; SCHUELER, L.; GUERRA, R.; BARREIRA, L. A.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, c. 16, p. 367-398, 2016.
- SINGH, A.; OLSEN, S. I. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**, v. 88, p. 3548-3555, 2011.
- SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, M.; BADGUZ, A.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-37, 2017.
- SIRISUK, P.; RA, C. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 175-181, 2018.

SOLOMON, E. P.; BERG, L. R.; MARTIN, D. W. **Biology**, 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1999.

SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789-793, 2014.

TEO, C. L.; ATTA, M.; BUKHARI, A.; TAISIR, M.; YUSUF, A. M.; IDRIS, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 34-44, 2014.

YE, Y.; HUANG, Y.; XIA, A.; FU, Q.; LIAO, Q.; ZENG, W.; ZHENG, Y.; ZHU, X. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 80-87, 2018.

ZHANG, X.; YUAN, H.; JIANG, Z.; LIN, D.; ZHANG, X. Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 498-506, 2018.



### **ARTIGO 3**

ÁGUA SALOBRA EM CULTIVOS DE *Spirulina*: POTENCIAL ALTERNATIVA NA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CARBOIDRATOS



## ÁGUA SALOBRA EM CULTIVOS DE *Spirulina*: POTENCIAL ALTERNATIVA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CARBOIDRATOS

### RESUMO

A composição da água salobra apresenta importantes elementos necessários no metabolismo de microalgas. Este estudo avaliou a utilização de 100% de água salobra com suplementação de diferentes concentrações de nutrientes presentes no meio Zarrouk em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18. Os parâmetros de crescimento e a composição da biomassa, incluindo proteínas, carboidratos, cinzas, lipídios e ácidos graxos foram avaliados nos diferentes ensaios. Os melhores resultados, quanto aos parâmetros de crescimento, foram obtidos nos cultivos utilizando 100% de água salobra e 25% de nutrientes do meio Zarrouk, sendo iguais ( $p > 0,05$ ) ao ensaio controle (sem adição de água salobra e 100% de meio Zarrouk). As concentrações de carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados na biomassa aumentaram até 4 e 3,3 vezes, respectivamente, quando água salobra foi utilizada nos cultivos. O perfil lipídico das biomassas cultivadas com água salobra demonstrou potencial para aplicação na produção de biodiesel. A água salobra é alternativa sustentável e econômica para obtenção de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 em quantidade e qualidade para aplicação, principalmente, na produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Biodiesel. Bioetanol. Composição da biomassa. Fonte de água. Microalgas.



## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e as mudanças climáticas ameaçam recursos naturais, como energia, alimentos e água (MCNEILL et al., 2017). A escassez de água é um problema recorrente em diversas regiões no mundo. Em locais de clima semi-árido, com secas recorrentes, há um acúmulo de águas subterrâneas salobras inaptas ao consumo humano (SÁNCHEZ; NOGUEIRA; KALID, 2015). Os processos de dessalinização comumente aplicados para tornar esta água acessível para o consumo humano possuem elevados custos de implantação e manutenção. Além disso, estes processos geram grandes quantidades de concentrados salinos residuais que, sem um destino adequado, tornam-se um problema ambiental (VOLKMANN et al., 2007).

*Spirulina* é uma microalga fotossintética amplamente estudada e comercializada devido a composição de sua biomassa, rica em compostos benéficos ao organismo humano. Certas espécies podem alcançar até 70% de proteínas, além de conter aminoácidos essenciais, vitaminas como a B12, pigmentos e ácidos graxos essenciais (BELAY; KATO; OTA, 1996; VONSHAK, 1997). Além disso, os carboidratos e lipídios presentes em sua biomassa podem ser utilizados para produção de biocombustíveis (SHIRAZI; SABET; GHOTBI, 2017; SILVA; BERTUCCO, 2016). *Spirulina* requer sais minerais em seu metabolismo, que podem ser encontrados em águas salobras (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). Sendo assim, ao utilizar esta água nos cultivos, *Spirulina* pode ser capaz de consumir seus nutrientes e, em contrapartida, dessalinizar a água, tornando-a disponível para aplicação na agricultura, no consumo animal ou até mesmo para o consumo humano. Paralelamente, biomassa pode ser produzida para aplicação em diversos fins biotecnológicos. Deste modo, considerando também que a dessalinização a partir de cultivo de *Spirulina* não geraria resíduo salino, este processo pode ser uma alternativa viável tanto economicamente, como ambientalmente.

Na literatura não há relatos da aplicação de água salobra em cultivos de *Spirulina*. Estudos avaliaram a utilização de água residual do processo de dessalinização da água salobra (concentrado salino - CS), no cultivo de algumas espécies microalgais. A espécie *Spirulina platensis* cultivada com 50% de CS obteve concentração de biomassa máxima cerca de 91,5% vezes maior ao ensaio controle utilizando 100% de meio de cultivo padrão (VOLKMANN et al., 2007). Cultivos da microalga *Nannochloropsis gaditana* apresentaram concentração de biomassa máxima 1,4 vezes maior nos cultivos com 75% de CS e 25% de meio de cultivo padrão, quando comparados ao cultivo controle utilizando 100% do meio de cultivo padrão.

(MATOS et al., 2015a). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de água salobra nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, com diferentes suplementações nutricionais, analisando os parâmetros de crescimento e a composição bioquímica das biomassas finais produzidas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizada neste estudo foi obtida a partir do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Esta microalga foi isolada da Lagoa Mangueira, localizada no sul do Brasil (latitude 32°32'05" S e longitude 33°31'57" W) (MORAIS; COSTA, 2007). Água salobra (composição fornecida na Tabela 1) foi utilizada como fonte de água e de nutrientes nos cultivos, com suplementação de diferentes concentrações dos nutrientes do meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966). Esta água foi proveniente de uma planta dessalinizadora localizada no sertão nordestino brasileiro (Mandassaia II, Riachão do Jacuípe, Bahia, Brasil). A água salobra foi coletada em frascos de plástico e transportada até a Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foi congelada a -18 °C. A análise da composição da água salobra foi realizada por laboratório especializado na UFBA.

**Tabela 1** – Composição da água salobra proveniente do sertão nordestino brasileiro (Mandassaia II, Riachão do Jacuípe, Bahia, Brasil).

| Parâmetro avaliado |                                          | Parâmetro avaliado |                         |
|--------------------|------------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| pH                 | 8,50                                     | Sulfato            | 44 mg L <sup>-1</sup>   |
| Condutividade      | 9323 µS cm <sup>-1</sup>                 | Magnésio           | 17,5 mg L <sup>-1</sup> |
| Salinidade         | 5,49 g L <sup>-1</sup>                   | Potássio           | 15,4 mg L <sup>-1</sup> |
| Sólidos totais     | 4,67 g L <sup>-1</sup>                   | Brometo            | 11 mg L <sup>-1</sup>   |
| dissolvidos        |                                          |                    |                         |
| Alcalinidade total | 424 mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> | Cloretos           | 2782 mg L <sup>-1</sup> |
| Dureza total       | 356 mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> | Amônia             | 0,98 mg L <sup>-1</sup> |
| Sódio              | 832 mg L <sup>-1</sup>                   | Zinco              | 0,15 mg L <sup>-1</sup> |
| Cálcio             | 114 mg L <sup>-1</sup>                   | Cobre              | 0,02 mg L <sup>-1</sup> |
| Nitrato            | 46,8 mg L <sup>-1</sup>                  |                    |                         |

## 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Anteriormente a realização dos ensaios, a água salobra foi descongelada *overnight* a temperatura ambiente (em torno de 21 °C) e, após, autoclavada. Os inóculos de *Spirulina* sp. LEB 18 foram centrifugados (4.400 rpm, 3 min e 4 °C), o sobrenadante descartado e a biomassa recuperada. Após, procedeu-se uma lavagem na biomassa recuperada a partir da adição de água destilada, a fim de remover os sais oriundos do meio de cultivo de manutenção da microalga. O inóculo foi novamente centrifugado, a água e os sais descartados e a biomassa recuperada para ser utilizada nos cultivos. Os fotobiorreatores utilizados nos ensaios foram do tipo *Erlenmeyer* (1 L de volume).

Sob condições assépticas, 0,8 L de água salobra estéril foram adicionados aos fotobiorreatores, juntamente com as biomassas lavadas ( $\sim 0,3 \text{ g L}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados em duplicata, com suplementação de diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk (0, 25, 50, 75 e 100%). Cultivo controle também foi realizado, utilizando as mesmas condições dos experimentos, exceto o meio de cultivo, que não teve adição de água salobra e foi utilizado 100% de meio Zarrouk.

Os experimentos foram realizados por 7 d, em estufa termostatzada a 30 °C, com fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro. Lâmpadas fluorescentes com intensidade luminosa de  $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  foram utilizadas como fonte energética (MORAIS; COSTA, 2007). A agitação dos cultivos foi realizada a partir de aeração ( $\sim 0,3 \text{ vvm}$ ) a partir de ar comprimido. Previamente a injeção nos cultivos, o ar foi filtrado em lã de vidro para remoção de contaminantes. A cada 24h, anteriormente a retirada de amostra dos experimentos, a água evaporada dos cultivos foi completada ao volume inicial a partir da adição de água destilada estéril. A Figura 1 apresenta a disposição dos fotobiorreatores no interior da estufa.

**Figura 1** – Fotobiorreatores dispostos no interior da estufa com os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra



## 2.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E pH

A concentração de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nos experimentos foi acompanhada diariamente a partir da leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro digital (PerkinElmer, Lambda 35 UV/VIS, Singapura) utilizando comprimento de onda de 670 nm. Para obtenção da concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), previamente a realização dos experimentos, curvas padrões foram construídas, relacionando a densidade ótica das culturas com a massa seca (COSTA et al., 2002).

Os parâmetros de crescimento avaliados nos experimentos foram produtividade de biomassa total máxima e velocidade específica máxima de crescimento celular. A produtividade foi calculada para cada dia dos cultivos, de acordo com a Equação  $P_X = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , sendo  $X_t$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t_0$  (d). A produtividade máxima de cada experimento foi obtida a partir do maior valor de produtividade encontrado ao longo do cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento celular foi obtida a partir de regressão linear aplicada na fase logarítmica dos cultivos. Os valores de pH dos cultivos também foram acompanhados diariamente e as medições foram realizadas com auxílio de um pHmetro digital (Sanxin, PHS-3D, China).

## 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido a partir de centrifugação (4.400 rpm, 3 min e 4 °C) e, posteriormente, lavada com água destilada para remoção dos sais e centrifugada novamente. A biomassa recuperada em cada cultivo foi congelada em ultrafreezer e, após, liofilizada e armazenada a -20 °C até o momento das análises. Previamente às análises de proteínas e carboidratos, a biomassa foi descongelada e tratada para rompimento da parede celular e liberação do material intracelular, com auxílio de sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA). Extratos foram obtidos a partir da adição de 5 mg de biomassa em 10 mL de água destilada e, então, sonicados com 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s desligado. As concentrações de proteínas na biomassa foram determinadas a partir da metodologia colorimétrica proposta por Lowry et al. (1951), com prévia hidrólise térmica e alcalina da biomassa, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Os carboidratos foram determinados pela metodologia colorimétrica fenol-sulfúrico proposta por Dubois et al. (1956), utilizando-se curva padrão de glicose. As

determinações de cinzas e umidade foram realizadas segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). A concentração lipídica na biomassa foi determinada segundo Folch, Lees e Stanley (1957) e os ácidos graxos foram analisados segundo Jesus et al. (2017).

## 2.5 CONVERSÃO TEÓRICA DOS CARBOIDRATOS DA BIOMASSA EM BIOETANOL

Os teores de carboidratos obtidos nas biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18 foram utilizados para a realização dos cálculos de conversão teórica desta biomolécula em bioetanol. Sendo assim, considerou-se como base de cálculo: 100 g de biomassa, 0,511 a constante estequiométrica teórica de conversão de glicose em bioetanol e 70% a eficiência de formação de bioetanol (ROSA et al., 2015).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância, seguida de teste de Tukey, para comparação entre as médias, com nível de 95% de confiança.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água salobra apresentou composição elevada em cloretos, sódio e cálcio. Além disso, outros elementos importantes no metabolismo microalgal foram detectados nesta água, como nitrato, fosfato, magnésio, potássio, zinco e cobre (Tabela 1). Nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, apesar da presença de amônia na água salobra ( $0,98 \text{ mg L}^{-1}$ ), que pode ser tóxica às células dependendo da concentração (MATOS et al., 2015b), sua multiplicação celular não foi inibida. As concentrações máximas de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nos experimentos utilizando 100% de água salobra e suplementação de 25 e 75% de nutrientes do meio Zarrouk foram iguais ( $p > 0,05$ ) aos valores obtidos nos cultivos controles (Tabela 2). Além disso, as produtividades máximas nos experimentos com 100% de água salobra, suplementados com 25, 50 e 75% de nutrientes do meio Zarrouk, também foram iguais ( $p > 0,05$ ) a produtividade máxima obtida no cultivo controle. As velocidades específicas máximas de crescimento celular foram iguais ( $p > 0,05$ ) entre os experimentos utilizando 100% de água salobra com suplementação de 25, 50 e 75% de nutrientes do meio Zarrouk. O cultivo utilizando 100% de

água salobra e sem suplementação de nutrientes do meio Zarrouk não apresentou crescimento celular e, logo no segundo dia, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 coagulou, impossibilitando a leitura na densidade ótica do cultivo em espectrofotômetro (Figura 2). Nestes cultivos, o crescimento celular foi interrompido provavelmente devido à ausência de elementos essenciais à multiplicação das células.

**Tabela 2** – Concentração de biomassa máxima, produtividade máxima e velocidade específica máxima de crescimento celular obtidas nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk.

| % Zarrouk | X <sub>máx</sub><br>(g L <sup>-1</sup> ) | P <sub>máx</sub><br>(g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | μ <sub>máx</sub><br>(d <sup>-1</sup> ) |
|-----------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Controle* | 1,07 <sup>a,b</sup> ± < 0,01             | 0,15 <sup>a</sup> ± < 0,01                               | 0,42 <sup>a</sup> ± < 0,01             |
| 25        | 0,94 <sup>b,c</sup> ± 0,10               | 0,12 <sup>a</sup> ± 0,03                                 | 0,21 <sup>b</sup> ± 0,01               |
| 50        | 0,87 <sup>c</sup> ± 0,03                 | 0,11 <sup>a</sup> ± 0,01                                 | 0,21 <sup>b</sup> ± 0,04               |
| 75        | 1,19 <sup>a</sup> ± < 0,01               | 0,18 <sup>a</sup> ± < 0,01                               | 0,28 <sup>b</sup> ± < 0,01             |
| 100       | 0,18 <sup>d</sup> ± 0,01                 | -                                                        | -                                      |

Média ± desvio padrão. As mesmas letras na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as respostas obtidas, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ). \*100% de meio zarrouk (em água destilada)

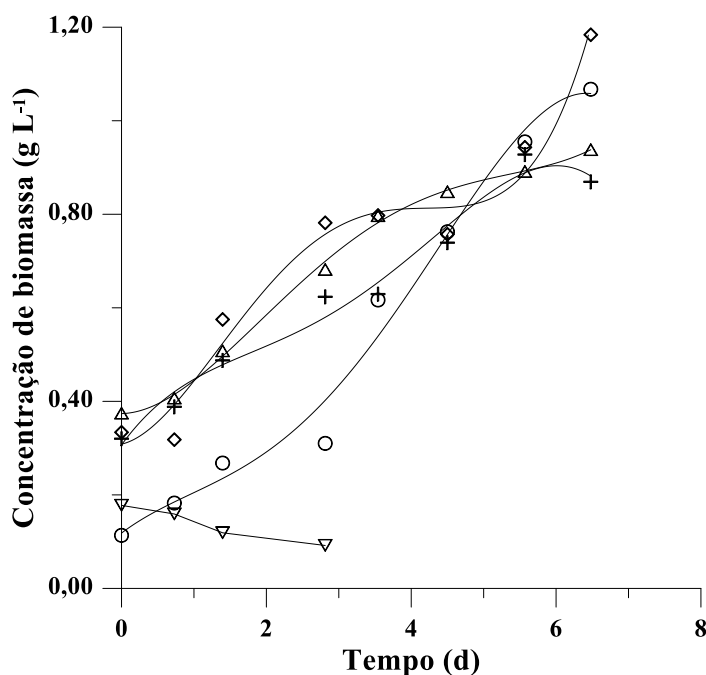
**Figura 2** – 2º d de cultivo - Experimento de *Spirulina* sp. LEB 18 com 100% de água salobra e sem suplementação de nutrientes do meio Zarrouk



No cultivo com 100% de água salobra e suplementação de 100% dos nutrientes do meio Zarrouk, também não foi observado crescimento celular ao longo dos dias de cultivo, provavelmente devido à elevada concentração de sais presentes no meio. Com exceção destes dois experimentos citados acima, os demais apresentaram crescimento celular desde o primeiro dia dos ensaios, finalizando no 10º d ainda na fase exponencial de cultivo, obtendo-se cerca de 1 g L<sup>-1</sup> de concentração de biomassa (Figura 3).

O meio de cultivo Zarrouk, frequentemente empregado para o crescimento celular de *Spirulina* sp. LEB 18, possui em sua composição elevado teor de sais. Deste modo, a salinidade proveniente da água salobra utilizada nos ensaios pode não ter ocasionado impacto às células pré-adaptadas a este tipo de meio, o que explica a ausência de fase de adaptação fisiológica nos ensaios com 100% de água salobra e suplementação de 25, 50 e 75% dos nutrientes do Zarrouk. Estes resultados obtidos demonstram a potencial utilização de água salobra como fonte hídrica nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18. De acordo com Borowitzka e Moheimani (2013), a utilização deste tipo de água é a maneira mais sustentável de realizar cultivos de microalgas em larga escala, de modo que não competem com água doce destinada à agricultura, por exemplo.

**Figura 3** – Curvas de concentração de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ao longo do tempo nos cultivos com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk: (O) Controle; ( $\Delta$ ) 25%; (+) 50%; ( $\diamond$ ) 75% e ( $\nabla$ ) 100%



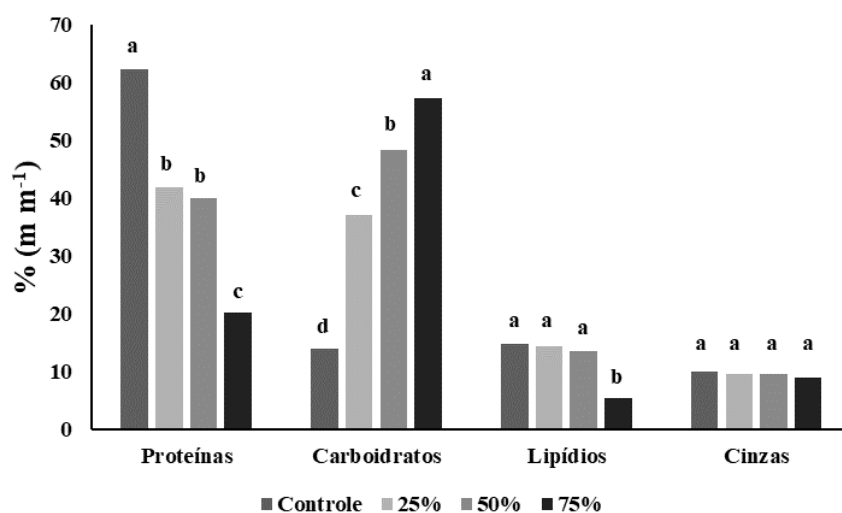
Matos et al. (2015a) cultivaram *Nannochloropsis gaditana* utilizando concentrado salino (CS) e obtiveram as concentrações de biomassa máximas nos ensaios com 75% de meio padrão F/2 e apenas 25% de CS. Volkmann et al. (2007) cultivaram *Spirulina platensis* utilizando 100% de CS e 50% do meio de cultivo padrão Paoletti e obtiveram concentração máxima de biomassa semelhante ao presente estudo ( $\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ ). No entanto, neste estudo, os melhores resultados foram obtidos utilizando 100% de água salobra e suplementação de

nutrientes do meio Zarrouk de apenas 25%, o que é vantajoso em termos de redução de custos com nutrientes durante os cultivos.

Os valores de pH iniciais dos cultivos com água salobra foram semelhantes ao obtido no cultivo controle. As faixas de pH ao longo dos cultivos foram 9,25-10,30 (controle), 9,15-10,05 (suplementação de 25%), 9,18-10,13 (suplementação de 50%), 9,27-10,19 (suplementação de 75%) e 9,3-8,5 (suplementação de 100%). Com exceção do ensaio com suplementação de 100% dos nutrientes do meio Zarrouk, o restante apresentou aumento do pH ao longo do crescimento celular. As faixas de valores de pH obtidas nos experimentos com água salobra são consideradas ótimas para o desenvolvimento celular de microalgas do gênero *Spirulina* (9,0-11,0) (BELAY, 2008).

Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com 100% de água salobra e com suplementação de diferentes concentrações de meio Zarrouk influenciaram na composição da biomassa final obtida (Figura 4). As principais biomoléculas afetadas foram proteínas e carboidratos. As concentrações de proteínas nas biomassas finais foram inversamente proporcionais ao aumento das concentrações de meio Zarrouk nos cultivos. Por outro lado, os teores de carboidratos nas biomassas foram proporcionais ao aumento das concentrações de meio Zarrouk nos cultivos.

**Figura 4** – Composição da biomassa (em base seca) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. Letras iguais, para cada biomolécula, indicam que não houve diferença estatística a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ )



As biomassas dos cultivos com água salobra e suplementação de 75% de meio Zarrouk apresentaram cerca de 3 vezes mais carboidratos e 4 vezes menos proteínas, quando

comparadas a biomassa do cultivo controle. Além disso, até mesmo nos cultivos com suplementação de 25% de meio Zarrouk a produção de carboidratos aumentou cerca de 2,7 vezes. Leema et al. (2010) também observaram redução do teor de proteínas e aumento no teor de carboidratos em cultivos de *Spirulina platensis* com água do mar. No entanto, o presente estudo com cultivos em água salobra apresentou aumento de carboidratos cerca de 2 vezes maior aos cultivos com água do mar realizados por Leema et al. (2010).

A produção de carboidratos pelas microalgas apresenta como propósito servir como componente estrutural nas paredes celulares e como componente de armazenamento dentro da célula. Como biomoléculas de armazenamento, os carboidratos fornecem a energia necessária para o metabolismo de microalgas em situações de estresse. Deste modo, o aumento da concentração salina nos cultivos pode ter ocasionado elevação da pressão osmótica do meio e, consequentemente, aumento da produção de carboidratos a fim de proteger as células (GEIDER; LA ROCHE, 2002; MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012; RAVEN; BEARDALL, 2004).

As biomassas com elevado teor de carboidratos obtidas a partir dos cultivos com água salobra apresentam potencial para produção de bioetanol. Enquanto os carboidratos presentes na biomassa do cultivo controle podem produzir, de acordo com valor teórico, 6,35 mL de bioetanol, nos cultivos com água salobra esta produção quadruplica para 25,84 mL (experimento com 100% de água salobra e suplementação com 75% dos nutrientes do meio Zarrouk). A principal vantagem na obtenção deste biocombustível a partir de biomassa microalgal é que, ao contrário das biomassas lignocelulósicas, seus carboidratos não contêm lignina e suas células, em geral, não são recalcitrantes, o que gera redução de processos e custos com pré-tratamento (LI; LIU; LIU, 2014).

Para obtenção de biomoléculas de reserva (carboidratos e lipídios) a partir de microalgas, geralmente condições de estresse são aplicadas, o que acarreta em redução das produtividades dos cultivos em muitos casos (GRIFFITHS; HARRISON, 2009; MA et al., 2018b). No entanto, neste estudo, foi obtida biomassa com elevados teores de carboidratos e produtividades iguais ao ensaio controle, o que torna a obtenção de bioetanol por microalgas cultivadas com água salobra vantajoso.

Os cultivos com água salobra apresentaram variação na concentração de proteínas em suas biomassas de 20 a 40% e foram menores ( $p < 0,05$ ) que o valor obtido no ensaio controle. Matos et al. (2015b) também observaram redução no teor proteico de *Chlorella vulgaris* quando a microalga foi cultivada com água residual do processo de dessalinização da

água salobra. A redução no teor de proteínas pode estar relacionada com um redirecionamento energético para processos como a osmorregulação em vez da síntese destas biomoléculas (KIRST, 1989). A fração proteica em biomassas de *Spirulina* é reconhecida por sua excelente composição em aminoácidos essenciais (GARCIA; FERNÁNDEZ; SEVILLA, 2012). Além disso, quando comparadas com fontes proteicas tradicionais, como carne e soja, as biomassas de microalgas tem como vantagens o rápido crescimento celular, custos reduzidos de cultivo e a não competição com áreas destinadas à produção de alimentos. Deste modo, a utilização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 como fonte de proteínas na dieta humana é alternativa sustentável à demanda mundial crescente por esta biomolécula. Além disso, as proteínas de microalgas podem ser utilizadas na área farmacêutica, na produção de biofilmes e emulsificantes, entre outras (SINGH et al., 2017; YE et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

A concentração de lipídios na biomassa final dos cultivos com água salobra com suplementação de 25 e 50% de meio Zarrouk não foi afetada, obtendo-se valores iguais ( $p > 0,05$ ) ao ensaio controle. No entanto, observa-se redução ( $p < 0,05$ ) no teor lipídico nos experimentos com 75% de meio Zarrouk, que pode ter ocorrido pelo desvio do metabolismo para a produção de carboidratos. De modo contrário, a concentração de ácidos graxos no experimento com 75% de meio Zarrouk foi maior que o restante dos ensaios, obtendo-se cerca de 3,6 vezes mais ácidos graxos que o ensaio controle (Tabela 3).

Em geral, os experimentos com água salobra apresentaram maiores concentrações de ácidos graxos que o ensaio controle. De acordo com Fon et al. (2014), para lidar com as mudanças na salinidade associadas à permeabilidade da membrana das células, as microalgas ativam um mecanismo osmorregulatório adaptativo, que acarreta em maiores produções de ácidos graxos saturados. Além disso, as produções de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) nos cultivos com água salobra foram maiores que no ensaio controle e aumentaram proporcionalmente com a concentração de meio Zarrouk. Fujii et al. (2001) também observaram aumento de PUFAs proporcional a salinidade do meio e sugerem o envolvimento de enzimas responsáveis pelo aumento da produção destas biomoléculas. PUFAs são muito importantes para a saúde de seres humanos e animais, sendo bastante utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardíacas e inflamatórias, bem como suplemento nutricional (PLOUGUERNÉ et al., 2014; RUXTON et al., 2005; SUN et al., 2018).

Para produção de biodiesel, é importante que a composição lipídica apresente ácidos graxos saturados e longos, que forneçam ao biocombustível maior poder calorífico, número de cetano e estabilidade à oxidação (KONDAMUDI et al., 2005). Além disso, ácidos graxos de cadeias e mais insaturadas também são importantes na produção de biodiesel, visto

que estão relacionadas com suas características de viscosidade e fluxo a baixas temperaturas (KNOTHE, 2005). Sendo assim, considerando-se que todos os ensaios com água salobra apresentaram mais de 50% de ácidos graxos saturados, além dos insaturados, verifica-se que os lipídios provenientes destes cultivos são promissores na produção de biodiesel.

**Tabela 3** – Perfil de ácidos graxos ( $\text{mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de água salobra e diferentes concentrações de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk.

| Ácido graxo | Nome trivial         | Controle          | 25%               | 50%               | 75%               |
|-------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| C11:0       | Hendecanóico         | NI*               | 113,35 $\pm$ 0,08 | 22,28 $\pm$ 1,55  | 36,60 $\pm$ 0,49  |
| C16:0       | Palmítico            | 79,18 $\pm$ 0,36  | 157,89 $\pm$ 0,15 | 142,96 $\pm$ 2,04 | 279,88 $\pm$ 0,54 |
| C18:1w9c    | Oleico               | 25,18 $\pm$ 1,60  | 110,27 $\pm$ 0,51 | 52,90 $\pm$ 0,43  | 71,77 $\pm$ 0,54  |
| C18:2w6c    | Linoleico            | 22,59 $\pm$ 0,58  | 45,03 $\pm$ 0,07  | 38,70 $\pm$ 0,49  | 59,46 $\pm$ 0,48  |
| C18:3w6     | $\gamma$ -Linolênico | 40,24 $\pm$ 0,60  | 24,97 $\pm$ 1,72  | 66,51 $\pm$ 0,53  | 149,30 $\pm$ 0,35 |
| Total       |                      | 167,19 $\pm$ 3,14 | 451,51 $\pm$ 2,53 | 323,35 $\pm$ 5,04 | 597,01 $\pm$ 2,40 |
| Saturados   |                      | 79,18 $\pm$ 0,36  | 271,24 $\pm$ 0,23 | 165,24 $\pm$ 3,59 | 316,48 $\pm$ 1,03 |
| Insaturados |                      | 88,01 $\pm$ 2,78  | 180,27 $\pm$ 2,30 | 158,11 $\pm$ 1,45 | 280,53 $\pm$ 1,37 |

Média  $\pm$  desvio padrão. \*NI: Não identificado.

Os teores de cinzas foram iguais ( $p > 0,05$ ) em todos os ensaios, provavelmente pela lavagem realizada ao final dos cultivos, removendo os sais minerais aderidos nas biomassas. No cultivo com água salobra sem suplementação de Zarrouk, bem como no ensaio utilizando 100% dos nutrientes do meio de cultivo Zarrouk, não houve produção de biomassa, logo não foi possível realizar as caracterizações bioquímicas.

#### 4 CONCLUSÃO

Os melhores resultados foram obtidos nos cultivos com 100% de água salobra e 25% de suplementação de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk, com produtividade de biomassa igual ( $p > 0,05$ ) ao cultivo controle. As produções de carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados aumentaram em até 4 e 3,3 vezes, respectivamente, quando água salobra foi utilizada nos cultivos. A composição lipídica da biomassa apresentou combinação ideal de ácidos graxos saturados e insaturados, o que é uma característica vantajosa para a produção de biodiesel. Neste estudo, demonstrou-se os potenciais benefícios da aplicação de água salobra

nos cultivos de *Spirulina* sp., obtendo-se biomassa de qualidade para aplicação em diferentes fins biotecnológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Official Methods of Analysis of the association of analytical chemists international** (16th ed.), Virgínia: AOAC International, 1995.

BELAY, A.; KATO, T.; OTA, Y. *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 303-311, 1996.

BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 13-25, 2013.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FON SING S. F.; ISDEPESKY, A.; BOROWITZKA, M. A.; LEWIS, D. M. Pilot scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 47-54, 2014.

FUJII, S.; UENAKA, M.; NAKAYAMA, S.; YAMAMOTO, R.; MANTANI, S. Effects of sodium chloride on the fatty acids composition in *Boekelovia hooglandii* (Ochromonadales, Chrysophyceae). **Phycological Research**, v. 49, p. 73-77, 2001.

GARCIA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 164-170, 2012.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v. 37, p. 1-17, 2002.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 493-507, 2009.

JESUS, C. S.; UEBEL, L. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E. G.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-

scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

KIRST, G. O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 40, p. 21-53, 1989.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KONDAMUDI, N.; STRULL, J.; MISRA, M.; MOHAPATRA, S. A green process for producing biodiesel from feather meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 p. 6163-6166, 2009.

LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9221-9227, 2010.

LI, K.; LIU, S.; LIU, X. An overview of algae bioethanol production. **International Journal of Energy Research**, v. 38, p. 965-977, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, Y.; GAO, Z.; WANG, Q.; LIU, Y. Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 631-641, 2018.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631-645, 2012.

MATOS, A. P.; FELLER, R.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 48-55, 2015a.

MATOS, A. P.; FERREIRA, W. B.; TORRES, R. O. C.; MORIOKA, L. R. I.; CANELLA, M. H. M.; ROTTA, J.; SILVA, T.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. Optimization of biomass production of *Chlorella vulgaris* grown in desalination concentrate. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1473-1483, 2015b.

MATOS, A. P.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. **Algal Research**, v. 24, p. 505-508, 2017.

MCNEILL, K.; MACDONALD, K.; SINGH, A.; BINNS, A. D. Food and water security: Analysis of integrated modeling platforms. **Agricultural Water Management**, v. 194, p. 100-112, 2017.

- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349-1352, 2007.
- PLOUGUERNÉ, E.; DA, G. B.; PEREIRA, R. C.; BARRETOBERGTER, E. Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 174, 2014.
- RAVEN, J. A.; BEARDALL, J. Carbohydrate metabolism and respiration in algae, In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. **Photosynthesis in algae, Advances in photosynthesis and respiration**. Netherlands: Springer, 2004, p. 205-224.
- ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO<sub>2</sub> biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321-327, 2015.
- RUXTON, C. H.; CALDER, P. C.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, p. 113-129, 2005.
- SÁNCHEZ A. S.; NOGUEIRA, I. B. R.; KALID, R. A. Uses of the reject brine from inland desalination for fish farming, *Spirulina* cultivation, and irrigation of forage shrub and crops. **Desalination**, v. 364, p. 96-107, 2015.
- SHIRAZI, H. M.; SABET, J. K.; GHOTBI, C. Biodiesel production from *Spirulina* microalgae feedstock using direct transesterification near supercritical methanol condition. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 378-386, 2017.
- SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 51, p. 1833-1842, 2016.
- SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, M.; BADGUZ, A.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-37, 2017.
- SUN, X. M.; GENG, L. J.; REN, L. J.; JI, X. J.; HAO, N.; CHEN, K. Q.; HUANG, H. Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 868-876, 2018.
- TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*), In: Vonshak, A. ***Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, cell biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997, p. 01-16.
- VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98-101, 2007.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997.

YE, Y.; HUANG, Y.; XIA, A.; FU, Q.; LIAO, Q.; ZENG, W.; ZHENG, Y.; ZHU, X. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 80-87, 2018.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

ZHANG, X.; YUAN, H.; JIANG, Z.; LIN, D.; ZHANG, X. Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 498-506, 2018.



#### **ARTIGO 4**

CULTIVO DE *Spirulina* SOB CONDIÇÕES NÃO CONTROLADAS UTILIZANDO ÁGUA  
SALOBRA



## CULTIVO DE *Spirulina* SOB CONDIÇÕES NÃO CONTROLADAS UTILIZANDO ÁGUA SALOBRA

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com 100% de água salobra e 25% de suplementação nutricional, em fotobiorreator de 200 L. Durante os cultivos foram avaliados os parâmetros de crescimento e, ao final dos experimentos, a composição da biomassa foi determinada. Houve produção de biomassa durante os 30 d de cultivo e, após este tempo, os cultivos ainda se apresentavam na fase exponencial de crescimento celular. Ao comparar com o ensaio controle, o cultivo com água salobra apresentou redução de apenas 8% na concentração de biomassa máxima. A composição da biomassa foi alterada quando *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada com água salobra, com aumento no teor de carboidratos e redução na concentração de proteínas. Os elevados teores obtidos de ambas as biomoléculas,  $29,48 \pm 0,75\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ) e  $53,07 \pm 0,98\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ), respectivamente, demonstram a potencialidade da aplicação da biomassa cultivada em água salobra para a produção de bioetanol e para a suplementação alimentar humana e animal, respectivamente.

Palavras-chave: Alimentos. Bioetanol. Biomassa. Carboidratos. Microalgas. Proteínas.



## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, aliado com a escassez de recursos naturais, aumentará a demanda por água, alimentos e energia em 40, 35 e 50%, respectivamente, no ano de 2030 (ENDO et al., 2017; US NIC, 2012). Dentro deste cenário, *Spirulina* surge como alternativa potencial a fim de atender a essas crescentes demandas. A partir da fotossíntese, esta microalga produz biomassa com elevada concentração de proteínas, pigmentos antioxidantes e antiinflamatórios, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, podendo ser aplicada na alimentação animal e humana (CHA et al., 2018; MARTELLI et al., 2014; SMETANA et al., 2017). Os lipídios e carboidratos de sua biomassa podem ser também utilizados na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (SILVA e BERTUCCO, 2016). As principais vantagens na utilização de biomassa de *Spirulina* como fonte nutricional e energética são sua elevada produtividade, ausência de regime de safra dos cultivos e a possibilidade de utilização de locais inóspitos, não competindo, deste modo, com áreas destinadas a agricultura (MANIRAFASHA et al., 2016).

Em cultivos em larga escala, fotobiorreatores do tipo *raceway* são os mais comumente utilizados, devido principalmente à facilidade de manutenção e custos de operação reduzidos (COSTA et al., 2017). Uma das principais desvantagens dos cultivos microalgais em larga escala é a quantidade de água necessária, que pode alcançar 1 tonelada métrica para a produção de 1 kg de biomassa (GUIEYSSE et al., 2013; MURPHY; ALLEN, 2011). Deste modo, a fim de tornar a obtenção de biomassa de *Spirulina* em larga escala sustentável ambientalmente, fontes hídricas alternativas necessitam ser exploradas e aplicadas. Água salobra subterrânea, encontrada em abundância no Nordeste brasileiro, surge como alternativa a fim de atender a demanda de água nos cultivos de microalgas. A vantagem principal na utilização desta água é que, além de fonte hídrica, a água salobra apresenta em sua composição sais minerais e outros compostos importantes no metabolismo microalgal. Deste modo, os custos com nutrientes dos cultivos podem ser reduzidos (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

Em estudo prévio em escala laboratorial e com controle dos parâmetros de luz e temperatura, demonstrou-se o potencial da utilização de água salobra como fonte de água e de nutrientes nos cultivos de *Spirulina* (artigo 3). Dando continuidade ao estudo, no presente trabalho o objetivo foi cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra em escala ampliada,

aplicando a melhor condição de suplementação nutricional obtida em estudo anterior e avaliando a potencialidade da biomassa obtida.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A microalga utilizada neste estudo foi a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira (Sul do Brasil - latitude 32°32'05" S e longitude 33°31'57" W) e pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (MORAIS; COSTA, 2007).

Água salobra subterrânea proveniente do Sertão Nordestino foi utilizada como fonte de água e de nutrientes durante os cultivos. Esta água foi coletada no dia 20 de novembro de 2017 em Mandassaia II (Riachão do Jacuípe, Bahia, Brasil), onde existe uma planta dessalinizadora de água salobra (Figura 1). A água salobra subterrânea, como demonstrado na Figura 1b, foi captada por uma tubulação e é armazenada em caixas d'água, das quais as amostras foram coletadas em vários frascos de 20 L. Após a coleta, a água salobra foi transportada imediatamente ao Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (LAPESCA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foi mantida a 21 °C por cerca de 12 h até o início dos cultivos. O cultivo foi suplementado com nutrientes provenientes do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

**Figura 1** – a) Vista geral da planta dessalinizadora de água salobra (Mandassaia II - Riachão do Jacuípe, Brasil); b) Caixa d'água com água salobra armazenada



## 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados na rua, na UFBA, em uma estufa plástica transparente. Fotobiorreatores do tipo *raceway* (comprimento, largura e altura de 2,20 m, 0,90 m e 0,35 m, respectivamente) foram utilizados para os cultivos, com volume útil de 200 L. Os cultivos foram agitados com auxílio de 2 bombas pneumáticas acopladas no fundo dos fotobiorreatores. Anteriormente a realização dos ensaios, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi recuperada do meio de cultivo por filtração. Para remoção dos sais aderidos, a biomassa foi lavada com água destilada e novamente filtrada. 200 L de água salobra foram adicionados ao fotobiorreator, contendo 25% dos nutrientes presentes no meio de cultivo Zarrouk. Após, a biomassa lavada e concentrada de *Spirulina* sp. LEB 18 foi inoculada no fotobiorreator, até atingir a concentração de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . Paralelamente a este cultivo, um ensaio controle foi realizado, nas mesmas condições, porém sem adição de água salobra e com utilização de 100% do meio de cultivo Zarrouk.

Luz solar foi utilizada como fonte energética nos cultivos e sua intensidade luminosa foi medida diariamente, com auxílio de um luxímetro (MLM-1332, Taiwan). A temperatura e o pH dos cultivos foram controlados diariamente a partir de termômetro e de pHmetro (Sanxin, PHS-3D, China), respectivamente. Os cultivos foram realizados durante 30 d. A água evaporada foi completada ao volume inicial diariamente, antes da retirada de amostra dos cultivos. Ao longo dos ensaios, amostras dos cultivos foram observadas em microscópio, a fim de detectar possíveis contaminações. A Figura 2 mostra os fotobiorreatores com os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra e o cultivo controle.

**Figura 2** – Fotobiorreatores *raceway* dispostos no interior da estufa com os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra (a) e o cultivo controle (b)



## 2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

As concentrações de biomassa dos ensaios foram determinadas diariamente, a partir da leitura das densidades óticas dos cultivos, utilizando comprimento de onda 670 nm, em espectrofotômetro digital (PerkinElmer, Lambda 35 UV/VIS, Singapura). Com intuito de obter as concentrações de biomassa em  $\text{g L}^{-1}$ , previamente a realização dos ensaios, curvas padrões foram construídas, relacionando a densidade ótica dos cultivos com a massa seca de biomassa, de acordo com o método proposto por Costa et al. (2002).

Os parâmetros de crescimento determinados nos ensaios foram produtividade total e velocidade específica de crescimento celular. A produtividade foi calculada para cada dia dos cultivos, de acordo com a Equação  $P_X = (X_t - X_0)/(t - t_0)$ , sendo  $X_t$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t_0$  (d). A produtividade máxima de cada experimento foi o maior valor de produtividade encontrado ao longo do cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento celular foi obtida a partir de regressão linear aplicada na fase logarítmica dos cultivos.

Ao final dos cultivos, as biomassas foram recuperadas do meio líquido por filtração e, logo após, foram lavadas com água destilada para remoção dos sais presentes. As biomassas recuperadas foram congeladas em ultrafreezer, liofilizadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das caracterizações.

## 2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

Para as análises das concentrações de proteínas e carboidratos nas biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18, um pré-tratamento foi necessário, a fim de romper a parede da microalga e liberar seu material intracelular. Sendo assim, 5 mg das biomassas foram pesadas e diluídas em 10 mL de água destilada. Após, as amostras foram sonicadas em sonificador ultrassônico (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA), com 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s min desligado. A partir dos substratos obtidos, procederam-se as análises de proteínas e carboidratos. Para determinação de proteínas, as biomassas foram pré-tratadas a partir de hidrólise térmica e alcalina, a fim de tornar todas proteínas solúveis. A metodologia empregada para determinação proteica foi a de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Os carboidratos foram determinados seguindo a metodologia proposta por Dubois et al. (1956), utilizando-se curva padrão de glicose. Cálculos de conversão teórica de carboidratos em bioetanol foram realizados. Deste modo, considerou-

se como base de cálculo, 100 g de biomassa, 70% de eficiência de formação de bioetanol e 0,511 a constante estequiométrica teórica de conversão de glicose em bioetanol (ROSA et al., 2015). As determinações de cinzas e umidade nas biomassas seguiram a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). As concentrações de lipídios foram determinadas pelo método de Folch (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957).

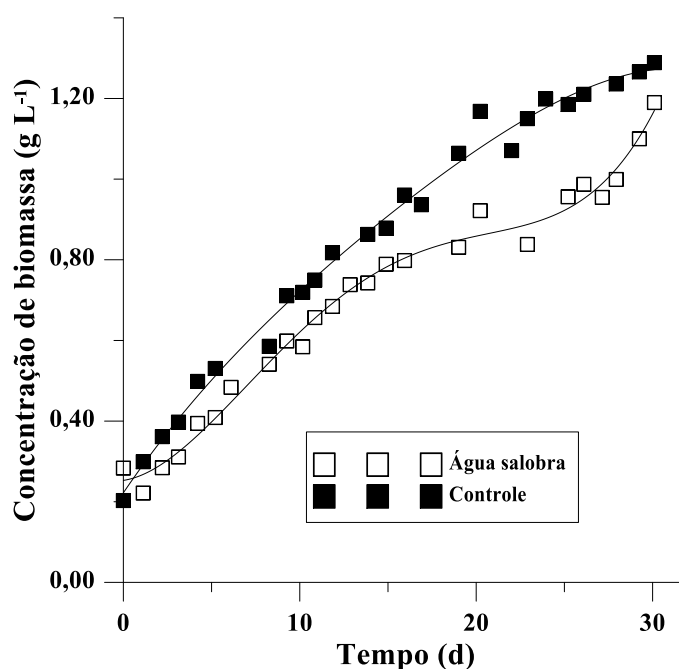
## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância, seguida de teste de Tukey, foi aplicada nos resultados obtidos, utilizando nível de confiança de 95%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em *raceway*, com 100% de água salobra e 25% de suplementação dos nutrientes do meio de cultivo Zarrouk, apresentou crescimento celular semelhante ao ensaio controle (Figura 3). A fase de adaptação fisiológica foi de 4 d para os cultivos com água salobra, provavelmente pela elevada salinidade em que o meio se encontrava e por não ter sido realizada nenhuma adaptação prévia do inóculo. Ambos os cultivos foram finalizados no 30º d de cultivo ainda na fase exponencial de crescimento celular. A concentração de biomassa máxima nos cultivos com água salobra (1,19 g L<sup>-1</sup>) foi apenas 8% menor que o cultivo controle (Tabela 1). Além disso, a produtividade de biomassa máxima e a velocidade específica máxima de crescimento celular neste cultivo não apresentaram redução acentuada, quando comparadas ao ensaio controle. A produtividade de biomassa e a velocidade específica obtidas no cultivo com água salobra foram cerca de 17% e 29% superiores aos valores obtidos por Jesus et al. (2018) ao cultivarem a mesma cepa em condições não controladas semelhantes ao presente estudo, utilizando 100% de meio de cultivo Zarrouk e sem adição de água salobra. Deste modo, o potencial da utilização de água salobra nos cultivos sob condições não controladas de *Spirulina* sp. LEB 18 pôde ser demonstrada, sem reduções acentuadas dos parâmetros de crescimento. A substituição da água doce por água salobra torna os cultivos de microalgas mais sustentáveis para a produção de biomassa em larga escala, de modo que não competem com a água doce destinada ao consumo humano e a agricultura (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013).

**Figura 3** – Curvas de concentração de biomassa ao longo do tempo nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com água salobra e controle



**Tabela 1** – Resultados de parâmetros de crescimento e composição da biomassa dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em água salobra e controle.

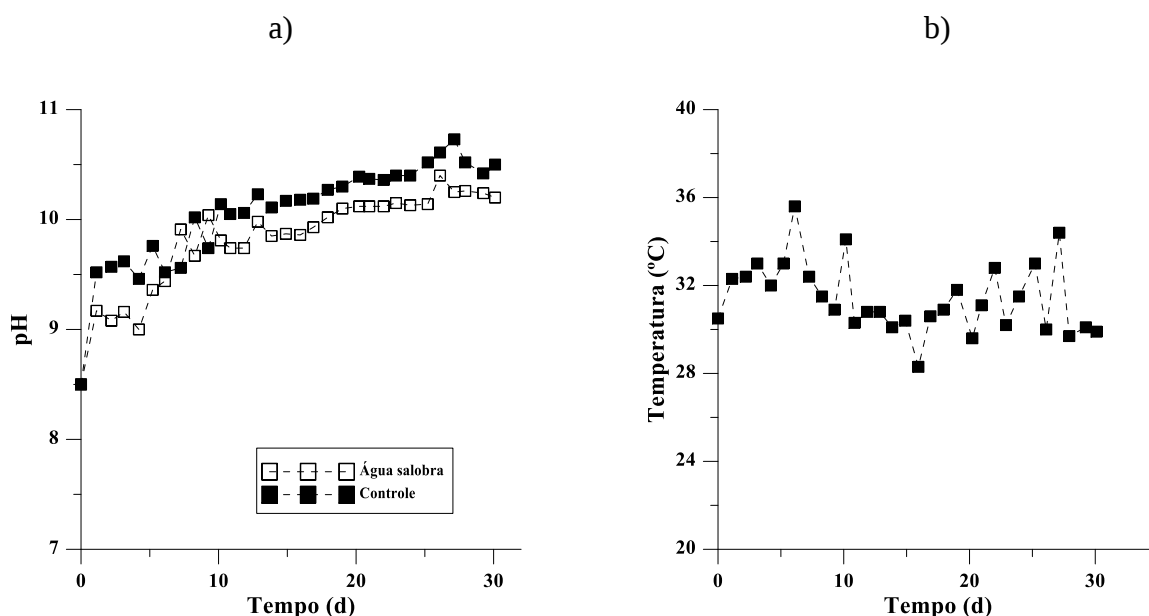
| Respostas                                             | Ensaio                    |                           |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                                       | Água salobra              | Controle                  |
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                 | 1,19                      | 1,29                      |
| $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 0,06                      | 0,09                      |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                 | 0,07                      | 0,09                      |
| Proteínas (%) <sup>*</sup>                            | 53,07 <sup>b</sup> ± 0,98 | 68,39 <sup>a</sup> ± 1,48 |
| Carboidratos (%) <sup>*</sup>                         | 29,48 <sup>a</sup> ± 0,75 | 18,35 <sup>b</sup> ± 1,33 |
| Lipídios (%) <sup>*</sup>                             | 11,86 <sup>a</sup> ± 0,31 | 12,37 <sup>a</sup> ± 0,61 |
| Cinzas (%) <sup>*</sup>                               | 10,90 <sup>a</sup> ± 3,86 | 13,03 <sup>a</sup> ± 0,03 |

<sup>\*</sup>Base seca. Média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre as respostas, nos diferentes cultivos, a um nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ).

Apesar das vantagens, principalmente econômicas, dos cultivos sob condições não controladas, a maioria das espécies de microalgas não é capaz de crescer nestas situações. Entre os principais impasses, estão a contaminação por outros micro-organismos, variações no clima e elevadas temperaturas e intensidades de luz (VONSHAK, 1997). No entanto, no presente estudo, demonstrou-se o potencial da aplicação da cepa de *Spirulina* sp. LEB 18 em cultivos

sob condições não controladas. Ao longo dos ensaios, não foi observada contaminação por outras espécies de microalgas nos cultivos. Microalgas do gênero *Spirulina* crescem em pH alcalino (BELAY, 2008), diferentemente da maioria das espécies, o que pode ter tornado o meio mais seletivo, juntamente com a elevada salinidade. O pH inicial do cultivo com água salobra (em torno de 8,5) foi semelhante ao ensaio controle. Durante o crescimento, as microalgas consomem os nutrientes e, em contrapartida, liberam  $\text{OH}^-$  no meio, o que promove elevação do pH dos cultivos (GROBBELAAR, 2013; TEBBANI et al., 2014). Na Figura 4a é possível observar que durante os 4 primeiros dias de cultivo com água salobra houve tendência do pH se manter constante, devido a fase de adaptação fisiológica, onde não houve consumo de nutrientes pelas células. Em ambos os ensaios houve tendência do pH aumentar ao longo do cultivo, demonstrando o crescimento das microalgas. O pH dos cultivos com água salobra ao longo do tempo foi ligeiramente inferior aos valores obtidos no ensaio controle, o que está de acordo com as curvas de concentração de biomassa obtidas (Figura 3). A faixa de pH ao longo dos cultivos ficou entre os valores ideais para espécies do gênero *Spirulina* (9,0-11,0) (BELAY, 2008).

**Figura 4** – Curvas de pH (a) e temperatura (b) ao longo dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com água salobra e controle



Os ensaios foram realizados na primavera (21/11 a 21/12/2017), período de calor e luz solar intensos na região do nordeste brasileiro. A temperatura dos cultivos apresentou variação de 28 a 36 °C ao longo dos ensaios (Figura 4b). Microalgas do gênero *Spirulina* apresentam a grande vantagem de resistirem à amplas faixas de temperatura (4-44 °C)

(MORAIS et al., 2009), o que pode justificar o aumento de biomassa em temperaturas de até 36 °C. No entanto, na maior parte do tempo de cultivo, a temperatura ficou na faixa ótima para o cultivo de microalgas do gênero *Spirulina*, em torno de 30-32 °C (VONSHAK, 1997). A intensidade luminosa dos cultivos foi medida diariamente e também em diferentes turnos, apresentando variação de 136 a 5400 lux. A elevada intensidade de luz observada em alguns dias ao longo dos ensaios, não ocasionou a inibição do crescimento celular. Devido a profundidade dos fotobiorreatores do tipo *raceway*, a parte inferior dos cultivos pode receber uma menor quantidade de luz (COSTA et al., 2017) e, deste modo, mesmo com elevadas intensidades luminosas, fenômenos de fotooxidação e/ou fotoinibição podem ter sido minimizados.

A composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi alterada quando cultivada com 100% de água salobra e 25% de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk (Tabela 1). O teor de proteínas reduziu cerca de 17%, enquanto que o teor de carboidratos aumentou 38%, em comparação com o cultivo controle. Matos et al. (2015b) ao cultivarem *Chlorella vulgaris* com concentrado salino também observaram redução no teor proteico e aumento da concentração de carboidratos. Sob condições de estresse, as microalgas tendem a desviar o metabolismo da multiplicação celular e produção proteica para a síntese de biomoléculas de reserva, como carboidratos ou lipídios. A elevada salinidade proveniente da água salobra utilizada no cultivo pode ter ocasionado estresse osmótico celular. Em elevadas concentrações salinas, há acúmulo de osmólitos no interior das células, como glicosil-glicerol no caso de cianobactérias, que protegem as microalgas da desidratação (REED et al., 1984).

A maioria das condições aplicadas para acumular carboidratos nas biomassas de microalgas acarreta em redução do crescimento celular, prejudicando as produtividades dos cultivos (CHEN et al., 2013). No entanto, no presente estudo foi possível demonstrar que além de acumular carboidratos, os parâmetros de crescimento dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 não foram influenciados. A produtividade de carboidratos obtida (0,018 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) nos cultivos com água salobra foi semelhante a cultivos de espécies consideradas ricas em carboidratos, como a cepa *Chlorella vulgaris* Beijerinck (CCAP 211/11B), por exemplo (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000). Quando aplicada água salobra nos cultivos, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou cerca de 1,6 vezes mais potencial para produção de bioetanol (13,37 mL), quando comparada à biomassa do cultivo controle (8,32 mL). Comparando a produção teórica de bioetanol em biomassa de cultivos sob condições não controladas e controladas (artigo 3), observa-se que em condições não controladas de cultivo, há uma redução de cerca de 20% no potencial de produção do biocombustível. Rosa et al. (2015), em cultivos

de *Spirulina* sp. LEB 18 com monoetanolamina, obtiveram volume de bioetanol teórico semelhante ao presente estudo (12,8 mL).

Apesar da redução no teor de proteínas na biomassa final nos cultivos com água salobra, o valor obtido ( $53,07 \pm 0,98\%$ ,  $\text{m m}^{-1}$ ) ainda foi superior a alimentos reconhecidos como altamente proteicos, como carne e ovo, por exemplo (VO; NGO; KIM, 2015). Deste modo, a biomassa de *Spirulina* cultivada com água salobra apresenta potencialidade também na utilização como suplemento proteico na dieta humana e animal. Biomassa de *Spirulina* proveniente de cultivos em meios salinos podem apresentar grande parte dos aminoácidos necessários à saúde humana, com exceção da lisina e triptofano, em concentrações superiores às exigidas pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (VOLKMANN et al., 2007). Deste modo, a aplicação da biomassa de *Spirulina* na dieta da população nordestina, por exemplo, pode auxiliar na minimização da problemática de desnutrição enfrentada pela região.

O teor lipídico na biomassa do cultivo com água salobra não teve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do ensaio controle, possivelmente devido ao desvio da rota metabólica dos cultivos para a síntese de carboidratos como moléculas de reserva, ao invés de lipídios. Leema et al. (2010) ao cultivarem *Spirulina platensis* com água do mar também observaram desvio do metabolismo para a produção de carboidratos, obtendo concentração lipídica igual ao ensaio controle e semelhante ao presente estudo ( $12,14 \pm 0,45\%$ ,  $\text{m m}^{-1}$ ). Ao final dos cultivos, a biomassa foi lavada para remoção dos sais provenientes do meio de cultivo, o que pode explicar o baixo teor de cinzas obtido na biomassa dos ensaios com água salobra e controle.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível demonstrar o potencial do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 sob condições não controladas, utilizando como meio de cultivo 100% de água salobra, com suplementação de apenas 25% dos nutrientes do meio Zarrouk. Os parâmetros de crescimento obtidos no ensaio com água salobra foram semelhantes ao ensaio controle, havendo redução de apenas 8% da concentração de biomassa máxima. A composição da biomassa cultivada com água salobra aumentou 38% o teor de carboidratos, apresentando, desta forma, potencialidade para conversão em bioetanol. Além disso, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com água salobra foi altamente proteica ( $53,07 \pm 0,98\%$ ,  $\text{m m}^{-1}$ ), podendo ter aplicação também na suplementação alimentar da população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - **Official Methods of Analysis of the association of analytical chemists international** (16th ed.), Virgínia: AOAC International, 1995.

BELAY, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: production and quality assurance. In: GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. ***Spirulina in human nutrition and health***. Portland: Taylor & Francis, 2008.

BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 13-25, 2013.

CHA, T. S.; CHEE, J. Y.; LOH, S. H.; JUSOH, M. Oil production and fatty acid composition of *Chlorella vulgaris* cultured in nutrient-enriched solid-agar-based medium. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 218-223, 2018.

CHEN, C. Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHANG, J. S. Microalgae based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; VAZ, B.; MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H.; SANTOS, T.; MORAIS, M. G. PhotobioreactorD for Biological CO<sub>2</sub> Biofixation. In: Yiu Fai Tsang. (Org.). **Photobioreactors: Advancements, Applications and Research**. 1ed.: Nova Science Publishers, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ENDO, A.; TSURITA, I.; BURNETT, K.; ORENCIO, P. M. A review of the current state of research on the water, energy, and food nexus. **Journal of Hydrology: Regional Studies**, v. 11, p. 20-30, 2017.

FANZO, J.; DAVIS, C.; MCLAREN, R.; CHOUFANI, J. The effect of climate change across food systems: Implications for nutrition outcomes. **Global Food Security**, v. 18, p. 12-19, 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

GUIEYSSE, B.; BÉCHET, Q.; SHILTON, A. Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 317-323, 2013.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

JESUS, C. S.; UEBEL, L. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E. G.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9221-9227, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

MATOS, A. P.; FELLER, R.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 48-55, 2015a.

MATOS, A. P.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. **Algal Research**, v. 24, p. 505-508, 2017.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349-1352, 2007.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 29, p. 60-64, 2009.

MURPHY, C. F.; ALLEN, D. T. Energy-water nexus for mass cultivation of algae. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 5861-5868, 2011.

REED, R. H.; RICHARDSON, D. L. WARR, S. R. R.; STEWART, W. D. P. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1-4, 1984.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO<sub>2</sub> biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321-327, 2015.

SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 51, p. 1833-1842, 2016.

SMETANA, S.; SANDMANN, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D.; HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162-170, 2017.

TEBBANI, S.; FILIPA LOPES, F.; FILALI, R.; DUMUR, D.; PAREAU, D. **Carbon dioxide biofixation by microalgae**. London: John Wiley & Sons, 2014.

US NIC - United States National Intelligence Council - Global Trends 2030: **Alternative Worlds**, Washington DC, USA, 2012, p. 137.

VO, T.S., NGO, D.H., KIM, S.K. 2015. Nutricional and Pharmaceutical properties of microalgal *Spirulina*. In: **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Soth Korea: Elsevier.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98-101, 2007.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

## **CAPÍTULO IV**



## 5. CONCLUSÃO GERAL

A presente Tese demonstrou a possibilidade de cultivos de microalgas mais sustentáveis ambientalmente, a partir da utilização de LEDs (como fonte de luz) e água salobra (como fonte de água e de nutrientes). LEDs azuis como fonte energética aumentaram em até 80% a velocidade específica máxima de crescimento celular em cultivos de *Synechococcus nidulans* LEB 115, quando comparados com cultivos utilizando fontes energéticas tradicionais. Além disso, a aplicação de LEDs azuis fotoestimulou a produção lipídica pela cepa *Chlorella fusca* LEB 111, acumulando até 50% mais lipídios na biomassa do que outros estudos utilizando luz fluorescente. O aumento da intensidade luminosa dos LEDs azuis de 50 para 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , acumulou em até 4,5 e 2,4 vezes mais clorofilas e carotenoides, respectivamente, nas biomassas microalgais. LEDs rosas proporcionaram aumento de 42,2% na concentração de biomassa máxima e de 61,9% na velocidade específica dos cultivos de *Synechococcus nidulans*, quando comparados com as lâmpadas fluorescentes. Os cultivos com LEDs rosas fotoestimularam também a produção proteica pelas células, obtendo-se concentrações desta biomolécula de  $70,41 \pm 0,45\%$  ( $\text{m m}^{-1}$ ). A ordem decrescente dos resultados de parâmetros de crescimento obtidos em diferentes faixas espectrais de LEDs foi: rosa > verde > amarelo > vermelho > azul. A utilização de LEDs como fonte energética nos cultivos de microalgas, além de sustentável ambientalmente, mostrou-se promissora na produção de biomassa e de metabólitos de interesse.

Nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com água salobra, os melhores resultados de parâmetros de crescimento foram obtidos utilizando 100% de água salobra e 25% de suplementação com nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. A concentração de biomassa máxima ( $0,94 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ ) e a produtividade máxima ( $0,12 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) nestes cultivos foram iguais ( $p > 0,05$ ) ao ensaio controle. As produções de carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados aumentaram em até 4 e 3,3 vezes, respectivamente, quando água salobra foi utilizada nos cultivos. O cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com água salobra, em escala ampliada e sob condições não controladas apresentou redução de apenas 8% na concentração de biomassa máxima obtida, quando comparado com o cultivo controle. Nestes cultivos, houve aumento de 38% no teor de carboidratos. Além disso, a biomassa cultivada com água salobra foi altamente proteica ( $53,07 \pm 0,98\%$   $\text{m m}^{-1}$ ). Além de sustentável, a utilização de água salobra pode reduzir custos dos cultivos, produzir biomassa para fins energéticos e alimentares, além da possibilidade de geração de água dessalinizada para aplicação agrícola, animal e humana.



## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Avaliar a utilização de LEDs como fonte energética em cultivos de outras espécies microalgais;
2. Avaliar fotoperíodos e diferentes intensidades luminosas de LEDs nos cultivos;
3. Avaliar a influência da aplicação de LEDs como fonte energética na produção de ficocianina em cultivos de microalgas;
4. Determinar o consumo de nutrientes nos cultivos de *Spirulina* com água salobra;
5. Realizar ciclos de cultivo de *Spirulina* reutilizando a água salobra como fonte de nutrientes;
6. Estudar a viabilidade da ampliação de escala dos cultivos de *Spirulina* sp. em água salobra no sertão nordestino.



## **CAPÍTULO V**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBALAGAN, A.; SCHWEDE, S.; NEHRENHEIM, E. Influence of light emitting diodes on indigenous microalgae cultivation in municipal wastewater. **Energy Procedia**, v. 75, p. 786-792, 2016.

AOAC - **Official Methods of Analysis of the association of analytical chemists international** (16th ed.), Virgínia: AOAC International, 1995.

ARORA, N.; LAURENS, L. M. L.; SWEENEY, N.; PRUTHI, V.; PIENKOS, P. T. Elucidating the unique physiological responses of halotolerant *Scenedesmus* sp. cultivated in sea water for biofuel production. **Algal Research**, v. 37, p. 260-268, 2019.

ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373-378, 2013.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; DA ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425-1432, 2017.

BELAY, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): production and quality assurance. In: GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. **Spirulina in human nutrition and health**. Portland: Taylor & Francis, 2008.

BELAY, A.; KATO, T.; OTA, Y. *Spirulina* (Arthrospira): potential application as an animal feed supplement. J Appl Phycol. 8 (1996) 303-311. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373-378, 2013.

BLANKEN, W.; CUARESMA, M.; WIJFFELS, R. H.; JANSSEN, M. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. **Algal Research**, v. 2, p. 333-340, 2013.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 13-25, 2013.

BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Enhancement of the carbohydrate content in *Spirulina* by applying CO<sub>2</sub>, thermoelectric fly ashes and reduced nitrogen supply. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1241-1247, 2019.

CARDIAS, B. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. CO<sub>2</sub> conversion by the integration of biological and chemical methods: *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation with diethanolamine and potassium carbonate addition. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 77-83, 2018.

CARVALHO, A. P.; SILVA, S. O.; BAPTISTA, J. M.; MALCATA, F. X. Light requirements in microalgae photobioreactors: an overview of biophotonic aspects.

**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1275-1288, 2011.

CASSURIAGA, A. A. A.; FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Innovate polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456-463, 2018.

CHA, T. S.; CHEE, J. Y.; LOH, S. H.; JUSOH, M. Oil production and fatty acid composition of *Chlorella vulgaris* cultured in nutrient-enriched solid-agar-based medium. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 218-223, 2018.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510-516, 2012.

CHEN, C. Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHANG, J. S. Microalgae based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHEN, H. B.; WU, J. Y.; WANG, C. F.; FU, C. C.; SHIEH, C. J.; CHEN, C. I.; WANG, C. Y.; LIU, Y. C. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 52-56, 2010.

CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336-346, 2018.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CHOW, T. J.; SU, H. Y.; TSAI, T. Y.; CHOU, H. H.; LEE, T. M.; CHANG, J. S. Using recombinant cyanobacterium (*Synechococcus elongates*) with increased carbohydrate productivity as feedstock for bioethanol production via separate hydrolysis and fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 33-41, 2014.

CIRILO, J. A.; MONTENEGRO, S. M. G. L.; CAMPOS, J. N. B. A questão da água no semiárido brasileiro. In: BICUDO, C.E. de M; TUNDISI, J.G.; SCHEUENSTUHL, M.C.B. (Org.). **Águas do Brasil análises estratégicas**. 1ed. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 1, p. 81-91, 2010.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; VAZ, B.; MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H.; SANTOS, T.; MORAIS, M. G. PhotobioreactorD for Biological CO<sub>2</sub> Biofixation. In: Yiu Fai Tsang. (Org.). **Photobioreactors: Advancements, Applications and Research**. 1ed.: Nova Science Publishers, 2017.

COWARD, T.; FUENTES-GRUNEWALD, C.; SILKINA, A.; OATLEY-RADCLIFFE, D. L.; LLEWELLYN, G.; LOVITT, R. W. Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 607-615, 2016.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 912-916, 2016.

DÍAZ, M. T.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, C. I.; LAUZURICA, S.; CAÑEQUE, V.; GONZÁLEZ, C.; FUENTE, J. Feeding microalgae increases omega 3 fatty acids of fat deposits and muscles in light lambs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 115-123, 2017.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1242-1245, 2018.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159-165, 2016.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO<sub>2</sub> mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ENDO, A.; TSURITA, I.; BURNETT, K.; ORENCIO, P. M. A review of the current state of research on the water, energy, and food nexus. **Journal of Hydrology: Regional Studies**, v. 11, p. 20-30, 2017.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FON SING S. F.; ISDEPESKY, A.; BOROWITZKA, M. A.; LEWIS, D. M. Pilot scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 47-54, 2014.

FU, W.; GUDMUNDSSON, O.; PAGLIA, G.; HERJÓLFSSON, G.; ANDRÉSSON, O. S.; PALSSON, B. O.; BRYNJÓLFSSON, S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2395-2403, 2013.

FUJII, S.; UENAKA, M.; NAKAYAMA, S.; YAMAMOTO, R.; MANTANI, S. Effects of sodium chloride on the fatty acids composition in *Boekelovia hooglandii* (Ochromonadales, Chrysophyceae). **Phycological Research**, v. 49, p. 73-77, 2001.

GARCIA, J. M. R.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 164-170, 2012.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v. 37, p. 1-17, 2002.

GLEMSE, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRUCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1077-1088, 2016.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403-415, 2017.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 493-507, 2009.

GROBBELAAR J. Algal nutrition: mineral nutrition. Em: RICHMOND, A., **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

GUIEYSSE, B.; BÉCHET, Q.; SHILTON, A. Variability and uncertainty in water demand and water footprint assessments of fresh algae cultivation based on case studies from five climatic regions. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 317-323, 2013.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v.135, p. 191-198, 2013.

HOSSEINI, S. M.; KHOSRAVI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1231-1237, 2013.

HULTBERG, M.; JONSSON, H. L.; BERGSTRAND, K. J.; CARLSSON, A. S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 465-467, 2014.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

IZADPANA, M.; GHESHLAGHI, R.; MAHDAVI, M. A.; ELKAMEL, A. Effect of light spectrum on isolation of microalgae from urban wastewater and growth characteristics of subsequent cultivation of the isolated species. **Algal Research**, v. 29, p. 154-158, 2018.

JAHNS, P.; HOLZWARTH, A. R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1817, p. 182-193, 2012.

JESUS, C. S.; UEBEL, L. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E. G.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

KATSUDA, T.; LABALPOUR, A.; SHIMAHARA, K.; KATOH, S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 81-86, 2004.

KAY, R. Microalgae as food and supplement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, p. 555-576, 1991.

KIBRIA, A.; AKHUNDJANOV, S. B.; OLADI, R. Fossil fuel share in the energy mix and economic growth. **International Review of Economics & Finance**, v. 59, p. 253-264, 2019.

KIM, C. W.; SUNG, M. G.; NAM, K.; MOON, M.; KWON, J. H.; YANG, J. W. Effect of monochromatic illumination on lipid accumulation of *Nannochloropsis gaditana* under continuous cultivation. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 30-35, 2014.

KIRST, G. O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 40, p. 21-53, 1989.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KONDAMUDI, N.; STRULL, J.; MISRA, M.; MOHAPATRA, S. A green process for producing biodiesel from feather meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6163-6166, 2009.

LEE, C. G.; PALSSON, B. High-Density algal photobioreactors using light-emitting diodes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1161-1167, 1994.

LEE, O. K.; OH, Y. K.; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 22-27, 2015.

LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9221-9227, 2010.

LEHMUSKERO, A.; CHAUTON, M. S.; BOSTROM, T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular - and molecular-scale optical processes. **Progress in Oceanography**, v. 168, p. 43-56, 2018.

- LI, K.; LIU, S.; LIU, X. An overview of algae bioethanol production. **International Journal of Energy Research**, v. 38, p. 965-977, 2014.
- LIECHTENTHALER, H. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 239-260, 1987.
- LOERA-QUEZADA, M.; ANGELES, G.; OLGUÍN, E. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 2, p. 81-92. 2011.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Paulo: RiMa, 2006.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT**, v. 90, p. 270-276, 2018.
- MA, R.; THOMAS-HALL, S. R.; CHUA, E. T.; ELTANAHY, E.; NETZEL, M. E.; NETZEL, G.; LU, Y.; SCHENK, P. M. LED power efficiency of biomass, fatty acid, and carotenoid production in *Nannochloropsis* microalgae. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 118-126, 2018a.
- MA, Y.; GAO, Z.; WANG, Q.; LIU, Y. Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 631-641, 2018b.
- MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016.
- MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- MARKOU, G. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2758-2768, 2014.
- MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631-645, 2012.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipid. **The Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 574-576, 1966.
- MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

- MASHAYEKHI, M.; SARRAFZADEH, M. H.; TAVAKOLI, O.; SOLTANI, N.; FARAMARZI, M. A. Potential for biodiesel production and carbon capturing from *Synechococcus elongatus*: An isolation and evaluation study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 230-235, 2017.
- MATHIMANI, T.; BALDINELLI, A.; RAJENDRAN, K.; PRABAKAR, D.; MATHESWARAN, M.; PIETER VAN LEEUWEN, R.; PUGAZHENDHI, A. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 1053-1064, 2019.
- RABAHARAN, D. Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. **Renewable Energy**, v. 105, p. 637-646, 2017.
- MATOS, A. P.; FELLER, R.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 48-55, 2015a.
- MATOS, A. P.; FERREIRA, W. B.; TORRES, R. C. O.; MORIOKA, L. R. I.; CANELLA, M. H. M.; ROTTA, J.; SILVA, T.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. Optimization of biomass production of *Chlorella vulgaris* grown in desalination concentrate. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1473-1483, 2015b.
- MATOS, A. P.; MOECKE, E. H. S.; SANT'ANNA, E. S. The use of desalination concentrate as a potential substrate for microalgae cultivation in Brazil. **Algal Research**, v. 24, p. 505-508, 2017.
- MCNEILL, K.; MACDONALD, K.; SINGH, A.; BINNS, A. D. Food and water security: Analysis of integrated modeling platforms. **Agricultural Water Management**, v. 194, p. 100-112, 2017.
- MEHTA, P.; RANI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A. S.; PURI, S. K. Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 in seawater salinity recycled medium. **Algal Research**, v. 36, p. 88-95, 2018.
- MERCHANT, R. E.; ANDRE, C. A. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. **Alternative Therapies In Health And Medicine**, v. 7, p. 79-91, 2001.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004. Site: [www.mma.gov.br/](http://www.mma.gov.br/). Acesso em 08/08/2018 às 20:00:00.
- MOHSENPOUR, S. F.; RICHARDS, B.; WILLOUGHBY, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 75-81, 2012.
- MOISAN, T. A.; BLATTNER, K. L.; MAKINEN, C. P. Influences of temperature and nutrients on *Synechococcus* abundance and biomass in the southern Mid -Atlantic Bight. **Continental Shelf Research**, v. 30, p. 1275-1282, 2010.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349-1352, 2007.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 29, p. 60-64, 2009.

MURPHY, C. F.; ALLEN, D. T. Energy-water nexus for mass cultivation of algae. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 5861-5868, 2011.

NABAVI, S. M.; SILVA, A. S. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. London: Elsevier, 2019.

NAGARAJAN, D.; LEE, D. J.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 373-387, 2017.

PLEISSNER, D.; LAU, K. Y.; SCHNEIDER, R.; VENUS, J.; LIN, C. S. K. Fatty acid feedstock preparation and lactic acid production as integrated processes in mixed restaurant food and bakery wastes treatment. **Food Research International**, v. 73, p. 52-61, 2015.

PLOUGUERNÉ, E.; DA, G. B.; PEREIRA, R. C.; BARRETOBERGTER, E. Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, p. 174, 2014.

PRASAD, P. V. V.; THOMAS, J. M. G.; NARAYANAN, S. Global warming effect. In: **Encyclopedia of Applied Plant Science** (2nd ed.). New York: Academic Press, 2017.

PRATES, D. F.; RADMANN, E. M.; DUARTE, J. H.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 34-43, 2018.

RA, C. H.; KANG, C. H.; JUNG, J. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 254-261, 2016.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V., Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RAJAK, U.; VERMA, T. N. *Spirulina* microalgae biodiesel – A novel renewable alternative energy source for compression ignition engine. **Journal of Cleaner Production**, v. 201, p. 343-357, 2018.

RAVEN, J. A.; BEARDALL, J. Carbohydrate metabolism and respiration in algae, In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. **Photosynthesis in algae, Advances in photosynthesis and respiration**. Netherlands: Springer, 2004, p. 205-224.

REBOLEIRA, J.; FREITAS, R.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; ALVES, C.; PEDROSA, R.; BERNARDINO, S. *Spirulina. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. London: Elsevier, 2019.

REED, R. H.; RICHARDSON, D. L. WARR, S. R. R.; STEWART, W. D. P. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1-4, 1984.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of general microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO<sub>2</sub> biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321-327, 2015.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Green alga cultivation with monoethanolamine: Evalutation of CO<sub>2</sub> fixation and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 206-212, 2018.

RUXTON, C. H.; CALDER, P. C.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, p. 113-129, 2005.

SAHIN, S. C. The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 236-243, 2018.

SÁNCHEZ A. S.; NOGUEIRA, I. B. R.; KALID, R. A. Uses of the reject brine from inland desalination for fish farming, *Spirulina* cultivation, and irrigation of forage shrub and crops. **Desalination**, v. 364, p. 96-107, 2015.

SANKARAN, K.; PREMALATHA, M. Nutrients uptake from anaerobically digested distillery wastewater by *Spirulina* sp. under xenon lamp illumination. **Journal of Water Process Engineering**, v. 25, p. 295-300, 2018.

SANTOS, T. S.; BATISTA, M. C.; POZZA, S. A.; ROSSI, L. S. Análise da eficiência energética, ambiental e econômica entre lâmpadas de LED e convencionais. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 20, p. 595-602, 2015.

SCHOPF, J. W.; POSTGATE, J. R.; WALTER, M. R. Orygen and Early Evolution of Cyanobacteria:the geological evidence. In: “**The Biology of Cyanobacteria**”. Londres: Blackwell, 2000.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, p. 422-430, 2014.

SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H. G. C.; SANTOS, T. F. C.; SCHUELER, L.; GUERRA, R.; BARREIRA, L. A.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, c. 16, p. 367-398, 2016.

SHIRAZI, H. M.; SABET, J. K.; GHOTBI, C. Biodiesel production from *Spirulina* microalgae feedstock using direct transesterification near supercritical methanol condition. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 378-386, 2017.

SIBI, G. Low cost carbon and nitrogen sources for higher microalgal biomass and lipid production using agricultural wastes. **Environmental Science & Technology**, v. 8, p. 113-121, 2015.

SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 51, p. 1833-1842, 2016.

SILVA, C. S. P.; STENICO, M. E. S.; CASTRO, H. F.; RÓS, P. C. M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p. 1-7, 2014.

SINGH, A.; OLSEN, S. I. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**, v. 88, p. 3548-3555, 2011.

SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, M.; BADGUZ, A.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-37, 2017.

SIRISUK, P.; RA, C. H.; JEONG, G. T.; KIM, S. K. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 175-181, 2018.

SMETANA, S.; SANDMANN, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D.; HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162-170, 2017.

SOLOMON, E. P.; BERG, L. R.; MARTIN, D. W. **Biology**, 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1999.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.

SRIMONGKOL, P.; THONGCHUL, N.; PHUNPRUCH, S.; KARNCHANATAT A. Ability of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. VDW to remove ammonium from brackish aquaculture wastewater. **Agricultural Water Management**, v. 212, p. 155-161, 2019.

- SUBHASH, G. V.; ROHIT, M. V.; DEVI, M. P.; SWAMY, Y. V.; MOHAN, S. V. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 789-793, 2014.
- SUH, I. S.; LEE, C.G. Photobioreactor engineering: design and performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 313-321, 2003.
- SUN, B.; FAN, X.; YE, H.; FAN, H.; QIAN, C.; DRIEL, W. V.; ZHANG, G. A novel lifetime prediction for integrated LED lamps by electronic-thermal simulation. **Reliability Engineering & System Safety**, v. 163, p. 14-21, 2017.
- SUN, X. M.; GENG, L. J.; REN, L. J.; JI, X. J.; HAO, N.; CHEN, K. Q.; HUANG, H. Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 868-876, 2018.
- SZUBERT, K.; WIGLUSZ, M.; MARZEC, H. M. Bioactive metabolites produced by *Spirulina subsalsa* from the Baltic Sea. **Oceanografia**, v. 60, p. 245-255, 2018.
- TAVAKOLI, O.; YEGANI, R.; MORTEZAEIKIA, V. Membrane-sparger vs. membrane contactor as a photobioreactors for carbon dioxide biofixation of *Synechococcus elongatus* in batch and semi-continuous mode. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 16, p. 23-31, 2016.
- TEBBANI, S.; FILIPA LOPES, F.; FILALI, R.; DUMUR, D.; PAREAU, D. **Carbon dioxide biofixation by microalgae**. London: John Wiley & Sons, 2014.
- TEO, C. L.; ATTA, M.; BUKHARI, A.; TAISIR, M.; YUSUF, A. M.; IDRIS, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 34-44, 2014.
- TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- TUCKETT, R. **Greenhouse Gases - Encyclopedia of Analytical Science**, 3rd. ed. Elsevier, 2018.
- UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, v. 45, p. 309-311, 2007.
- US NIC - United States National Intelligence Council - Global Trends 2030: **Alternative Worlds**, Washington DC, USA, 2012, p. 137.
- VO, T.S., NGO, D.H., KIM, S.K. 2015. Nutricional and Pharmaceutical properties of microalgal *Spirulina*. In: **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Soth Korea: Elsevier.

- VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: Protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98-101, 2007.
- VONSHAK, A. *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997.
- WENSEL, P.; HELMS, G.; WILLIAM, H. B.; DAVIS, C.; KIRCHHOFF, H.; BULE, M.; YU, L.; CHEN, S. Isolation, characterization, and validation of oleaginous, multi-trophic, and haloalkaline-tolerant microalgae for two-stage cultivation. **Algal Research**, v. 4, p. 2-11, 2014.
- YAMANAKA, G.; GLAZER, A. N.; WILLIAMS, R. C. Cyanobacterial phycobilisomes - characterization of phycobilisomes of *Synechococcus*-sp 6301. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 8303-8310, 1978.
- YE, Y.; HUANG, Y.; XIA, A.; FU, Q.; LIAO, Q.; ZENG, W.; ZHENG, Y.; ZHU, X. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 80-87, 2018.
- YEH, K. L.; CHANG, J. S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120-127, 2012.
- ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.
- ZHANG, X.; YUAN, H.; JIANG, Z.; LIN, D.; ZHANG, X. Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella* sp.. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 498-506, 2018.
- ZHAO, Y.; SUN, S.; HU, C.; ZANG, H.; XU, J.; PING, L. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various mixed light-emitting diode light wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 338-345, 2015.
- ZHOU, D.; QIAO, B.; LI, G.; XUE, S.; YIN, J. Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 609-615, 2017a.
- ZHOU, W.; LI, Y.; GAO, Y.; ZHAO, H. Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 10-17, 2017b.
- ZNAD, H.; KETIFE, A. M. D.; JUDD, S.; ALMOMANI, F.; VUTHALURU, H. B. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Ecological Engineering**, v. 110, p. 1-7, 2018.