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

# CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 E *Chlorella fusca* LEB 111 SUPLEMENTADO COM OS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

JÉSSICA TEIXEIRA DA SILVEIRA

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador
PROF.ª DR.ª ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA
Co-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

# CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 E *Chlorella fusca* LEB 111 SUPLEMENTADO COM OS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

JÉSSICA TEIXEIRA DA SILVEIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador
PROF.ª DR.ª ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2019

Ficha catalográfica

S587c Silveira, Jéssica Teixeira da.
Cultivo de *Spirulina sp*. LEB 18 e *Chlorella Fusca* LEB 111 suplementado com os fitohormônios ácido 3-indolacético e trans-zeatina / Jéssica Teixeira da Silveira. – 2019.
111 f.

Dissertação (mestrado) – 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.
Coorientadora: Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa.

1. Auxina 2. Biomassa 3. Biomoléculas 4. Citocinina 5. Lipídios 6. Microalgas I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Rosa, Ana Priscila Centeno da III. Título.

CDU 579:639.64

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

# APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Jéssica Teixeira da Silveira e aprovada em 28 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG

Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte - FURG

Dra. Etiele Greque de Morais – Universidade do Algarve

*Dedico este trabalho aos meus pais, Nilton e Cristina.*

**AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pelas oportunidades que colocou em meu caminho, mas principalmente pelas dificuldades que me fizeram crescer e ser mais forte.

Aos meus pais, principalmente pelo amor que sempre me foi dado, incondicionalmente. Mas também pela educação, apoio financeiro, incentivo, pela construção de caráter, por eu ser hoje quem eu sou e por me orgulhar disso. Tenho certeza que vocês também se orgulham e sabem que fizeram um bom trabalho.

Ao meu namorado Pedro, minha paz, no meio do turbilhão que sou! Aquele que deixa tudo sempre bem, que faz eu esquecer o quanto as coisas estão difíceis e que está sempre ao meu lado, mesmo que do meu lado não esteja tão bom assim.

Minha amiga Camila, meu braço direito, esquerdo, e por muitas vezes minhas duas pernas, cérebro e coração. Não sei se esse trabalho teria sido terminado sem ela. Sempre digo e repito que agradeço todo o dia por ter ela na minha vida e ela faz eu ser uma pessoa muito melhor todos os dias.

Minha irmã e afilhadas, que por mais ausente que eu tenha sido sempre me recebiam com sorrisos, abraços, beijos e muito amor!

A família LEB, TODOS, sem uma exceção, são parte desse trabalho. Foi no LEB que achei meu lugar, que me sinto bem e feliz! Lutamos juntos, sonhamos juntos, ficamos felizes juntos e nos consolamos quando é preciso também! Vibramos e sofremos uns com os outros, como uma verdadeira família! Obrigada mil vezes por terem me acolhido e terem feito eu sentir parte dessa grande família!

Thaisa, Luiza e Gabriel, nossos pós-docs sempre prontos pra ajudar, com paciência e conselhos, a gente sabe que a posição de vocês não é fácil. Obrigada por serem nossa base!

Minhas amigas: Ana Paula, Bárbara Catarina, Bruna Cardias, Camila (de novo) Etiele, Kricelle, Priscilla, fizeram e fazem meus dias mais completos e felizes, com toda a certeza não seria tão feliz se vocês não fizessem parte da minha vida! Muito obrigada!!!

Roque, meu amigo, sempre fazendo de tudo pra me ver bem, pra me ajudar e apoiar! Não sei como vamos seguir sendo quem somos quando tu te aposentares!!!

A minha família e amigos que sempre me recebem de braços abertos, mesmo com toda a ausência. Que mesmo sem entender, sempre me apoiam e se orgulham de tudo o que faço!

Meus orientadores, Jorge Alberto Vieira Costa e Ana Priscila Centeno da Rosa, pelos ensinamentos, por terem contribuído imensamente com minha formação e amadurecimento!

Por todas as oportunidades e principalmente por toda a confiança que sempre depositaram em mim!

Ao MIBI, sempre de portas abertas para qualquer ajuda que fosse necessário. Especialmente agradeço a Bruna Vaz, minha companheira de análises de caracterização, obrigada por todos os ensinamentos, paciência e companhia!

Minhas iniciantes científicas, Gabi e Jenyfer (mesmo que por pouco tempo). Esse trabalho também é um pouco de vocês! Espero que eu tenha conseguido ensinar tanto à vocês quanto vocês ensinaram pra mim!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, por sempre estarem tão dispostos a ensinar e lutarem junto com a gente por um futuro melhor! Especialmente agradeço a Prof. Eliana, por todas as contribuições na qualificação, que com sábias palavras mudou o rumo desse trabalho para muito melhor!

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

FURG, minha segunda casa, a qual tenho muito orgulho!

Ao pensar e escrever sobre esses dois anos, sou só gratidão, orgulho e satisfação! Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, mas mais ainda para eu me tornar a profissional e pessoa que estou me tornando!

MUITO OBRIGADA MIL VEZES!!!!

*“Não adianta olhar pro céu com muita fé e pouca luta.”*

Gabriel O pensador

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

**Tabela 1 -** Cultivos de microalgas suplementados com ácido 3-indolacético ..... 35

**Tabela 2** - Cultivos de microalgas suplementados com *trans*-zeatina ..... 37

CAPÍTULO III

ARTIGO 1: *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**Tabela 1** - Concentrações de suplementação dos fitohormônios tZ e AIA nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18..... 51

**Tabela 2** - Produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração ($t_g$) obtidos nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com suplementação de AIA e tZ ..... 55

**Tabela 3** - Conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios referentes aos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina..... 60

ARTIGO 2: *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**Tabela 1** - Concentrações de suplementação de tZ e AIA nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111..... 74

**Tabela 2** - Produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração ($t_g$) obtidos a partir dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com suplementação de AIA e tZ..... 78

**Tabela 3 -** Conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios referentes aos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com AIA e tZ ..... 82

CAPÍTULO V

**Tabela A1-** Composição química do meio de cultivo Zarrouk ..... 111

**Tabela A2-** Composição química do meio de cultivo BG 11..... 111

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

**Figura 1** - Microalga *Spirulina* sp. LEB 18 ..... 30

**Figura 2** - Microalga *Chlorella fusca* LEB 111 ..... 31

**Figura 3** - Molécula de ácido 3-indolacético ..... 34

**Figura 4** - Molécula de *trans*-zeatina ..... 36

CAPÍTULO III

ARTIGO 1: *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**Figura 1 -** Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementada com diferentes concentrações de tZ referentes ao experimento preliminar ..... 53

**Figura 2 -** Curvas de crescimento do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com tZ ..... 54

**Figura 3 -** Curvas de crescimento do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com AIA ..... 54

**Figura 4 –** Concentrações máxima de biomassa ($X_{máx}$) obtidas nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com suplementação **(a)** tZ, **(b)** AIA e **(c)** tZ+AIA ..... 56

**Figura 5 -** Micrografias com aumento de 5x de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivadas com suplementação dos fitohormônios **(a)** AIA, **(b)** tZ e **(c)** tZ+AIA ..... 58

**Figura 6 -** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementada com AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30 ..... 61

**Figura 7 –** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com tZ nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30 ..... 62

**Figura 8 -** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 tZ + AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30 ..... 63

ARTIGO 2: *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**Figura 1 -** Curvas de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementada com diferentes concentrações de AIA ..... 77

**Figura 2 -** Curvas de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementada com diferentes concentrações de tZ ..... 77

**Figura 3 -** Concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) referente aos experimentos de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com **(a)** tZ, **(b)** AIA e **(c)** tZ+AIA ..... 79

**Figura 4** - Micrografias com aumento de 50x de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivadas com suplementação dos fitohormônios **(a)** AIA, **(b)** tZ e **(c)** tZ+AIA ..... 81
**Figura 5 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30..... 83
**Figura 6 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com tZ nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30..... 84
**Figura 7 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com tZ + AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30 ..... 85

CAPÍTULO V

**Figura AP1**- Ensaios em fotobiorreatores E*rlenmeyers*..... 109
**Figura AP2 -** Curva padrão da microalga *Spirulina* sp. LEB 18..... 109
**Figura AP3** – Curva padrão da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 ..... 109

**SUMÁRIO**

CAPÍTULO I ..... **19**

**RESUMO** ..... 19
**ABSTRACT** ..... 21
**1 INTRODUÇÃO** ..... **23**
1.1 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA ..... 23
**2 OBJETIVOS** ..... **25**
2.1 OBJETIVO GERAL ..... 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 25

CAPÍTULO II ..... 27

**3 REVISÃO DA LITERATURA** ..... **29**
3.1 MICROALGAS ..... 29
**3.1.1 *Spirulina*** ..... **30**
**3.1.2 *Chlorella*** ..... **31**
3.2 FITOHORMÔNIOS ..... 32
**3.2.1 Auxinas** ..... **34**
**3.2.2 Citocininas** ..... **36**
3.3 INTERAÇÃO ENTRE FITOHORMÔNIOS ..... 37
3.4 MODO DE AÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ..... 38

CAPÍTULO III ..... 41

**4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO** ..... **43**

ARTIGO 1: *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA ..... 45
**RESUMO** ..... 47
**1 INTRODUÇÃO** ..... **49**
**2 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **50**
2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO ..... 50

2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR ..... 51
2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL..... 52
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 53
**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 53**
3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR..... 53
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL..... 59
**4 CONCLUSÃO ..... 63**
**REFERÊNCIAS ..... 64**

ARTIGO 2: *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA..... 69
**RESUMO**..... 71
**1 INTRODUÇÃO ..... 73**
**2 MATERIAL E MÉTODOS ..... 73**
2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO ..... 73
2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR ..... 75
2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL..... 76
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 76
**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 76**
3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR..... 76
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL..... 81
**4 CONCLUSÃO ..... 86**
**REFERÊNCIAS ..... 86**

CAPÍTULO IV ..... 91

**5 CONCLUSÃO GERAL ..... 93**
**6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... 95**

CAPÍTULO V..... 97

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA ..... 99**
**APÊNDICES** ..... 109
**ANEXOS** ..... 111

# CAPÍTULO I

**RESUMO**

As microalgas podem ter sua biomassa utilizada para a alimentação, além de terem potencial industrial para a produção de produtos de alto valor agregado, como ácidos graxos essenciais. Em função disso, a área de biotecnologia microalgal incentiva a busca por novas tecnologias que tornem viáveis a aplicação das microalgas na indústria. Para isso, uma alternativa é a suplementação de fitohormônios nos cultivos microalgais. Esses podem causar efeitos no crescimento e alterar rotas metabólicas de produção de compostos, assim como fazem em plantas. Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ) nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111. Para ambas microalgas a suplementação de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$ de AIA e tZ foram avaliadas, além de misturas dos dois fitohormônios em diferentes proporções (0,01 tZ: 1 AIA; 0,1 tZ: 01, AIA; 1 tZ: 0,01 AIA mg $L^{-1}$). Os experimentos foram divididos em grupo GD, no qual foi realizada amostragem diária e grupo G10, com amostragem a cada 10 dias. Os experimentos foram conduzidos *indoor* em duplicatas por 30 dias, de forma descontínua. As respostas quanto ao crescimento microalgal foram obtidas a partir da quantificação de biomassa e parâmetros cinéticos de crescimento. A caracterização da biomassa foi realizada pela determinação do conteúdo de carboidratos, lipídios, proteínas e perfil proteico. Os resultados obtidos mostraram que os fitohormônios AIA e tZ são eficientes para estimular o crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e versáteis para induzir a produção de biomoléculas de interesse. As concentrações máximas de biomassa foram obtidas para ambas microalgas com condições de suplementação de AIA e menor frequência de amostragem (G10). Nos experimentos com *Spirulina* a concentração máxima de biomassa foi 3,7 g $L^{-1}$ com a adição de 1 mg $L^{-1}$ de AIA. Da mesma forma a suplementação de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$ de AIA nos cultivos de *Chlorella* teve como resposta aumentos nas concentrações máxima de biomassa (2,2 g $L^{-1}$). Além disso, o conteúdo de macrocomponentes foi aumentado atingindo valores de até 70% de proteínas (com suplementação de 1 mg $L^{-1}$ AIA G10), 21% de carboidratos (com adição de10 mg $L^{-1}$ AIA G10) e 25% de lipídios (com uso de 0,1 mg $L^{-1}$ AIA GD) nos cultivos de *Spirulina*. Nos experimentos com *Chlorella*, as suplementações de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$ de AIA, 0,01 mg $L^{-1}$ e 0,1 de tZ e a mistura de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ e 1 mg $L^{-1}$ de AIA foram eficientes para aumentar o conteúdo de lipídios (34%), proteínas (50%) e carboidratos (32%), respectivamente. Além disso, ao acompanhar a morfologia das células durante os cultivos se observou que os fitohormônios proporcionaram alongamento acentuado nas células de *Spirulina*. Sendo assim, a suplementação de fitohormônios se mostrou uma alternativa versátil e promissora para aumentar a produção de biomassa e biomoléculas em microalgas, principalmente para aplicação em industrial, pois tem a capacidade de agregar aumento no acúmulo de biomassa e biomoléculas.

Palavras-chave: Auxina. Biomassa. Biomolécula. Biotecnologia. Citocinina. Microalga.

## ABSTRACT

### CULTIVATION OF *Spirulina* sp. LEB 18 E C*hlorella fusca* LEB 111 SUPPLEMENTED WITH THE PHYTOHORMONES 3-INDOLACETIC ACID AND *trans*-ZEATIN

Microalgae can have their biomass used for food, as well as having industrial potential for the production of high added value products, such as essential fatty acids. Because of this, the area of microalgal biotechnology encourages the search for new technologies that make feasible the application of microalgae in industry. For this, an alternative is the supplementation of phytohormones in microalgal cultures. These can cause growth effects and alter metabolic pathways of compound production, just as they do in plants. In this context, the objective of this work was to evaluate the effects of the supplementation of phytohormones 3-indoleacetic acid (IAA) and *trans*-zeatin (tZ) on *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella* fusca LEB 111. For both microalgae the supplementation of 0.01; 0.1; 1 and 10 mg $L^{-1}$ of IAA and tZ were evaluated, in addition to mixtures of the two phytohormones in different proportions (0.01 tZ: 1 IAA, 0.1 tZ: 01, IAA, 1 tZ: 0.01 IAA mg $L^{-1}$). The experiments were divided in GD group, in which daily sampling and G10 group, with sampling every 10 days. The experiments were conducted indoor in duplicates for 30 days, discontinuously. Responses for microalgal growth were obtained from the quantification of biomass and kinetic growth parameters. The biomass characterization was performed by determining the carbohydrate, lipid, protein and protein profile content. The results obtained showed that the phytohormones IAA and tZ are efficient to stimulate the growth of *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 and versatile to induce the production of biomolecules of interest. Maximum biomass concentrations were obtained for both microalgae with IAA supplementation conditions and lower sampling frequency (G10). In the experiments with *Spirulina* the maximum concentration of biomass was 3.7 g $L^{-1}$ with the addition of 1 mg $L^{-1}$ of IAA. Likewise, supplementation of 0.1 and 1 mg $L^{-1}$ of IAA in *Chlorella* cultures resulted in increases in the maximum concentrations of biomass (2.2 g $L^{-1}$). In addition, the content of macrocomponents was increased to values of up to 70% of proteins (with supplementation of 1 mg $L^{-1}$ IAA G10), 21% of carbohydrates (with addition of 10 mg $L^{-1}$ IAA G10) and 25% of lipids (using 0.1 mg $L^{-1}$ IAA GD) in *Spirulina* cultures. In the experiments with *Chlorella*, supplements of 0.1 and 1 mg $L^{-1}$ of IAA, 0.01 and 0.1 mg $L^{-1}$ of tZ and the mixture of 0.01 mg $L^{-1}$ of tZ and 1 mg $L^{-1}$ of IAA were efficient to increase the content of lipids (34%), proteins (50%) and carbohydrates (32%), respectively. In addition, monitoring the cell morphology during cultivations showed that phytohormones provided marked elongation in *Spirulina* cells. Thus, phytohormone supplementation has proved to be a versatile and promising alternative to increase the production of biomass and biomolecules in microalgae, mainly for industrial applications, since it has the capacity to increase the accumulation of biomass and biomolecules.


Keywords: Auxin. Biomass. Biomolecules. Biotechnology. Cytokinin. Lipids. Microalgae.

# 1 INTRODUÇÃO

Microalgas são fontes de carboidratos, proteínas, lipídios, pigmentos e antioxidantes. A produção e composição da biomassa microalgal pode ser manipulada por meio de algumas condições para maior produção do metabólito de interesse. Variações nas condições de cultivo como temperatura, intensidade luminosa, pH, salinidade e composição do meio de cultura são alguns dos fatores que tornam isso possível (KIM, 2015).

As cianobactérias do gênero *Spirulina* se destacam pelo alto valor nutricional, pois possuem elevado teor proteico, ácidos graxos poli-insaturados, minerais e pigmentos. Devido a isso são muito aplicadas na indústria alimentícia (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). As microalgas do gênero *Chlorella*, nos últimos anos, recebem atenção por serem ricas em lipídios, o que as torna potenciais matérias-primas para produção de biodiesel (SATI et al., 2019).

Entretanto, apesar de todo o potencial de aplicação desses microrganismos, ainda hoje são estudadas formas de cultivo que aumentem a produção de biomassa e biomoléculas de forma sustentável e econômica (ABINANDAN et al., 2019; UGGETTI et al., 2018). Para isso, uma alternativa é suplementar os cultivos microalgais com fitohormônios (LV et al., 2019). Essas substâncias são conhecidas por atuarem em plantas, influenciando o crescimento e ajustando várias rotas metabólicas (DILWORTH; RILEY; STENNETT, 2017). Além disso, alguns autores como Kozlova; Hardy e Levin (2018), Renuka et al. (2017) e Yu et al. (2018) relataram que a suplementação de fitohormônios em cultivos microalgais é eficiente para aumentar a produção de biomassa e biomoléculas, principalmente lipídios.

Sendo assim, este estudo visou obter respostas a respeito da suplementação de fitohormônios em cultivos de dois tipos de microalgas, eucarióticas e procarióticas, levando em consideração as diferenças de cada uma. Além disso, buscou-se definir o fitohormônio e concentração mais adequados para aumentar a produção de biomassa e biomoléculas, sendo possível inclusive induzir a produção de uma molécula de interesse. Dessa forma, acredita-se que pode ser fornecida uma base para o desenvolvimento de estratégias para a melhora na produção de microalgas baseadas na suplementação de fitohormônios e assim, contribuir com alternativas para tornar a biotecnologia microalgal mais eficiente.

## 1.1 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA

Diferentes condições de cultivo e aplicação da biomassa microalgal são estudadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade

Federal do Rio Grande (FURG) desde 1996. Mais recentemente, tem-se estudos de aplicação da biomassa microalgal no desenvolvimento de alimentos (LUCAS et al., 2018), suplementos proteicos (PEREIRA; LISBOA; COSTA, 2018), nutricosméticos (MORO, 2017), e nanofibras (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). E, quando se refere a forma de cultivo, os últimos estudos visam cultivos com aplicação de campo magnéticos (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019), diodos emissores de luz (LEDs) (DUARTE; COSTA, 2018), uso de fontes alternativas de carbono orgânico (CASSURIAGA et al., 2018; MORAIS et al., 2019), efluentes industriais (BRAGA et al., 2019), compostos químicos (CARDIAS; MORAIS; COSTA, 2018; ROSA; MORAIS; COSTA, 2019) e biofixação de $CO_2$ (MORAES et al., 2018). Além da obtenção de ficocianina (PRATES et al., 2018) e antioxidantes (COSTA et al., 2019) a partir desses microrganismos. Ainda, os pesquisadores vêm desenvolvendo trabalhos de isolamento de microalgas como *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) e *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE; MORAIS, 2012).

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o fitohormônio e concentração que promovam maior crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111;
- Analisar a composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 suplementadas com os fitohormônios *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético;
- Observar modificações na morfologia das células de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 promovidas pela suplementação de ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina;
- Avaliar a interferência da frequência de amostragem na disponibilidade de fitohormônio para consumo das células;
- Determinar o efeito sinérgico dos fitohormônios *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111.

# CAPÍTULO II

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos que apresentam a capacidade de realizar fotossíntese. A classificação desses microrganismos é dada pelos constituintes da parede celular, pigmentos e natureza química dos produtos de reserva. Também, para esse fim, podem ser considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas e sua estrutura, processos de formação do núcleo e divisão celular, presença e caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (SINGH; SAXENA, 2015). Esses microrganismos podem apresentar estrutura celular procariótica, como as pertencentes às divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta, ou eucariótica, como os organismos das Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, entre outros), Cryptophyta e Dinophyta (DERNER et al., 2006).

A biomassa microalgal vem sendo utilizada na alimentação humana há séculos por povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México. A partir disso, culturas comerciais de microalgas foram iniciadas nas décadas de 1960 (*Chlorella*) e 1970 (*Spirulina*) (RICHMOND, 2003). Sendo, até hoje, a maior aplicação industrial dos cultivos microalgais, comercializada em forma de biomassa seca integral como suplemento alimentar (JACOB-LOPES et al., 2019). Entretanto, a biomassa de algas pode ser utilizada para a produção de co-produtos industrialmente ou produtos de valor agregado como pigmentos, ração animal, fertilizantes orgânicos, cosméticos, produtos químicos, nutracêuticos e ácidos graxos essenciais (CHEW et al., 2017). Além disso, são consideradas potenciais fontes de biocombustíveis de terceira geração como, biodiesel, biohidrogênio, bioetanol e biogás. Seu cultivo pode trazer benefícios ambientais como, fitorremediação de águas residuais e o sequestro de $CO_2$ (MATHIMANI; PUGAZHENDHI, 2019).

Essa diversidade de aplicação das microalgas se deve ao fato de que se pode, por meio de fatores externos, induzir modificações metabólicas nas células que levem a maior produção de um composto de interesse. Além da natureza de cada espécie, fatores como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e concentração de $CO_2$ no meio de cultivo são fatores que afetam o crescimento e composição da biomassa (KIM, 2015). Em função disso, a área de biotecnologia microalgal incentiva a busca por novas tecnologias e formas de cultivo que tornem viáveis, econômica e ambientalmente, a aplicação das microalgas na indústria.

Principalmente se tratando de gêneros de microalgas já conhecidos e com mercado estabelecido, mas que apresentem potencial para maiores aplicações, como *Spirulina* e *Chlorella* (KHANRA et al., 2018).

Além da diferença morfológica, *Spirulina* é um microrganismo procariótico e *Chlorella* eucariótico, sendo assim, apresentam diferentes sistemas fotossintéticos. Nos procariotos a fotossíntese ocorre em grânulos ligados à membrana plasmática e em eucariotos ocorre nos cloroplastos (MARZZOCO; TORRES, 1999).

### 3.1.1 *Spirulina*

Microrganismos do gênero *Spirulina* (Figura 1), contém clorofila, o que os classifica como microalgas pertencentes à classe de Cyanophyceae. Entretanto, devido à sua estrutura procariótica, também são classificadas como cianobactérias (KORU, 2012). *Spirulina* é um organismo multicelular e filamentoso que forma tricomas cilíndricos com 1 a 12 µm de diâmetro e se dispõem na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento (VONSHAK, 1997).

**Figura 1** - Microalga *Spirulina* sp. LEB 18

Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG.

Os requisitos de crescimento da microalga *Spirulina* são semelhantes aos das plantas, entretanto as microalgas utilizam esses recursos de forma muito eficiente, apresentando maior produtividade da biomassa (SUDHAKAR; PREMALATHA; RAJESH, 2014). Existem diferentes composições de meio de cultivo que podem ser utilizados para cultivar *Spirulina*, sendo mais comum a utilização do meio Zarrouk. Entretanto, o meio pode variar com as condições de cultivo, mas essencialmente é constituído de nitrato, bicarbonato e certos íons podem estar presentes como sulfato, cloreto, nitrato e sódio (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013). Entre os fatores físicos, aeração e agitação são importantes para proporcionar

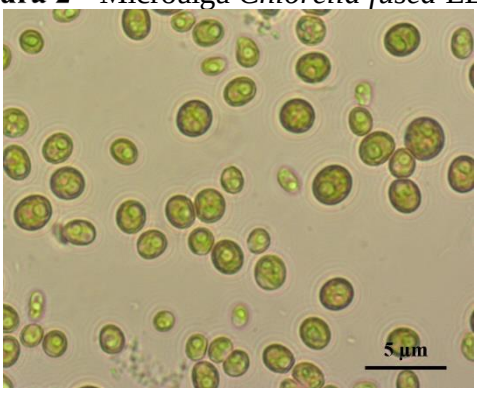
distribuição homogênea das células em todo o sistema para garantir exposição adequada à luz. Em questões de temperatura e pH, as faixas ideais de crescimento para *Spirulina* são 29 - 35 °C e pH entre 9 e 11 (RICHMOND, 2003).

A biomassa de *Spirulina* é fonte principalmente de proteínas cerca de 60% - 70% do seu peso seco, vitaminas B1, B2, B12, E, minerais como ferro, magnésio, cálcio e fósforo (VONSHAK, 1997). Além de ser rica em compostos antioxidantes, anti-virais e anti-tumorais (WAN; WU; KUČA, 2016). Devido a essas características, é considerada um alimento rico nutricionalmente e uma matéria-prima potencial para aplicação em nutracêuticos e farmacêuticos (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

### 3.1.2 *Chlorella*

Dentro da divisão Chlorophyta estão microalgas do gênero *Chlorella* (Figura 2) que possuem clorofilas a e b, são eucarióticas unicelulares e esféricas com diâmetro entre 2 e 10 µm, variando conforme a espécie (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000). Microalgas desse gênero possuem um único cloroplasto, contendo grânulos de amido e quantidades elevadas de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RuBisCO) (SAFI et al., 2014). A enzima rubisco é essencial para a fotossíntese, pois catalisa a fixação de dióxido de carbono no ciclo de Calvin (NELSON; COX, 2011) e, por apresentar grande teor dessa enzima, a microalga *Chlorella* tem potencial para capturar grandes concentrações de $CO_2$ da atmosfera (HO et al., 2011).

**Figura 2** - Microalga *Chlorella fusca* LEB 111




Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG.

Microalgas do gênero *Chlorella* produzem diferentes compostos intra e extracelulares, contendo em média, 53% de proteínas, 23% de carboidratos e 9% de lipídios (MORAIS et al., 2015). Contém vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno e vitamina B12, e todos os aminoácidos essenciais (HENRIKSON, 1994). Também possuem mais de 2% de clorofila, o que permite rápido crescimento (VONSHAK, 1997). Entretanto, a cepa de *Chlorella fusca* LEB 111, a qual foi isolada de lagoas de assentamento de cinzas na Usina Termelétrica Presidente Médici (MORAIS; DUARTE, 2012), apresenta algumas características peculiares. Apresentam em média 15% de lipídios em sua biomassa e valores de pH elevados durante o cultivo (BRAGA et al., 2019; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016). Para o gênero normalmente é descrito pH ótimo de 8,5 (TAŞTAN et al., 2012), porém em cultivos realizados com *Chlorella fusca* LEB 111 o pH varia entre 8 e 10,5 aproximadamente (BRAGA et al, 2019; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016). Esses valores de pH elevados também são justificados pelo local de isolamento da microalga, no qual o pH relatado é superior a 9,0 (MORAIS; DUARTE, 2012.

## 3.2 FITOHORMÔNIOS

Os fitohormônios são moléculas sinalizadoras (VOβ et al., 2014) presentes em plantas. Essas substâncias desempenham funções de controle no crescimento e desenvolvimento e, devido sua atuação, são também denominadas reguladores de crescimento de plantas (YAMAGUCHI et al., 2010). Esses compostos são divididos em cinco classes clássicas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). Entretanto, a definição de fitohormônio não é bem estabelecida e, dependendo da vertente que é considerada, vários outros grupos podem ser descritos como hormônios vegetais por exemplo, brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico (YAMAGUCHI et al., 2010).

Além de estarem presentes em plantas, os fitohormônios também vêm sendo identificados em algas e microalgas desde 1980 (VANCE, 1987). No entanto, estudos sobre a presença de fitohormônios nesses organismos ainda são escassos quando comparados a estudos em vegetais. Além disso, não há clareza de quais são as semelhanças e diferenças no metabolismo e mecanismos de ação de fitohormônios em microalgas, algas e plantas (KISELEVA; TARAKHOVSKAYA; SHISHOVA, 2012; TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007).

Na agricultura, os fitohormônios exercem um papel importante e podem ser adicionados a cultivos vegetais para estimular o crescimento das plantas. A utilização dessas

substâncias apresenta vantagens como ser eficiente em concentrações muito baixas (aproximadamente $10^{-4}$ mol $L^{-1}$), serem naturais, ambientalmente seguras e se degradarem rapidamente (CHERNYAD'EV, 2009). Além disso, a legislação brasileira não determina limites máximos de resíduos e intervalo de segurança para a maioria dos fitohormônios, visto que os mesmos têm ocorrência natural em culturas alimentares (BRASIL, 2018). Devido a essas características, biofertilizantes comerciais que contém fitohormônios como princípio ativo são utilizados principalmente para cultivos de alimentos orgânicos (BRASIL, 2013).

Assim, como nos cultivos vegetais, a aplicação exógena de fitohormônios em cultivos microalgais é uma alternativa que pode auxiliar no aumento da produção de biomassa (LU; XU, 2015). Sabe-se que em plantas a dose de fitohormônio suplementado é de extrema importância para sua atuação. Por exemplo, baixas concentrações desses compostos exercem função como biofertilizantes em plantas. Mas, em doses elevadas, os fitohormônios são utilizados como biopesticidas, pois inibem o crescimento celular. Entretanto, a concentração tóxica para cada organismo depende da sua capacidade de desintoxicação (CAMPBELL; SHAWN, 2000). Dessa forma, para aplicação dessas substâncias em microalgas, a adequação da concentração é ainda mais importante, visto que, variações pequenas no cultivo podem gerar grandes mudanças nas células (LU; XU, 2015).

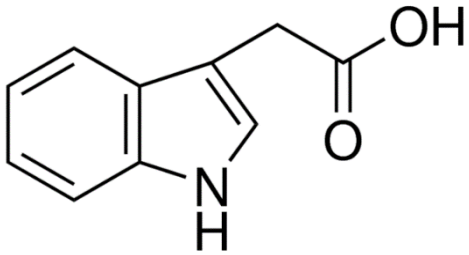
Outra questão ligada ao uso de fitohormônios nos cultivos microalgais é o aumento de custos de produção, pois se trata de um insumo de alto custo, apesar de utilizado em pequenas quantidades. Devido a isso, alguns estudos são focados em avaliar a viabilidade econômica dessa estratégia. Park et al. (2013) analisaram a viabilidade econômica do cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* suplementado com fitohormônios em comparação com o meio sintético controle. Este estudo mostrou que o custo de produção de biomassa, com o uso de fitohormônios ácido 3-indolacético, ácido giberélico, cinetina e 1-triacontanol foi de aproximadamente R$ 0,30 por grama, mais econômico do que sem fitohormônios (R$ 0,48 por grama). Salama et al. (2014) mostraram também menor custo final da produção de biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*, suplementada com ácido 3-indolacético (R$ 0,90 por grama) em relação ao meio padrão de cultivo (R$ 1,80 por grama).

Apesar dos vários grupos de fitohormônios existentes, auxinas e citocininas são os mais conhecidos. Isso porque há indícios de que fitohormônios pertencentes a esses dois grupos são necessários continuamente para o metabolismo das plantas, enquanto que fitohormônios dos demais grupos só se fazem necessários em processos específicos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

### 3.2.1 Auxinas

Auxinas são fitohormônios conhecidos por atuarem principalmente no alongamento do caule e atraso na abscisão foliar em plantas vasculares (SALAMA et al., 2014). Esse grupo de hormônios é quimicamente diverso, mas, em sua maioria, é composto por substâncias que apresentam um sistema aromático (anel indol, fenol ou naftaleno) e uma cadeia lateral com um grupo carboxila (COOKE et al., 2002). Dentre as auxinas, o ácido 3-indolacético (AIA), se destaca devido a ser natural e apresentar maior atividade em plantas e algas (BONNER; BANDURSKI, 1952; CZERPAK; BAJGUZ, 1997). Acredita-se que a principal rota de biossíntese desse composto seja dependente de triptofano, e quatro vias são descritas: 3-indolacetaldoxima, 3-indolacetamida, triptamina e vias do ácido 3-indolpirúvico. E, ao se observar a molécula de AIA (Figura 3) pode-se verificar a semelhança com a molécula do aminoácido. Entretanto, uma via independente de triptofano, 3-indolglicerol fosfato, também já foi descrita (TIVENDALE; ROSS; COHEN, 2014).

**Figura 3** - Molécula de ácido 3-indolacético




Fonte: Bajguz; Piotrowska (2009).

Quando usadas exogenamente no cultivo de algas, as auxinas apresentam aspectos interessantes na divisão celular, principalmente por estímulo da mitose (HUNT et al., 2010; PIOTROWSKA; CZERPAK, 2009) e eliminação da fase *lag* (VANCE, 1987). Isso leva a redução no tempo de geração e consequentemente aumenta o crescimento, fazendo com que se alcance maior rendimento de biomassa (ARROUSSI et al., 2015). Há na literatura alguns estudos em que a adição de ácido 3-indolacético aos cultivos microalgas aumentou a concentração máxima de biomassa (Tabela 1). Entretanto, como já mencionado anteriormente, os efeitos positivos da suplementação dos cultivos de microalgas com fitohormônios se manifestam em baixas concentrações, porém quando essas concentrações são aumentadas há inibição no crescimento. Piotrowska-Niczyporuk e Bajguz (2014) ao realizar cultivo de *Chlorella vulgaris* com adição de $10^{-7}$ mol $L^{-1}$ de AIA ao meio, conseguiram aumento de 53%

em densidade celular, porém com adição de $10^{-4}$ mol $L^{-1}$ do fitohormônio, a concentração celular da microalga foi inibida em aproximadamente 10%.

**Tabela 1 -** Cultivos de microalgas suplementados com ácido 3-indolacético

| Microalga | Concentração do fitohormônio | Concentração celular do cultivo suplementado ($x10^6$ cél $mL^{-1}$) | Concentração celular do cultivo controle ($x10^6$ cél $mL^{-1}$) | Referência |
|---|---|---|---|---|
| *Scenedesmus obliquus* | $10^{-8}$ mol $L^{-1}$ | 38 | 32 | (SALAMA et al., 2017) |
| *Ourococcus multisporus* | $10^{-6}$ mol $L^{-1}$ | 86 | 78 | (SALAMA et al., 2017) |
| *Chlorella vulgaris* | $10^{-5}$ mol $L^{-1}$ | 44 | 33 | (SALAMA et al., 2017) |
| *Nannochloropsis oceanica* | 10 mg $L^{-1}$ | 579,5 | 215,5 | (UDAYAN; ARUMUGAM, 2017) |
| *Scenedesmus quadricauda* | $10^{-8}$ mol $L^{-1}$ | 2,03 | 1,6 | (KOZLOVA et al., 2017) |
| *Scenedesmus sp.* | 1 mg $L^{-1}$ | 4,47 | 3,56 | (DAO et al., 2018) |

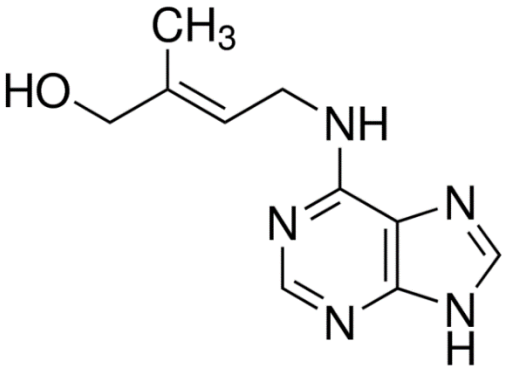
Além de aumentos no crescimento celular, estudos em que cultivos microalgais foram suplementados com AIA mostraram aumentos na produção de lipídios e proteínas. O estudo de Babu et al. (2017) mostrou que a suplementação de $10^{-5}$ mol $L^{-1}$ de AIA aumentou em 23% a produção de lipídios pela microalga *Chlorella sorokiniana*. No estudo de Park et al. (2013) a suplementação de 0,1 mg $L^{-1}$ de AIA no cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* estimulou o aumento da produção de proteínas em 35%. E, assim como para o acúmulo de biomassa, a produção de biomoléculas também é estimulada gradualmente com o aumento na concentração de fitohormônio suplementado. Entretanto, depois de uma concentração ótima, o aumento da concentração de suplementação promove uma queda na produção. Esse fato foi relatado no estudo de Salama et al. (2014), onde houve aumento no conteúdo de proteínas de 32% para 34% com a suplementação de $10^{-8}$ mol $L^{-1}$ de AIA em relação ao cultivo de *Scenedesmus obliquus* sem suplementação. Porém, posteriormente com o aumento gradual da

concentração de suplementação até $10^{-5}$ mol $L^{-1}$ de AIA os conteúdos de proteínas diminuíram de 34% para 25%.

### 3.2.2 Citocininas

Citocininas são fitohormônios que, em plantas, controlam o desenvolvimento do broto e retardam o envelhecimento natural das folhas (senescência) (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007), além de desempenharem papel na divisão celular e desenvolvimento de tecido vascular (GALUSZKA et al., 2008). Essas substâncias ocorrem naturalmente e são derivadas do metabolismo de nucleotídeos, mais especificamente de adeninas, com uma cadeia lateral de isoprenóide ou derivado aromático. Dentre as citocininas isoprenóides, a *trans*-zeatina (Figura 4) é a de maior ocorrência natural e apresenta maior atividade em bioensaios (BAJGUZ; PIOTROWSKA, 2009).

**Figura 4** - Molécula de *trans*-zeatina




Fonte: Bajguz; Piotrowska (2009).

Esses fitohormônios também são encontrados em microalgas, nas quais desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese (PIOTROWSKA; CZERPAK, 2009). Devido a isso, estudos estão sendo realizados com a adição dessas substâncias nos cultivos microalgais (Tabela 2). Renuka et al. (2017), comprovaram que a suplementação de citocinina nos cultivos de microalgas pode aumentar a eficiência fotossintética principalmente no final da fase log, o que leva a um maior crescimento das microalgas. Nesse estudo os autores suplementaram o cultivo de *Acutodesmus obliquus* com 0,1 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina e obtiveram 47,54 e 0,651 de taxa relativa de transporte de elétrons e eficiência máxima quântica, respectivamente. O cultivo controle nessas mesmas análises apresentou

40,37 de taxa relativa de transporte de elétrons e 0,348 para eficiência máxima quântica. Esse aumento na eficiência fotossintética pode ser justificado pela capacidade das citocininas de melhorar a fixação de carbono na fotossíntese, de forma que pode aumentar a atividade das enzimas envolvidas no processo, principalmente a rubisco, e proteger as células de condições de estresse, como por exemplo inibindo a degradação da estrutura dos cloroplastos (CHERNYAD'EV, 2009).

**Tabela 2** - Cultivos de microalgas suplementados com *trans*-zeatina

| **Microalga** | **Concentração do fitohormônio *trans*-zeatina** | **Concentração celular do cultivo suplementado** | **Concentração celular do cultivo controle** | **Referência** |
|---|---|---|---|---|
| *Acutodesmus obliquus* | 0,1 mg $L^{-1}$ | 2,01 g $L^{-1}$ | 2,22 g $L^{-1}$ | (RENUKA et al., 2017) |
| *Chlorella vulgaris* | $10^{-8}$ mol $L^{-1}$ | 1,8 x $10^{6}$ cél $mL^{-1}$ | 4,3 x $10^{6}$ cél $mL^{-1}$ | (BAJGUZ; PIOTROWSKA-NICZYPORUK, 2014) |
| *Chlorella vulgaris* | $10^{-5}$ mol $L^{-1}$ | 38 x $10^{5}$ cél $mL^{-1}$ | 78 x $10^{5}$ cél $mL^{-1}$ | (PIOTROWSKA; CZERPAK, 2009) |

Além disso, o aumento na produção de biomoléculas também recebe destaque. Piotrowska e Czerpak (2009) mostraram que a síntese de proteínas aumentou 185% quando o cultivo de *Chlorella vulgaris* foi suplementado com $10^{-8}$ mol $L^{-1}$ de *trans*-zeatina. Em outro estudo Bajguz e Piotrowska (2014) relataram aumento significativo de 50% na produção de monossacarídeos por *Chlorella vulgaris* tratada com 10 nmol $L^{-1}$ de tZ. E, Renuka et al. (2017) com suplementação de 0,1 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina em cultivos de *Acutodesmus obliquus* obtiveram aumento de aproximadamente 64% na produtividade lipídica.

## 3.3 INTERAÇÃO ENTRE FITOHORMÔNIOS

Na natureza, os fitohormônios raramente funcionam como agentes únicos. Dentro das células, os fitohormônios atuam ativando vias de sinalização específicas que normalmente

interagem entre si (VERHAGE; VAN WEES; PIETERSE, 2010). Contudo, essa interação pode ter características diferentes resultando em ações sinérgicas, aditivas ou antagônicas (GRAY, 2004). Efeito sinérgico é quando a combinação de duas substâncias apresenta melhores resultados que a soma das respostas obtidas por cada uma individualmente. Os efeitos de adição são quando os resultados das combinações entre as mesmas são melhores que os resultados de cada uma delas atuando sozinhas, mas não necessariamente precisa ser superior a soma desses resultados. Em contraste, um efeito antagonista é definido como o resultado observado quando o efeito de compostos misturados é menor que o efeito de cada composto sozinho (TALLARIDA, 2011).

Os resultados da interação entre fitohormônios são dependentes das concentrações dos fitohormônios e espécies de plantas, algas ou microalgas em questão, bem como das condições de cultivo e/ou ambientais. Por exemplo, estudos demonstraram que em plantas auxinas e citocininas atuam em conjunto e que modificações nas proporções entre as mesmas determinam o tipo de órgão a ser formado pelo organismo (SU; LIU; ZHANG, 2011). Já em microalgas, estudos que avaliam as misturas de fitohormônios na suplementação dos cultivos começaram a ser realizados recentemente. Kozlova, Hardy e Levin (2018) suplementaram misturas de auxinas e brassinosteróides em diferentes proporções no cultivo de *Scenedesmus quadricauda*. Os autores obtiveram aumento na densidade celular em 1,74 vezes com a suplementação da mistura de 2 nmol $L^{-1}$ de 24-epibrassinolide e 5 nmol $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético comparado com a suplementação dos fitohormônios sozinhos. Entretanto, a combinação 0,5 de nmol $L^{-1}$ de 24-epibrassinolide e 100 nmol $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético teve resultados de crescimento celular inferiores a suplementação de 100 nmol $L^{-1}$ de AIA sozinho.

## 3.4 MODO DE AÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS

De forma geral, o modo de ação de qualquer hormônio vegetal ocorre em três etapas: percepção do sinal, transdução do sinal percebido e alvos primários da ação hormonal. A percepção, é realizada através da ligação do hormônio a um receptor específico, os quais normalmente são proteínas localizadas na membrana celular ou no citoplasma. Após a ligação o receptor pode sofrer mudança conformacional, alcançando um estágio ativado, a partir do qual são desencadeadas reações químicas intracelulares que leva a uma resposta característica. Dessa forma, além das proteínas receptoras aturem na detecção também atuam na transdução do sinal, juntamente com outras moléculas denominadas como mensageiros secundários. Por

fim, o sinal percebido e amplificado deve atuar sobre os alvos primários fundamentais, os quais são mecanismos celulares básicos como a expansão, divisão e diferenciação. O somatório dessa atuação sobre os alvos primários se traduz na modificação organismo, entretanto cada classe hormonal possui especificidades em seus mecanismos de ação (KERBAUY, 2004).

Muitos genes estão envolvidos na atuação das auxinas nos organismos. Os genes da família Aux/IAA são as principais medidas de resposta as auxinas, proteínas Aux/IAA funcionam como reguladores negativos da expressão gênica (REMINGTON et al., 2004). Além disso, membros da família de fatores de resposta à auxina (ARFs, *Auxin Response Factors*) são fatores de transcrição que se ligam à elementos de resposta as auxinas (AREs, *Auxin-Responsive Elements*) nos promotores dos genes de respostas primárias, medindo sua transcrição. A ativação ou repressão desses e de outros genes durante o processo são responsáveis pelos efeitos fisiológicos da auxina (ULMASOV; HAGEN; GUILFOYLE, 1997). Entretanto, essa sinalização medida por Aux/IAA e ARE provavelmente não é a única via pela qual auxinas agem. Isso porque, algumas respostas à auxinas são muito rápidas para serem medidas por transcrição gênica, como por exemplo a despolarização da membrana (FELLE; PETERS; PALME, 1991).

Diferentemente, as citocininas atuam sob o sistema regulatório de dois componentes, o qual é comum em procariotos, eucariotos simples e plantas. Esse sistema consiste em uma enzima cinase do tipo histidina (componente 1) que percebe a entrada do sinal e de um regulador de resposta (componente 2) que controla a saída do sinal. A via de sinalização se inicia quando a cinase é ativada por citocinina e fosforila seu próprio resíduo de histidina, transferindo esse fosfato, por fim, para o regulador de resposta (ARR). No caso de citocininas, há um terceiro componente no sistema, os transferidores de fosfato (AHP) que agem entre o componente 1 e 2 (KERBAUY, 2004).

# CAPÍTULO III

# 4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi divido em duas etapas. Na primeira foram realizados os cultivos com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e, na segunda os cultivos com *Chlorella fusca* LEB 111. Ambas microalgas foram suplementadas com diversas concentrações dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ) de forma isolada e em conjunto. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação no comportamento das diferentes microalgas, sendo uma procariótica e outra eucariótica. Para esse fim, a produção de biomassa microalgal e a composição dessas foram avaliadas, gerando dois artigos científicos:

ARTIGO 1: *Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

ARTIGO 2: *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

ARTIGO 1:

*Spirulina* sp. LEB 18 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**RESUMO**

Fitohormônios auxiliam o crescimento e modificam rotas metabólicas de plantas e podem apresentar o mesmo efeito em microalgas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e caracterizar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ). A suplementação de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$ dos fitohormônios AIA e tZ foram avaliados, além de misturas dos dois fitohormônios em diferentes proporções. Os experimentos foram divididos em grupo GD, no qual foi realizada amostragem diária e, grupo G10, com amostragem a cada 10 dias. Os grupos tiveram suplementação e condições de cultivo idênticas. Nos dois grupos, os fitohormônios estimularam positivamente o crescimento celular. Entretanto os experimentos do grupo G10 apresentaram resultados superiores de concentração máxima de biomassa (3,7 g $L^{-1}$ com a adição de 1 mg $L^{-1}$ de AIA) que o grupo GD (2,4 g $L^{-1}$ com a adição de 1 mg $L^{-1}$ de AIA). A suplementação também aumentou a produtividade máxima de biomassa (102,5 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$ com adição de 0,01 mg $L^{-1}$ tZ) e todas as concentrações de suplementação de fitohormônios isolados proporcionaram alongamento acentuado na estrutura da célula. Além disso, o conteúdo de macrocomponentes foi aumentado atingindo valores de até 70% (1 mg $L^{-1}$ AIA G10) para proteínas, 21% (10 mg $L^{-1}$ AIA G10) para carboidratos e 25% (0,1 mg $L^{-1}$ AIA GD) para lipídios. Quando suplementados os fitohormônios combinados não foi observado efeito positivo entre as combinações das concentrações testadas. A suplementação de fitohormônios se mostrou uma alternativa promissora para aumentar a produção de biomassa e biomoléculas.

**Palavras-chave:** Alongamento celular. Auxina. Biomassa. Biomoléculas. Citocinina. Microalga.

# 1 INTRODUÇÃO

*Spirulina* é um dos gêneros de microalga mais estudados devido a presença de compostos de interesse comercial em sua biomassa (SHARMA; SHARMA, 2017). Esse microrganismo é comercialmente importante devido a sua diversidade de aplicação. Estudos já foram realizados para a produção de alimentos (LUCAS et al., 2018) e suplementos alimentares (CARVALHO et al., 2016), antioxidantes (COSTA et al., 2019), pigmentos (PRATES et al., 2018), biopolímeros (COSTA et al., 2018), nanofibras (MOREIRA et al., 2018), biocombustíveis (COSTA; MORAIS, 2011), dentre outros, utilizando este microrganismo.

Alguns parâmetros nos cultivos de microalgas vêm sendo estudados e modificados para que se possa aproveitar todo potencial de aplicação desses microrganismos, seja para aumentar o acúmulo de biomassa ou induzir metabolicamente produtos de maior interesse comercial (PROKOP; BAJPAI; ZAPPI, 2015). Para isso, uma alternativa que tem se mostrado promissora, é a suplementação dos cultivos microalgais com fitohormônios, os quais também são denominados reguladores de crescimento de plantas (PARK et al., 2013).

Os fitohormônios são moléculas sinalizadoras (VOβ et al., 2014) que desempenham funções no crescimento de plantas (YAMAGUCHI et al., 2010). Além disso, apresentam vantagens como serem eficientes em baixas concentrações, naturais, ambientalmente seguros e se degradarem rapidamente (CHERNYAD'EV, 2009). Devido a essas característiscas, os fitohormônios podem ser utilizados como biofertilizantes em culturas orgânicas, visto que os mesmos apresentam ocorrência natural em culturas alimentares, e apresentam efeitos ecológicos prejudiciais mínimos no solo, na água e ambiente (WONG et al., 2015).

Assim como nos cultivos vegetais, a aplicação exógena de fitohormônios em cultivos microalgais é uma alternativa que pode auxiliar no aumento da produção de biomassa. Entretanto, quando essas substâncias são aplicadas em microalgas, a adequação da concentração é um fator importante, visto que, variações pequenas no cultivo podem gerar grandes mudanças nas células e o excesso de fitohormônio pode ter efeito de inibição no crescimento celular (LU; XU, 2015).

Apesar dos vários grupos de fitohormônios existentes, auxinas e citocininas são os mais conhecidos. Isso porque há indícios de que fitohormônios pertencentes a esses grupos são necessários continuamente pelo metabolismo das plantas, enquanto os demais só se fazem necessários em processos específicos (TAIZ; ZIEGLER, 2004). Além disso, estudos demonstraram que em plantas esses dois hormônios atuam em conjunto e que modificações no balanço auxina-citocinina determinam o tipo de órgão a ser formado pelo organismo (SU; LIU;

ZHANG, 2011). Acredita-se que o balanço entre os dois tipos de fitohormônios também tenha efeitos na biomassa microalgal, o que ainda precisa ser explorado. Dentre as auxinas, o fitohormônio ácido 3-indolacético (AIA), e dentre as citocininas, o fitohormônio *trans*-zeatina (tZ) se destacam pela ocorrência natural e maior atividade em plantas (BAJGUZ; PIOTROWSKA, 2009; BONNER; BANDURSKI, 1952; CZERPAK; BAJGUZ, 1997).

Neste trabalho foi avaliado o crescimento e caracterizada a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de *Spirulina* sp. LEB 18 isolada da Lagoa Mangueira (latitude 33º31’08”S e longitude 53º22’05”W) (MORAIS et al., 2008) e pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) foi utilizada para os ensaios. A microalga foi cultivada em meio Zarrouk (Tabela A1) (ZARROUK, 1966).

Os fitohormônios comerciais *trans*-zeatina (tZ) e ácido 3-indolacético (AIA) (Sigma-Aldrich, Brasil, 98%) foram adicionados aos experimentos a partir de solução-estoque 0,1 mg $mL^{-1}$, composta pelo fitohormônio, hidróxido de sódio (NaOH) e água destilada. Foram realizadas suplementações com um único fitohormônio, com misturas de tZ e AIA, além de ensaios controle, nos quais não foram adicionados fitohormônios (Tabela 1).

Para os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com *trans*-zeatina foi realizado um experimento preliminar. Esta, avaliou os efeitos das concentrações do fitohormônio no crescimento da microalga por 15 dias. A partir desses resultados foi selecionada a concentração mais promissora para realizar os experimentos durante 30 dias.

Os ensaios de 30 d foram divididos em dois grupos, ambos com experimentos controle. Entretanto, para grupo diário (GD) foi realizada amostragem diária e foram avaliadas todas as concentrações de AIA propostas e a concentração mais promissora de tZ, selecionada a partir do experimento preliminar. Para o grupo 10 dias (G10) foi realizada amostragem a cada 10 dias, foram avaliadas todas as concentrações propostas de tZ e AIA. Também foram estudadas suplementações de misturas com diferentes proporções entre os fitohormônios.

**Tabela 1** - Concentrações de suplementação dos fitohormônios tZ e AIA nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18

| Experimento | tZ (mg $L^{-1}$) | AIA (mg $L^{-1}$) |
|---|---|---|
| Controle | 0 | 0 |
| AIA0,01 | 0 | 0,01 |
| AIA0,1 | 0 | 0,1 |
| AIA1 | 0 | 1 |
| AIA10 | 0 | 10 |
| tZ0,01 | 0,01 | 0 |
| tZ0,1 | 0,1 | 0 |
| tZ1 | 1 | 0 |
| tZ10 | 10 | 0 |
| tZ0,01+AIA1 | 0,01 | 1 |
| tZ0,1+AIA0,1 | 0,1 | 0,1 |
| tZ1+AIA0,01 | 1 | 0,01 |

Os experimentos dos dois grupos foram conduzidos em duplicatas, de forma descontínua, em biorreatores do tipo *Erlenmeyers* de 0,5 L, com volume útil de 0,4 L (Figura AP1), concentração inicial de 0,2 g $L^{-1}$ e reposição da evaporação com água destilada estéril ao longo do tempo. Os cultivos foram realizados em câmara termostatizada mantida à 30 ºC com fotoperíodo (12 h:12 h) (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006), intensidade luminosa de aproximadamente 70 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes e agitação por injeção de ar comprimido estéril. Ao final dos experimentos a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (Hitachi, himac CR-GIII, Japão) a 9690 *g*, 20 °C por 20 min, foi realizada lavagem para remoção de sais, após a mesma foi congelada e liofilizada.

## 2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

Os cultivos foram acompanhados diariamente (GD) e a cada 10 d (G10) por verificação do pH com uso de pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça), avaliação da morfologia das células em microscópio eletrônico (AxioCan ERc 5s Microscope camera, Zeizz, Alemanha) e determinação da concentração de biomassa por meio de leitura da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmin-1240

spectrophotometer, Japão), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com massa seca de biomassa (Figura AP2) (COSTA et al., 2002).

A partir da densidade óptica foi obtida a concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) mensurada para experimentos dos dois grupos. Já, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, $d^{-1}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$, mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) e tempo de geração ($t_g$, d) foram estimados apenas para o grupo com amostragem diária. A velocidade específica máxima foi calculada utilizando uma regressão linear da fase de crescimento log do perfil semi-log da concentração de biomassa (ln X) versus tempo (d) onde a inclinação da reta obtida foi o $\mu_{máx}$ (BAILEY; OLLIS, 1986). A produtividade máxima de biomassa e tempo de geração foram calculados por meio das Equações 1 (SCHMIDEL et al., 2001) e 2 (BAILEY; OLLIS, 1986), respectivamente. Onde $X_t$ é a concentração de biomassa (g $L^{-1}$) no tempo t (d), e $X_0$ a concentração de biomassa (g $L^{-1}$) no tempo $t_0$ (d).

$$P=\frac{X_t-X_0}{t-t_0} \quad (1)$$

$$t_g=\frac{\ln 2}{\mu_{máx}} \quad (2)$$

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A análise de lipídios foi realizada diretamente na biomassa pelo método proposto por Marsh e Weinstein (1966) em que os lipídios foram extraídos por solventes orgânicos clorofórmio:metanol (1:2) e quantificados colorimetricamente comparando com curva padrão de tripalmitina. Previamente às análises de carboidratos e proteínas, as biomassas foram tratadas para rompimento da parede celular e liberação do material intracelular, com auxílio de sonda ultrassônica (Cole Parmer, CPX 130, EUA). Extratos foram preparados a partir da adição de 5 mg de biomassa liofilizada em 10 mL de água destilada e, então, sonicados com 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s desligado. A quantificação de carboidratos totais foi determinada por meio do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) com curva padrão de glicose. O teor proteico foi determinado por meio de método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão e com etapa prévia de solubilização de proteínas com hidróxido de sódio.

Para o perfil proteico amostras foram obtidas a partir das culturas líquidas a cada 10 d para os dois grupos de experimentos. As células foram separadas por centrifugação a

2000 *g* por 5 min (Eppendorf, Microcentrifuge 5410, Alemanha) e ressuspensas em tampão Tris-HCl 80 mmol $L^{-1}$ (pH 6,8), 2-mercaptoetanol 0,1 mol $L^{-1}$, 2% (m $v^{-1}$) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 15% (v $v^{-1}$) de glicerol, e 0,006% (m $v^{-1}$) de m-cresol púrpura, aquecidos por 5 min a 100 ºC. As amostras foram submetidas a eletroforese descontinuada em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de concentração acrilamida 5% (m $v^{-1}$) e gel de separação acrilamida 12,5% (m $v^{-1}$).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

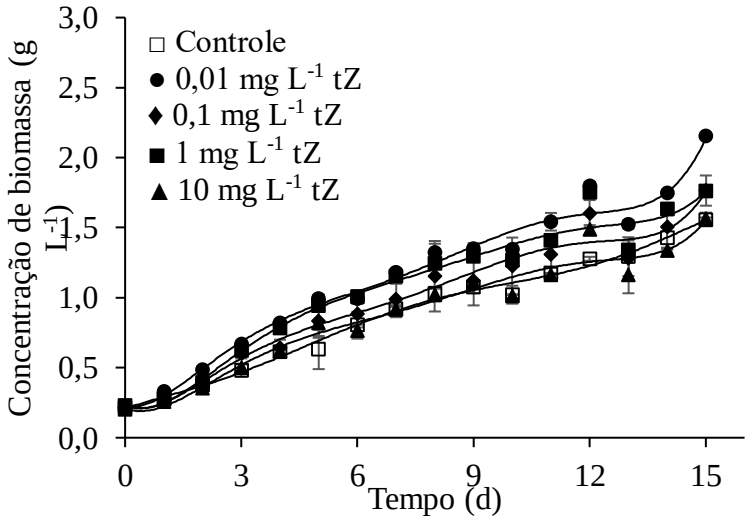
As respostas foram analisadas em triplicata por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Fisher para comparação das médias, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

A partir das curvas de crescimento referentes ao monitoramento da densidade óptica dos cultivos de *Spirulina* suplementada com 0,01; 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$ do fitohormônio *trans*-zeatina (Figura 1) com duração de 15 d foi possível selecionar a concentração mais promissora para o crescimento da microalga (0,01 mg $L^{-1}$ tZ). Então foi realizado novo cultivo com essa concentração, durante 30 d e com monitoramento diário do crescimento (GD) (Figura 2).

**Figura 1 -** Curvas de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementada com diferentes concentrações de tZ referentes ao experimento preliminar



Além dessas, o monitoramento do crescimento também foi realizado para os experimentos referentes ao cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com suplementação de ácido 3-indolacético (GD) (Figura 3). Ao observar as figuras (2 e 3) é possível notar que apesar de nos primeiros dias de cultivo os experimentos com fitohormônios terem apresentado crescimentos similares aos controles, com o passar do tempo, todas as condições com suplementação se mostraram superiores em concentração de biomassa que os experimentos sem a adição dos fitohormônios. Além disso, nota-se que nos últimos dias dos experimentos a microalga está entrando em fase estacionária de crescimento em todas as condições.

**Figura 2 -** Curvas de crescimento do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com tZ

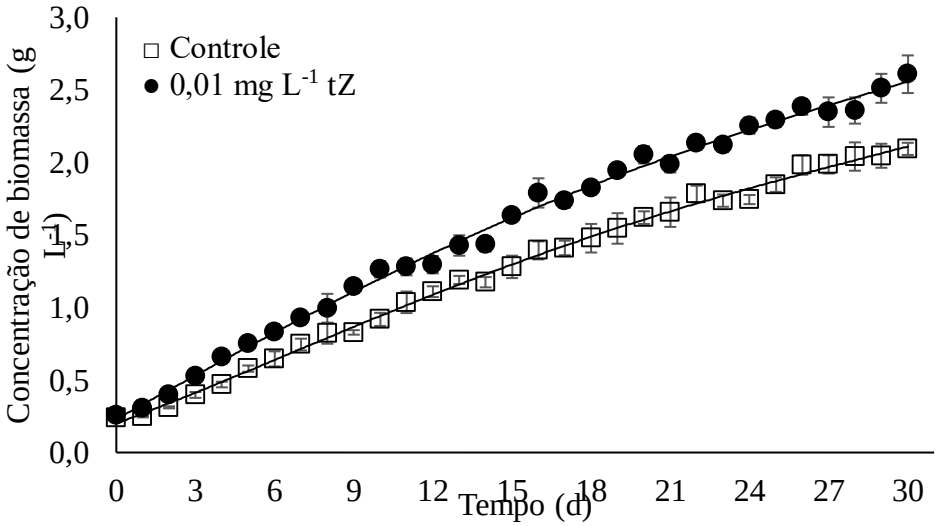
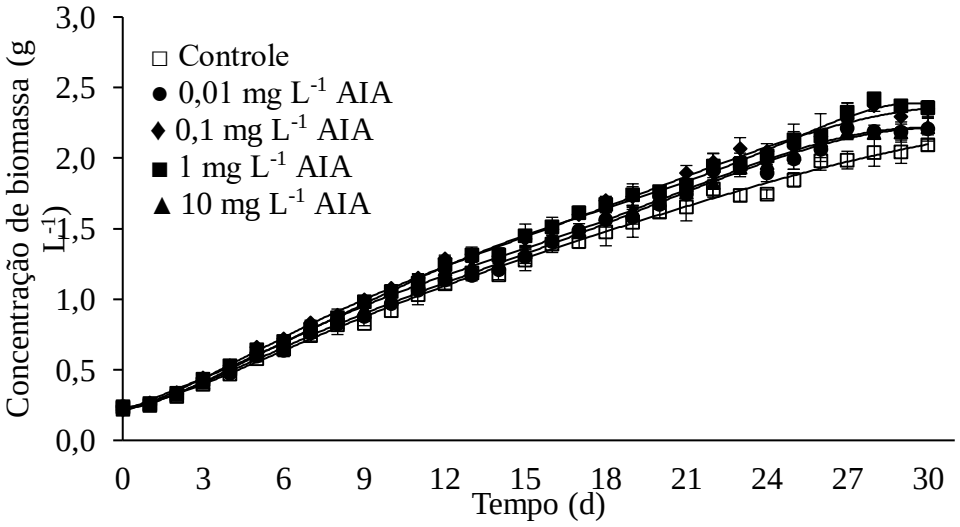



**Figura 3 -** Curvas de crescimento do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com AIA



Ao suplementar cultivos de *Nannochloropsis oceanica* CASA CC201, *Chlorella sorokiniana* IAN C212 e *Scenedesmus obliquus* com ácido 3-indolacético em diferentes concentrações Udayan e Arumugam (2017), Ozioko, Chiejina e Ogbonna (2015) e Salama et al. (2014) respectivamente, relataram comportamento de crescimento semelhante a este estudo. Os mesmos observaram maior crescimento dos cultivos suplementados, em relação ao controle, somente a partir do 3º dia de experimento. Da mesma forma, Hunt et al. (2010) ao realizar experimentos *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 suplementada com 0,002 ppm de *trans*-zeatina não observou melhoras no crescimento até o 5º dia de cultivo. Isso pode ser explicado com base no transporte de nutrientes para as células. A metabolização dos fitohormônios pela célula, torna o ambiente desfavorável para o crescimento, principalmente porque seu consumo tende a modificar o pH interno das mesmas. Essas, ao tentarem manter seu pH por neutralização ou expelindo prótons desviam a energia de funções relacionadas ao crescimento até que consigam novamente tornar o ambiente externo ideal, destinando então sua energia para acelerar o crescimento (RAYLE; CLELAND, 1992).

A partir dos resultados obtidos para parâmetros cinéticos calculados para experimentos do grupo GD (Tabela 2), é possível verificar que o experimento com suplementação de 0,01 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina apresenta valor superior de produtividade máxima de biomassa (102,5 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) sendo estatisticamente diferente ($p \leq 005$) das demais condições estudadas. Quanto aos experimentos com ácido 3-indolacético é possível observar maior produtividade máxima de biomassa com a adição de 0,1 mg $L^{-1}$ (90,7 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$). Esses resultados máximos foram ambos dados no 4º dia dos cultivos.

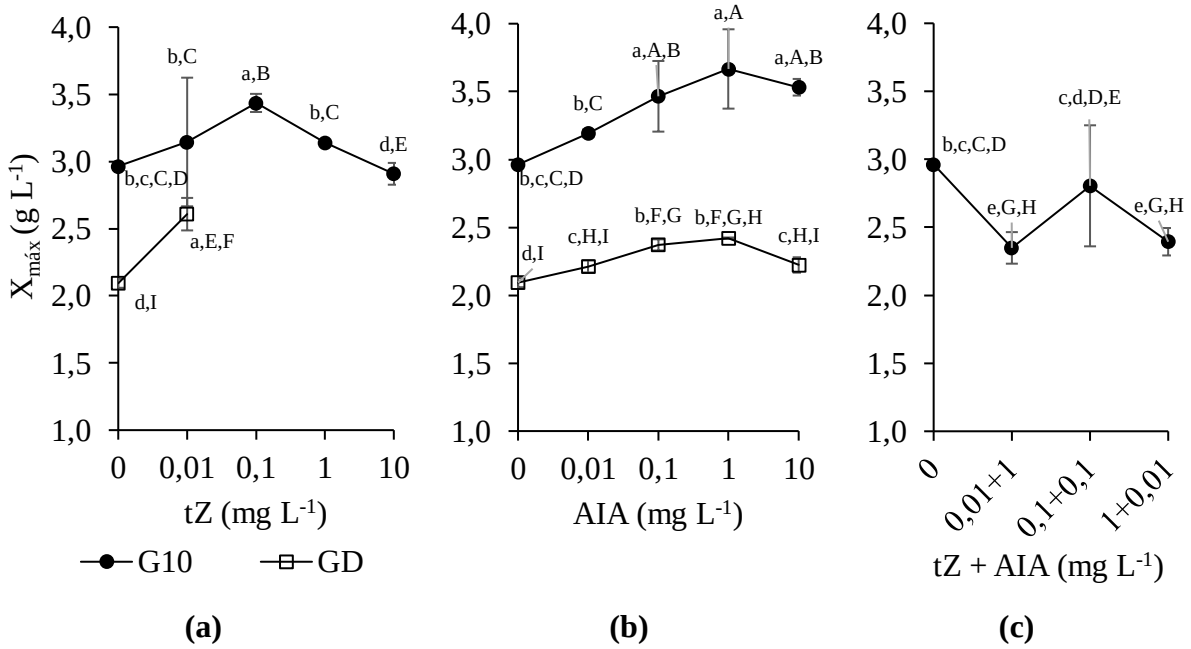
**Tabela 2** - Produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração ($t_g$) obtidos nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com suplementação de AIA e tZ

| **Experimento** | **$P_{máx}$ (mg $L^{-1}$ $d^{-1}$)** | **$\mu_{máx}$ ($d^{-1}$)** | **$t_g$ (d)** | ***$R^2$** | **$\Delta t$ (d)** |
|---|---|---|---|---|---|
| C | $76{,}31^{d}\pm5{,}9$ | $0{,}21^{b,c}\pm0{,}01$ | $3{,}28^{a,b}\pm0{,}13$ | $0{,}99\pm0{,}01$ | 1-5 |
| AIA0,01 | $77{,}5^{d}\pm1{,}8$ | $0{,}21^{c}\pm0{,}02$ | $3{,}36^{a}\pm0{,}27$ | $0{,}99\leq0{,}01$ | 1-5 |
| AIA0,1 | $90{,}7^{b}\pm3{,}8$ | $0{,}23^{a}\leq0{,}01$ | $3{,}04^{c}\pm0{,}06$ | $0{,}99\leq0{,}01$ | 1-5 |
| AIA1 | $85{,}9^{c}\pm3{,}8$ | $0{,}23^{a}\pm0{,}02$ | $3{,}08^{c}\pm0{,}23$ | $0{,}99\pm0{,}01$ | 1-5 |
| AIA10 | $86{,}6^{c}\pm1{,}8$ | $0{,}22^{a,b}\leq0{,}01$ | $3{,}17^{b,c}\pm0{,}05$ | $0{,}99\leq0{,}01$ | 1-5 |
| tZ0,01 | $102{,}5^{a}\pm4{,}1$ | $0{,}23^{a}\leq0{,}01$ | $3{,}04^{c}\pm0{,}03$ | $0{,}99\leq0{,}01$ | 0-6 |

Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0{,}05$) para a mesma resposta. *$R^2$: coeficiente de determinação da regressão linear que foi aplicado na fase logarítmica de crescimento. **$\Delta t$: tempo inicial-tempo final da fase exponencial de crescimento.

Ao comparar as respostas de concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) obtidas no dia 30 para o grupo G10 e entre os dias 27 e 30 para o grupo GD (Figura 4), é evidente que todos os componentes do grupo G10, do qual eram retiradas amostras a cada 10 d, tiveram concentração de biomassa maior que seus semelhantes do grupo GD, do qual eram retiradas amostras diariamente. Isso porque, quando a amostragem é feita diariamente, além de retirar células que poderiam estar se duplicando, é retirado também parte do fitohormônio que foi adicionado. Esse fato afeta a disponibilidade de fitohormônio para consumo da microalga.

**Figura 4 –** Concentrações máxima de biomassa ($X_{máx}$) obtidas nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com suplementação **(a)** tZ, **(b)** AIA e **(c)** tZ+AIA




Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a resposta analisando cada grupo individualmente. Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a resposta comparando todas as amostras.

Os experimentos com suplementação de 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético (G10) se destacaram ao aumentar a concentração de biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 atingindo a aproximadamente 3,5 g $L^{-1}$. Ao observar as figuras 4a e 4b é possível constatar que há uma tendência de dose dependência. Pois, da mesma forma em que é aumentada a concentração do fitohormônio adicionado, a concentração máxima de biomassa também aumenta. Entretanto após uma concentração de suplementação limite, neste caso 1 mg $L^{-1}$ de AIA e 0,1 mg $L^{-1}$ tZ a concentração de biomassa máxima diminui. Esse fato também foi descrito por Saygideger e Okkay (2008) que testaram várias concentrações da auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para suplementar cultivos de *Spirulina platensis*. Os autores notaram que os maiores valores de suplementação utilizados ($9 \times 10^{-3}$ e $9 \times 10^{-2}$ mmol $L^{-1}$)

inibiram o crescimento da microalga. Isso é atribuído ao efeito tóxico dos fitohormônios em concentrações maiores que a adequada para o organismo ao qual é adicionado. Essa característica permite que os fitohormônios, na agricultura, além de utilizados como biofertilizantes, também sejam utilizados como biopesticidas (GROSSMANN, 2000). Além disso, células procarióticas como as de *Spirulina* necessitem de menor concentração de fitohormônios para seu estímulo, quando comparadas com células eucarióticas (SAYGIDEGER; OKKAY, 2008).

Quando são avaliadas as respostas dos grupos separadamente, tem-se que no grupo GD todas as condições com suplementação apresentaram influência positiva sobre a concentração máxima de biomassa microalgal, chegando a valores aproximadamente 25% maiores que o experimento controle. Entretanto, a condição com adição de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ foi estatisticamente diferente ((p≤005) ds demais. Da mesma forma que as suplementações de 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético e 0,1 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina para o grupo G10, as quais estimularam aumentos na concentração de biomassa atingindo valores até 22% maiores que o experimento controle.

As proporções das misturas de fitohormônios suplementadas foram estabelecidas a partir das respostas do crescimento e parâmetros cinéticos obtidas quando os fitohormônios foram suplementados de forma isolada. Ao realizar a suplementação dos fitohormônios em conjunto a combinação de 0,1 mg $L^{-1}$ de cada fitohormônio se manteve igual ao experimento controle. Isso se deve ao fato de o aumento na produção de biomassa provavelmente estar relacionado com o balanço entre auxina e citocinina e, ao adicionar aos cultivos microalgais concentrações iguais de ambos, não se altera o balanço e da mesma forma não se altera a produção de biomassa (SU; LIU; ZHANG, 2011). As combinações de 0,01 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina e 1 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético, e 1 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina e 0,01 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético podem ter desencadeado um desequilíbrio na relação auxina-citocinina, o que pode ter resultado na menor produção de biomassa quando comparadas ao experimento controle do seu grupo. Sendo assim, foi observado efeito antagônico entre as combinações das concentrações testadas. Entretanto, estudos testando outras combinações de concentrações de tZ e AIA na suplementação de *Spirulina* são necessários para esclarecer se há efeitos sinérgicos desses dois fitohormônios no crescimento da microalga.

A partir dos resultados obtidos na avaliação parâmetros de crescimento celular, pode-se presumir que a suplementação do cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina estimula o crescimento celular. A adição desses fitohormônios aos experimentos aumentou a concentração e a produtividade máximas de biomassa para todas

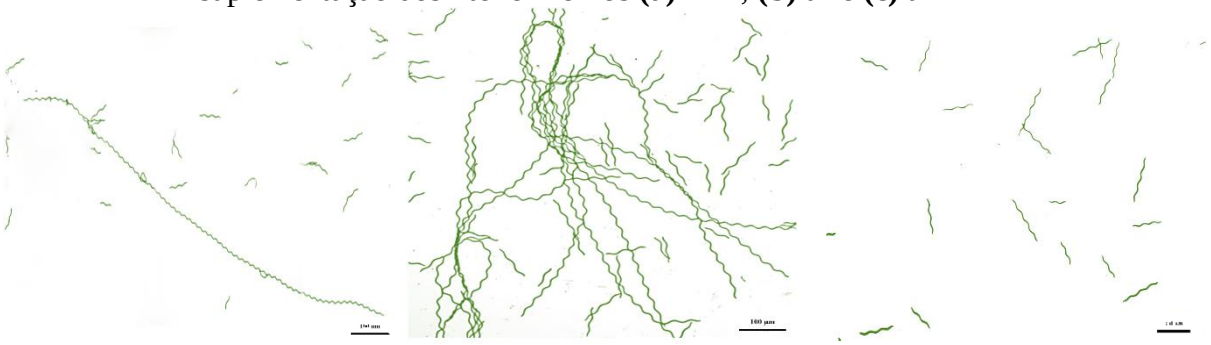
as condições quando comparadas à condição controle. Esses resultados confirmam a evidência que fitohormônios atuam nas microalgas da mesma maneira que atuam em plantas, ajustando rotas metabólicas e estimulando o crescimento (LU; XU, 2015).

Além dos parâmetros já citados, os cultivos de *Spirulina* também foram monitorados por meio de determinação do pH. Os diferentes tipos e concentrações de fitohormônios suplementados e tempos de amostragem não proporcionaram mudanças significativas nesse parâmetro, no qual todas as condições testadas apresentaram variações no pH entre 9,73 a 11,53.

Essa variação de pH é dada pelo crescimento microalgal. Inicialmente, a forma de carbono presente no meio de Zarrouk é bicarbonato de sódio, forma primária usada pelas microalgas em seu mecanismo de assimilação de carbono (OTA et al., 2009), e representada pelo pH em uma faixa de 6 a 10,5. Ao longo do tempo, dois íons de bicarbonato são consumidos pela célula, um deles é internalizado em forma de dióxido de carbono e o outro liberado na forma de carbonato, o que leva ao aumento do pH no meio para valores superiores a 10,5 (SHIRAIWA; GOYAL; TOLBERT, 1993).

Ao acompanhar a morfologia das células durante os experimentos foram observadas células com mais de 2 mm de comprimento (Figura 5), enquanto células normais apresentam no máximo 1 mm. Esse efeito foi causado pelos fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina em todas as concentrações testadas. Da mesma forma Park et al. (2013) ao avaliarem o efeito da adição dos fitohormônios ácido indol-3-acético, ácido giberélico, cinetina, 1-triacontanol e ácido abscísico, em concentrações de 0,1 a 10 ppm nas células de *Chlamydomonas reinhardtii* constataram que os tratamentos com os cinco fitohormônios resultaram em aumento acentuado do tamanho das células.

**Figura 5 -** Micrografias com aumento de 5x de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivadas com suplementação dos fitohormônios **(a)** AIA, **(b)** tZ e **(c)** tZ+AIA



**(a)** **(b)** **(c)**

Esse alongamento nas células poderia justificar a maior concentração de biomassa dada pela suplementação dos cultivos microalgais com fitohormônios. Uma vez que, nos experimentos em que foi realizada a suplementação dos dois fitohormônios em conjunto não foram identificadas células alongadas, assim como não houve estimula na concentração de biomassa.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Ao fazer uma análise geral, a produção de proteínas, carboidratos e lipídios (base úmida) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com diferentes concentrações dos fitohormônios AIA e tZ (Tabela 3), é possível verificar que a suplementação de AIA foi mais eficiente para a microalga. Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com 1 e 10 mg $L^{-1}$ de AIA (G10) foram superiores e estatisticamente diferentes ($p \leq 005$) na produção de proteínas e carboidratos, compondo aproximadamente 69% e 20% da biomassa microalgal, respectivamente. A síntese de lipídios atingiu em média 24% com a adição de 0,1 e 0,01 mg $L^{-1}$, nos grupos GD e G10, respectivamente.

Ao analisar as respostas das condições em que houve mistura dos fitohormônios, se verifica novamente resultados semelhantes ou menores que a condição controle. Fato que evidencia que o balanço entre fitohormônios dos tipos auxina e citocinina é essencial para estimular a concentração não só de biomassa, mas também de macrocomponentes.

Os melhores resultados apresentados para conteúdo de proteínas e carboidratos do grupo G10, sugerem que o fato de se realizar amostragem diária, mesmo que retirando alíquotas de pequeno volume, interfere na disponibilidade do fitohormônio para consumo da célula. Uma vez que, a cada alíquota do experimento que é retirada provavelmente se retira uma fração do fitohormônio suplementado. Além disso, a frequência de retirada de alíquotas também foi um fator relevante na produção de lipídios. A suplementação com 0,01 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético teve alta produção de lipídios quando amostras foram retiradas a cada 10 d, condição na qual o fitohormônio estava mais disponível que quando a amostragem foi diária. Por outro lado, a condição com suplementação de 0,1 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético e amostragem diária teve produção de lipídios superior a mesma condição com amostragem a cada 10 d. Nesse caso, é possível que a faixa ideal de suplementação do fitohormônio ácido 3-indolacético para *Spirulina* sp. LEB 18 a fim de estimular a produção lipídica seja restrita e concentrações acima da faixa ideal diminuam a produção dessa biomolécula.

**Tabela 3** - Conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios referentes aos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina

| **GD** | | | |
|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Proteínas (% m m$^{-1}$)** | **Carboidratos (% m m$^{-1}$)** | **Lipídios (% m m$^{-1}$)** |
| C | 54,0$^{c,d}$±1,2 | 13,3$^{d,e}$±0,7 | 15,8$^{b}$±0,3 |
| AIA0,01 | 54,7$^{c}$±1,1 | 11,5$^{f,g}$±0,3 | 14,4$^{b,c,d}$±1,3 |
| AIA0,1 | 37,8$^{i}$±1,8 | 9,0$^{h}$±0,2 | 24,6$^{a}$±2,6 |
| AIA1 | 49,2$^{f,g}$±2,7 | 12,8$^{e,f}$±0,1 | 11,9$^{e,f}$±0,9 |
| AIA10 | 46,4$^{g}$±2,2 | 11,7$^{f,g}$±0,7 | 12,8$^{c,d,e}$±1,6 |
| tZ0,01 | 64,8$^{b}$±2,1 | 10,9$^{g}$±0,3 | 14,6$^{b,c,d}$±0,7 |
| **G10** | | | |
| **Amostra** | **Proteínas (% m m$^{-1}$)** | **Carboidratos (% m m$^{-1}$)** | **Lipídios (% m m$^{-1}$)** |
| C | 52,3$^{c,d,e,f}$±1,6 | 13,7$^{d,e}$±0,4 | 13,0$^{c,d,e}$±0,4 |
| AIA0,01 | 53,2$^{c,d,e}$±0,4 | 8,9$^{h}$±0,4 | 23,9$^{a}$±0,5 |
| AIA0,1 | 66,7$^{b}$±0,1 | 18,8$^{b}$±1,7 | 11,9$^{e,f}$±0,5 |
| AIA1 | 70,3$^{a}$±1,4 | 19,9$^{a,b}$±0,3 | 13,0$^{c,d,e}$±0,7 |
| AIA10 | 67,7$^{a,b}$±1,3 | 21,3$^{a}$±0,7 | 14,4$^{b,c,d}$±0,2 |
| tZ0,01 | 54,6$^{c}$±1,6 | 9,3$^{h}$±0,3 | 15,0$^{b,c}$±1,9 |
| tZ0,1 | 54,7$^{c}$±0,2 | 15,7$^{c}$±0,1 | 15,5$^{b}$±0,2 |
| tZ1 | 51,1$^{d,e,f}$±0,3 | 15,8$^{c}$±1,3 | 15,7$^{b}$±1,2 |
| tZ10 | 49,4$^{f,g}$±1,0 | 14,7$^{c,d}$±0,9 | 12,8$^{d,e}$±1,2 |
| tZ0,01+ AIA1 | 43,0$^{h}$±3,2 | 13,8$^{d,e}$±0,7 | 11,2$^{e,f}$±0,2 |
| tZ0,1+AIA0,1 | 50,4$^{e,f}$±0,8 | 13,8$^{d,e}$±1,0 | 15,3$^{b}$±0,3 |
| tZ1+AIA0,01 | 36,5$^{i}$±0,7 | 11,0$^{g}$±0,1 | 9,9$^{f}$±0,5 |

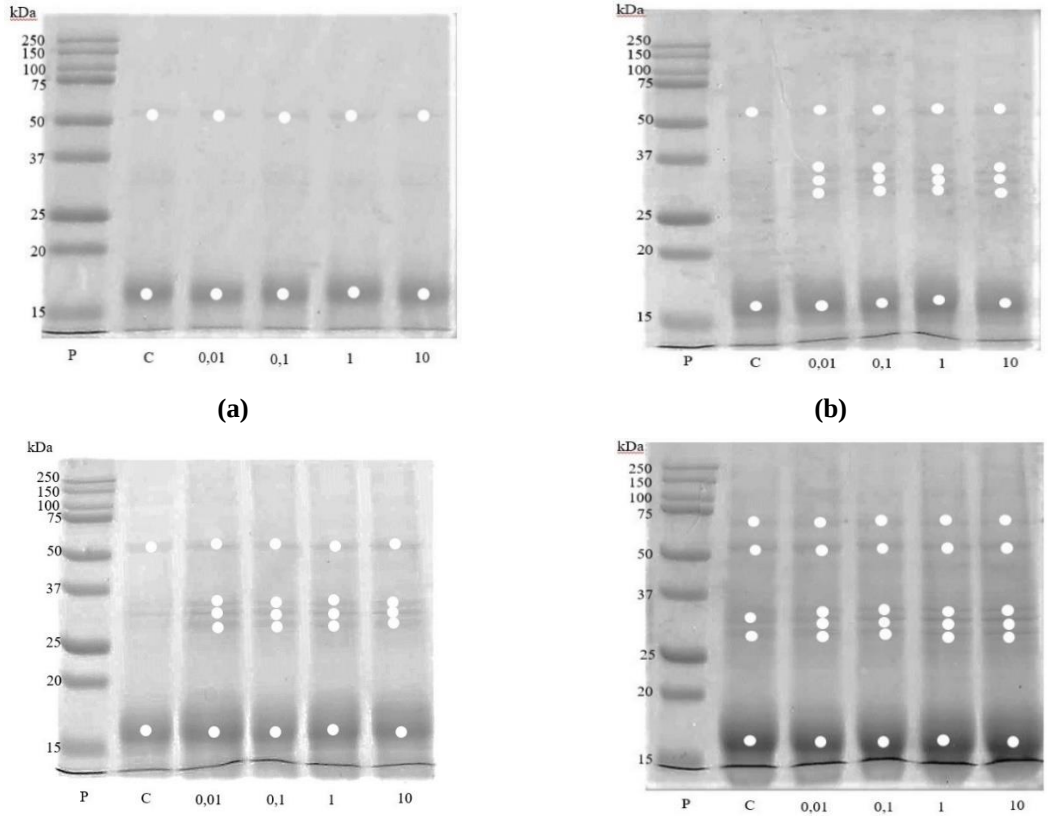
Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para cada resposta comparando todas as amostras.

Os perfis de proteínas obtidos por SDS-PAGE revelaram diferentes conteúdos proteicos quando suplementados com ácido 3-indolacético, t*rans*-zeatina e com a mistura dos dois fitohormônios (Figuras 6, 7 e 8 respectivamente). Entretanto, em todas as condições se pode verificar um maior número de bandas proteicas nos perfis referentes aos dias 30.

Quando os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 foram suplementados com ácido 3-indolacético (Figura 6) em todos os dias analisados foram expressas bandas próximas a 15 e 50 kDa. No dia 10 (Figura 6b) e 20 (Figura 6c) os perfis também mostram três bandas proteicas entre 25 e 37 kDa para as condições com suplementação. No dia 30 (Figura 6d), além das

proteínas já mencionadas há a expressão de bandas próximas a 75 kDa e duas bandas entre 25 e 37 kDa nos experimentos controle.

**Figura 6 -** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementada com AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30

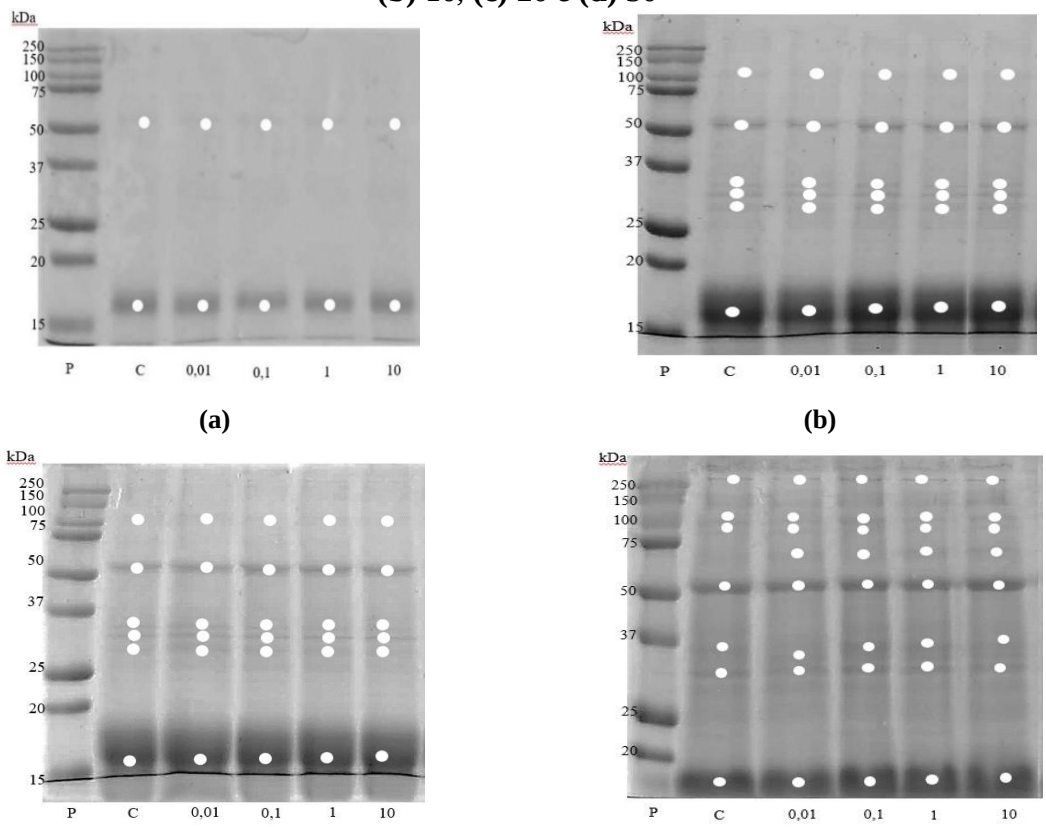



**(a)** **(b)** **(c)** **(d)**

Os perfis proteicos gerados para os experimentos de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com *trans*-zeatina (Figura 7) assim como com AIA apresentam bandas próximas a 15 e 50 kDa em todos os dias analisados. Nos dias 10 (Figura 7b) e 20 (Figura 7c) também são expressas proteínas com pesos moleculares próximas a 100 kDa e 3 bandas entre 25 e 37 kDa. Além dessas, no dia 30 (Figura 7d) também se nota a presença de outra banda próxima a 100 kDa e proteínas com pesos moleculares próximos a 250 e 75 kDa.

A suplementação dos fitohormônios em conjunto geraram perfis (Figura 8) com bandas próximas a 100 kDa, 50 kDa, 15 kDa e entre 25 e 37 kDa em todos os dias analisados. No dia 10 (Figura 8b) também há a expressão de uma proteína com peso molecular próximo a 75 kDa entretanto, a mesma não é expressas nos próximos dias analisados, o que sugere que a proteína possa ter sido degradada. No dia 30 (Figura 8d), além das bandas já mencionadas foi gerada uma banda próxima a 250 kDa.

**Figura 7 –** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementados com tZ nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30

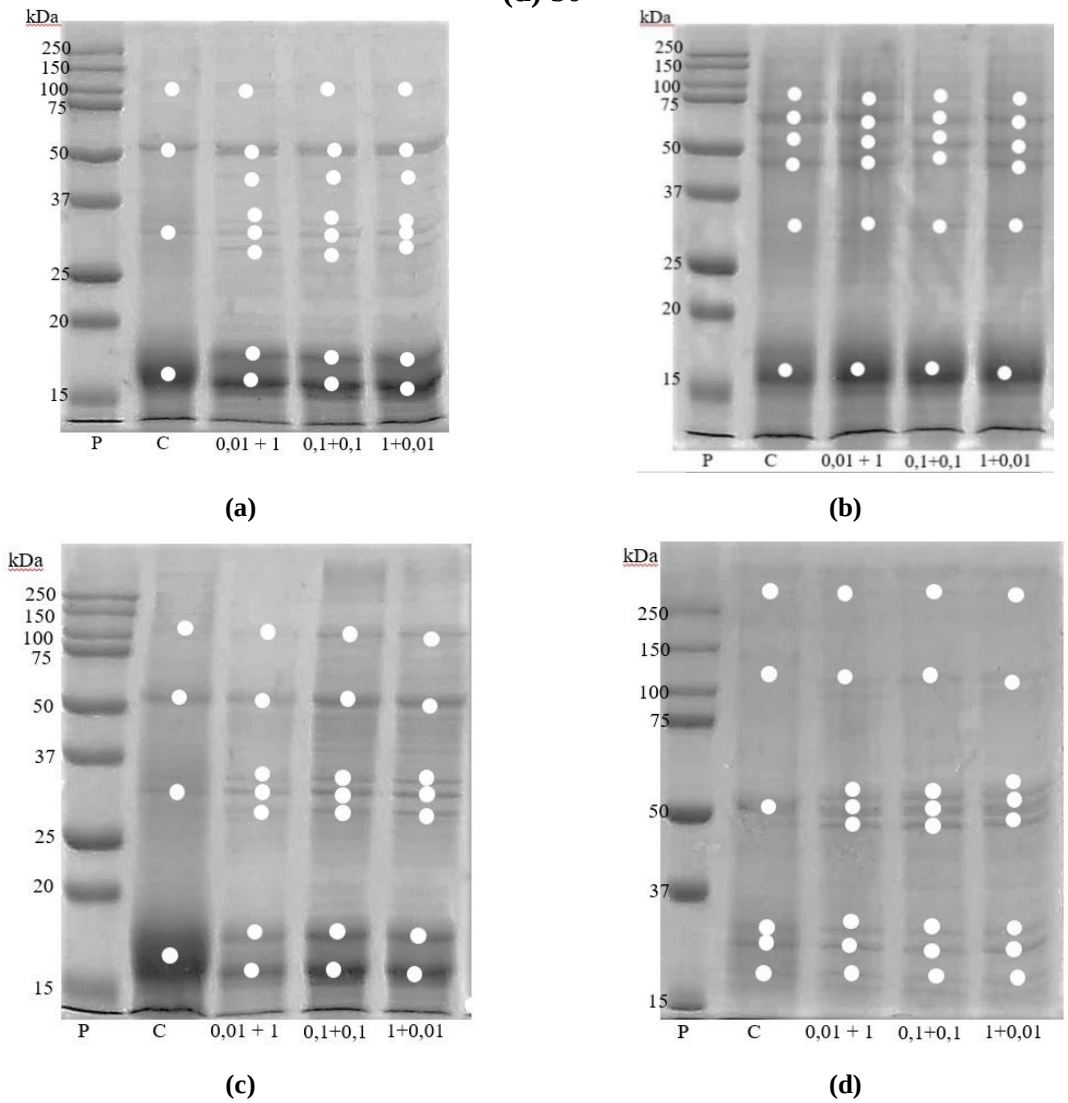



**(a)** **(b)** **(c)** **(d)**

Todas as proteínas detectadas nos perfis proteicos foram relacionadas com enzimas fotossintéticas, já que a suplementação de fitohormônios nos cultivos pode aumentar a eficiência fotossintética das microalgas (PIOTROWSKA te al., 2008). As bandas detectadas entre 15 e 20 kDa podem ser subunidades do complexo pigmento-proteína do fotossistema II, as quais podem ser psbS (± 21 kDa), que tem papel crucial quando há excesso de energia e psbV (± 15 kDa) que catalisa reações do oxigênio em procariotos (SCHELLER et al., 2004). As proteínas detectadas com peso molecular entre 25 kDa e 37 kDa podem ser relacionadas com a expressão das enzimas LHCB (24 – 28 kDa), as quais fazem parte do complexo coletor de luz do fotossistema II. Este complexo está envolvido na partição de energia entre os fotossistemas I e II e na prevenção de danos ao aparelho fotossintético (TAIZ; ZIEGLER, 2004). Além dessas, acredita-se que as bandas próximas de 50 kDa, expressas em todos os perfis gerados, sejam Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), a qual têm aproximadamente 56 kDa e é a principal enzima fotossintética, pois catalisa a fixação de dióxido de carbono a 1,5-ribulose-bisfosfato no ciclo de Calvin, produzindo o 3-fosfoglicerato essencial para a ocorrência da fotossíntese (NELSON; COX, 2011). Ainda, as bandas próximas

a 75 kDa podem ser psaA e psaB, subunidades do complexo do fotossistema I, ligados a assimilação da luz e transporte de elétrons (SCHELLER et al., 2004).

**Figura 8 -** Perfil proteico de *Spirulina* sp. LEB 18 tZ + AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30




As nomenclaturas de suplementação conjunta são dadas em tZ+AIA para todos os perfis.

## 4 CONCLUSÃO

Este estudo confirmou as evidências que fitohormônios além de atuarem no metabolismo de plantas, têm ação semelhante em células microalgais. A suplementação com 1 mg $L^{-1}$ de AIA junto com a menor frequência de amostragem (G10) nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 aumentou em até 43% a concentração máxima de biomassa (3,7 g $L^{-1}$) quando comparado ao controle. Além disso, os fitohormônios estimularam a produção de proteínas

(70%), carboidratos (21%) e lipídios (24%) com a adição de AIA nas concentrações 1, 10 e 0,01 mg $L^{-1}$, respectivamente. Também, verificou-se a importância do balanço entre auxinas-citocininas, visto que quando se suplementa a mesma quantidade de ambos fitohormônios, não há aumento no crescimento. Muitas questões sobre microalgas e fitohormônios ainda precisam ser estudadas e debatidas, mas este estudo colabora com o esclarecimento de alguns fatos importantes para a área.

## REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1986.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Phytochemistry conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochemistry**, v. 70, n. 8, p. 957–969, 2009.

BONNER, J.; BANDURSKI, R. S. Studies of the physiology, pharmacology, and biochemistry of the auxins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 3, p. 59–86, 1952.

CARVALHO, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Acceptance of novel foods for physical activity practitioners formulated with *Spirulina*. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 7–11, 2016.

CHERNYAD'EV, I. I. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 351–362, 2009.

COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; ROSA, A. P. C. DA; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. LEB18. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 173–178, 2019.

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.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2–9, 2011.

COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; ASSIS, D. J.; SOUZA, C. O.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. **Algal Research**, v. 33, p. 231–238, 2018.

CZERPAK, R.; BAJGUZ, A. Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenes, with differential effects on xanthophylls in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 66, p. 41–46, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

GROSSMANN, K. Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long , drawn out story. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 506–508, 2000.

HUNT, R. W.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2400–2414, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein menasurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273–282, 2015.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A.V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 270–276, 2018.

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

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. D. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 144–150, 2008.

MOREIRA, J. B.; LIM, L. T.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Microalgae protein heating in acid/basic solution for nanofibers production by free surface electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v. 230, p. 49–54, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OTA, M.; KATO, Y.; WATANABE, H.; WATANABE, M.; SATO, Y.; SMITH JR, R. L.; INOMATA, H. Fatty acid production from a highly $CO_2$ tolerant alga, *Chlorocuccum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5237–5242, 2009.

OZIOKO, F. U.; CHIEJINA, N. V.; OGBONNA, J. C. Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 30, p. 2367–2376, 2015.

PARK, W.; YOO, G.; MOON, M.; KIM, C. W.; CHOI, Y. E.; YANG, J. W. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for

biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 5, p. 1128–1142, 2013.

PIOTROWSKA, A.; CZERPAK, R.; PIETRYCZUK, A.; OLESIEWICZ, A.; WĘDOŁOWSKA, M. The effect of indomethacin on the growth and metabolism of green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 2, p. 125–136, 2008.

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. 38–43, 2018.

PROKOP, A.; BAJPAI, R. K.; ZAPPI, M. E. (Eds.). **Algal Biorefineries - Volume 2: Products and Refinery Design**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1271–1274, 1992.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23–28, 2006.

SALAMA, E.; KABRA, A. N.; JI, M.; RAE, J.; MIN, B.; JEON, B. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 97–103, 2014.

SAYGIDEGER, S. D.; OKKAY, O. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth, protein and chlorophyll-a content of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* cells. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 2, p. 175-178, 2008.

SCHELLER, H. V.; LUNDE, C.; HALDRUP, A.; JENSEN, P. E. Functional characterization of the photosynthetic apparatus in arabidopsis thaliana. In: LEISTER, D. (Ed.). **Plant Functional Genomics**. 1. ed. Binghamton: Food Products Press, 2004. p. 393-425.

SCHMIDEL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 2**. São Paulo: Blücher, 2001.

SHARMA, P.; SHARMA, N. Industrial and biotechnological applications of algae: A review. **Journal of Advances in Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–25, 2017.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 649–657, 1993.

SU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X. Auxin – cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 616-625, 2011.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

UDAYAN, A.; ARUMUGAM, M. Selective enrichment of Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in *N . oceanica* CASA CC201 by natural auxin supplementation. **Bioresource Technology**,

v. 242, p. 329–333, 2017.

VOβ, U.; BISHOPP, A.; FARCOT, E.; BENNETT, M. J. Modelling hormonal response and development. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 5, p. 311–319, 2014.

WONG, W. S.; TAN, S. N.; GE, L.; YONG, J. W. H. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. In: MAHESHWARI, D. (Ed). **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem – Volume 12**. Cham: Springer, 2015. p. 105-158.

YAMAGUCHI, I.; COHEN, J. D.; CULLER, A. H.; QUINT, M.; SLOVIN, J. P.; NAKAJIMA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKAKIBARA, H.; KUROHA, T.; HIRAI, N.; YOKOTA, T.; OHTA, H.; KOBAYASHI, Y.; MORI, H.; SAKAGAMI, Y. Plant Hormones. In: LIU, H. W.; MANDER, L. (Eds.).**Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier Science, 2010. p. 9-125.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physuques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Ph.D Thesis, Université de Paris, 1966.

ARTIGO 2:

*Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM SUPLEMENTAÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

**RESUMO**

A suplementação de fitohormônios nos cultivos microalgais pode causar efeitos no crescimento e alterar rotas metabólicas de produção de compostos, assim como acontece em plantas. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento e caracterizar a biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ). Para isso, os cultivos foram suplementados com AIA e tZ nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg $L^{-1}$, e combinados em diferentes proporções. Os experimentos foram conduzidos *indoor* em duplicatas por 30 dias, de forma descontínua. As respostas quanto ao crescimento microalgal foram obtidas a partir da produção de biomassa e parâmetros cinéticos de crescimento. A caracterização da biomassa foi realizada a partir da determinação do conteúdo de carboidratos, lipídios, proteínas e perfil proteico. Os resultados obtidos mostraram que os fitohormônios são eficientes para aumentar o crescimento da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 e versáteis para induzir a produção de compostos de interesse. A suplementação de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$ de AIA teve como resposta aumentos nas concentrações máxima de biomassa (2,2 g $L^{-1}$) e lipídios (34%). A adição de 0,01 mg $L^{-1}$ e 0,1 de tZ melhorou as respostas de produtividade máxima de biomassa (64 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) e proteínas (50%). Além disso, a mistura de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ e 1 mg $L^{-1}$ de AIA elevou a produção de carboidratos à 32%. Esses resultados são interessantes principalmente para aplicação em estudos de produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

**Palavras-chave:** Auxina. Biomassa. Carboidratos. Citocinina. Lipídios. Microalga.

# 1 INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de microalgas são fotoautotróficas, e dependem inteiramente da fotossíntese para suas necessidades metabólicas (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). Além disso, apresentam diversidade em metabolismo e propriedades bioquímicas, o que as torna microrganismos comercialmente e biotecnologicamente importantes devido à variedade de aplicações (PROKOP; BAJPAI; ZAPPI, 2015).

Microalgas do gênero *Chlorella* são cultivadas em grande escala para utilização desde a década de 60 (BENEMANN; WOERTZ; LUNDQUIST, 2018). A manipulação de condições de cultivo pode estimular a biossíntese de diferentes compostos. Exemplos disso são os estudos de Rosa, Morais e Costa (2019) no qual o cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em batelada alimentada com $CO_2$ e monoetanolamina apresentou alta produtividade de proteínas (67,1 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) e lipídios (46,9 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$); Braga et al. (2019) em que com redução de nitrogênio em 50% obteve aumento de 25% na produção de carboidratos e, Cassuriaga et al. (2018) que com a adição de pentoses atingiu acúmulo de polihidroxibutirato (17,4% m $m^{-1}$). Da mesma forma, a suplementação de cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com fitohormônios pode ser uma alternativa para manipulação da produção de compostos de interesse.

Os fitohormônios, além de serem conhecidos como reguladores de crescimento de plantas (YAMAGUCHI et al., 2010) demonstraram ter ações também em modificações metabólicas de microalgas. Inclusive em outras espécies de *Chlorella* como *C. sorokiniana* (BABU et al., 2017), *C. pyrenoidosa* (LIU; QIU; SONG, 2016) e *C. vulgaris* (JUSOH et al., 2015). Estes estudos mostraram que a adição de fitohormônios em microalgas do gênero aumentam a produção de biomassa e de lipídios. Fato que é importante devido ao grande interesse do cultivo de *Chlorella* para produção de biodiesel (COSTA; MORAIS, 2011).

Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento e caracterizar a biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com suplementação dos fitohormônios ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (tZ).

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi cultivada utilizando meio BG 11 (Tabela A2) (RIPPKA et al., 1979). Essa cepa foi isolada da lagoa de estabilização de efluentes

e resíduos da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM) (latitude 24°36’13’’S e longitude 52º32’43’’W) e é pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

A suplementação dos cultivos foi realizada com fitohormônios comerciais *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético (Sigma-Aldrich, Brasil) com pureza ≥ 98%. Esses, foram adicionados aos experimentos a partir de uma solução-estoque 0,1 mg $mL^{-1}$, composta pelo fitohormônio, hidróxido de sódio (NaOH) e água destilada. Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de um único fitohormônio, com a mistura de ambos fitohormônios e ensaio controle, no qual não há suplementação (Tabela 1).

**Tabela 1** - Concentrações de suplementação de tZ e AIA nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111

| **Amostra** | **tZ (mg $L^{-1}$)** | **AIA (mg $L^{-1}$)** |
|---|---|---|
| C | 0 | 0 |
| AIA0,01 | 0 | 0,01 |
| AIA0,1 | 0 | 0,1 |
| AIA1 | 0 | 1 |
| AIA10 | 0 | 10 |
| tZ0,01 | 0,01 | 0 |
| tZ0,1 | 0,1 | 0 |
| tZ1 | 1 | 0 |
| tZ10 | 10 | 0 |
| tZ0,01+AIA1 | 0,01 | 1 |
| tZ0,1+AIA0,1 | 0,1 | 0,1 |
| tZ1+AIA0,01 | 1 | 0,01 |

Os experimentos foram divididos em dois grupos que diferiram em frequência de amostragem. O grupo GD consistiu em amostragem realizada diariamente e, o grupo G10 em amostragem realizada a cada 10 d, sendo que a suplementação das misturas de fitohormônios foram realizadas somente no grupo 2. Entretanto, a condução dos cultivos e suplementação dos fitohormônios separados foram idênticas entre os grupos. Os experimentos foram conduzidos de forma descontínua, em duplicatas durante 30 d. Os biorreatores utilizados foram do tipo *Erlenmeyers* de 0,5 L, com volume útil de 0,4 L (Figura AP1), concentração inicial de 0,2 g $L^{-1}$ e reposição da evaporação com água destilada estéril ao longo do tempo. Os cultivos

foram realizados *indoor* com fotoperíodo de 12 h: 12 h (claro: escuro) e foram mantidos em câmara termostatizada à 30 ºC (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006), com intensidade luminosa, fornecida por lâmpadas fluorescentes, de aproximadamente 70 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ e agitação por meio de injeção de ar comprimido estéril. Ao final dos experimentos a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (Hitachi, himac CR-GIII, Japão) a 9690 *g*, 20 °C por 20 min, foi realizada lavagem para remoção de sais e, então, a mesma foi congelada e liofilizada.

## 2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento microalgal foi monitorado por meio de leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 670 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmin-1240 spectrophotometer, Japão). Para isso, foi realizada curva de calibração que relaciona densidade óptica com massa seca de biomassa (Figura AP3) (COSTA et al., 2002). Além disso, o pH dos cultivos foi verificado por meio de pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça) e morfologia das células foi observada em microscópio eletrônico (AxioCan ERc 5s Microscope camera, Zeizz, Alemanha). Essas análises foram realizadas a diariamente para o grupo GD e a cada 10 d para o grupo G10.

Os dois grupos tiveram a concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) determinadas por meio da análise de densidade óptica das culturas. A produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$, mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) e o tempo de geração ($t_g$, d), foram calculados a partir das Equações 1 (SCHMIDEL et al., 2001) e 2 (BAILEY; OLLIS, 1986), respectivamente. Onde $X_t$ é a concentração de biomassa (g $L^{-1}$) no tempo t (d), e $X_0$ a concentração de biomassa (g $L^{-1}$) no tempo $t_0$ (d). Já a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, $d^{-1}$) foi calculada utilizando uma regressão linear da fase de crescimento log do perfil semi-log da concentração de biomassa (ln X) versus tempo (d) onde a inclinação foi o $\mu_{máx}$ (BAILEY; OLLIS, 1986). A velocidade específica máxima de crescimento, a produtividade máxima de biomassa e o tempo de geração foram calculados somente para os experimentos do grupo GD.

$$P=\frac{X_t-X_0}{t-t_0} \quad (1)$$

$$t_g=\frac{\ln 2}{\mu_{máx}} \quad (2)$$

## 2.3 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A extração e determinação de lipídios foi realizada diretamente da biomassa liofilizada pelo método de Marsh e Weinstein (1966) em que os lipídios foram extraídos por solventes orgânicos clorofórmio:metanol (1:2) e quantificados colorimetricamente comparando com curva padrão de tripalmitina. Já, para quantificar carboidratos e proteínas foi necessário realizar rompimento da parede celular para liberação do material intracelular. Para isso, extratos da biomassa liofilizada foram sonicados em sonda ultrassônica (Cole Parmer, CPX 130, EUA) com 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s desligado. Logo, o conteúdo de carboidratos totais foi determinado por meio do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando curva padrão de glicose e o teor proteico por meio do método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951) com curva padrão de albumina de soro bovino, além de ser realizado pré-tratamento térmico e alcalino da biomassa para solubilizar as proteínas.

A fim de gerar os perfis proteicos foram obtidas amostras dos experimentos a cada 10 d. Essas, foram centrifugadas (Eppendorf, Microcentrifuge 5410, Alemanha) a 2000 *g* por 5 min, ressuspensas em tampão composto por Tris-HCl 80 mmol $L^{-1}$ (pH 6,8), 2-mercaptoetanol 0,1 mol $L^{-1}$, 2% (m $v^{-1}$) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 15% (v $v^{-1}$) de glicerol, e 0,006% (m $v^{-1}$) de m-cresol púrpura e aquecidas a 100 ºC durante 5 min. A partir dessas foi realizada eletroforese descontinuada em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de concentração acrilamida 5% (m $v^{-1}$) e gel de separação acrilamida 12,5% (m $v^{-1}$).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas foram analisadas em triplicata por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Fisher para comparação das médias, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

A partir do acompanhamento do crescimento celular se pode gerar curvas de concentração de biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementada com AIA e tZ ao longo do tempo (Figuras 1 e 2).

**Figura 1 -** Curvas de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementada com diferentes concentrações de AIA

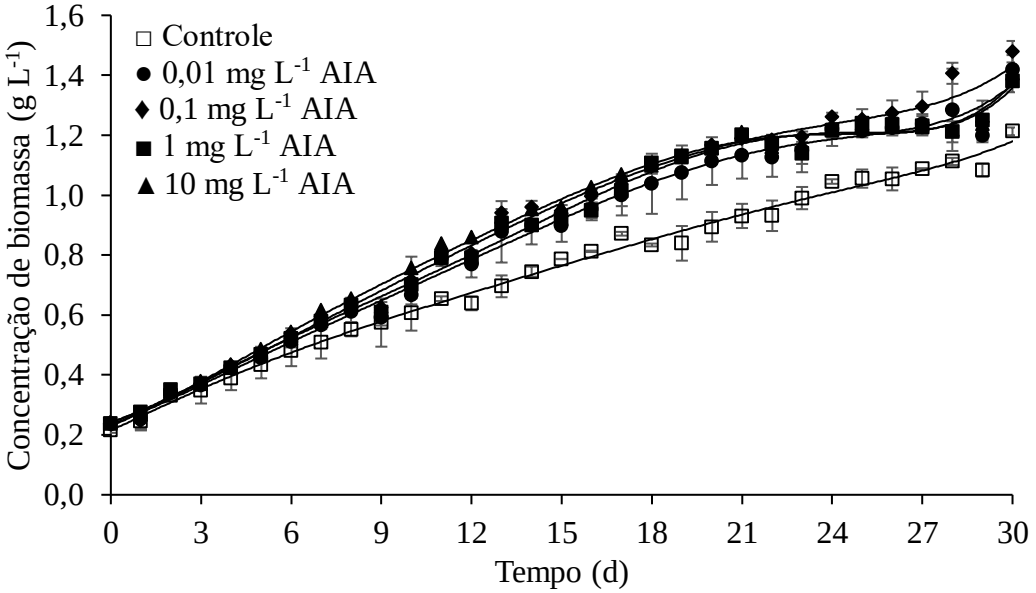
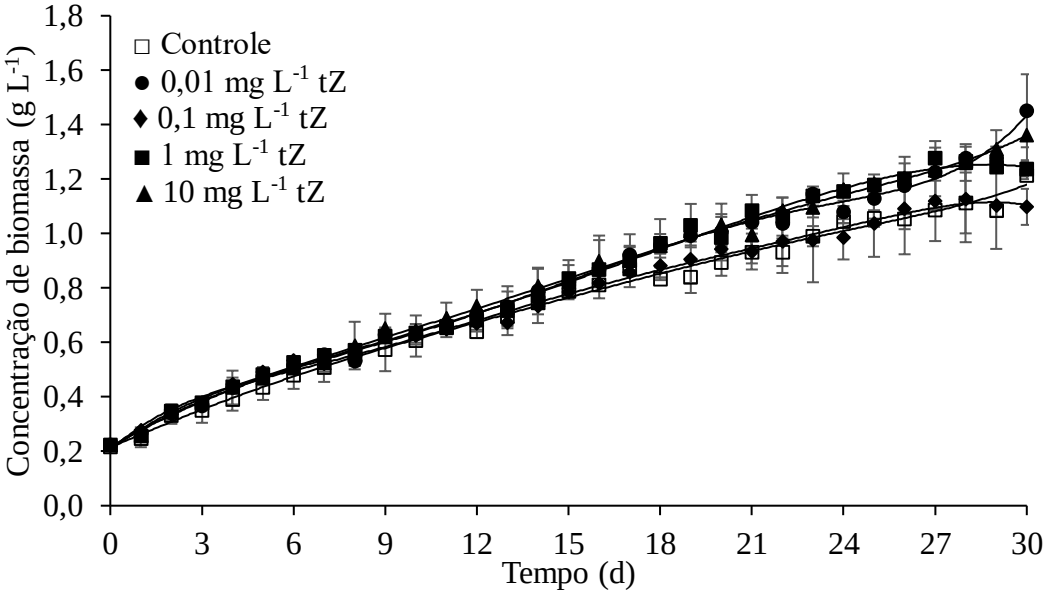



**Figura 2 -** Curvas de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementada com diferentes concentrações de tZ




A partir das mesmas é possível observar que, com exceção do experimento com suplementação de 0,1 mg $L^{-1}$ de tZ, todas as concentrações de suplementação de ácido 3-indolacético e as demais concentrações de adição de *trans*-zeatina nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 resultaram em maiores crescimentos que os experimentos controle. Além disso, nos experimentos com ácido 3-indolacético é possível observar que no último dia de cultivo a microalga ainda está em crescimento em todas as condições, não sendo detectada fase

estacionária. Nos experimentos com suplementação de *trans*-zeatina se observa uma queda na produção de biomassa nas concentrações intermediárias do fitohormônio (0,1 e 1 mg $L^{-1}$). Além disso, é possível verificar que os efeitos de ambos fitohormônios no crescimento não ocorrem nos dias inicias de cultivo, sendo identificado apenas a partir do 5º dia de cultivo.

Além das curvas de crescimento, para o grupo GD foram calculados alguns parâmetros cinéticos. Produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo e geração ($t_g$) (Tabela 2). A produtividade máxima de biomassa de todos os ensaios com suplementação de *trans*-zeatina foi em média 63 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$ no 2º dia de experimento, valor estatisticamente superior as demais condições. Nos ensaios com suplementação de ácido 3-indolacético ficou evidenciada a relação dose dependência dos fitohormônios sob os parâmetros cinéticos do cultivo microalgal. A produtividade máxima de biomassa aumenta da mesma forma que a concentração de fitohormônio adicionada ao meio. Entretanto, parece existir um limite máximo de concentração de suplementação e, quando essa concentração limite é ultrapassada, neste caso com a adição de 0,01 mg $L^{-1}$ de AIA, há uma queda na produtividade.

**Tabela 2** - Produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração ($t_g$) obtidos a partir dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com suplementação de AIA e tZ

| **Amostra** | **$P_{máx}$ (mg $L^{-1}$ $d^{-1}$)** | **$\mu_{máx}$ ($d^{-1}$)** | **$t_g$ (d)** | ***$R^2$** | ****Δt** |
|---|---|---|---|---|---|
| C | $57,2^{c,d}$±3,1 | $0,09^{d}$±0,01 | $7,51^{a}$±0,66 | 0,99≤0,01 | 3-8 |
| AIA0,01 | $60,1^{b,c,d}$±4,6 | $0,11^{b}$ ±0,01 | $6,50^{b}$±0,38 | 1,00≤0,01 | 2-7 |
| AIA0,1 | $58,4^{b,c,d}$±4,4 | $0,11^{b}$≤0,01 | $6,32^{b,c}$±0,21 | 0,99≤0,01 | 2-7 |
| AIA1 | $56,5^{c,d}$±1,8 | $0,12^{a}$≤0,01 | $5,94^{c}$±0,04 | 0,99≤0,01 | 2-7 |
| AIA10 | $54,3^{d}$±0,9 | $0,12^{a}$≤0,01 | $5,92^{c}$±0,01 | 0,99≤0,01 | 2-7 |
| tZ0,01 | $63,3^{a,b,c}$±10,2 | $0,11^{b}$≤0,01 | $6,43^{b}$±0,14 | 0,99±0,01 | 2-7 |
| tZ0,1 | $64,9^{a}$±5,4 | $0,11^{b}$±0,01 | $6,22^{b}$±0,57 | 0,99±0,01 | 2-6 |
| tZ1 | $62,1^{a,b,c}$±53,1 | $0,11^{b,c}$±0,01 | $6,46^{b}$±0,38 | 0,99≤0,01 | 2-6 |
| tZ10 | $61,7^{a,b,c}$±4,5 | $0,10^{c,d}$≤0,01 | $7,13^{a}$±0,19 | 0,99≤0,01 | 2-6 |

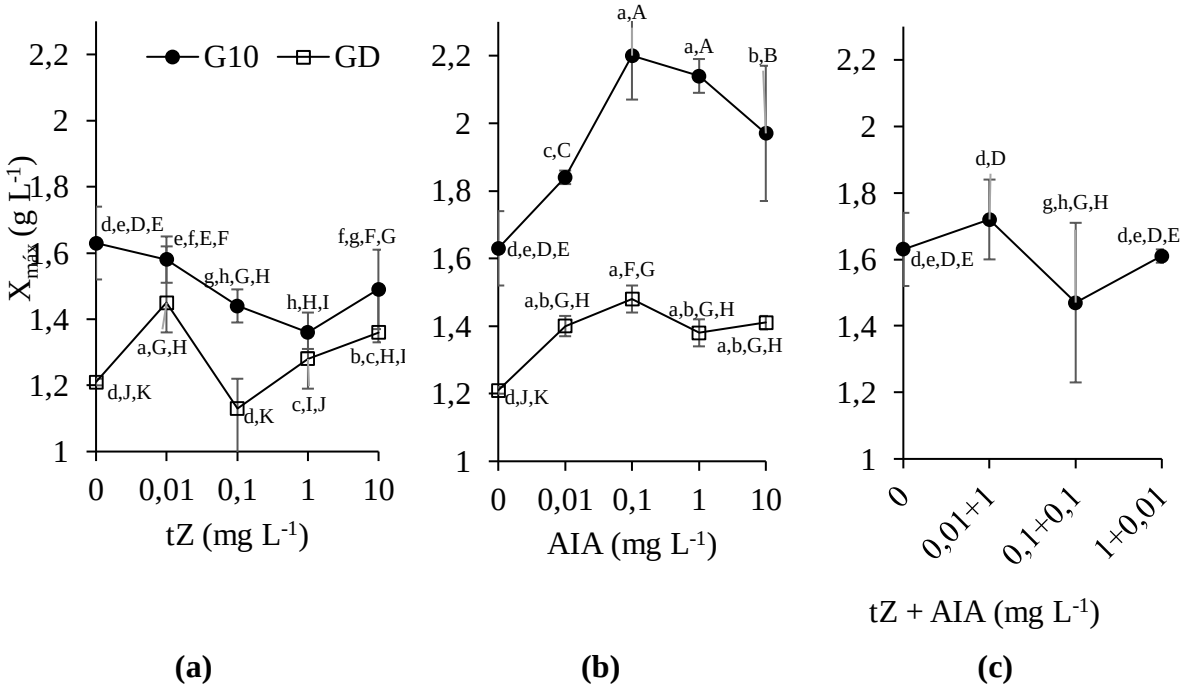
Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa (p≤0,05) para a mesma resposta. *$R^2$: coeficiente de determinação da regressão linear que foi aplicado na fase logarítmica de crescimento. **Δt: tempo inicial-tempo final da fase exponencial de crescimento.

Essa queda na produtividade de biomassa pode ser atribuída ao efeito tóxico dos fitohormônios em concentrações maiores que a adequada para o organismo, o que pode causar

menor taxa de crescimento. Segundo Campbell e Shawn (2005) a concentração limite de suplementação para cada organismo depende da sua capacidade de desintoxicação. Além disso, a toxicidade dos fitohormônios é bastante conhecida na agricultura. Essa característica permite com que os mesmos sejam utilizados tanto como biofertilizantes como biopesticida, alterando somente a dose em que a substância é aplicada (GROSSMANN, 2000).

Ao analisar as respostas obtidas para concentração máxima de biomassa (Figura 3) é possível verificar que os ensaios do grupo G10 com suplementação de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético se destacaram ao aumentar a concentração de biomassa da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 atingindo aproximadamente 2,20 g $L^{-1}$. Nesse grupo, somente os experimentos com adição de ácido 3-indolacético estimularam aumento da concentração de biomassa, atingindo valores até 38% maiores que o controle. Por outro lado, no grupo GD, com exceção da condição com suplementação de 0,1 mg $L^{-1}$ de tZ, os demais experimentos apresentaram influência positiva sobre a produção de biomassa microalgal, apresentando aumento de até aproximadamente 23% em relação ao controle.

**Figura 3 -** Concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) referente aos experimentos de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com **(a)** tZ, **(b)** AIA e **(c)** tZ+AIA




Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a resposta analisando cada grupo individualmente. Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a resposta comparando todas as amostras.

Ao comparar as respostas apresentadas pelos grupos é evidente que todos os componentes do grupo G10, do qual eram retiradas amostras a cada 10 d, tiveram maior

produção de biomassa que seus semelhantes do grupo GD, do qual eram retiradas amostras diariamente. Isso porque, quando a amostragem é feita diariamente, a disponibilidade dos fitohormônios para consumo da microalga está sendo afetada, principalmente nas menores concentrações de suplementação. Ao retirar amostras é também retirado parte do fitohormônio suplementado, além de células que poderiam estar se duplicando.

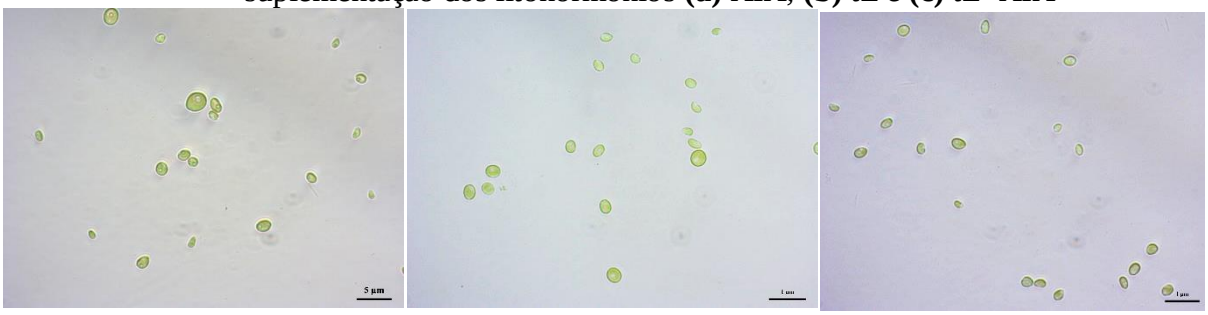
Uma das teorias relacionada ao aumento da produção de biomassa ao suplementar fitohormônios é o adequado balanço entre proporções de auxinas e citocininas (SU; LIU; ZHANG, 2011). Essa pode ser uma explicação para o estímulo positivo na produção de biomassa identificada neste estudo. Pois, mesmo ao suplementar os cultivos com os fitohormônios isolados já está se alterando esse balanço, uma vez que as microalgas possuem naturalmente fitohormônios endógenos. Um estudo de Stirk et al. (2013) afirma que auxinas e citocininas estão presentes de forma endógena em 24 cepas de microalgas, incluindo o gênero *Chlorella*. Entretanto, apesar de algumas suplementações dos fitohormônios isolados alterarem o balanço entre auxinas e citocininas, as concentrações combinadas entre *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético avaliadas neste estudo não tiveram o mesmo efeito. Provavelmente as proporções não alteraram o balanço entre auxinas e citocininas expressivamente, o que da mesma forma não teve influência na produção de biomassa.

Também, os efeitos de dose dependência e concentração limite que foi observado nos parâmetros cinéticos ocorre com o acúmulo de biomassa. Essa mesma relação foi descrita por Yu et al. (2017) ao cultivar *Chlorella* sp. SDEC-18 com as auxinas ácido 3-indolbutírico e ácido naftilacético nas concentrações de 0, 5, 20, 30 e 50 mg $L^{-1}$. Nesse estudo, a suplementação de 5 e 20 mg $L^{-1}$ das substâncias apresentaram resultados superiores ao controle, sendo que 20 mg $L^{-1}$ foi a concentração de fitohormônio que promoveu maior acúmulo de biomassa (600 mg $L^{-1}$). As suplementações de 30 e 50 mg $L^{-1}$ inibiram o acúmulo de biomassa (300 e 100 mg $L^{-1}$). A partir disso os autores concluíram que em microalgas os fitohormônios tem efeitos positivos em concentrações muito baixas e efeitos negativos quando são suplementados em concentrações excessivas.

Ao acompanhar a morfologia das células durante os cultivos com suplementação de ácido 3-indolacético, *trans*-zeatina e com as combinações entre os dois fitohormônios (Figura 4a, 4b e 4c, respectivamente), não se observou mudanças nas células. Resultado diferente do que foi relatado por Park et al. (2013) ao avaliarem o efeito da adição dos fitohormônios ácido indol-3-acético, ácido giberélico, cinetina, 1-triacontanol e ácido abscísico, em concentrações de 0,1 a 10 ppm nas células de *Chlamydomonas reinhardtii*, que constataram

que os tratamentos com os cinco fitohormônios resultaram em aumento acentuado do tamanho das células.

**Figura 4** - Micrografias com aumento de 50x de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivadas com suplementação dos fitohormônios **(a)** AIA, **(b)** tZ e **(c)** tZ+AIA



**(a)** **(b)** **(c)**

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

As concentrações de macrocomponentes na biomassa (base úmida) de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes concentrações de fitohormônios foram analisadas (Tabela 3). A produção de proteínas foi aumentada ao suplementar 0,01 mg $L^{-1}$ (G10) e 0,1 mg $L^{-1}$ (GD e G10) compondo aproximadamente 50% da biomassa. Os carboidratos compuseram até 32% da biomassa microalgal com a adição de 1 mg $L^{-1}$ de AIA (GD) e com a suplementação conjunta de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ e 1 mg $L^{-1}$ de AIA. Também, todos os experimentos com *trans*-zeatina do grupo G10 e com 1 e 10 mg $L^{-1}$ de AIA (G10) produziram em média 30% desse macrocomponente. Para a produção de lipídios a suplementação de AIA se destaca, uma vez que é possível atingir até 34% da composição da biomassa microalgal suplementando 0,1 e 1 mg $L^{-1}$ de AIA (G10) e até 32% com a adição de 10 mg $L^{-1}$ (GD e G10).

Ao se tratar de um gênero de microalga bastante estudado para produção de biocombustíveis, os resultados desse estudo, que associam aumento na produção biomassa e lipídios e aumento de carboidratos, podem ser bastante interessantes para a área. Os resultados obtidos na caracterização da biomassa microalgal demonstram que a suplementação de fitohormônios pode ser bastante versátil. O que de acordo com Yu et. al (2017) é devido a ajustes no particionamento de carbono. Os autores concluíram que dependendo da concentração de fitohormônio suplementada é facilitado o transporte do carbono ou por vias de síntese de carboidratos ou por vias de síntese de lipídios. No entanto, os mecanismos de particionamento de carbono em microalgas ainda não foram completamente esclarecidos.

**Tabela 3 -** Conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios referentes aos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com AIA e tZ

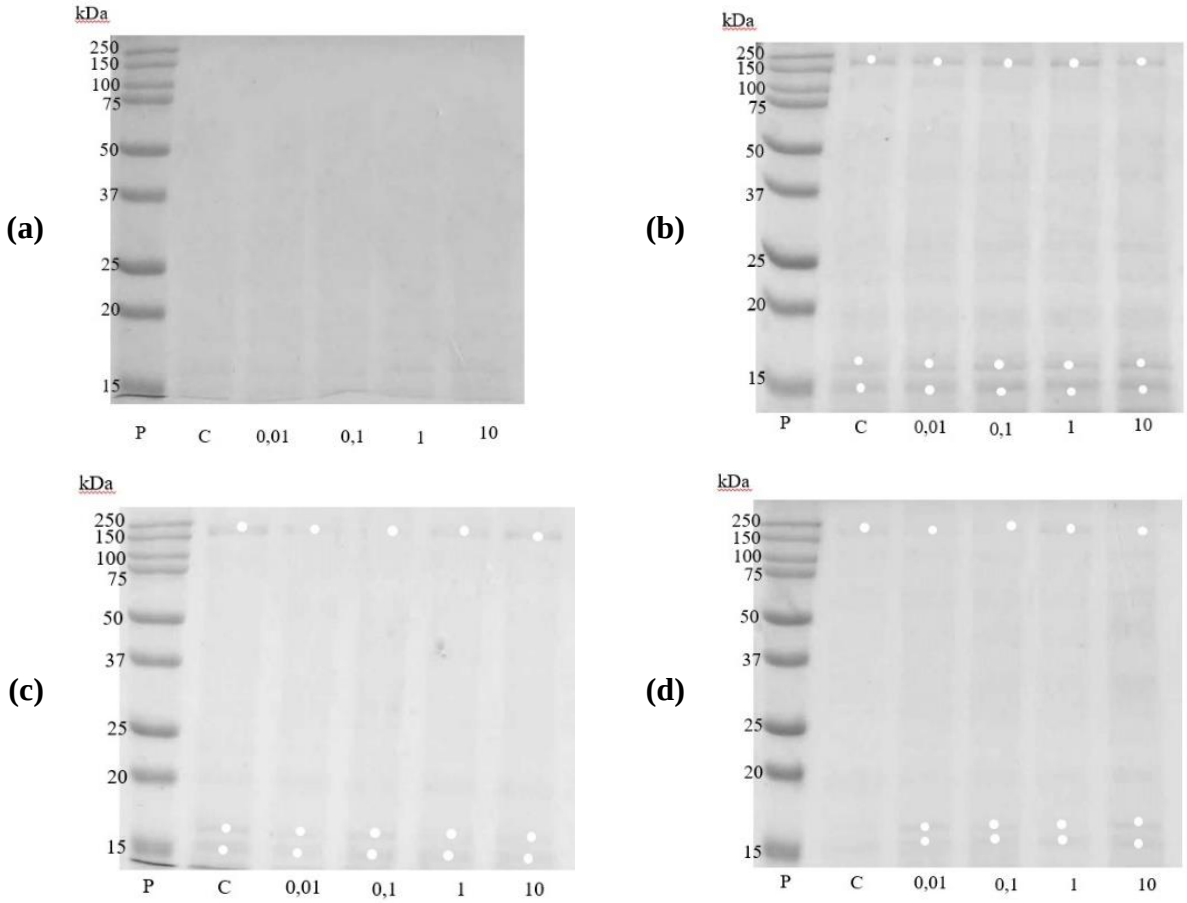
| **Grupo GD** | | | |
|---|---|---|---|
| **Amostra** | **Proteínas (% m m$^{-1}$)** | **Carboidratos (% m m$^{-1}$)** | **Lipídios (% m m$^{-1}$)** |
| C | 46,7$^{b}$±0,1 | 20,3$^{j}$±0,1 | 26,1$^{e,f,g,h,}$±0,3 |
| AIA0,01 | 42,5$^{c,d,e}$±0,1 | 23,7$^{g,h,i}$±0,1 | 28,6$^{c,d,e}$±0,5 |
| AIA0,1 | 41,7$^{c,d,e,f}$±0,7 | 22,9$^{g,h,i,j}$±0,4 | 28,0$^{d,e,f}$±0,3 |
| AIA1 | 44,1$^{b,c}$±0,9 | 31,9$^{a}$±0,5 | 26,9$^{e,f,g}$±0,3 |
| AIA10 | 39,9$^{e,f,g,h}$±0,5 | 25,5$^{e,f,g}$±0,3 | 32,0$^{a,b}$±2,6 |
| tZ0,01 | 42,5$^{c,d,e}$±2,0 | 24,7$^{e,f,g,h}$±0,5 | 26,2$^{e,f,g,h}$±0,7 |
| tZ0,1 | 50,1$^{a,}$±2,9 | 24,3$^{f,g,h}$±0,3 | 27,0$^{e,f,g}$±1,5 |
| tZ1 | 41,2$^{d,e,f,g}$±1,4 | 21,3$^{i,j}$ ±0,1 | 25,3$^{e,f,g,h}$±2,9 |
| tZ10 | 44,1$^{b,c}$±2,3 | 22,6$^{h,i,j}$±0,3 | 34,8$^{a}$±2,0 |
| **Grupo G10** | | | |
| **Amostra** | **Proteínas (% m m$^{-1}$)** | **Carboidratos (% m m$^{-1}$)** | **Lipídios (% m m$^{-1}$)** |
| C | 42,7$^{c,d}$±0,8 | 29,2$^{b,c}$±1,0 | 27,0$^{e,f,g}$±2,1 |
| AIA0,01 | 38,5$^{g,h,i}$±0,4 | 29,8$^{a,b,c}$±0,5 | 30,5$^{b,c,d}$±0,9 |
| AIA0,1 | 36,2$^{i,j}$±0,6 | 27,5$^{c,d,e}$±0,1 | 33,8$^{a,b}$±2,0 |
| AIA1 | 40,7$^{d,e,f,g}$±0,4 | 30,1$^{a,b,c}$±0,9 | 34,5$^{a}$±2,7 |
| AIA10 | 37,5$^{h,i,j}$±0,7 | 29,6$^{a,b,c}$±1,7 | 31,9$^{a,b,c}$±2,2 |
| tZ0,01 | 50,7$^{a,}$±1,5 | 26,8$^{d,e,f}$±0,7 | 28,6$^{c,d,e}$±1,9 |
| tZ0,1 | 50,5$^{a}$±3,0 | 30,4$^{a,b}$±0,8 | 24,1$^{g,h}$±1,4 |
| tZ1 | 46,1$^{b}$±0,8 | 30,9$^{a,b}$1,2 | 25,1$^{f,g,h}$±0,3 |
| tZ10 | 35,0$^{j}$±0,7 | 31,4$^{a,b}$±0,7 | 24,2$^{g,h}$±0,2 |
| tZ0,01+ AIA1 | 38,5$^{g,h,i}$±1,1 | 32,3$^{a}$±0,1 | 25,4$^{e,f,g,h}$±1,0 |
| tZ0,1+AIA0,1 | 41,2$^{d,e,f,g}$±0,8 | 28,6$^{b,c,d}$±0,2 | 23,4$^{h}$±1,2 |
| tZ1+AIA0,01 | 39,4$^{f,g,h}$±0,6 | 28,9$^{b,c,d}$±0,9 | 24,2$^{g,h}$±1,2 |

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para cada resposta comparando todas as amostras.

Ao analisar os resultados gerados a partir da análise SDS-PAGE dos experimentos com ácido 3-indolacético, t*rans*-zeatina e com a mistura dos dois fitohormônios (Figuras 4, 5 e 6, respectivamente) é possível notar que a suplementação dos fitohormônios influencia no perfil proteico da microalga *Chlorella fusca* LEB 111.

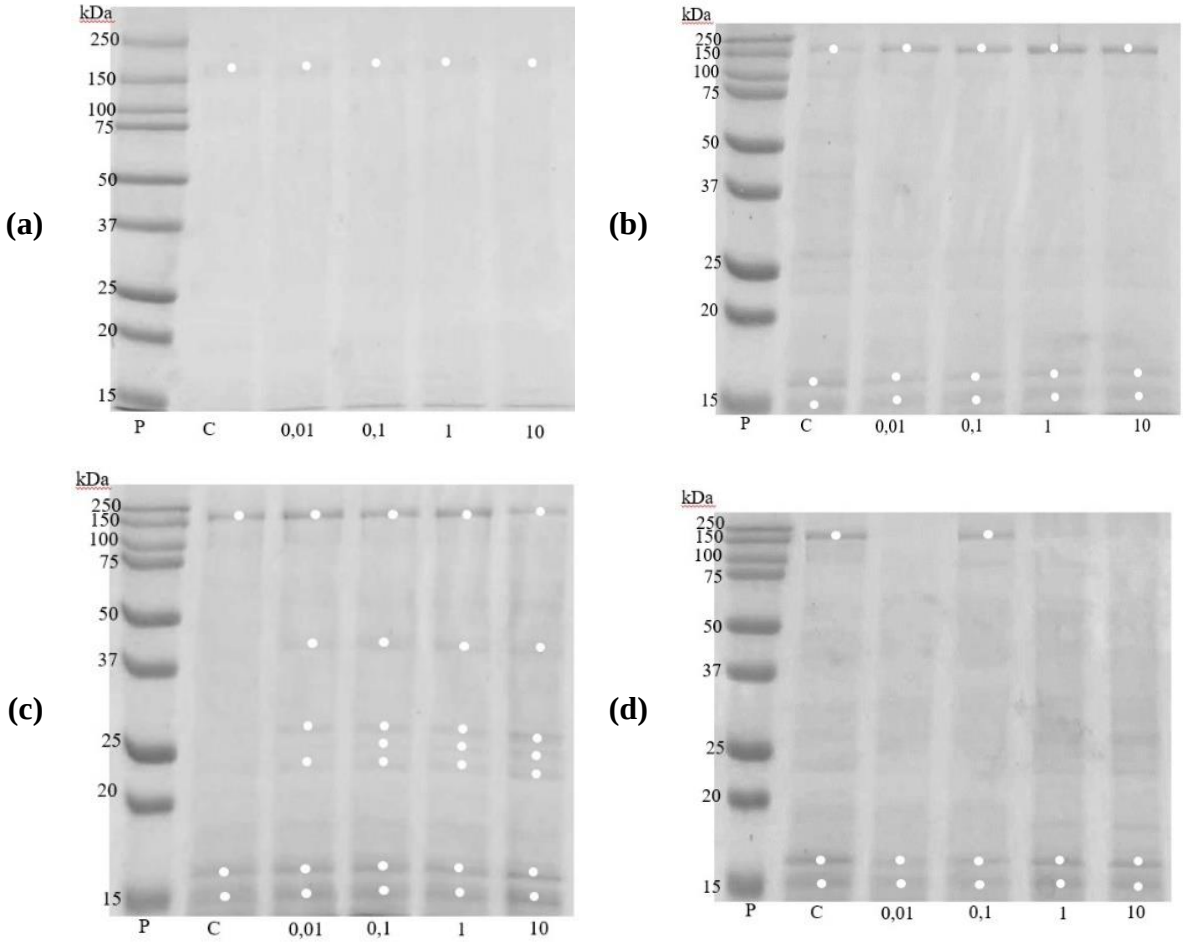
Quando os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 foram suplementados com ácido 3-indolacético o perfil proteico no dia 0, não expressou nenhuma banda no intervalo analisado (Figura 4a). Já nos dias 10, 20 e 30 foram identificadas a expressão de uma proteína próxima a 150 kDa e duas entre 15 e 20 kDa (Figuras 4b, 4c e 4d, respectivamente). No dia 30, essas duas últimas bandas citadas não aparecem no cultivo controle, provavelmente por terem sido degradadas devido ao longo tempo de cultivo.

**Figura 5 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30




Nos perfis proteicos gerados para os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com *trans*-zeatina, proteínas próximas a 150 kDa são expressas em todos os dias amostrados (Figura 5a – 5d). A partir do dia 10 também são expressas duas bandas entre 15 e 20 kDa. Já no dia 20, é notável que houve síntese de uma proteína entre 37 e 50 kDa e três próximas a 25 kDa, exceto para a condição controle. Entretanto, no dia 30, essas proteínas parecem ter sido degradas e o perfil proteico gerado é semelhante ao dia 10.

**Figura 6 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com tZ nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30

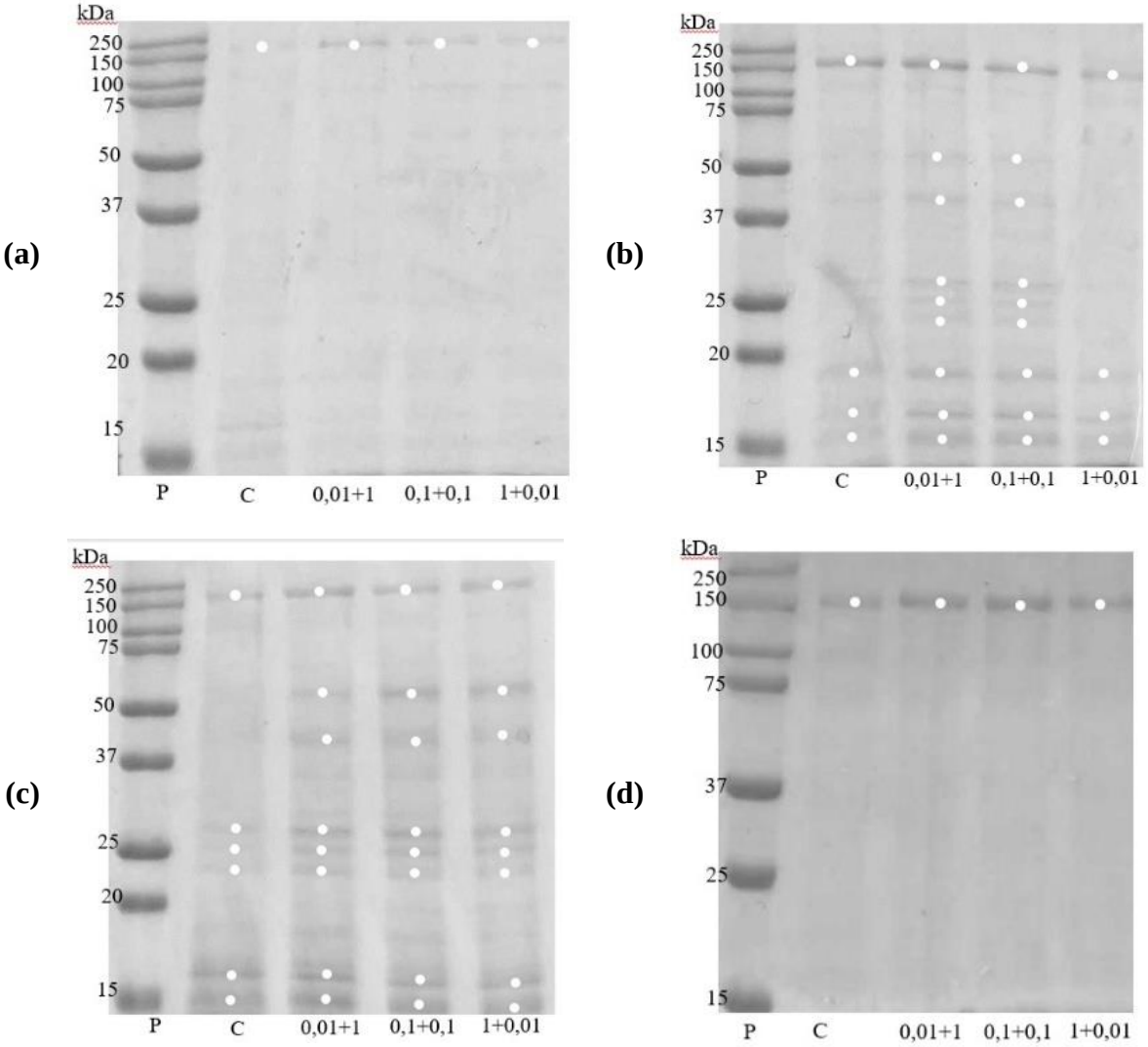



Os perfis proteicos referentes aos cultivos suplementados com a mistura entre os fitohormônios foi o que expressou mais bandas proteicas (Figuras 6a – 6d). Em todos os dias e condições expressou uma proteína próxima a 150 kDa. No dia 10 foram geradas bandas de proteínas próximas a 50, 37 kDa e três bandas próximas a 25 kDa, quando os cultivos foram suplementados com 0,01 mg $L^{-1}$ de *trans*-zeatina e 1 mg $L^{-1}$ de ácido 3-indolacético e, com a mistura de 0,1 mg $L^{-1}$ de cada fitohormônio. Além dessas, há três bandas expressas entre 15 e 20 kDa para todas as condições. Já no dia 20 foram geradas bandas próximas a 50 e 37 kDa e três bandas próximas 25 kDa em todas as condições com suplementação. E, assim como no dia 10, há a expressão de proteínas entre 15 e 20 kDa, entretanto se nota duas bandas e não três como na amostragem anterior. O que indica que houve degradação proteica.

Acredita-se que as expressões proteicas encontradas nos perfis gerados para os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 sejam referentes a proteínas fotossintéticas, visto que os fitohormônios incentivam as reações de fixação de $CO_2$ à ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase

oxigenase (rubisco) e à fosforilação fotossintética, o que aumenta a eficiência fotossintética (PIOTROWSKA et al., 2008).

**Figura 7 -** Perfil proteico de *Chlorella fusca* LEB 111 suplementados com tZ + AIA nos dias **(a)** 0, **(b)** 10, **(c)** 20 e **(d)** 30




As nomenclaturas de suplementação conjunta são dadas em tZ+AIA para todos os perfis.

Dessa forma, a detecção próxima de 50 kDa pode ser a expressão de Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), a qual têm aproximadamente 56 kDa e é a principal enzima fotossintética, pois catalisa a fixação de dióxido de carbono a 1,5-ribulose-bisfosfato no ciclo de Calvin, produzindo o 3-fosfoglicerato essencial para a ocorrência da fotossíntese (NELSON; COX, 2011). Já as bandas detectadas entre 15 e 20 kDa podem ser subunidades do complexo pigmento-proteína do fotossistema II, como psbS (± 21 kDa), a qual tem um papel crucial quando há excesso de energia ou psbS (± 20 kDa) e psbQ

(± 16 kDa) que estabilizam reações do oxigênio e estão presentes somente em eucariotos (SCHELLER et al., 2004). Além disso, as bandas próximas a 25 kDa, podem ser enzimas LHCB (24 – 28 kDa), as quais fazem parte do complexo coletor de luz do fotossistema II. Este complexo está envolvido na partição de energia entre os fotossistemas I e II e na prevenção de danos ao aparelho fotossintético (TAIZ; ZIEGLER, 2004). Por último, proteínas próximas 37 kDa podem ser D1 e D2, que tem peso molecular de aproximadamente 39 kDa. Essas, são enzimas que constituem o centro de reação do fotossistema II, que é um complexo a cadeia de transporte de elétrons eucariotos (SCHELLER et al., 2004). Além disso, as expressões mais acentuadas aparecem nos dias intermediários, pois no dia 0 ainda estão muito fracas e no dia 30 já podem ter sido degradas devido ao longo tempo de cultivo.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a utilização de fitohormônios nos cultivos de *Chlorella* pode ser uma alternativa eficiente para manipulação de produção de compostos de interesse e aumento na produção de biomassa. A utilização de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$de ácido 3-indolacético juntamente com a menor frequência de amostragem (G10) se mostrou a condição mais eficiente em termos de concentração de biomassa, atingindo valores até 45% maiores que o experimento controle. Também, foi possível aumentar a produção de proteínas (50%), lipídios (34%) e carboidratos (32%) com as suplementações de tZ (0,01 e 0,1 mg $L^{-1}$), AIA (0,1 e 1 mg $L^{-1}$) e a mistura de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ e 1 mg $L^{-1}$ de AIA, respectivamente. Esses resultados mostram a versatilidade da utilização dos fitohormônios para a produção de macromoléculas, além de agregar aumento de produção de biomassa e lipídios, o que a aumenta seu potencial para aplicações principalmente no setor de biocombustíveis.

## REFERÊNCIAS

BABU, A. G.; WU, X.; KABRA, A. N.; KIM, D. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. **Algal Research**, v. 23, p. 178–185, 2017.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1986.

BENEMANN, J. R.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic microalgae biomass production: from niche markets to commodities. **Industrial Biotechnology**, v. 14, p. 3-10, 2018.

BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 277, p. 55–61, 2019.

CAMPBELL, M. K.; SHAWN, O. F. **Biochemistry**. 5. ed. Boston: Brooks Cole, 2005.

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

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.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2–9, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

GROSSMANN, K. Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long , drawn out story. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 506–508, 2000.

HUNT, R. W.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga , *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2400–2414, 2010.

JUSOH, M.; HONG, S.; SENG, T.; AZIZ, A.; SAN, T. Phytochemistry indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content , fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. **Phytochemistry**, v. 111, p. 65–71, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LIU, J.; QIU, W.; SONG, Y. Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. **Algal Research**, v. 18, p. 273–280, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein menasurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, p. 574–576, 1966.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006

OZIOKO, F. U.; CHIEJINA, N. V.; OGBONNA, J. C. Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 2367–2376, 2015.

PIOTROWSKA, A.; CZERPAK, R.; PIETRYCZUK, A.; OLESIEWICZ, A.; WĘDOŁOWSKA, M. The effect of indomethacin on the growth and metabolism of green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 2, p. 125–136, 2008.

PROKOP, A.; BAJPAI, R. K.; ZAPPI, M. E. (Eds.). **Algal Biorefineries – Volume 2**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1271–1274, 1992.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23–28, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Fed-batch cultivation with $CO_2$ and monoethanolamine : influence on *Chlorella fusca* LEB 111 cultivation, carbon biofixation and biomolecules production. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 627–633, 2019.

SCHELLER, H. V.; LUNDE, C.; HALDRUP, A.; JENSEN, P. E. Functional Characterization of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis thaliana*. In: LEISTER, D. (Ed.). **Plant Functional Genomics**. 1. ed. Binghamton: Food Products Press, 2004.

SCHMIDEL, W.; LIMA, U. ALMEIDA; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 2**. São Paulo: Blücher, 2001.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 459–467, 2013.

SU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X. Auxin – cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, 2011.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

YAMAGUCHI, I.; COHEN, J. D.; CULLER, A. H.; QUINT, M.; SLOVIN, J. P.; NAKAJIMA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKAKIBARA, H.; KUROHA, T.; HIRAI, N.; YOKOTA, T.; OHTA, H.; KOBAYASHI, Y.; MORI, H.; SAKAGAMI, Y. Plant Hormones. In: LIU, H. W.; MANDER, L. (Eds.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford:

Elsevier Science, 2010. p. 9-125.

YU, Z.; SONG, M.; PEI, H.; JIANG, L.; HOU, Q.; NIE, C.; ZHANG, L. The effects of combined agricultural phytohormones on the growth , carbon partitioning and cell morphology of two screened algae. **Bioresource Technology**, v. 23, p. 87-96, 2017.

# CAPÍTULO IV

# 5 CONCLUSÃO GERAL

Nos experimentos, com ambas microalgas, notou-se que em menores concentrações os fitohormônios estimulam o crescimento microalgal em uma relação dose dependência, quanto maior a dose suplementada maior o crescimento celular. Entretanto, parece haver um limite de suplementação suportado pelas células, sendo 0,1 mg $L^{-1}$ tZ e 1 mg $L^{-1}$ AIA para *Spirulina* e 0,01 mg $L^{-1}$ tZ e 0,1 mg $L^{-1}$ AIA para *Chlorella*. Após esse limite de concentração de suplemento o crescimento microalgal tende a diminuir.

Para os cultivos com a microalga *Spirulina* a suplementação com 1 mg $L^{-1}$ de AIA junto com a menor frequência de amostragem (G10) aumentou em até 43% a concentração máxima de biomassa (3,7 g $L^{-1}$) quando comparado ao controle (2,1 g L). Além disso, os fitohormônios estimularam a produção de proteínas (70%), carboidratos (21%) e lipídios (24%) com a adição de AIA nas concentrações 1, 10 e 0,01 mg $L^{-1}$, respectivamente. Ainda, constatou-se que a suplementação de fitohormônios no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 afeta a morfologia da célula, causando acentuado alongamento celular.

Nos cultivos de *Chlorella* a utilização de 0,1 e 1 mg $L^{-1}$de AIA juntamente com a menor frequência de amostragem (G10) se mostrou a condição mais eficiente em termos de concentração de biomassa, atingindo valores até 45% maiores que o experimento controle (1,2 g $L^{-1}$). Também, foi possível aumentar a produção de proteínas (50%), lipídios (34%) e carboidratos (32%) com as suplementações de tZ (0,01 e 0,1 mg $L^{-1}$), AIA (0,1 e 1 mg $L^{-1}$) e a mistura de 0,01 mg $L^{-1}$ de tZ e 1 mg $L^{-1}$ de AIA, respectivamente.

A frequência de retirada de amostra se mostrou um fator importante a ser levado em consideração na suplementação de cultivos microalgais com fitohormônios. Neste estudo, constatou-se que a menor frequência traz melhores resultados na produção de biomassa e biomoléculas devido a menor interferência na disponibilidade dos fitohormônios para consumo da microalga.

Ainda, verificou-se a importância no balanço auxina-citocinina, uma vez que ao suplementar concentrações combinadas entre *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético não se observou efeito no estímulo do crescimento microalgal. Provavelmente as proporções avaliadas neste estudo não foram suficientes para alterar o balanço entre auxinas e citocininas expressivamente, o que da mesma forma não teve influência na produção de biomassa.

Muitas questões sobre microalgas e fitohormônios ainda precisam ser estudadas e debatidas, mas este estudo colabora com o esclarecimento de alguns fatos importantes para a área, principalmente mostrando a eficiência da suplementação dos fitohormônios no estímulo

do crescimento tanto de células eucarióticas como de procarióticas. Também, demonstrou-se a versatilidade da produção de biomoléculas com o uso dos fitohormônios nos cultivos microalgais. Sendo que, a partir de variações somente na concentração de suplementação é possível induzir a produção de diferentes biomoléculas. Acredita-se que os resultados desse estudo que agregam aumento de produção de biomassa e biomoléculas, principalmente lipídios, torna a utilização de fitohormônios nos cultivos microalgais uma alternativa potencial para aplicações em biocombustíveis.

# 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outras proporções da mistura de *trans*-zeatina e ácido 3-indolacético nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111;
- Avaliar os efeitos da suplementação de outros fitohormônios e outras combinações entre eles em diferentes microalgas;
- Realizar cultivos em batelada alimentada para adição do fitohormônio;
- Verificar o efeito dos fitohormônios em cultivos *outdoor* e de maior escala;
- Avaliar a eficiência fotossintética após suplementar fitohormônios nos cultivos microalgais;
- Analisar produção de pigmentos (clorofila, carotenoides e ficocianina) e perfil de ácidos graxos;
- Estudar o consumo dos fitohormônios pelas microalgas e a atuação dessas substâncias no metabolismo microalgal;
- Estudar a viabilidade econômica da suplementação de fitohormônios em cultivos microalgais.

# CAPÍTULO V

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA


ABINANDAN, S.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; COLE, N.; DHARMARAJAN, R.; VENKATESWARLU, K.; MEGHARAJ, M. Sustainable production of biomass and biodiesel by acclimation of non-acidophilic microalgae to acidic conditions. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 316–324, 2019.

ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; BENNIS, I.; MERNISSI, N.; WAHBY, I. Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. **Renewable Energy**, v. 77, p. 15–19, 2015.

BABU, A. G.; WU, X.; KABRA, A. N.; KIM, D. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. **Algal Research**, v. 23, p. 178–185, 2017.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1986.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Phytochemistry conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochemistry**, v. 70, n. 8, p. 957–969, 2009.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA-NICZYPORUK, A. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.80, p. 176-183, 2014.

BENEMANN, J. R.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic microalgae biomass production: From niche markets to commodities. **Industrial Biotechnology**, v. 14, p. 3-10, 2018.

BONNER, J.; BANDURSKI, R. S. Studies of the physiology, pharmacology, and biochemistry of the auxins. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 3, p. 59–86, 1952.

BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 277, p. 55–61, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa Conjunta no 2, de 12 de julho de 2013.** Brasília, DF, 2013. 13 p.

BRASIL. **Monografias autorizadas**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: 19 set. 2018.

CAMPBELL, M. K.; SHAWN, O. F. **Biochemistry**. 5. ed. Boston: Brooks Cole, 2005.

CARDIAS, B. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. $CO_2$ 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, L. F.; MOREIRA, J. B.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Acceptance of novel foods for physical activity practitioners formulated with *Spirulina*. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 7–11, 2016.

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

CHERNYAD'EV, I. I. The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 351–362, 2009.

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.

COOKE, T. J.; POLI, D.; SZTEIN, A. E.; COHEN, J. D. Evolutionary patterns in auxin action. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 319–338, 2002.

COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. LEB18. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 173–178, 2019.

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.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2–9, 2011.

COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; ASSIS, D. J.; SOUZA, C. O.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. **Algal Research**, v. 33, p. 231–238, 2018.

CZERPAK, R.; BAJGUZ, A. Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenes, with differential effects on xanthophylls in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 66, n. 1, p. 41–46, 1997.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Use of static magnetic fields to increase $CO_2$ biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 103–109, 2019.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DILWORTH, L. L.; RILEY, C. K.; STENNETT, D. K. Plant Constituents. In: BADAL, S.; DELGODA, S. (Eds.). **Pharmacognosy**. Oxford: Elsevier Science, 2017. p. 61–80.

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 $CO_2$ , $SO_2$ , NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FELLE, H.; PETERS, W.; PALME, K. The electrical response of maize to auxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1064, n. 2, p. 199-204, 1991.

GALUSZKA, P.; SPÍCHAL, L.; KOPEČNÝ, D.; TARKOWSKI, P.; FRÉBORTOVÁ, J.; ŠEBELA, M.; FRÉBORT, I. Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 34, p. 203–264, 2008.

GRAY, W. M. Hormonal regulation of plant growth and development. **PLoS Biology**, v. 2, n. 9, p. 1270-1273, 2004.

GROSSMANN, K. Mode of action of auxin herbicides: A new ending to a long , drawn out story. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 506–508, 2000.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del future:** Alimentación y salud. Barcelona: Urano, 1994.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgal $CO_2$ -emission mitigation systems — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 189–198, 2011.

HUNT, R. W.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga , *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2400–2414, 2010.

ILLMAN, A.; SCRAGG, A.; SHALES, S. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631–635, 2000.

JACOB-LOPES, E.; MARONEZE, M. M.; DEPRÁ, M. C.; SARTORI, R. B.; DIAS, R. R.; ZEPKA, L. Q. Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 1–7, 2019.

JUSOH, M.; HONG, S.; SENG, T.; AZIZ, A.; SAN, T. Phytochemistry indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content , fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. **Phytochemistry**, v. 111, p. 65–71, 2015.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 60–84, 2018.

KIM, S. K. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae:** Biotechnology advances. Oxford: Elsevier Science, 2015.

KISELEVA, A. A.; TARACHOVSKAYA, E. R.; SHISHOVA, M. F. Biosynthesis of phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 595–610, 2012.

KORU, E. Earth Food *Spirulina* (Arthrospira): Production and Quality Standarts. In: EL-SAMRAGY, Y. (Ed.). **Food Additive**. Rijeka: InTech, 2012. p. 191-202.

KOZLOVA, T. A.; HARDY, B. P.; KRISHNA, P.; LEVIN, D. B. Effect of phytohormones on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda*. **Algal Research**, v. 27, p. 325–334, 2017.

KOZLOVA, T. A.; HARDY, B. P.; LEVIN, D. B. The combined influence of 24-epibrassinolide and 3-indoleacetic acid on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda* (CPCC-158). **Algal Research**, v. 35, p. 22-32, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LIU, J.; QIU, W.; SONG, Y. Stimulatory effect of auxins on the growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*. **Algal Research**, v. 18, p. 273–280, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein menasurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273–282, 2015.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A.V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 270–276, 2018.

LV, H.; WANG, Q.; WANG, S.; QI, B.; HE, J.; JIA, S. Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. **Aquaculture**, v. 503, p. 146–155, 2019.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, p. 574–576, 1966.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MATHIMANI, T.; PUGAZHENDHI, A. Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 326–330, 2019.

MORAES, L.; ROSA, G. M. DA; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation and production of *Spirulina* sp. LEB 18 biomass with different concentrations of $NaNO_3$ and NaCl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1–10, 2018.

MORAIS, E. G.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. LEB 18. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 40–45, 2019.

MORAIS, E. G; DUARTE, J. H. **Isolamento de microalgas para biofixação de CO2 proveniente de geração termelétrica**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **A Journal of Biosciences**, v. 63, p. 144–150, 2008.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

MOREIRA, J. B.; LIM, L. T.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Microalgae protein heating in acid/basic solution for nanofibers production by free surface electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v. 230, p. 49–54, 2018.

MORO, G. M. B. **Potencial do extrato de C-ficocianina como ingrediente bioativo para a formulação de nutricosméticos**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OTA, M.; KATO, Y.; WATANABE, H.; WATANABE, M.; SATO, Y.; SMITH JR, R. L. S.; INOMATA, H. Fatty acid production from a highly $CO_2$ tolerant alga, *Chlorocuccum littorale*, in the presence of inorganic carbon and nitrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5237–5242, 2009.

OZIOKO, F. U.; CHIEJINA, N. V.; OGBONNA, J. C. Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 2367–2376, 2015.

PARK, W.; YOO, G.; MOON, M.; KIM, C. W.; CHOI, Y. E.; YANG, J. W. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for

biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 5, p. 1128–1142, 2013.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

PIOTROWSKA, A.; CZERPAK, R. Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p. 573–585, 2009.

PIOTROWSKA, A.; CZERPAK, R.; PIETRYCZUK, A.; OLESIEWICZ, A.; WĘDOŁOWSKA, M. The effect of indomethacin on the growth and metabolism of green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 2, p. 125–136, 2008.

PIOTROWSKA-NICZYPORUK, A.; BAJGUZ, A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Plant Growth Regulation**, v. 73, p. 57–66, 2014.

PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 24, p. 159–171, 2013.

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. 38–43, 2018.

PROKOP, A.; BAJPAI, R. K.; ZAPPI, M. E. (Eds.). **Algal Biorefineries - Volume 2: Products and Refinery Design**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1271–1274, 1992.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23–28, 2006.

REMINGTON, D. L.; VISION, T. J.; GUILFOYLE, T. J.; REED, J. W. Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. **Plant physiology**, v. 135, n. 3, p. 1738-1752, 2004.

RENUKA, N.; GULDHE, A.; SINGH, P.; ANSARI, F. A.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluating the potential of cytokinins for biomass and lipid enhancement in microalga *Acutodesmus obliquus* under nitrogen stress. **Energy Conversion and Management**, v. 140, p. 14–23, 2017.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford: Blackwell Publishin, 2003.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Green alga cultivation with monoethanolamine: Evaluation of $CO_2$ fixation and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 261, p. 206–212, 2018.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Fed-batch cultivation with $CO_2$ and monoethanolamine: Influence on *Chlorella fusca* LEB 111 cultivation, carbon biofixation and biomolecules production. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 627–633, 2019.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; GARCIA, C. V. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SALAMA, E.; KABRA, A. N.; JI, M.; RAE, J.; MIN, B.; JEON, B. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 97–103, 2014.

SATI, H.; MITRA, M.; MISHRA, S.; BAREDAR, P. Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 38, p. 1-12, 2019.

SAYGIDEGER, S. D.; OKKAY, O.; Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth, protein and chlorophyll-a content of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* cells. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 2, p. 175-178, 2008.

SCHELLER, H. V.; LUNDE, C.; HALDRUP, A.; JENSEN, P. E. Functional Characterization of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis thaliana*. In: LEISTER, D. (Ed.). **Plant Functional Genomics**. 1. ed. Binghamton: Food Products Press, 2004. p. 393-425.

SCHMIDEL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 2**. São Paulo: Blücher, 2001.

SHARMA, P.; SHARMA, N. Industrial and biotechnological applications of algae: A review. **Journal of Advances in Plant Biology**, v. 1, p. 1–25, 2017.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 649–657, 1993.

SINGH, J.; SAXENA, R. C. An Introduction to Microalgae. In: KIM, S. K. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae:** Biotechnology advances. Oxford: Elsevier Science, 2015. p. 11–24.

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.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 459–467, 2013.

SU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X. Auxin – cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 616-625, 2011.

SUDHAKAR, K.; PREMALATHA, M.; RAJESH, M. Large-scale open pond algae biomass yield analysis in India: A case study. **International Journal of Sustainable Energy**, v. 33, n. 2, p. 304–315, 2014.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TALLARIDA, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes and Cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003–1008, 2011.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163–170, 2007.

TAŞTAN, B. E.; DUYGU, E.; ATAKOL, O.; DÖNMEZ, G. $SO_2$ and $NO_2$ tolerance of microalgae with the help of some growth stimulators. **Energy Conversion and Management**, v. 64, n. 2, p. 28–34, 2012.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

TIVENDALE, N. D.; ROSS, J. J.; COHEN, J. D. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 44–51, 2014.

UDAYAN, A.; ARUMUGAM, M. Selective enrichment of Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in *N. oceanica* CASA CC201 by natural auxin supplementation. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 329–333, 2017.

UGGETTI, E.; SIALVE, B.; HAMELIN, J.; BONNAFOUS, A.; STEYER, J. P. $CO_2$ addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater. **Journal of $CO_2$ Utilization**, v. 28, p. 292–298, 2018.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5844-5849, 1999.

VANCE, B. D. Phytohormone effects on cell division in *Chlorella pyrenoidosa* Chick (TX-7-11-05) (Chlorellaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 5, p. 169–173, 1987.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 592–598, 2019.

VERHAGE, A.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 536–540, 2010.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira)* physiology, cell-biology and biotechnology.** Londres: Taylor & Francis, 1997.

VOβ, U.; BISHOPP, A.; FARCOT, E.; BENNETT, M. J. Modelling hormonal response and development. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 5, p. 311–319, 2014.

WAN, D.; WU, Q.; KUČA, K. *Spirulina*. In: GRUMEZESCU, A. (Ed.). **Nutraceuticals**. Oxford: Elsevier Science, 2016. p. 569–583.

WONG, W. S.; TAN, S. N.; GE, L.; YONG, J. W. H. The Importance of phytohormones and microbes in biofertilizers. In: MAHESHWARI, D. (Ed). **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem – Volume 12**. Cham: Springer, 2015. p. 105-158.

YAMAGUCHI, I.; COHEN, J. D.; CULLER, A. H.; QUINT, M.; SLOVIN, J. P.; NAKAJIMA, M.; YAMAGUCHI, S.; SAKAKIBARA, H.; KUROHA, T.; HIRAI, N.; YOKOTA, T.; OHTA, H.; KOBAYASHI, Y.; MORI, H.; SAKAGAMI, Y. Plant Hormones. In: LIU, H. W.; MANDER, L. (Eds.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier Science, 2010. p. 9-125.

YU, Z.; PEI, H.; JIANG, L.; HOU, Q.; NIE, C.; ZHANG, L. Phytohormone addition coupled with nitrogen depletion almost tripled the lipid productivities in two algae. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 904–914, 2018.

YU, Z.; SONG, M.; PEI, H.; JIANG, L.; HOU, Q.; NIE, C.; ZHANG, L. The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae. **Bioresource Technology**, v. 23, p. 87-96, 2017.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physuques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Ph.D Thesis, Université de Paris, 1966.

# APÊNDICES

**Figura AP1**- Ensaios em fotobiorreatores E*rlenmeyers*

**Figura AP2 -** Curva padrão da microalga *Spirulina* sp. LEB 18

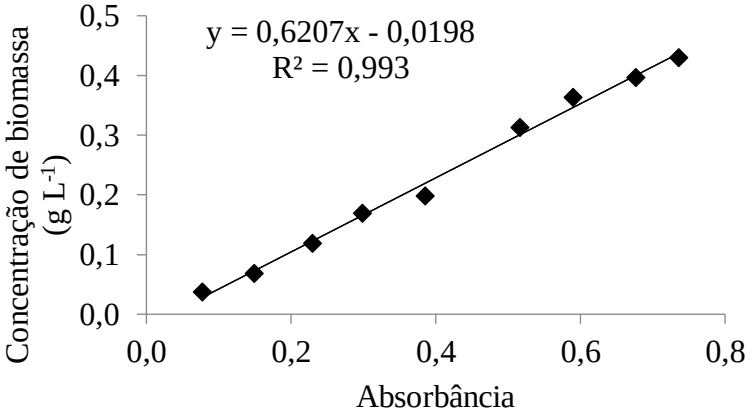
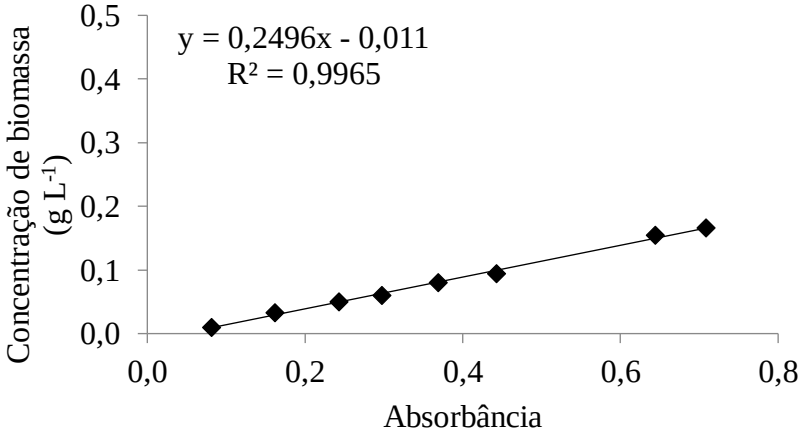



**Figura AP3** – Curva padrão da microalga *Chlorella fusca* LEB 111



# ANEXOS

**Tabela A1-** Composição química do meio de cultivo Zarrouk

| Nº | Nomenclatura | Fórmula química | Concentração |
|---|---|---|---|
| 1 | Bicarbonato de sódio | $NaHCO_3$ | 16,8 g $L^{-1}$ |
| 2 | Fosfato de potássio dibásico | $K_2HPO_4$ | 0,5 g $L^{-1}$ |
| 3 | Nitrato de sódio | $NaNO_3$ | 2,5 g $L^{-1}$ |
| 4 | Sulfato de potássio | $K_2SO_4$ | 1,0 g $L^{-1}$ |
| 5 | Cloreto de sódio | NaCl | 1,0 g $L^{-1}$ |
| 6 | Sulfato de magnésio heptahidratado | $MgSO_4.7H_2O$ | 0,2 g $L^{-1}$ |
| 7 | Cloreto de cálcio | $CaCl_2$ | 0,04 g $L^{-1}$ |
| 8 | Sulfato ferroso heptahidratado | $FeSO_4.7H_2O$ | 0,01 g $L^{-1}$ |
| 9 | EDTA dissódico | EDTA | 0,08 g $L^{-1}$ |
| $A_5$ | Solução de micronutrientes | * | 1,0 mL $L^{-1}$ |
| $B_6$ | Solução de metais | ** | 1,0 mL $L^{-1}$ |

Fonte: Zarrouk (1966). *Solução A5 (g $L^{-1}$): $H_3BO_3$ (2,86), $MnCl_2.4H_2O$ (1,81), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,222), $NaMoO_4$ (0,015), $CuSO_4.5H_2O$ (0,079). **Solução B6 (mg $L^{-1}$): $NH_4VO_3$ (23,0), $K_2Cr_2(SO_4)_4.24H_2O$ (96,0), $NiSO_4.7H_2O$ (48,0), $Na_2WO_4.2H_2O$ (18,0), $TiOSO_4.H_2SO_4.8H_2O$ (61,1), $Co(NO_3)_2.6H_2O$ (44,0).

**Tabela A2-** Composição química do meio de cultivo BG 11

| N° | Nomenclatura | Fórmula Química | Concentração |
|---|---|---|---|
| 1 | Nitrato de sódio | $NaNO_3$ | 1,5 g $L^{-1}$ |
| 2 | Fosfato de potássio dibásico trihidratado | $K_2HPO_4.3H_2O$ | 0,040 g $L^{-1}$ |
| 3 | Sulfato de magnésio heptahidratado | $MgSO_4.7H_2O$ | 0,075 g $L^{-1}$ |
| 4 | Cloreto de cálcio bihidratado | $CaCl_2.2H_2O$ | 0,036 g $L^{-1}$ |
| 5 | Citrato férrico amoniacal | $C_6H_{11}FeNO_7$ | 0,006 g $L^{-1}$ |
| 6 | EDTA dissódico | $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ | 0,001 g $L^{-1}$ |
| 7 | Carbonato de sódio | $Na_2CO_3$ | 0,020 g $L^{-1}$ |
| 8 | Ácido cítrico | $C_6H_8O_7$ | 0,006 g $L^{-1}$ |
| $A_5$ | Solução de micronutrientes + Cobalto | * | 1 mL $L^{-1}$ |

Fonte: Rippka et al. (1979). *Solução A5+Co (g $L^{-1}$): $H_3BO_3$ (2,86), $MnCl_2.4H_2O$ (1,81), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,222), $NaMoO_4$ (0,015), $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,079), $Co(NO_3).6H_20$ (0,0494).