



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

OBTENÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL A PARTIR DE
MICROALGAS

CAMILA GONZALES CRUZ

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Orientador

PROF.^a DR.^a ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2019

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

OBTENÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL A PARTIR DE
MICROALGAS

CAMILA GONZALES CRUZ

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

C957o Cruz, Camila Gonzales.

Obtenção de promotores de crescimento vegetal a partir de microalgas / Camila Gonzales Cruz. – 2019.

118 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. Auxinas 2. Citocininas 3. Fitohormônios 4. Fotoperíodo
5. Microalgas I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Rosa, Ana Priscila Centeno da III. Título.

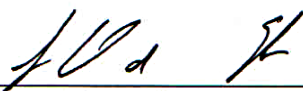
CDU 579:639.64

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Camila Gonzales Cruz e aprovada em 18 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



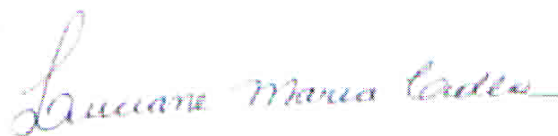
Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa - FURG



Profa. Dra. Luciellen Oliveira dos Santos - FURG



Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG



Profa. Dra. Luciane Maria Colla - UPF

AGRADECIMENTOS

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

A minha **Super Mãe Sandra** pela educação, apoio financeiro mesmo em momentos difíceis, incentivo em todas as horas, pela construção do meu caráter, por me ensinar a lutar pelos meus sonhos, pela melhor amizade que eu poderia ter, por todo apoio, dedicação e carinho dedicados a mim e, principalmente, por todo e maior amor do mundo.

Ao meu **paizão Jorge**, por uma vida inteira dedicada a segurança pública, muitas vezes correndo risco de vida para proporcionar educação a seus filhos, por todo apoio financeiro, pelos conselhos, amizade, carinho e, principalmente pelo amor que me foi dado em todos esses anos.

A minha irmã engenheira, mestre e futura doutora **Jéssica**, por ser meu exemplo, por me inspirar a estar aqui hoje, por sempre me apoiar, pela paciência durante os momentos difíceis, pela amizade, cumplicidade, carinho e muito amor, és meu orgulho!

Ao meu irmão **Vinicius**, por todo apoio, carinho, pelas risadas, pela amizade, cumplicidade, carinho e muito amor, eu te amo!!!

A minha vózinha **Valda** por todo amor, carinho e incentivo. E ao meu vózinho **Adão**, que mesmo não estando mais aqui, sempre foi um exemplo de pessoa para mim, a qual eu jamais esquecerei.

A minha melhor amiga **Larissa**, por me entender e entender a minha ausência, por sempre me apoiar e me aconselhar, por ser tão parecida comigo, por muitas vezes preparar um chimarrão e ficar do meu lado enquanto eu redigia este documento, sem uma palavra, só pelo fato de estar presente. Muito obrigada por toda essa amizade e por permanecer em minha vida!

Aos meus filhos de quatro patas, **Sophia e Frederico**, muito obrigada por estarem presentes na minha vida, por sempre me receberem fazendo festa, por ficarem ao meu lado em todas as horas, mesmo sem a atenção que merecem. Eu amo vocês!

Aos meus tios **Carla e Paulinho**, e meus priminhos **Guilherme e Martina**, vocês são a minha base, meu porto seguro, tudo o que eu preciso para seguir em frente.

Ao meu querido orientador e professor **Jorge Alberto Vieira Costa**, por ter me proporcionado a oportunidade de estar trabalhando com o que eu amo, e em seu maravilhoso grupo de pesquisa, um grupo pelo qual tenho imenso orgulho de fazer parte. Por lutar tanto pela nossa ciência. És um exemplo de profissional para todos! Muito obrigada por tudo!

A minha querida co-orientadora e como eu costumo dizer “minha mãe da Furg”, **Ana Priscila Centeno da Rosa**, pelo exemplo de profissional que és, pelos ensinamentos, pelos conselhos e amizade de sempre, por ter contribuído imensamente com este trabalho, e, acima de tudo, pela preocupação que sempre tem comigo. Muito obrigada!

A minha colega, amiga e irmã, **Jéssica Teixeira da Silveira**, presente que a Furg me deu, tenho muita sorte em te ter nos meus dias. Muito obrigada por todo apoio, amizade, conselhos e por ser exatamente quem tu és, esse trabalho é teu também!

As colegas e principalmente amigas, **Ana Paula, Bruna Cardias, Etiele, Kricelle e Priscila**, muito obrigada por toda ajuda, apoio, por me aturarem, pela amizade, gargalhadas, pelos nossos cafés! Vocês fazem parte deste trabalho, eu amo vocês!

A minha querida e fofa iniciante científica **Gabriela**, por todas as horas dedicadas a este trabalho, sem a tua ajuda, teria sido bem mais difícil.

A todos os **colegas e amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB)**, em especial aos queridos pós-doutores **Bárbara Freitas, Luiza, Thaísa e Gabriel** agradeço muito por toda ajuda que me foi dada, esse trabalho tem um pouco de cada um de vocês, tenho imenso orgulho em trabalhar na nossa equipe.

A professora **Michele Moraes** e aos colegas do **Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MIBI)**, por me auxiliarem durante o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por toda ajuda e paciência durante estes 2 anos.

Ao meu querido amigo e técnico do LEB, Sr. **Roque Zílio**, por toda experiência que me foi passada, por todo carinho, pelas piadas, risadas, conversas, pelo maravilhoso pão e café de toda manhã, és um orgulho para todos que convivem contigo!

Aos técnicos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) **Josencler e Thaís**, muito obrigada pela ajuda e por toda paciência que tiveram comigo.

A **Universidade Federal do Rio Grande (FURG)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECA)**, representados pelos **excelentes professores e funcionários**. Muito obrigada pela dedicação e profissionalismo em prol da educação e formação de cada um de seus alunos. Também agradeço pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudo.

Muito obrigada a todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO I

Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração nos ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro e 24 h claro e cultivo heterotrófico.....57

Tabela 2 - Concentração de Ácido 3-indolacético (AIA) durante os ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.59

Tabela 3 - Concentração de *trans*-zeatina (*t-Z*) durante os ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.61

Tabela 4 - Conteúdo de carboidratos (% m m⁻¹), proteínas (% m m⁻¹) e lipídios (% m m⁻¹) dos ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.....63

ARTIGO II

Tabela 1 - Conteúdo de Ácido 3-indolacético (AIA) (nmol g⁻¹) e *trans*-zeatina (*t-Z*) (nmol g⁻¹) de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 cultivada em diferentes condições.79

Tabela 2 - Conteúdos de carboidratos (% m m⁻¹), proteínas (% m m⁻¹), lipídios (% m m⁻¹) e lipídios neutros (µg 10⁻⁶ cél⁻¹) (média ± desvio padrão) de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 cultivada em diferentes condições.....80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 -Aplicações da biomassa de microalgas.....	26
Figura 2 - Micrografia de <i>Chlorella</i> sp.	27
Figura 3 - Micrografia de <i>Chlamydomonas</i> sp.....	28
Figura 4 -Micrografia de <i>Scenedesmus</i> sp.....	28
Figura 5 -Micrografia de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.	29
Figura 6 - Micrografia de <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115.....	30
Figura 7 -Esquema do processo de fotossíntese dividido em dois estágios, fase clara e fase escura. 31	
Figura 8 -Esquema exemplificando o princípio do ensaio ELISA para quantificação de promotores de crescimento vegetal.	38
Figura 9 - Estrutura química dos fitohormônios Ácido 3-indolacético e <i>trans</i> -zeatina.	39

CAPÍTULO III

ARTIGO I

Figura 1 - Curvas de crescimento das microalgas <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (♦), <i>C. fusca</i> LEB 111 (○), <i>C. vulgaris</i> LEB 112 (■), <i>S. nidulans</i> LEB 115 (□) e <i>S. obliquus</i> LEB 117 (▲) cultivadas no fotoperíodo 12 h claro/escuro (a), 24 h claro (b) e heterotrófico (c).	54
Figura 2 - pH durante o cultivo das microalgas <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (♦), <i>C. fusca</i> LEB 111 (○), <i>C. vulgaris</i> LEB 112 (■), <i>S. nidulans</i> LEB 115 (□) e <i>S. obliquus</i> LEB 117 (▲) cultivadas no fotoperíodo 12 h claro/escuro (a), 24 h claro (b) e heterotrófico (c).	55

ARTIGO II

Figura 1 - Perfil de crescimento de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC1021 cultivada nas condições 12 h claro/escuro (■), luz contínua (▲) e heterotrófico (●).....	78
Figura 2 -Perfil de proteínas em <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC1021 em diferentes tempos e condições de cultivo da microalga. P: padrão; 0: inóculo no 0 d; 1: 12 h claro/escuro no 6º d; 2: 12 h claro/escuro no 10º d; 3: 24 h claro no 6º d; 4: 24 h claro no 10º d; 5: heterotrófico no 6º d; 6: heterotrófico no 10º d. Pontos brancos indicam variação na expressão de proteínas.	83

APÊNDICES

Figura 1 - Curva padrão da microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111.....	109
Figura 2 - Curva padrão da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> LEB 112.	109
Figura 3 - Curva padrão da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117.	110
Figura 4 - Curva padrão da microalga <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115.	110
Figura 5 - Curva padrão da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	111
Figura 6 - Curva padrão da microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC1021.	111
Figura 7 - Disposição dos fotobiorreatores <i>Erlenmeyer</i> nos ensaios realizados com as microalgas <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, <i>Chlorella vulgaris</i> LEB 112, <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117, <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 em estufa termostatzada com fotoperíodo 12 h claro/escuro.	112
Figura 8 - Disposição dos fotobiorreatores <i>Erlenmeyer</i> nos ensaios realizados com as microalgas <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, <i>Chlorella vulgaris</i> LEB 112, <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117, <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 em estufa termostatzada com fotoperíodo 24 h claro.....	112
Figura 9 - Disposição dos fotobiorreatores <i>Erlenmeyer</i> nos ensaios realizados com as microalgas <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, <i>Chlorella vulgaris</i> LEB 112, <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117, <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 em estufa termostatzada em modo heterotrófico.	113

Figura 10 - Disposição dos fotobiorreatores <i>Erlenmeyer</i> em um dos ensaios realizados com a microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC1021.	113
Figura 11 - Curva padrão de ácido 3-indolacético.	114
Figura 12 - Curva padrão de <i>trans</i> -zeatina.	114
Figura 13 - Amostra de fitohormônios após a extração a partir da biomassa microalgal.	115
Figura 14 - Concentrações de ficocianina obtidas nos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com fotoperíodo 12 h claro/escuro e 24 h claro.	115

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
1INTRODUÇÃO	19
2OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
 CAPÍTULO II.....	 23
3REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 MICROALGAS.....	25
3.1.1 <i>Chlorella</i>	26
3.1.2 <i>Chlamydomonas</i>	27
3.1.3 <i>Scenedesmus</i>	28
3.1.4 <i>Spirulina</i>	29
3.1.5 <i>Synechococcus</i>	30
3.2 FOTOSSÍNTESE	30
3.3 CULTIVO DE MICROALGAS.....	31
3.3.1 Luz.....	32
3.3.2 Nutrientes.....	33
3.4 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL	34
3.4.1 Microalgas na agricultura	35
3.4.2 Promotores de crescimento vegetal	36
3.4.2.1 Auxinas e citocininas	38
 CAPÍTULO III	 41
4DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	43
 ARTIGO I: PRODUÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E <i>TRANS</i> -ZEATINA A PARTIR DE MICROALGAS	 45
1INTRODUÇÃO	49
2MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 SELEÇÃO DE MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	50
2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E PH DOS CULTIVOS.....	50
2.3 PRODUTIVIDADE MÁXIMA DE BIOMASSA	51
2.4 VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO.....	51
2.5 CONSUMO DE GLICOSE.....	51
2.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E <i>TRANS</i> -ZEATINA.....	51
2.7 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL.....	52
2.7.1 Concentração de carboidratos, proteínas e lipídios	52
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL E PH DOS CULTIVOS.....	53
3.2 CONTEÚDO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO NAS MICROALGAS	58
3.3 CONTEÚDO DE <i>TRANS</i> -ZEATINA NAS MICROALGAS.....	61

3.4 COMPOSIÇÃO DAS BIOMASSAS MICROALGAIS.....	63
4CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ARTIGO II: INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE FITOHORMÔNIOS ENDÓGENOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E <i>TRANS</i> -ZEATINA NO CULTIVO DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> CC1021	69
--	----

1INTRODUÇÃO	73
2MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	74
2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	74
2.2.1 Concentração de biomassa.....	74
2.2.2 Consumo de glicose.....	75
2.2.3 Extração e quantificação de fitohormônios.....	75
2.2.4 Concentração de lipídios neutros	76
2.2.5 Perfil de proteínas.....	76
2.3 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	76
2.3.1 Concentração de carboidratos, proteínas e lipídios	77
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL.....	77
3.2 CONTEÚDO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E <i>TRANS</i> -ZEATINA.....	78
3.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA.....	80
3.4 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS NEUTROS	82
3.5 PERFIL DE PROTEÍNAS.....	83
4CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

CAPÍTULO IV	91
5CONCLUSÃO GERAL	93
6SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95

CAPÍTULO V	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICES.....	109

CAPÍTULO I

RESUMO

A demanda por alimentos mais saudáveis, cultivados sem utilização de fertilizantes químicos e tratados sem pesticidas é cada vez maior. Ainda que os resíduos desses insumos agrícolas sintéticos encontrados nos alimentos não excedam os limites permitidos para consumo humano, não se tem conhecimento exato dos efeitos do acúmulo dessas substâncias no organismo. Neste contexto, microalgas podem representar potenciais alternativas para o melhoramento de cultivos agrícolas, pois possuem em sua composição compostos que atuam como promotores do desenvolvimento vegetal. Estes compostos, também chamados de fitohormônios, desempenham papel importante na mediação do crescimento e respostas ao estresse nas plantas. Entre os principais fitohormônios estudados, estão a auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z). Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a obtenção de promotores de crescimento vegetal a partir de microalgas. As cepas *Chlamydomonas reinhardtii* CC 1021, *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18 pertencentes a Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, foram cultivadas com o intuito de verificar quais se apresentam como potenciais produtoras de AIA e *t*-Z. Assim, foram realizados cultivos autotróficos com fotoperíodo 12 h claro/escuro e com luz contínua. Também foram realizados cultivos heterotróficos em modo batelada alimentada com adição de glicose. Os cultivos autotróficos foram realizados durante 15 dias em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume útil de 0,4 L, mantidos a 30 °C em estufa termostatzada, $70 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e agitação realizada com injeção de ar estéril. Os cultivos heterotróficos foram realizados durante 10 dias em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume útil de 0,4 L, mantidos a 30 °C em câmara incubadora, com agitação orbital de 100 rpm, sem a presença de luz e em modo batelada alimentada mantendo concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose nos meios de cultivo. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi cultivada em meio Tris Acetato Fosfato (TAP) durante 10 dias em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume útil de 0,4 L mantidos em câmara incubadora, com agitação orbital de 100 rpm a 25 °C e $70 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas condições autotróficas e heterotróficas citadas anteriormente. Como resultados, todas as microalgas cresceram e produziram AIA e *trans*-zeatina endógenos nas três condições avaliadas (autotrófico 12 h claro/escuro, autotrófico 24 h claro e heterotrófico). As concentrações de AIA variaram de 1,94 a 56,45 nmol g⁻¹. Enquanto que as concentrações de *t*-Z obtidas variaram de 0,06 a 35,52 pmol g⁻¹. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021, apresentou as maiores concentrações de AIA (20237,34 nmol g⁻¹) e *t*-Z (2593,89 nmol g⁻¹) com o cultivo heterotrófico, destacando-se entre as demais microalgas estudadas. Além disso, as condições de cultivo estudadas foram capazes de incrementar as concentrações de carboidratos e proteínas na biomassa das microalgas cultivadas. Logo, as condições de cultivo e a espécie microalgais utilizadas, apresentaram resultados promissores. Portanto, este estudo contribui com alternativas de minimização das consequências ambientais causadas pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

Palavras-chave: Auxinas. Citocininas. Fitohormônios. Fotoperíodo. Microalgas.

ABSTRACT

OBTAINMENT OF VEGETABLE GROWTH PROMOTERS BY MICROALGAE

The demand for healthier foods, obtained without chemical fertilizers and pesticides is increasing nowadays. Although the residues of these synthetic agricultural inputs found in foods do not exceed the limits allowed for human consumption, there is no exact knowledge about the accumulation effects of these substances in the healthy. In this context, microalgae may represent potential alternatives for the improvement of agricultural crops, since they have in their composition many compounds that can act as plant promoters. These compounds, also called phytohormones, and play an important role in mediating growth and stress responses in plants. Among the main phytohormones are the auxin 3-indoleacetic acid (AIA) and the cytokinin trans-zeatin (*t*-Z). Therefore, the present study aims to evaluate the obtainment of vegetable plant promoters by microalgae. The strains *Chlamydomonas reinhardtii* CC 1021, *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 and *Spirulina* sp. LEB 18 were cultivated with the purpose of verifying which microalga can be considered as producing potential of AIA and *t*-Z. Thus, were performed autotrophic cultivations with photoperiod 12 light/dark and continuous light. Heterotrophic cultivations were also performed with addition of glucose in fed batch. The autotrophic cultivations were performed for 15 days in Erlenmeyers photobioreactors (0.4 L), at 30 °C in a growth chamber, under 70 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of illuminance and aeration by sterile air injection. The heterotrophic cultivations were carried out for 10 days on Erlenmeyer type photobioreactors with a useful volume of 0.4 L, kept at 30° C in incubator chamber, with orbital agitation of 100 rpm, without the presence of light and in batch mode fed while maintaining concentration of 0.5 g L⁻¹ of glucose in culture media. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 was cultured in Tris Acetate Phosphate (TAP) medium for 10 days in Erlenmeyer photobioreactors (0.4 L), in incubator chamber with orbital shaking, at 100 rpm at 25 °C and 70 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at autotrophic and heterotrophic conditions mentioned above. As a result, all microalgae grew and produced AIA and *t*-Z endogenous in the three conditions evaluated (12 h light/dark, 24 h light and heterotrophic). The concentrations of AIA ranged from 1.94 to 56.45 nmol g⁻¹. While the obtained *t*-Z concentrations ranged from 0.06 to 35.52 pmol g⁻¹. The microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 had the highest concentration of AIA (20237,34 nmol g⁻¹) and *t*-Z (2593,89 nmol g⁻¹) with the heterotrophic cultivation, highlighting among other microalgae cultivated. In addition, the culture conditions studied were able to increase the carbohydrate and protein content in the microalgal biomass. The culture conditions and microalgal species evaluated showed promising results. Therefore, this study contributes with alternatives to minimize the environmental consequences caused by the use of synthetic chemical inputs in agriculture.

Keywords: Auxins. Cytokinins. Phytohormones. Photoperiod. Microalgae.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é considerada uma atividade essencial para a vida humana, portanto é imprescindível o estabelecimento de práticas agrícolas sustentáveis, que preservem o meio ambiente e proporcionem segurança alimentar (GOMIERO, 2017). Na agricultura, pesticidas e fertilizantes químicos são utilizados em grandes concentrações. Os pesticidas evitam perdas causadas por doenças e pragas nas plantações agrícolas, enquanto que os fertilizantes são aplicados em cultivos vegetais a fim de fornecer substâncias necessárias para o desenvolvimento e crescimento de vegetais (BALE; VAN LENTEREN; BIGLER, 2008).

Pesquisas apontaram que a população mundial irá aumentar 50% neste século, atingindo cerca de 11,2 bilhões até 2100 (UNITED NATIONS, 2015). Isso implica expansão do sistema agrícola moderno para atender às crescentes necessidades alimentares da população. No entanto, essa modernização da agricultura vem acarretando o aumento do uso de pesticidas e fertilizantes químicos. Ambos contêm elementos tóxicos contaminantes dos alimentos, solo e água, que podem causar diversas consequências ambientais, como redução da biodiversidade global (LANZ; DIETZ; SWANSON, 2018; STEHLE; SCHULS, 2015).

Devido a esses fatores, pesquisas na área agrícola visam desenvolver alternativas para minimizar essas consequências ambientais, como a produção de insumos agrícolas naturais. Os biofertilizantes são insumos agrícolas naturais que podem ser produzidos a partir de micro-organismos, como as microalgas (GOMIERO, 2017). Além de apresentarem biomassa rica em macro e micronutrientes, as microalgas produzem substâncias promotoras do crescimento vegetal, como auxinas e citocininas (LU; XU, 2015).

A aplicação da biomassa de microalgas na agricultura apresenta diversas vantagens, visto que estes micro-organismos podem ser cultivados apresentando maior produção de biomassa por área, produção sem regime de safras, coleta diária, além de não utilizar terras aráveis para serem cultivados (RICHMOND, 1986). Dessa forma, a adição de biomassa microalgal aos cultivos vegetais é alternativa sustentável, que pode contribuir para a minimização das consequências ambientais causadas pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

Dentre os principais promotores de crescimento vegetal, ou fitohormônios, como também são chamados estão a auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z), devido suas funções de promoverem o crescimento e desenvolvimento quando aplicados em cultivos vegetais (LU; XU, 2015; STIRK et al, 2013). Estudos visando a obtenção de

promotores de crescimento vegetal a partir de microalgas foram desenvolvidos com o objetivo de identificar quais gêneros são capazes de sintetizar estas substâncias. Stirk et al. (2013), verificaram a produção de diferentes tipos de auxinas e citocininas em 24 espécies de microalgas, entre estas a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* se destacou produzindo cerca de 9,2 pmol g⁻¹ de citocininas e aproximadamente 38 nmol g⁻¹ de auxinas em base seca. Ördög et al. (2004) avaliaram a produção endógena de citocininas por Chlorophytas, mostrando que os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* são capazes de sintetizar este fitohormônio. A produção de auxinas e citocininas também foi estudada em cianobactérias por Ahmed, Stal e Hasnain (2010), que verificaram a produção de AIA em *Spirulina platensis*. Stirk et al. (2002), estudaram a produção de auxinas e citocininas em cianobactérias dos gêneros *Calothrix* e *Phormidium*, mostrando que cianobactérias são capazes de sintetizar promotores de crescimento vegetal (STIRK et al., 2002). Entretanto, novos estudos são necessários a fim de otimizar a síntese de fitohormônios por microalgas e esclarecer as vias metabólicas de produção (LU; XU, 2015), pois se tem conhecimento destes aspectos em plantas superiores, mas poucos estudos com microalgas, mostrando a necessidade de trabalhos nesta linha de pesquisa.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizado na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, destaca-se por possuir estrutura dedicada ao estudo do cultivo de microalgas desde 1996. Em sua coleção de micro-organismos, encontram-se diversas cepas de microalgas com ambas estruturas (procarióticas e eucarióticas), como, por exemplo, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, entre outras, que possuem potencial para serem utilizadas na obtenção de promotores de crescimento vegetal.

Com isso, este estudo avaliou a obtenção de promotores de crescimento vegetal a partir de microalgas, visando a futura utilização da biomassa destas espécies como biofertilizantes agrícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar a obtenção de promotores de crescimento vegetal a partir de microalgas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se as microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021, *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 são capazes de produzir a auxina ácido 3-indolacético e a citocinina *trans*-zeatina;
- Avaliar nos cultivos das microalgas se a variação de fotoperíodo e cultivo em modo heterotrófico influenciam na produção de fitohormônios;
- Caracterizar as biomassas microalgais quanto ao conteúdo de carboidratos, proteínas e lipídios, a fim de verificar a relação entre fitohormônios e macromoléculas.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROALGAS

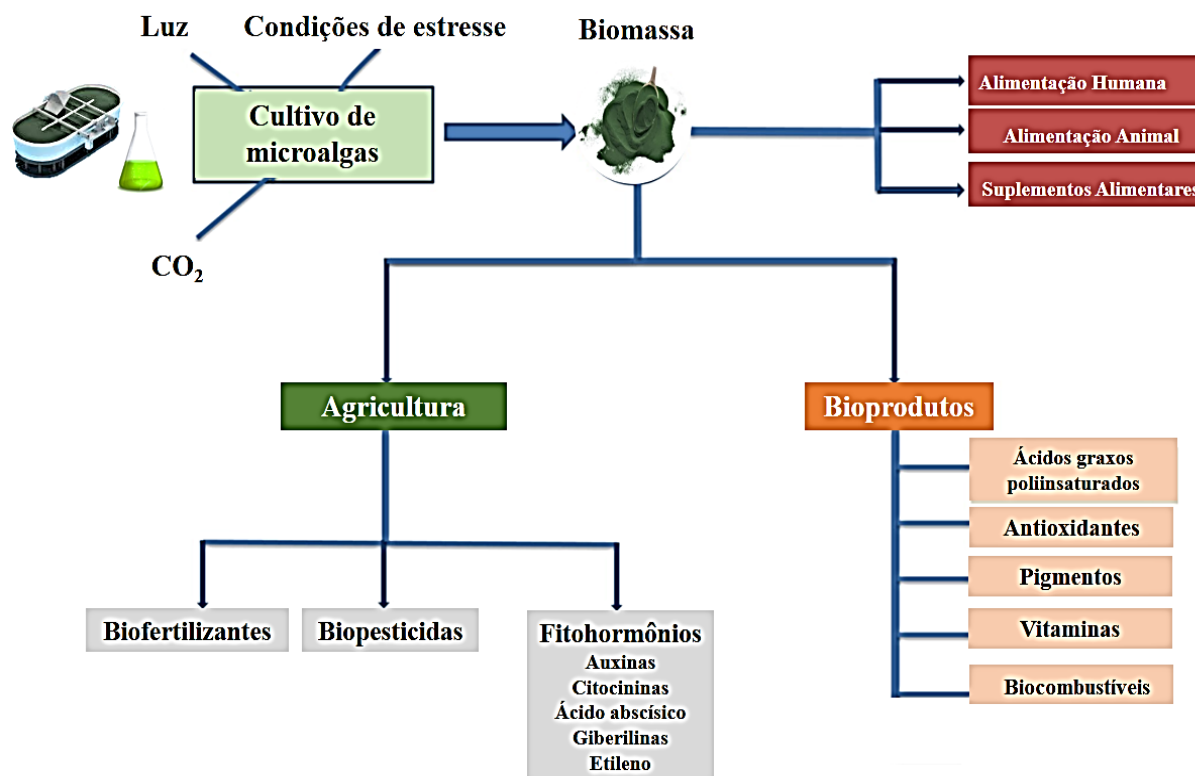
Microalgas são micro-organismos que vivem em meio aquático e podem apresentar dois tipos de estrutura: procariótica ou eucariótica (DERNER et al., 2006; VONSHAK, 1997). As divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta correspondem às microalgas com estrutura procariótica. As divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta correspondem às microalgas eucarióticas (DERNER et al., 2006).

As microalgas são amplamente aplicadas como suplementos alimentares, em que a biomassa ou seu extrato é incorporada na alimentação humana (LUCAS et al., 2018; KHAN; SHIN; KIM, 2018). Entretanto, diversos estudos utilizam a biomassa microalgal em outras aplicações de interesse comercial como: alimentação animal (MADEIRA et al., 2017; SMETANA et al., 2017), para extração de pigmentos e vitaminas (HU et al., 2018; PRATES et al., 2018), produção de compostos antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórios e antimicrobianos (SATHASIVAM et al., 2017), produção de biocombustíveis (FARIED et al., 2017; ISLAM; HEIMANN; BROWN, 2017) e na mitigação dos gases do efeito estufa (CARDIAS; MORAIS; COSTA, 2018; DUARTE et al., 2017). A Figura 1 mostra algumas das diversas aplicações da biomassa de microalgas.

Além das aplicações relatadas, as microalgas são capazes de produzir substâncias com potencial aplicação como biofertilizantes. Pesquisas têm demonstrado que a utilização de extratos microalgais em cultivos vegetais, resulta em maior absorção de nutrientes pelas plantas, maior acúmulo de biomassa vegetal e maior rendimento de plantas. Microalgas possuem a capacidade de produzir substâncias que auxiliam no crescimento das plantas, como auxinas e citocininas, além de compostos que podem melhorar a estrutura do solo como vitaminas, aminoácidos, substâncias antibacterianas e antifúngicas (GARCIA-GONZALES; SOMMERFELD, 2016).

Em comparação ao cultivo de vegetais, microalgas se destacam por apresentar várias vantagens quando cultivadas para obtenção de promotores de crescimento vegetal. Microalgas demonstram maior eficiência fotossintética, rápido crescimento, maior produção de biomassa por área, produção sem regime de safras, coleta diária, cultivos em condições climáticas ambientais, além de não utilizar terras aráveis para serem cultivadas (DARCY-VRILLON, 1993; RICHMOND, 1986).

Figura 1 -Aplicações da biomassa de microalgas.



Fonte: Adaptado de KHAN; SHIN; KIM (2018)

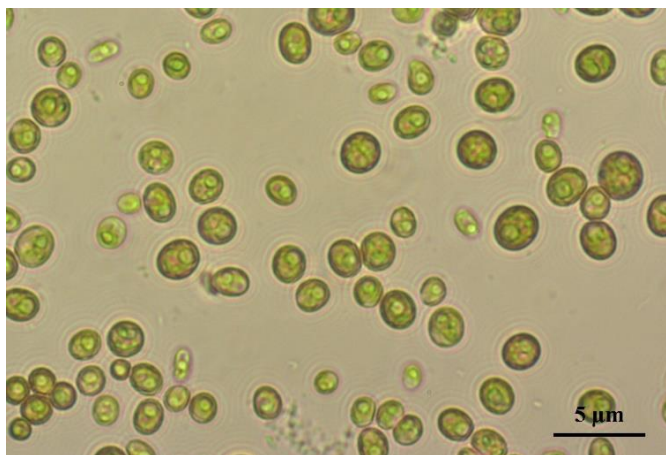
3.1.1 *Chlorella*

Microalgas do gênero *Chlorella* (Figura 2) possuem estrutura celular eucariótica unicelular esférica, microscópica, e com diâmetro varia de 5-10 µm, encontram-se na divisão Chlorophyta e ordem Chlorococcales (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001). Possuem em média 53 % de proteínas, 23 % de carboidratos, 9 % de lipídeos e 5 % de minerais em seu peso seco, o que leva este gênero a ser muito aplicado em alimentação humana. Uma característica importante das microalgas deste gênero é que possuem o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde (LOURENÇO, 2006).

Estudos relataram que várias espécies de *Chlorella* possuem em sua composição auxinas e citocininas que podem ser utilizadas como promotores de crescimento vegetal (LU; XU, 2015; STIRK et al., 2002, 2013). Stirk et al. (2014) testaram o efeito da luz, escuro contínuo e condição heterotrófica na produção de fitohormônios endógenos em *Chlorella minutíssima* MACC 360, obtendo como resultados o aumento das concentrações de auxinas e citocininas presentes na biomassa desta microalga em fotoperíodo 14 h claro/10 h escuro

(3,7 pg mg⁻¹ e 67,8 pg mg⁻¹, de *t*-Z e AIA, respectivamente) e em cultivo heterotrófico (3,9 pg mg⁻¹ e 649,4 pg mg⁻¹, de *t*-Z e AIA, respectivamente), porém na condição de escuro contínuo não ocorreu aumento nas concentrações destes fitohormônios.

Figura 2 - Micrografia de *Chlorella* sp.



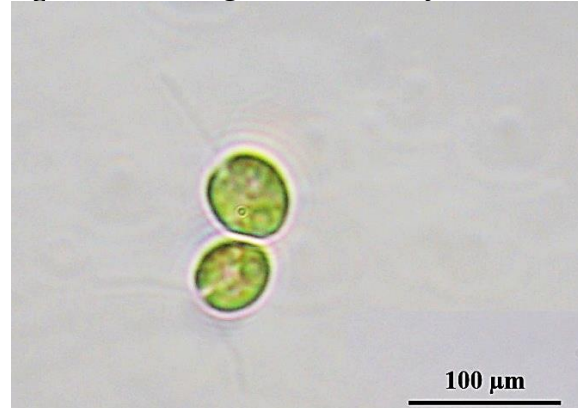
Fonte: Laboratório de Engenharia bioquímica-LEB-FURG.

3.1.2 *Chlamydomonas*

Microalgas do gênero *Chlamydomonas* (Figura 3) podem apresentar estrutura celular com flagelos na região anterior (com funções de mobilidade e reprodução) e um número variável de mitocôndrias. *Chlamydomonas reinhardtii* é considerado um organismo modelo fotossintético para estudos metabólicos, pois possui todo genoma disponível, sendo assim a espécie de *Chlamydomonas* que mais se destaca. Trata-se de uma alga verde eucariótica e unicelular, com um único cloroplasto, onde se encontra todo o aparelho fotossintético (MERCHANT et al., 2012).

Além disso, estudos evidenciam a utilização de várias espécies de *Chlamydomonas* como produtora de auxinas e citocininas, sendo que a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta as maiores concentrações desses fitohormônios em comparação à outras espécies de seu gênero (STIRK et al. 2002, 2013, ŽIŽKOVÁ et al. 2017). Stirk et al. (2013) obtiveram 19,1 pmol g⁻¹ da citocinina *trans*-zeatina e aproximadamente 40 nmol g⁻¹ da auxina ácido indolacético em *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada em meio Bristol, com temperatura de 25 °C, fotoperíodo 14 h claro/10 h escuro, intensidade luminosa 130 µmol_{fótons} m⁻² s⁻¹, mostrando a capacidade desta microalga em produzir fitohormônios.

Figura 3 - Micrografia de *Chlamydomonas* sp.



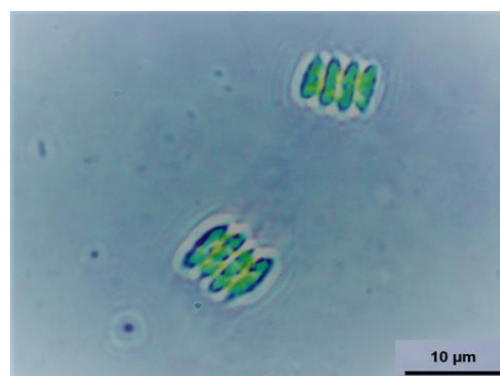
Fonte: Laboratório de Engenharia bioquímica-LEB-FURG.

3.1.3 *Scenedesmus*

As microalgas do gênero *Scenedesmus* (Figura 4) são Chlorophytas, unicelulares e uninucleadas, pertencem à família *Scenedesmaceae*. Estas microalgas possuem forma elipsoidal, formam colônias planas pela união de 5 - 6 células (LOURENÇO, 2006).

Em relação a presença de fitohormônios para este gênero, auxinas e citocininas foram identificadas por Žižková et al. (2017) em *Scenedesmus obliquus*, obtendo como resultados 0,048 nmol g⁻¹ de AIA e 3 pmol.mg⁻¹ de *t*-Z. Auxinas foram identificadas por Lu e Xu (2015) em *Scenedesmus armatus* com objetivo de demonstrar os papéis desses fitorhormônios no crescimento e divisão celular dessa microalga. Outros estudos relataram que espécies do gênero *Scenedesmus* são produtoras de citocininas, com concentrações de citocininas variando de 0,018 a 6,5 nmol g⁻¹ (ÖRDÖG et al. 2004; STIRK et al., 2002, 2013; ŽIŽKOVÁ et al. 2017).

Figura 4 -Micrografia de *Scenedesmus* sp.



Fonte: Laboratório de Engenharia bioquímica-LEB-FURG.

3.1.4 *Spirulina*

Spirulina (Figura 5) é uma cianobactéria pertencente ao grupo das Cyanophytas. Essa microalga possui estrutura procariótica, filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, e se dispõe na forma espiralada (VONSHAK, 1997). Além de água, requer dióxido de carbono, energia luminosa e nutrientes inorgânicos para seu crescimento (RADMER; PARKER, 1994).

Figura 5 -Micrografia de *Spirulina* sp. LEB 18.



Fonte: Laboratório de Engenharia bioquímica-LEB-FURG.

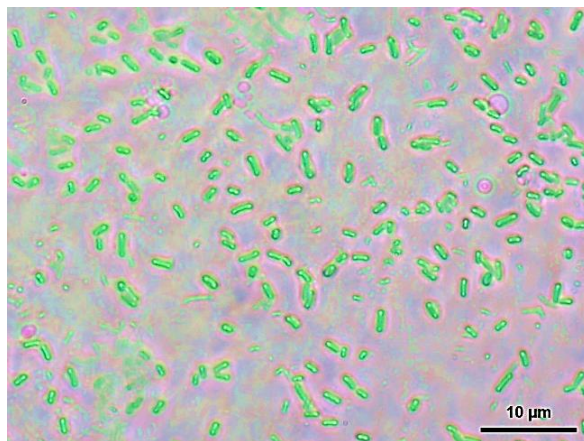
A biomassa da microalga *Spirulina* pode ser utilizada em diversas aplicações, destacando-se na aplicação em alimentos, principalmente por seu valor nutricional, elevada produtividade em biomassa e facilidade de cultivo (DARCY-VRILLON, 1993; TREDICI et al., 2009). Possui certificado GRAS emitido pelo FDA, podendo ser adicionada em produtos para consumo humano (LOURENÇO, 2006).

Desde 1981, a microalga *Spirulina* é utilizada em substituição a fertilizantes químicos e reconstrução de solos (FAO, 1981). *Spirulina platensis* foi utilizada por Wuang et al. (2016) a fim de avaliar a capacidade desta microalga como fertilizante no crescimento de rúcula (*Eruca sativa*), a aplicação da biomassa de *Spirulina* no solo, resultou em aumento de 71,8% na altura da planta em comparação às plantas cultivadas com fertilizante químico, além da melhora em outros parâmetros de crescimento destas plantas. Em relação a produção de auxinas e citocininas por *Spirulina*, um estudo de Ahmed et al. (2010), avaliou a produção de ácido indolacético por *Spirulina platensis* obtendo até 211,67 µg mL⁻¹, entretanto a microalga foi cultivada com a adição de um precursor desta substância, o L-triptofano, o que acarretou em incremento na concentração de ácido indolacético. Em relação a produção de citocininas, não foram encontrados estudos de identificação destas substâncias na microalga *Spirulina*.

3.1.5 *Synechococcus*

A microalga *Synechococcus* (Figura 6) é uma cianobactéria presente principalmente em oceanos, pertencente à classe Coccogoneae. O gênero *Synechococcus* é caracterizado por ser procariótico, cocóide e unicelular, com tamanho variando de 0,8 a 1,5 μm (MARGULIS; SCHWARTZ, 2001). Este gênero é estudado na literatura para extração de carotenoides (SANCHEZ et al., 2007), produção de bioetanol (CHOW et al., 2015), mitigação biológica de CO_2 (DUARTE; COSTA, 2017, RADMANN, 2011), entre outras aplicações. Ainda não foram realizados estudos que avaliem a produção de auxinas e citocininas em microalgas do gênero *Synechococcus*, mostrando a importância da utilização desta microalga neste estudo.

Figura 6 - Micrografia de *Synechococcus nidulans* LEB 115.

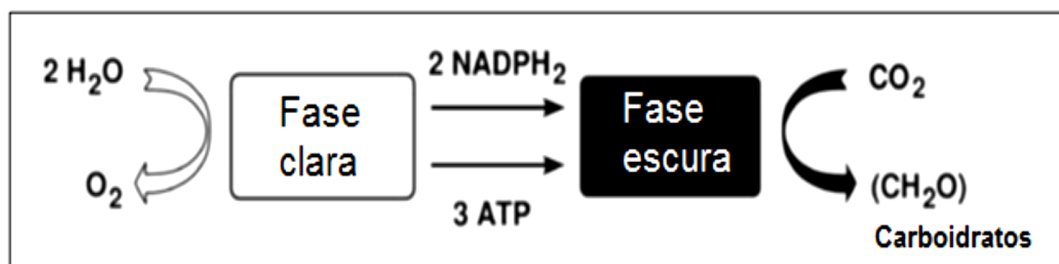


Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica-LEB-FURG.

3.2 FOTOSSÍNTESE

A fotossíntese é um processo de conversão da luz solar em energia, na qual compostos inorgânicos e energia da luz são convertidos em matéria orgânica por organismos fotoautotróficos. Este processo é dividido em duas fases (Figura 7), a fase clara, que acontece nas membranas fotossintéticas, onde energia da luz é convertida em energia química, proporcionando um redutor bioquímico, NADPH_2 e um composto de alta energia, ATP. Enquanto a fase escura, acontece no estroma, onde os produtos ricos em energia, obtidos na fase clara (NADPH_2 e ATP) são utilizados na redução sequencial bioquímica de dióxido de carbono a carboidratos como, por exemplo, glicose (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK, 2013).

Figura 7 -Esquema do processo de fotossíntese dividido em dois estágios, fase clara e fase escura.



Fonte: MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍZEK (2013).

As microalgas possuem um mecanismo fotossintético muito similar ao dos vegetais superiores, convertendo água e CO_2 em biomassa e O_2 . Em geral, as microalgas convertem a energia solar mais eficientemente, pois possuem estrutura celular simples. A água, o CO_2 e outros nutrientes ficam facilmente disponíveis devido ao fato dos micro-organismos crescerem suspensos em meio líquido (LOURENÇO, 2006).

3.3 CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas pode ser realizado de três maneiras distintas: autotrófico (fotoautotrófico), heterotrófico e mixotrófico (CHEN et al., 2011). No cultivo autotrófico as microalgas crescem utilizando luz e dióxido de carbono como fonte de carbono e energia. Enquanto que nos cultivos em modo heterotrófico as microalgas usam compostos orgânicos como energia e fonte de carbono. Enquanto que os cultivos mixotróficos utilizam simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO_2 e substrato orgânico como fontes de carbono (DERNER, 2006).

Por meio de variações nas condições de cultivo, a composição bioquímica de microalgas pode ser alterada e, com isso, pode-se otimizar os cultivos para produção de compostos de interesse comercial (PRAVEENKUMAR et al., 2012). Quando as microalgas são submetidas a condição de estresse, como por exemplo a redução de algum nutriente do meio de cultivo, são estimuladas a produzir maior concentração de determinada substância (MORAIS, 2006). Sob condições ótimas de crescimento, as células microalgais irão sintetizar proteínas que serão utilizadas para o crescimento. No entanto, a velocidade de crescimento é reduzida por fatores limitantes como nutrientes, temperatura e iluminância, podendo ocasionar maior produção de lipídios, carboidratos e outros metabólitos (SUKENIK, 1999).

O crescimento microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas de cada espécie cultivada. Enquanto que os fatores físicos e químicos que afetam o cultivo são principalmente a temperatura, intensidade luminosa, nutrientes (CHEN; CHEN, 2006), pH, agitação (CHEN; CHEN, 2006; MIAO; WU, 2004) e biorreatores (SONG et al., 2008).

Dentre os trabalhos que modificaram condições de cultivo a fim de otimizar a produção de biocompostos, destaca-se o estudo de Stirk et al. (2014), estes testaram cultivos de *Chlorella minutíssima* com modificações no fotoperíodo e cultivos heterotróficos, mostrando que a luz é capaz de afetar no crescimento e alterar as concentrações endógenas de promotores de crescimento vegetal. Como resultados, as concentrações endógenas de auxinas e citocininas aumentaram com o tempo nos cultivos com luz/escuro e no cultivo heterotrófico utilizando glicose como fonte de carbono, mas não aumentaram nos cultivos com escuro contínuo sem adição de fonte de carbono. A maior concentração de AIA foi obtida nos cultivos heterotróficos ($649,4 \text{ pg mg}^{-1}$), enquanto que nos cultivos com luz/escuro foram obtidas as maiores concentrações de citocininas ($795,9 \text{ pg mg}^{-1}$). Este estudo foi um dos principais motivos para a escolha das condições a serem testadas neste trabalho, visto que os autores evidenciam que a luz é capaz de influenciar as concentrações de AIA e *t-Z*.

3.3.1 Luz

A luz é essencial para o desenvolvimento das microalgas. A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, influenciando a produção de biomassa e a taxa de crescimento das culturas microalgais (DERNER, 2006). A exposição de cultivos a elevadas intensidades luminosas é responsável por dois fenômenos prejudiciais ao cultivo: a foto-oxidação e a fotoinibição. O primeiro pode causar efeitos letais para as células, podendo levar à perda total da cultura. Enquanto que fotoinibição pode acarretar decréscimo no crescimento, o qual também pode ocorrer sob intensidade luminosa moderada, caso a taxa fotossintética esteja limitada por alguns fatores estressantes, como a utilização de baixas temperaturas (JENSEN; KNUTSEN, 1993).

Em relação a influência da luz em fitohormônios, sabe-se que a luz é um dos fatores ambientais mais importantes. Nas plantas a exposição a luz regula os processos de desenvolvimento. As plantas rastreiam o status de luz ambiente, transduzem os sinais para o núcleo e direcionam as mudanças de expressão gênica para induzir respostas a luz. Por não apresentarem sistema nervoso, as plantas são capazes de sintetizar fitohormônios que agem

como mensageiros químicos internos para comunicação multicelular e coordenam o crescimento e desenvolvimento das plantas em adaptação a várias condições ambientais. Além disso, as vias de sinalização de luz e fitohormônio parecem estar integradas no nível dos fotorreceptores, fornecendo uma nova estrutura molecular para como as plantas transduzem informações de luz externa para direcionar respostas hormonais internas (LUO; SHI, 2018).

A influência da luz na síntese de fitohormônios por microalgas ainda é pouco explorada, entretanto alguns aspectos foram investigados no estudo de Stirk et al. (2014), em que os autores realizaram cultivos de *Chlorella minutissima* com modificações no fotoperíodo e cultivos heterotróficos, mostrando que a luz é capaz de afetar no crescimento e alterar as concentrações endógenas de promotores de crescimento vegetal. A auxina ácido 3-indolacético é a mais biologicamente ativa e sua atividade fisiológica relacionada à promoção da divisão e alongamento celular muitas vezes se dá em resposta à luz, como demonstrado nos primeiros experimentos de fototropismo de Charles Darwin com coleóptilos. No estudo de Stirk et al. (2014), as concentrações de auxina em *C. minutissima* foram afetadas pela luz. As concentrações de auxina aumentaram ao longo do tempo nas culturas com luz/escuro em comparação as com escuro contínuo.

Anteriormente, em cultivo de *Chlorella minutissima* sincronizada (MACC 361) e *Chlorella* sp. (MACC 458) cultivadas em condições luz/escuro, as concentrações de citocininas aumentaram gradualmente durante os cultivos, enquanto os cultivos realizados em escuro contínuo tiveram pouca divisão celular, não ocorreu aumento no tamanho celular e conteúdo de DNA, além disso, as concentrações de citocinina permaneceram constantes e baixas (STIRK et al., 2011). Estes estudos mostraram que existe influência da luz na concentração de fitohormônios. Dessa forma, a luz é um dos principais parâmetros a ser estudado no cultivo de microalgas e também para síntese de fitohormônios.

3.3.2 Nutrientes

Para produção de biomassa com determinadas características desejadas, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental, o que pode afetar a taxa de crescimento e produtividade de biomassa. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que a microalga adapte seu metabolismo às novas condições. Em geral, as modificações no meio mudam a composição bioquímica da biomassa, principalmente a composição de proteínas, lipídios e pigmentos. Os nutrientes necessários para o cultivo microalgal se dividem em

macronutrientes (C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si e Fe) e micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Mo, V, B, Co, Ca, Na, Se e Ni) (LOURENÇO, 2006).

O carbono é considerado o macronutriente mais importante nos cultivos de microalgas, constituindo cerca de 50 % da biomassa, e por isso pode atuar como fator limitante no crescimento microalgal. Além disso, a elevada demanda deste macronutriente é explicada pelo fato do mesmo estar presente em todas as substâncias que a célula microalgal sintetiza (LOURENÇO, 2006). Outra importância da fonte de carbono nos cultivos de microalgas é a prevenção da perda de biomassa e a ativação do crescimento celular contínuo durante o fotoperíodo escuro. Durante este fotoperíodo, a concentração celular dos micro-organismos fotossintéticos diminui sendo reestabelecida na subsequente fase de crescimento autotrófico, logo a adição de uma fonte de carbono orgânico, diminui problemas gerados pela ausência de luz (OGBONNA; TANAKA, 1998). Sob condições heterotróficas e mixotróficas, algumas espécies de microalgas podem metabolizar uma variedade de fontes de carbono, como glicose e ácido acético e ainda, compostos presentes em resíduos industriais (KUMAR et al., 2010).

Além disso, nas condições de cultivo citadas, o processo pode ser realizado com a adição destes nutrientes ao longo do cultivo. Isso pode evitar uma saturação do nutriente no meio, que poderia causar uma inibição do crescimento por excesso de nutrientes e consequentemente, uma menor formação de produto. Este sistema de cultivo é chamado de descontínuo alimentado, em que um ou mais nutrientes são fornecidos ao biorreator durante o processo. Este modo de cultivo permite que a concentração de um ou mais dos nutrientes no meio possa ser manipulada externamente, alterando a taxa de alimentação durante a fermentação de acordo com a concentração desejada (SCHMIDELL et al., 2001).

3.4 AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

As consequências causadas pelas atividades agrícolas incluem o esgotamento da fertilidade e erosão do solo, além do amplo uso de agroquímicos nocivos, como fertilizantes químicos e pesticidas, que contaminam os alimentos, o solo e a água (STEHLER; SCHULS, 2015). Dessa forma, é crescente o interesse em pesquisas que visam diminuir ou evitar o uso de insumos agrícolas sintéticos, a fim de garantir maior conservação ambiental, produzindo alimentos sem contaminação por metais pesados e com maior valor biológico (GOMIERO, 2017). Sistemas agroecológicos utilizam insumos naturais que fornecem nutrientes essenciais às plantas (SCHERER et al., 2003). Os biofertilizantes são insumos naturais, que conforme Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura contêm componentes ativos ou agentes

biológicos, que melhoram o desempenho do sistema de produção e são isentos de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos (BRASIL, 2007). De acordo com Bezerra et al. (2007), os biofertilizantes estimulam o crescimento das raízes e o desenvolvimento das plantas, funcionando como promotores do crescimento vegetal.

3.4.1 Microalgas na agricultura

Dentre os micro-organismos que podem ser utilizados como biofertilizantes destacam-se as microalgas, que são consideradas como modelo de organismo fotossintético pois possuem promotores de crescimento de plantas. Biofertilizantes devem propiciar os nutrientes necessários para o estímulo do crescimento de culturas agrícolas. As microalgas produzem biomassa rica em carbono, nitrogênio e fósforo, além de substâncias como auxinas e citocininas, que são responsáveis pela regulação e estímulo do crescimento de plantas (LEM; GLICK, 1985). Além dessas vantagens, o uso de microalgas na agricultura orgânica se justifica por outras vantagens como: fonte segura de nitrogênio; não causam poluição da água e do solo (MANJUNATH et al., 2016); não causam efeitos tóxicos nas plantas nem nos consumidores finais (LOURENÇO, 2006); apresentam a capacidade de sintetizar metabólitos com ação biopesticida (COSTA et al., 2019), atuam na recuperação de solos, no tratamento de águas residuais agrícolas e na remoção de metais pesados do solo (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012).

As microalgas vêm sendo estudadas por apresentarem resultados satisfatórios quando aplicadas a cultivos vegetais. Isto porque são capazes de atuar no crescimento e desenvolvimento destes, como foi relatado por Gemim (2016) ao realizar a aplicação de suspensões da biomassa liofilizada da microalga *Scenedesmus subspicatus* como biofertilizante em cultivos orgânicos de tomates. Como resultados, a suspensão da biomassa microalgal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 g L⁻¹ promoveu alterações no número de frutos, calibre dos frutos, incremento na produção, expansão foliar e aumento na concentração de aminoácido livres nas folhas, apresentando efeito biofertilizante no cultivo do tomateiro em sistema orgânico.

Faheed e Fattah (2008), avaliaram o efeito da biomassa fresca e seca de *Chlorella vulgaris* como biofertilizantes em mudas de alface, como resultados, a aplicação da biomassa fresca e seca aumentou os parâmetros de crescimento e conteúdo de pigmentos, em comparação com as plantas não fertilizadas. Os melhores resultados foram obtidos nos experimentos com aplicação de 2 e 3 g_{biomassa seca} kg⁻¹_{solo}, nos quais foi verificado aumento 3 vezes de massa da

planta, aproximadamente em relação ao controle. Wuang et al. (2016), avaliaram a capacidade de *Spirulina* como biofertilizante no crescimento de rúcula (*Eruca sativa*), em que foi aplicada a biomassa desta microalga obtida a partir de cultivo para tratamento de água residual. As plantas de rúcula cultivadas em solo enriquecido com 5 g de *Spirulina* apresentaram aumento de altura, do teor de clorofila, da massa fresca e seca em relação ao controle.

Em relação a aplicação de fitohormônios de microalgas na agricultura ainda não foram desenvolvidos produtos regulamentados, entretanto existe um produto à base de algas regulamentado pela Instrução Normativa nº 2, de 12 de julho de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece especificações de referência de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. Dentre estes produtos, destaca-se o Regulador de Crescimento à base de *Ecklonia maxima*, desenvolvido a partir do extrato aquoso da matéria fresca da alga contendo 9,63 a 11,77 mg de auxinas naturais / kg do produto formulado, em que o princípio ativo são auxinas naturais com efeito equivalente ao ácido 4-índol-3ilbutírico. Este produto apresenta Eficiência agrônômica comprovada para as culturas do algodão, milho e soja (MAPA, 2013).

3.4.2 Promotores de crescimento vegetal

O crescimento e desenvolvimento das plantas são regulados por uma série de hormônios vegetais, cuja biossíntese e degradação se produzem em resposta a uma complexa interação de fatores fisiológicos, metabólicos e ambientais (FACHINELLO; NACHTIGAL; KERSTEN, 2007). Segundo Weaver (1976) promotores de crescimento vegetal ou fitohormônios são substâncias naturais ou sintéticas que, em pequenas concentrações, são capazes de alterar qualquer processo fisiológico das plantas, como, por exemplo, a emissão de raízes, alongação de caules, abscisão de folhas e frutos, maturação de frutos, entre outros.

O uso de substâncias capazes de promover o crescimento vegetal produzidas sinteticamente, conhecidas por fertilizantes químicos, causam efeitos prejudiciais ao meio ambiente e riscos à saúde da população. Entretanto, as vantagens do uso de fertilizantes químicos incluem baixo custo de produção, melhoramentos nos cultivos vegetais e maiores rendimentos dos mesmos. Devido a isso, estes produtos ainda são amplamente utilizados em sistemas agrícolas de produção, mas ainda assim, devido as consequências causadas pelos mesmos, a substituição dos mesmos por agentes biológicos tem sido exigida tanto pela população, quanto por órgãos regulamentadores (SHAABAN et al., 2010).

Pesquisas sobre a utilização de substâncias reguladoras do crescimento na agricultura são realizadas mundialmente, com as mais variadas finalidades, de modo que cada vez mais são descobertos mecanismos de controle hormonal do crescimento e desenvolvimento vegetal (BARRAGÁN-OCAÑA; VALLE-RIVERA, 2016; BORDOLOI; BARUAH; THAKUR, 2018). Os fitohormônios ou hormônios vegetais são classificados em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (HARTMANN et al., 1997). Porém, os mais estudados por suas funções em vegetais são as auxinas e citocininas (WOODWARD; BARTEL, 2005).

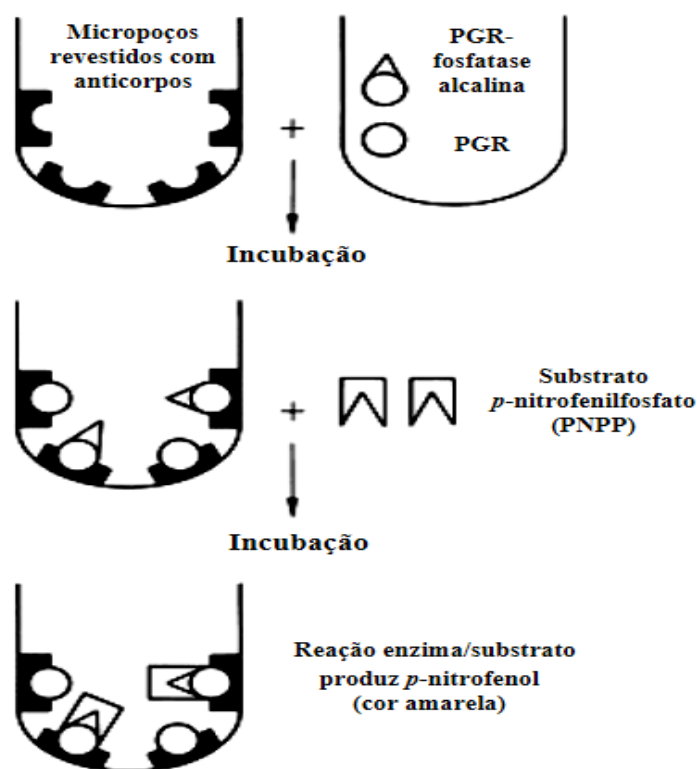
As vias de biossíntese de fitohormônios em plantas superiores são suficientemente estudadas e conhecidas, porém as características específicas do metabolismo hormonal em diferentes grupos de microalgas permanecem em grande parte desconhecidas e não sistematizadas. Mesmo com os estudos sobre o metabolismo de produção de hormônios em microalgas ainda fragmentado, acredita-se que os sistemas de produção de hormônios vegetais em plantas superiores tenham evoluído a partir de sistemas metabólicos primários pré-existent em microalgas (KISELEVA; TARACHOVSKAYA, 2012; LU; XU, 2015).

Em relação a quantificação de fitohormônios em microalgas, são comumente utilizadas técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto foram desenvolvidos ensaios rápidos que podem ser usados sem padronização interna sofisticada para detectar hormônios vegetais específicos em inúmeras cepas microalgais e identificar cepas que produzem altos níveis dos fitohormônios (JIRÁSKOVÁ et al., 2009). Estes ensaios são chamados de ELISAs direto, em que são utilizados kits de detecção de imunoensaio de reguladores de crescimento de plantas.

A Figura 8 exemplifica o princípio do ensaio ELISA para quantificação de promotores de crescimento vegetal (PGR). Este método de determinação utiliza o princípio da ligação competitiva para medir a concentração de fitohormônio nos extratos microalgais. Os anticorpos específicos do fitohormônio a ser quantificado são adicionados aos poços de reação. A amostra de extrato, contendo uma quantidade desconhecida de fitohormônio, é misturada no poço de reação com uma quantidade conhecida de um marcador (PGR-fosfatase alcalina) para reagir com um número limitado de anticorpos nos poços de reação. Durante a incubação, o fitohormônio na amostra compete com o marcador pelos sítios de ligação contendo os anticorpos. O marcador não ligado é lavado dos poços de reação e após é realizada a adição do substrato (p-nitrofenilfosfato - PNPP), que reage com o marcador ligado ao anticorpo. Como resultado da ligação enzimática, ocorrerá a produção de um produto de cor amarela (p-nitrofenol), que é inversamente proporcional a concentração de fitohormônio na amostra. A

absorbância da amostra é medida em 405 nm e é relacionada com a concentração de fitohormônios presente na amostra por meio de uma curva padrão específica para cada fitohormônio a ser quantificado (AGRISERA, 2018).

Figura 8 -Esquema exemplificando o princípio do ensaio ELISA para quantificação de promotores de crescimento vegetal.



Fonte: Adaptado de SIGMA-ALDRICH (2019)

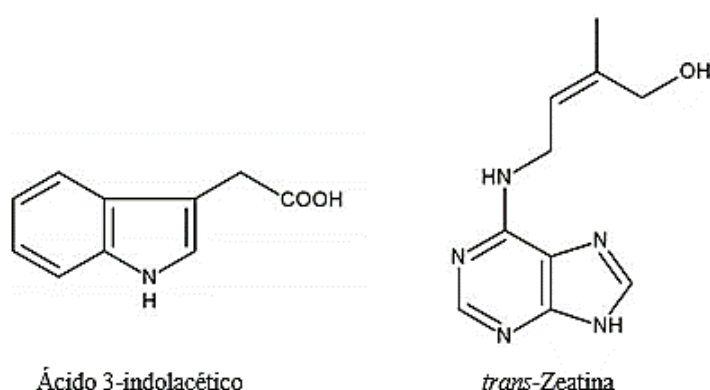
3.4.2.1 Auxinas e citocininas

As auxinas e as citocininas são essenciais para o crescimento vegetal, essas substâncias estão envolvidas no funcionamento de quase todos os aspectos de crescimento e desenvolvimento vegetal (WOODWARD; BARTEL, 2005). As auxinas compreendem substâncias que têm em comum a capacidade de promover crescimento e divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991). Dentre as diversas substâncias que pertencem a este grupo, destacam-se: o ácido 3-indolacético (AIA), o ácido indolbutírico (AIB), o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Essas substâncias são relacionadas com o ácido indolacético (AIA), a principal auxina sintetizada por vegetais e a ser identificada (FACHINELLO; NACHTIGAL; KERSTEN, 2007).

As citocininas formam o grupo dos fitohormônios vegetais responsáveis pela divisão e diferenciação celular, além de participar do controle do desenvolvimento e senescência dos vegetais, na germinação de sementes de algumas espécies, na maturação dos cloroplastos, entre outros (HARTMANN et al., 1997). A citocinina de maior ocorrência natural em vegetais é a zeatina. A maioria das citocininas utilizadas comercialmente são sintéticas, sendo que as principais são a benziladenina (BA) e a tetrahidropiranylbenziladenina (PBA) (FACHINELLO; NACHTIGAL; KERSTEN, 2007). Além de serem sintetizadas por organismos vegetais, as auxinas e citocininas são produzidas sinteticamente por processos químicos ou naturalmente por bactérias (RUSSO et al., 2008), fungos (KARABAGHLI-DEGRON et al., 1998) e microalgas (GRZESIK; ROMANOWSKA-DUDA, 2014; LU; XU, 2015; ÖRDÖG et al., 2004; STIRK et al., 2002, 2013; ŽIŽKOVÁ et al. 2017).

Devido suas funções comprovadas em cultivos vegetais, e a capacidade das microalgas de produção, optou-se por estudar neste trabalho a auxina ácido 3-indolacético e a citocinina *trans*-zeatina. A Figura 9 mostra a estrutura de ambos fitohormônios estudados. Embora as vias metabólicas de produção de fitohormônios por microalgas ainda não estejam estabelecidas de forma definitiva, a identificação destes compostos na biomassa destes microorganismos tem aumentado o número de estudos que buscam estabelecer as vias de síntese destes fitohormônios.

Figura 9 - Estrutura química dos fitohormônios Ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina.



Fonte: BAJGUZ; PIOTROWSKA (2009).

Com relação a biossíntese de auxinas a principal via de produção considerada é a síntese dependente de triptofano. Além desta, são propostas quatro vias individuais para biossíntese de AIA, sendo cada uma denominada de acordo com o radical abaixo do triptofano,

sendo as vias: indol-3-acetaldoxima (IAOx), indol-3-acetamida (IAM), triptamina e indol-3-ácido pirúvico (IPyA) (ŽIŽKOVÁ et al. 2017).

As citocininas de ocorrência natural são derivadas de adenina, classificadas como isoprenoides ou aromáticas em função da configuração da cadeia lateral ligada ao N⁶. As citocininas isoprenoides são aquelas que apresentam uma cadeia lateral reta de isopreno e são divididas em grupos isopenteniladenina (iP), *trans*-zeatina (*t*-Z), *cis*-zeatina (*c*-Z) e di-hidrozeatina (DZ) enquanto as citocininas aromáticas com estrutura de anel isoprenóico são representadas por grupos benziladenina (BA) e topolina (HUSSAIN et al., 2010). As vias de biossíntese de citocininas em microalgas diferem das rotas metabólicas propostas para algas, porém o estudo destas vias ainda é pouco explorado. Uma das propostas aceitas, é que as citocininas de microalgas sejam produzidas pela degradação de RNA transportador (RNA_t) (STIRK et al., 2013).

Como foi mostrado ao longo desta revisão, vários estudos evidenciam a presença de promotores de crescimento vegetal em microalgas, entretanto novos estudos são necessários a fim de otimizar a síntese de fitohormônios por microalgas e esclarecer os aspectos bioquímicos de produção de fitohormônios em microalgas bem como as vias metabólicas de produção (LU; XU, 2015), pois se tem conhecimento destes aspectos em plantas superiores, mas poucos estudos com microalgas.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente estudo foi desenvolvido em 2 etapas, nas quais primeiramente foram realizados ensaios autotróficos e heterotróficos com microalgas pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) - *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18. Esta etapa foi realizada a fim de verificar quais microalgas eram capazes de produzir os fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina, além de verificar se as modificações nas condições de cultivo seriam capazes de alterar as concentrações destes fitohormônios. Na segunda etapa, foram realizados experimentos com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021, adquirida do banco de cepas “*Chlamydomonas Resource Center*”. Para os estudos com essa microalga também foram testados cultivos autotróficos e heterotróficos, sendo analisados perfil de proteínas e lipídios neutros, a fim de verificar as alterações metabólicas na cepa em estudo. Cada etapa originou um artigo para submissão em periódicos de alto fator de impacto, contando com resultados promissores que ainda não haviam sido investigados.

ARTIGO 1: PRODUÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA A PARTIR DE MICROALGAS

ARTIGO 2: INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE FITOHORMÔNIOS ENDÓGENOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA NO CULTIVO DE *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021

ARTIGO I:
PRODUÇÃO DOS FITOHORMÔNIOS ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA A
PARTIR DE MICROALGAS

RESUMO

Algumas microalgas são capazes de biossintetizar substâncias capazes de promover o crescimento e desenvolvimento de organismos vegetais. Essas substâncias, também chamadas de fitohormônios, podem substituir insumos agrícolas sintéticos prejudiciais ao meio ambiente que são utilizados para este fim. Entre os principais fitohormônios, estão a auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção dos fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina endógenos pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18 em condições autotróficas e heterotróficas de crescimento. Os cultivos autotróficos foram realizados com fotoperíodo de 12 h claro/escuro e com luz contínua. Os cultivos heterotróficos foram realizados sem a presença de luz e em modo batelada alimentada mantendo concentração de 0,5 g L⁻¹ de glicose nos meios de cultivo. Como resultados, todas as microalgas produziram AIA e *t*-Z endógenos nas três condições avaliadas (autotrófico 12 h claro/escuro, autotrófico 24 h claro e heterotrófico). As concentrações obtidas de AIA variaram de 1,94 a 56,45 nmol g⁻¹. Enquanto que as concentrações de *t*-Z variaram de 0,06 a 35,52 pmol g⁻¹. Além disso, as condições de cultivo foram capazes de incrementar as concentrações de carboidratos e proteínas, porém não houveram diferenças estatísticas nos conteúdos de lipídios. Logo, as condições de cultivo e as espécies de microalgas utilizadas, apresentaram resultados promissores. Dessa forma, este estudo contribui com alternativas de minimização das consequências ambientais causadas pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Auxinas. Citocininas. Condições de cultivo.

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população mundial, juntamente com a maior demanda de alimentos, vem mostrando a necessidade do desenvolvimento de estratégias para minimizar as consequências ambientais causadas pelo elevado uso de insumos agrícolas prejudiciais ao meio ambiente, como fertilizantes químicos. Entretanto, o desenvolvimento de novas estratégias para o cultivo vegetal sustentável deve manter os padrões de cultivos com altos rendimentos, porém envolvendo menores danos ambientais (ALVES-DIAS et al. 2016). Uma alternativa é a substituição desses produtos químicos por substâncias biológicas (ELARROUSSI et al. 2016).

Biofertilizantes e promotores de crescimento vegetal se destacam como componentes promissores para o crescimento e desenvolvimento de cultivos vegetais, e, conseqüentemente, são capazes de promover maiores rendimentos agrícolas (FAHEED; FATTAH, 2008). Entre os principais promotores de crescimento vegetal ou fitohormônios estudados, estão a auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z) (STIRK et al., 2013).

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos, tipicamente autotróficos, cultivados por apresentarem diversas aplicações, dentre elas a produção de promotores de crescimento vegetal (fitohormônios), como AIA e *t*-Z (STIRK et al, 2013; LU; XU, 2015). A biomassa microalgal pode ser utilizada na alimentação humana não apresentando efeitos tóxicos e é indicada como método de prevenção de câncer, diabetes, obesidade, entre outras doenças (ANITHA; CHANDRALEKHA, 2010). Além disso, a biomassa de microalgas contribui com a ingestão diária de proteínas, carboidratos e ácidos graxos essenciais (DEAMICI et al., 2018, LUCAS et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

Entre as substâncias identificadas nas microalgas com possível efeito biofertilizante, destacam-se os fitohormônios auxinas e citocininas visto que correspondem às maiores concentrações. Žižková et al. (2017) analisaram o perfil de auxinas e citocininas em 20 microalgas consideradas principais representantes de nove classes (*Cyanophyceae*, *Xanthophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Porphyridiophyceae*, *Chlorophyceae*, *Ulvophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Zygnematophyceae* e *Klebsormidiophyceae*). No geral, as citocininas isopenteniladenina, *trans*-zeatina e *cis*-zeatina foram predominantes em todas as microalgas analisadas. Com relação ao perfil de auxinas, os autores relataram que o ácido 3-indolacético é predominante.

O uso de extratos microalgais vem sendo estudado como bioestimulante para aumentar o crescimento e reduzir estresses abióticos e bióticos de plantas. Mesmo com

resultados positivos em relação aos efeitos em culturas agrícolas, a biossíntese de fitohormônios por microalgas permanece pouco explorada (LU, XU, 2015).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção dos fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina endógenos, em condições autotróficas e heterotróficas de crescimento pelas microalgas *C. fusca* LEB 111, *C. vulgaris* LEB 112, *S. obliquus* LEB 117, *S. nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DE MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As microalgas *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul, Brasil, foram utilizadas neste estudo.

Para o cultivo das microalgas foram utilizados os meios BG-11 (RIPPKA et al., 1979) para as microalgas *C. vulgaris* LEB 112, *C. fusca* LEB 111, *S. obliquus* LEB117 e *S. nidulans* LEB 115 e Zarrouk (ZARROUK, 1966) para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18. As microalgas foram cultivadas em condições autotróficas e heterotróficas. Os cultivos autotróficos foram realizados com fotoperíodo de 12 h claro/escuro e fotoperíodo de 24 h claro (STIRK et al., 2014), ambos durante 15 dias em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume total de 0,5 L (volume útil 0,4 L) e concentração inicial de biomassa de 0,2 g L⁻¹. A temperatura foi mantida à 30°C em câmara termostatzada (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006) com intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A agitação das culturas foi realizada por meio de ar comprimido. Os cultivos heterotróficos, foram realizados durante 10 dias em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume útil de 0,4 L, mantidos a 30 °C em câmara incubadora, com agitação orbital de 100 rpm, sem a presença de luz e em modo batelada alimentada mantendo concentração de 0,5 g L⁻¹ de glicose nos meios de cultivo.

2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA E pH DOS CULTIVOS

A concentração de biomassa foi determinada diariamente mediante a leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmin-1240 spectrophotometer, Japão), no comprimento de onda de 670 nm, a partir de uma curva padrão

correspondente a cada microalga, que relaciona a densidade ótica e a massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002). O pH dos cultivos também foi determinado diariamente por meio da leitura direta em pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGo™, Suíça).

2.3 PRODUTIVIDADE MÁXIMA DE BIOMASSA

A produtividade máxima de biomassa ($P_{\max}$, $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi determinada de acordo com a equação $P_{\max} = (X_t - X_0) / t - t_0$, onde X_t é a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t_0 (d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

2.4 VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE GERAÇÃO

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$, d^{-1}) foi determinada utilizando regressão exponencial aplicada à fase de crescimento logarítmico. O tempo de geração (tg), que corresponde ao tempo de duplicação celular, foi determinado na fase exponencial de crescimento dos cultivos (BAILEY; OLLIS, 1986).

2.5 CONSUMO DE GLICOSE

O consumo de glicose foi verificado diariamente pelo método de determinação de açúcares redutores utilizando ácido 3,5-dinitrossalícílico (MILLER, 1959). O sistema de cultivo foi realizado em batelada alimentada, sendo mantida em $0,5 \text{ g L}^{-1}$ a concentração da fonte de carbono no meio de cultivo, adicionando diariamente glicose de acordo com o consumo a partir de uma solução estoque com concentração de 40 g L^{-1} .

2.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

Para a extração dos fitohormônios, foi utilizada metodologia descrita por Chokshi et al. (2017), em que 1 mL de meio líquido foi coletado no período inicial, intermediário e final de cada experimento (0, 7 e 15 d) e centrifugado (Eppendorf, Microcentrifuge 5410, Alemanha). Após, o sobrenadante foi descartado e a biomassa microalgal homogeneizada (COLE PARMER CPX 130 - Illinois - EUA) com tampão de extração produzido com ácido

clorídrico, 2-propanol e H₂O destilada segundo Pan, Welti e Wang (2010). Os fitohormônios foram separados da mistura pela adição de diclorometano, concentrados em atmosfera de nitrogênio e ressuspensos em metanol. As concentrações dos fitohormônios auxina (ácido 3-indolacético) e citocinina (*trans*-zeatina) extraídos das biomassas microalgais foram determinadas em ensaio ELISA utilizando kits de detecção de imunoenensaio de reguladores de crescimento de plantas (ácido 3-indolacético - AS11 1749, *trans*-zeatina - AS11 1784, AGRISERA ANTIBODIES, SUÉCIA) de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. Os fitohormônios foram quantificados em placas ELISA 96 poços e as densidades ópticas (D.O.) foram registradas à 405 nm em leitor de placas (*Gen5 Microplate Reader and Imager Software*, BIOTEK, EL808, USA). As concentrações dos fitohormônios foram calculadas por meio de curva padrão de ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina, utilizando a seguinte equação para padrões e amostras: % Ligação (L%) = [Padrão ou Amostra (D.O.)/Controle Positivo (D.O.) x 100]. Os resultados foram expressos em relação a concentração de fitohormônio pela concentração de biomassa no respectivo período analisado.

2.7 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

No final dos cultivos, a biomassa foi recuperada por centrifugação (HITACHI, himac CR-GIII, Japão) a 9000 *g* por 20 min, ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada por 20 min nas mesmas condições para melhor remoção de sais do meio. A biomassa centrifugada foi congelada a -80 ° C (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) por 48 h e depois liofilizada (LAB CONCO, EUA). As amostras liofilizadas foram armazenadas a -20 ° C para posterior caracterização.

2.7.1 Concentração de carboidratos, proteínas e lipídios

Determinações do conteúdo de proteínas e carboidratos foram realizadas ao final dos experimentos em extratos de biomassa preparados com 5 mg de biomassa e 10 mL de água destilada submetidos a sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 - Illinois - EUA). A concentração total de carboidratos na biomassa foi determinada usando o método fenol-sulfúrico, com uma curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O teor de proteína na biomassa foi determinado pelo método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951), com etapa de pré-tratamento térmico e alcalino com hidróxido de sódio para solubilização de

proteínas insolúveis e quantificação com curva padrão de albumina de soro bovino. A concentração lipídica na biomassa foi determinada também ao final dos experimentos pelo método colorimétrico proposto por Marsh e Weinstains (1966) usando clorofórmio e metanol como solventes para extração e quantificação com curva padrão de tripalmitina.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de Tukey para comparação entre as médias, ao nível de 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL E pH DOS CULTIVOS

As microalgas cultivadas foram capazes de crescer em todas condições experimentais (Figura 1) com exceção da microalga *S. nidulans* LEB 115 na condição heterotrófica em que a concentração se manteve de 0,2 g L⁻¹ a 0,27 g L⁻¹ (Figura 1c), mostrando que o meio de cultivo BG-11 com suplementação de glicose não foi capaz de suprir a demanda nutricional por carbono sem a presença de luz durante o crescimento dessa microalga.

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou as maiores concentrações de biomassa em relação as demais microalgas cultivadas no ensaio com presença contínua de luz (Figura 1b). Este fato não foi observado nas demais microalgas cultivadas com fotoperíodo de 24 h, em que as concentrações máximas de biomassa foram significativamente iguais ou menores que no fotoperíodo de 12 h claro/escuro (Tabela 1).

Também é possível observar que, com exceção da microalga *S. nidulans* LEB 115 na condição heterotrófica, as microalgas cultivadas apresentaram crescimento exponencial sem fase de adaptação nas 3 condições estudadas. Além disso, não ocorreu morte celular até o último dia dos experimentos em nenhuma condição.

A variação de pH dos cultivos nas condições estudadas pode ser visualizada na Figura 2. Observa-se que o pH permaneceu na faixa de 8,0 a 11,0 para todas as microalgas cultivadas, ocorrendo variações justificadas pelo crescimento das microalgas. Também, pode-se observar que com a variação do fotoperíodo, o pH dos cultivos apresentou variação, entretanto manteve-se nesta faixa citada. .

Figura 1 - Curvas de crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (◆), *C. fusca* LEB 111 (○), *C. vulgaris* LEB 112 (■), *S. nidulans* LEB 115 (□) e *S. obliquus* LEB 117 (▲) cultivadas no fotoperíodo 12 h claro/escuro (a), 24 h claro (b) e heterotrófico (c).

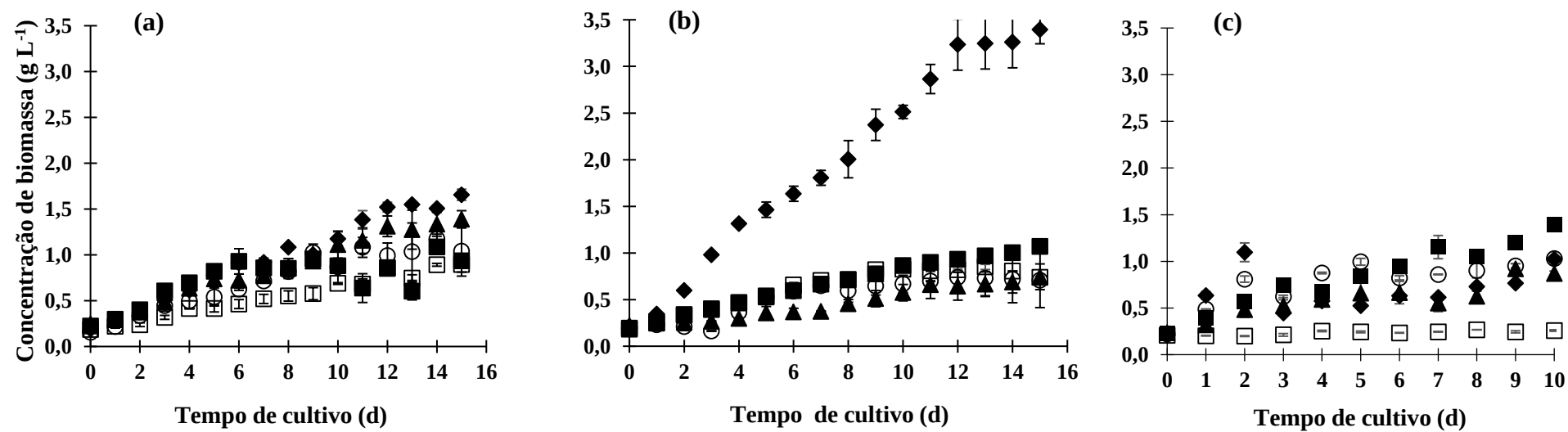
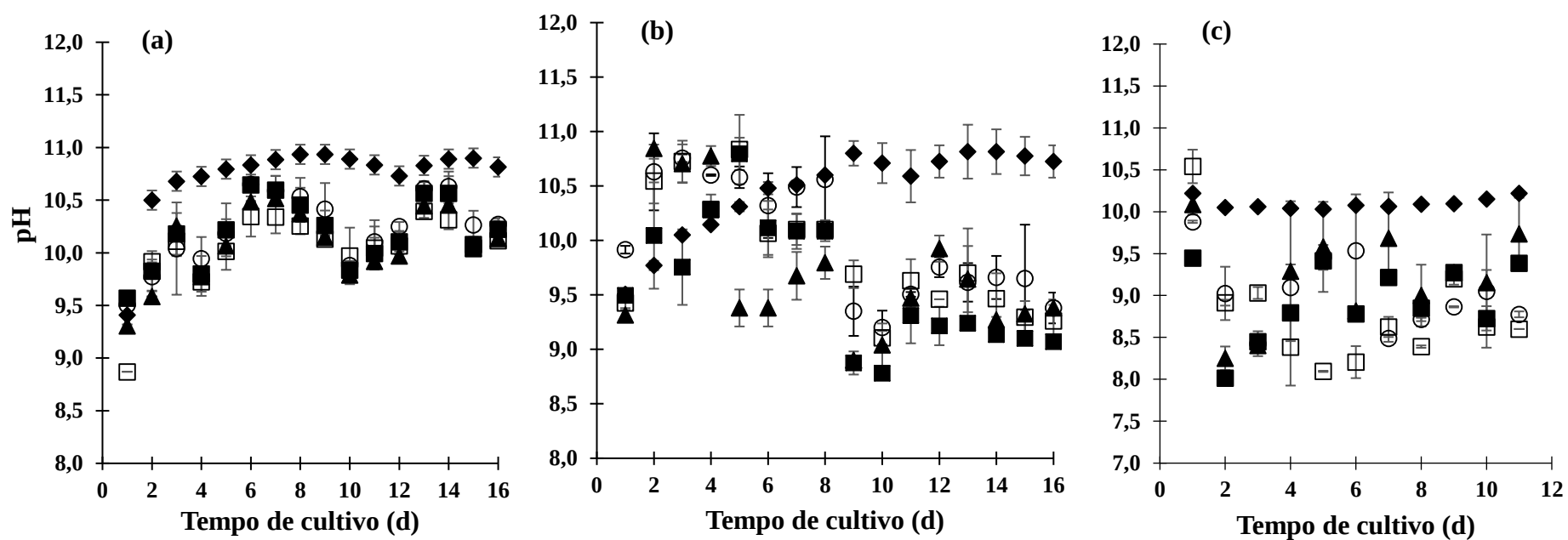


Figura 2 - pH durante o cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (◆), *C. fusca* LEB 111 (○), *C. vulgaris* LEB 112 (■), *S. nidulans* LEB 115 (□) e *S. obliquus* LEB 117 (▲) cultivadas no fotoperíodo 12 h claro/escuro (a), 24 h claro (b) e heterotrófico (c).



É importante ressaltar que, com exceção da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, as microalgas estudadas foram isoladas de uma lagoa de estabilização de cinzas próxima a uma usina termoeletrica, onde o pH corresponde a faixa de 9,0-10,0 o que pode justificar a faixa de pH obtida nos ensaios. Assim, como foi relatado no estudo de Radmann et al. (2011), em que amostras da microalga *S. obliquus* LEB 117 apresentavam pH de aproximadamente 10,0. Segundo Shi et al. (2016), com o aumento do pH a taxa de crescimento de *Spirulina* aumenta no primeiro momento, seguido de queda, sendo encontrado o máximo crescimento entre pH 9,5-10. Os ensaios se mantiveram nessa faixa em quase todo o tempo de cultivo para microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

A microalga *C. fusca* LEB 111 apresentou pH semelhante entre as condições estudadas, na faixa de 9,0 a 10,0, resultado que vai de acordo com estudo de Cassuriaga et al. (2018) com a mesma espécie microalgal e condições de cultivo semelhantes, em que o pH obtido manteve-se na faixa de 9,5 a 10,1. Em relação a microalga *C. vulgaris* LEB 112, os resultados de pH obtidos foram semelhantes aos de *C. fusca* LEB 111, pois estas espécies pertencem ao mesmo gênero microalgal. A microalga *S. nidulans* LEB 115 apresentou pH na faixa de 8,4 a 10,6 nas três condições testadas. Este resultado está de acordo com o estudo de Duarte e Costa (2017), que realizaram o cultivo desta mesma espécie de microalga, entretanto em diferentes condições de cultivo em que o pH se manteve na faixa de 8,8 a 10,0.

Além disso, no cultivo com luz contínua, é possível observar aumento no pH seguido de queda até o final dos ensaios para todas as microalgas com exceção da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Entretanto, ao verificar os resultados de crescimento celular, observa-se que apenas a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou incremento na concentração de biomassa na condição de luz contínua em relação a condição 12 h claro/ escuro. E como citado anteriormente, as variações de pH podem ser explicadas pelo crescimento das microalgas.

Os resultados de concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempo de geração (tg) dos ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico, podem ser verificados na Tabela 1. Observa-se que no fotoperíodo de 24 h claro a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou o maior valor de $X_{m\acute{a}x}$ (3,39 g L⁻¹), $P_{m\acute{a}x}$ (438,78 mg L⁻¹ d⁻¹) e $\mu_{m\acute{a}x}$ (0,47 d⁻¹), resultados significativamente maiores ($p \leq 0,05$) que no fotoperíodo de 12 h claro/escuro e que as demais microalgas cultivadas, mostrando a facilidade de adaptação desta microalga na presença de luz durante os 15 dias de cultivo. Este resultado de $X_{m\acute{a}x}$ foi semelhante ao encontrado por Deamici et al. (2018) em cultivo *outdoor* de *Spirulina* sp., onde a concentração máxima de biomassa em cultivo *outdoor* foi 3,40 g L⁻¹.

Tabela 1 -Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração nos ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e cultivo heterotrófico.

Respostas	Fotoperíodo 12 h claro/escuro				
	<i>C. fusca</i> LEB 111	<i>C. vulgaris</i> LEB 112	<i>S. obliquus</i> LEB 117	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	<i>S. nidulans</i> LEB 115
$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	1,23 ^a ±0,10	1,09 ^b ±0,02	1,39 ^a ±0,09	1,66 ^b ±0,06	0,92 ^a ±0,05
$P_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	335,42 ^a ±48,44	483,30 ^a ±72,19	236,63 ^b ±57,85	221,43 ^c ±31,42	183,76 ^a ±59,67
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,13 ^a ±0,03	0,27 ^a ±0,02	0,23 ^a ≤0,01	0,29 ^b ≤0,01	0,10 ^a ≤0,01
tg (d)	5,79 ^c ±1,46	2,62 ^c ±0,18	2,99 ^c ±0,01	2,43 ^b ±0,01	7,20 ^b ±1,23
*R ²	0,99±0,01	0,99≤0,01	0,99±0,01	0,99≤0,01	0,98≤0,01
**Δt (d)	2-7	0-4	0-5	0-4	5-10
Respostas	Fotoperíodo 24 h claro				
	<i>C. fusca</i> LEB 111	<i>C. vulgaris</i> LEB 112	<i>S. obliquus</i> LEB 117	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	<i>S. nidulans</i> LEB 115
$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	0,86 ^c ±0,12	1,07 ^b ±0,02	0,74 ^c ±0,14	3,39 ^a ±0,15	0,85 ^b ±0,02
$P_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	246,09 ^c ±26,15	109,18 ^c ±10,69	103,00 ^c ±41,09	438,78 ^a ±46,83	130,81 ^b ±23,21
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,09 ^b ±0,02	0,07 ^c ±0,03	0,10 ^b ±0,02	0,47 ^a ±0,01	0,12 ^a ±0,01
tg (d)	8,08 ^a ±2,03	11,89 ^a ±5,43	7,50 ^a ±1,56	1,47 ^b ±0,04	6,00 ^c ±0,51
*R ²	0,98≤0,01	0,99≤0,01	0,99±0,01	0,99≤0,01	0,99≤0,01
**Δt (d)	5-9	4-10	2-6	0-4	1-7
Respostas	Cultivo heterotrófico				
	<i>C. fusca</i> LEB 111	<i>C. vulgaris</i> LEB 112	<i>S. obliquus</i> LEB 117	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	<i>S. nidulans</i> LEB 115
$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	1,03 ^b ± 0,02	1,40 ^a ≤ 0,01	0,92 ^b ± 0,05	1,10 ^c ± 0,10	0,27 ^c ≤ 0,01
$P_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	321,56 ^b ±35,20	210,37 ^b ± 51,85	294,52 ^a ±3,24	335,35 ^b ±0,50	42,04 ^c ±21,57
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,10 ^b ≤0,01	0,18 ^b ±0,02	0,10 ^b ≤0,01	0,10 ^c ±0,02	0,04 ^b ≤0,01
tg (d)	7,21 ^b ±0,09	3,99 ^b ±0,48	7,01 ^b ±0,99	7,10 ^a ±1,49	19,81 ^a ±6,64
*R ²	0,99≤0,01	0,99≤0,01	0,99±0,01	0,99≤0,01	0,98≤0,01
**Δt (d)	1-5	1-5	2-6	3-7	2-6

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a mesma resposta. *R²: o coeficiente de determinação da regressão linear foi aplicado na fase logarítmica de crescimento. **Δt: tempo inicial-tempo final da fase exponencial de crescimento.

Outra cianobactéria utilizada neste estudo, *Synechococcus nidulans* LEB 115, obteve a maior concentração de biomassa e produtividade máxima de biomassa no fotoperíodo 12 h claro/escuro ($0,92 \text{ g L}^{-1}$ e $183,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente). Duarte e Costa (2017) obtiveram $X_{\text{máx}}$ $0,94 \text{ g L}^{-1}$ no cultivo desta mesma espécie em fotobiorreatores tubulares, durante 10 dias de experimento e demais condições iguais às do presente estudo. Mostrando comportamento de crescimento microalgal semelhante entre os estudos com a mesma espécie.

Em relação as microalgas do gênero *Chlorella*, a microalga *C. fusca* LEB 111 obteve máximo crescimento celular ($1,23 \text{ g L}^{-1}$) e produtividade ($335,42 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no fotoperíodo 12 h claro/escuro. Cassuriaga et al. (2018) obtiveram resultados de $X_{\text{máx}}$ e $P_{\text{máx}}$ de $0,84 \text{ g L}^{-1}$ e $60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, com a mesma espécie microalgal e mesmas condições do presente estudo, entretanto com menor intensidade luminosa, o que influencia diretamente na concentração celular, segundo os autores. A microalga *C. vulgaris* LEB 112 apresentou $X_{\text{máx}}$ significativamente maior no ensaio heterotrófico ($1,40 \text{ g L}^{-1}$), entretanto não ocorreram diferenças significativas na concentração de biomassa devido a alteração de fotoperíodo, onde foram obtidos valores de $X_{\text{máx}}$ de $1,09$ e $1,07 \text{ g L}^{-1}$ para 12h claro/escuro e 24 h claro, respectivamente. Perez-Garcia, Bashan e Puente (2002) obtiveram os melhores resultados de crescimento de *C. vulgaris* em cultivos heterotróficos com 1% de glicose ou 1% de acetato em comparação a cultivos autotróficos, e relataram que esta espécie é capaz de crescer eficientemente na ausência de luz com uma fonte de carbono orgânico, como mostram os resultados do presente estudo. A microalga *S. obliquus* LEB 117 obteve maior $X_{\text{máx}}$ com fotoperíodo 12 h claro/escuro ($1,39 \text{ g L}^{-1}$), assim como as microalgas *C. fusca* LEB 111 e *S. nidulans* LEB 115, mostrando que a condição 12 h claro/escuro é a condição ótima para o crescimento destas microalgas.

3.2 CONTEÚDO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO NAS MICROALGAS

Os resultados das concentrações de ácido 3-indolacético (AIA) obtidas no período inicial, intermediário e final dos ensaios com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico das microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18 podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de Ácido 3-indolacético (AIA) durante os ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.

Condição	Tempo (d)	AIA (nmol g ⁻¹)				
		<i>C. fusca</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>Spirulina</i>	<i>S.</i>
		LEB 111	LEB 112	LEB 117	sp. LEB 18	<i>nidulans</i> LEB 115
12 h claro/escuro	0	14,78 ^f	16,39 ^c	17,92 ^d	10,79 ^c	15,09 ^e
		±1,61	±0,39	±1,77	±0,37	±1,13
	7	22,15 ^e	30,83 ^b	41,91 ^a	22,08 ^a	16,25 ^e
		±0,44	±1,83	±0,49	±0,48	±0,18
	15	28,02 ^d	35,23 ^a	3,21 ^e	1,94 ^e	19,23 ^d
		±0,19	±0,17	±0,06	±0,18	±0,21
24 h claro	7	31,32 ^c	10,49 ^d	35,57 ^b	6,69 ^d	48,64 ^a
		±0,78	±0,05	±0,60	±0,08	±0,10
	15	56,45 ^a	2,0 ^f	4,62 ^e	7,41 ^d	6,93 ^f
		±0,16	±0,18	±0,18	±0,04	±0,24
Heterotrófico	6	21,01 ^e	12,0 ^d	38,92 ^{a,b}	15,08 ^b	32,34 ^c
		±0,11	±0,34	±1,04	±0,46	±0,48
	10	34,17 ^b	5,32 ^e	26,73 ^c	9,83 ^c	38,24 ^b
		±0,27	±0,45	±0,41	±0,04	±1,04

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a mesma resposta ($p \leq 0,05$).

Pode-se observar por meio dos resultados obtidos (Tabela 2), que as concentrações de AIA variaram de 1,94 a 56,45 nmol g⁻¹ para as microalgas estudadas. Žižková et al. (2017) ao analisarem as concentrações de auxinas em 20 espécies de microalgas obtiveram concentrações de AIA variando de 0,003 a 0,288 nmol g⁻¹ em condições de cultivo autotróficas com luz contínua a intensidade de 230 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com duração dos cultivos variando de 10 a 14 dias. Dentre as espécies estudadas por estes autores foi obtida concentração de 0,048 nmol g⁻¹ de AIA para a microalga *S. obliquus*, resultado inferior ao presente estudo. Em estudo de Jirásková et al., (2009), foram obtidas concentrações de AIA de 0,45 a 4,45 nmol g⁻¹ em espécies de *Chlorella*, estes autores realizaram a quantificação dos fitohormônios pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e compararam com ensaios ELISA, mostrando que os ensaios ELISA são rápidos, específicos e podem ser utilizados para este fim. Logo, os resultados obtidos (Tabela 2) mostram

que as espécies de microalgas utilizadas neste estudo são capazes de biossintetizar AIA e apresentaram resultados promissores.

Em relação as condições estudadas, pode-se observar que os resultados de AIA variam de espécie para espécie, para a microalga *C. fusca* LEB 111, e *S. nidulans* LEB 115 as concentrações de AIA tiveram incremento na condição de luz contínua. Enquanto que para as microalgas *C. vulgaris* LEB 112, *S. obliquus* LEB 117 e *Spirulina* sp. LEB 18, foram obtidas maiores concentrações de AIA com o fotoperíodo de 12 h claro/escuro. No cultivo heterotrófico, a concentração de AIA para a microalga *S. nidulans* LEB 115 foi estatisticamente igual a condição de luz contínua. Um resultado importante visto que a luz é um dos maiores custos no cultivo de microalgas.

Sergeeva, Liaimer e Bergman (2002) avaliaram a produção de AIA em 34 espécies de cianobactérias a fim de verificar se diferentes morfologias de microalgas influenciariam na produção deste fitohormônio. Como resultados, obtiveram a produção de AIA pelas espécies testadas, entretanto não ocorreu nenhuma correlação entre a produção de AIA e a complexidade morfológica das cianobactérias.

Além disso, também foi possível verificar por meio dos resultados obtidos (Tabelas 2 e 3), que existe uma tendência de variação nas concentrações dos fitohormônios com o tempo. Em relação ao dia 0, as concentrações podem aumentar ao longo do tempo, apresentando maiores resultados no último dia de experimento ou aumentar no 7º d e diminuir posteriormente. O mesmo fato ocorre em estudo de Stirk et al. (2014), em que os autores realizam a quantificação de AIA e *t*-Z em *Chlorella minutíssima*, entretanto em menores períodos de tempo (10 h, 15 h, 24 h, 34 h e 48 h), porém também ocorrem variações nas concentrações destes fitohormônios, assim como no presente estudo. Os autores relacionam isso com a variação da concentração dos precursores de AIA e *t*-Z que são produzidos naturalmente pelo metabolismo da microalga e estão presentes no meio, que pode ocasionar no aumento ou diminuição da biossíntese destes fitohormônios. Dessa forma, seria necessária a realização de mais estudos, a fim de verificar qual seria o melhor tempo de cultivo de cada microalga estudada para produção de biomassa e fitohormônios.

Outro fator a ser destacado, é a presença de AIA em *S. nidulans* LEB 115 e *C. fusca* LEB 111, pois ainda não haviam sido realizados estudos de quantificação de fitohormônios nestas espécies microalgais. Neste estudo, obteve-se a máxima concentração de AIA de 48,64 nmol g⁻¹ e 56,45 nmol g⁻¹ para *S. nidulans* LEB 115 e *C. fusca* LEB 111, respectivamente. Resultado aproximadamente 222,3% maior em relação ao dia 0 para a microalga *S. nidulans* LEB 115 e 281,9% maior em relação ao dia 0 para a microalga *C. fusca* LEB 111. Além disso, estas foram as maiores concentrações de AIA obtidas em comparação as demais microalgas estudadas.

3.3 CONTEÚDO DE *trans*-ZEATINA NAS MICROALGAS

De acordo com os resultados de concentrações de *t*-Z obtidos (Tabela 3), foi possível quantificar o fitohormônio *t*-z em todas as condições e espécies de microalgas cultivadas. As concentrações de *t*-z obtidas variaram de 0,06 a 35,52 pmol g⁻¹.

Žižková et al. (2017) ao analisarem as concentrações de citocininas em 20 espécies de microalgas obtiveram concentrações de *t*-Z variando de 0,18 a 23,93 pmol g⁻¹ em condições de cultivo autotróficas com luz contínua e intensidade de 230 μmol_{fótons} m⁻² s⁻¹ com duração dos cultivos variando de 10 a 14 dias. Entretanto as condições de cultivo eram diferentes das utilizadas no presente estudo, como descrito anteriormente, mostrando que as espécies cultivadas e condições testadas são capazes de otimizar a biossíntese de *t*-z.

Tabela 3 -Concentração de *trans*-zeatina (*t*-Z) durante os ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.

Condição	Tempo (d)	<i>t</i> -Z (pmol g ⁻¹)				
		<i>C. fusca</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>Spirulina</i>	<i>S. nidulans</i>
		LEB 111	LEB 112	LEB 117	sp.LEB 18	LEB 115
	0	1,69 ^b ±0,16	2,44 ^a ±0,14	2,34 ^d ±0,02	2,43 ^c ±0,25	1,85 ^f ±0,19
12 h claro/escuro	7	0,73 ^{c,d} ≤0,01	0,23 ^d ≤0,01	5,92 ^b ±0,10	1,68 ^d ±0,07	7,66 ^b ±0,09
	15	0,59 ^d ≤0,01	0,12 ^d ≤0,01	1,05 ^e ±0,15	1,04 ^e ±0,02	1,01 ^g ≤0,01
24 h claro	7	0,59 ^d ±0,04	2,67 ^a ±0,10	0,50 ^f ±0,07	0,06 ^f ≤0,01	6,82 ^c ±0,03
	15	0,94 ^b ±0,07	0,24 ^e ±0,07	0,66 ^f ±0,03	0,12 ^f ≤0,01	5,77 ^d ±0,07
Heterotrófico	6	4,56 ^a ±0,13	1,17 ^c ±0,19	6,44 ^a ±0,11	3,84 ^a ±0,10	5,15 ^e ±0,07
	10	4,62 ^a ±0,08	1,75 ^b ±0,04	5,07 ^c ≤0,01	3,15 ^b ±0,12	35,52 ^a ±0,14

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna correspondem à diferença significativa (p≤0,05) para a mesma resposta (p≤0,05).

Stirk et al. (2013) avaliaram os níveis de biossíntese de auxinas e citocininas em 24 espécies de microalgas em condições autotróficas de crescimento. Dentre as espécies avaliadas, *Chlorella minutíssima* e *Chlorella vulgaris* não apresentaram níveis de produção da citocinina *trans*-zeatina. No presente estudo com as condições testadas, obtiveram-se concentrações máximas de *t*-Z de 4,62 pmol g⁻¹ em *Chlorella fusca* com o cultivo heterotrófico, além de 2,44 e

2,67 pmol g⁻¹ em *Chlorella vulgaris* no início dos experimentos. Mostrando ser possível a obtenção de *trans*-zeatina em microalgas do gênero *Chlorella*.

Stirk et al. (2011) avaliaram a produção de citocininas em *Chlorella* sp. e *Chlorella minutíssima*, em que as células de ambas as espécies iniciavam a divisão celular logo após o início do período escuro dos cultivos, além disso não ocorria mais divisão celular durante o término dos períodos de luz. Os autores relataram que a produção de citocininas é maior no início do período escuro, pois estes fitohormônios atuam principalmente na divisão celular. Estes resultados indicam que existe relação entre a luz, o ciclo de divisão celular e a produção de citocininas. No presente estudo as maiores concentrações de *t*-Z obtidas foram no cultivo heterotrófico (Tabela 3). No início dos experimentos, os inóculos utilizados foram mantidos nas condições dos experimentos com fotoperíodo 12 h claro/escuro. Então as células já estavam passando por divisão celular, e poderiam estar produzindo *t*-Z no início dos experimentos, como mostram os resultados. No entanto, após o início dos experimentos, as concentrações foram diminuindo nas condições 12 h claro/escuro e 24 h claro, e aumentando na condição heterotrófica.

Stirk et al. (2011) também relataram que os cultivos que utilizam períodos de luz e escuro obtém maiores concentrações de citocininas do que os experimentos com escuro contínuo. Entretanto, no presente estudo, a adição de glicose como fonte de carbono e energia no cultivo heterotrófico, incrementou a produção de *t*-Z, permitindo o crescimento e divisão celular, e consequentemente maiores concentrações de *t*-Z, assim como no estudo de Stirk et al. (2014), onde os autores obtiveram 3,9 pg mg⁻¹ de *t*-Z em cultivo heterotrófico da microalga *Chlorella minutíssima* com adição de glicose. Além disso, existem evidências que as citocininas são utilizadas pelas células microalgais durante o crescimento exponencial, como foi visto por Stirk et al. (2011). Assim, onde são encontradas maiores concentrações de *t*-Z, pode significar uma forma de armazenamento devido a condições de estresse microalgal ou períodos de crescimento não exponencial, como mostram os resultados do presente estudo.

Stirk et al. (2014) verificaram em cultivo heterotrófico de *Chlorella minutíssima* com adição de glicose (5 g L⁻¹), que após período inicial dos experimentos a microalga estava ajustando seu metabolismo para utilizar a glicose como fonte de energia. Após este período, a biossíntese de citocininas foi iniciada. Estes resultados mostraram que a luz, por si só, não é um requisito para a biossíntese de citocininas, mas sim reservas de energia suficientes, como a glicose.

A maior concentração de *t*-Z obtida nesse estudo foi 35,52 pmol g⁻¹ em *S. nidulans* LEB 115, resultado que não havia sido investigado anteriormente, pois ainda não haviam sido realizados estudos de quantificação de fitohormônios nesta espécie de microalgas.

3.4 COMPOSIÇÃO DAS BIOMASSAS MICROALGAIS

De acordo com os resultados de composição de biomassa obtidos (Tabela 4), é possível observar que as variações nas condições de cultivo foram capazes de alterar os conteúdos de proteínas e carboidratos das microalgas estudadas. Entretanto, o conteúdo de lipídios não apresentou diferenças estatísticas, mostrando que os cultivos autotróficos e heterotróficos utilizados neste estudo não comprometeram as concentrações de lipídios presentes nas microalgas estudadas, porém as condições estudadas foram capazes de modificar as concentrações das demais macromoléculas e dos fitohormônios AIA e *t*-Z.

Tabela 4 -Conteúdo de carboidratos (% m m⁻¹), proteínas (% m m⁻¹) e lipídios (% m m⁻¹) dos ensaios realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico.

Microalga	Fotoperíodo 12 h claro/escuro	Fotoperíodo 24 h claro	Heterotrófico +glicose
Carboidratos (%)			
<i>C. fusca</i> LEB 111	22,7 ^c ±0,3	30,9 ^b ±1,7	56,9 ^a ±1,3
<i>C. vulgaris</i> LEB 112	21,2 ^{a,b} ±0,8	19,8 ^b ±1,7	22,7 ^a ±0,6
<i>S. obliquus</i> LEB 117	17,9 ^b ±1,8	33,3 ^a ±0,9	21,7 ^b ±1,9
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	9,5 ^b ±1,5	15,6 ^a ±0,1	6,4 ^c ±0,6
<i>S. nidulans</i> LEB 115	11,0 ^b ±1,67	32,3 ^a ±1,4	10,5 ^b ±1,0
Proteínas (%)			
<i>C. fusca</i> LEB 111	63,6 ^a ±1,1	30,8 ^b ±2,8	19,4 ^c ±1,0
<i>C. vulgaris</i> LEB 112	64,1 ^a ±1,0	48,6 ^b ±0,3	30,2 ^c ±0,7
<i>S. obliquus</i> LEB 117	47,13 ^a ±1,4	40,3 ^b ±0,4	31,2 ^c ±1,7
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	55,71 ^a ±1,1	56,2 ^a ±0,3	39,8 ^b ±1,4
<i>S. nidulans</i> LEB 115	49,87 ^a ±0,7	41,1 ^b ±0,4	31,8 ^c ±0,4
Lipídios (%)			
<i>C. fusca</i> LEB 111	19,0 ^a ±1,6	13,9 ^a ±0,9	14,2 ^a ±1,0
<i>C. vulgaris</i> LEB 112	23,9 ^a ±2,6	26,6 ^a ±3,1	19,0 ^a ±2,6
<i>S. obliquus</i> LEB 117	19,6 ^a ±1,7	19,6 ^a ±2,2	19,2 ^a ±2,2
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	17,0 ^{a,b} ±1,8	15,9 ^{a,b} ±0,1	12,02 ^b ±0,8
<i>S. nidulans</i> LEB 115	11,2 ^a ±2,6	12,1 ^a ±2,4	10,69 ^a ±1,2

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a mesma resposta ($p \leq 0,05$).

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou incremento na concentração de carboidratos com o cultivo heterotrófico (56,9%), e na concentração de proteínas com o fotoperíodo 12 h claro/escuro (63,6%). Cassuriaga et al. (2018) obtiveram com a mesma espécie microalgal conteúdos semelhantes de carboidratos e lipídios que a condição 12 h claro/escuro deste estudo. Entretanto, o conteúdo de proteínas foi 42,6 %, resultado inferior ao obtido no presente estudo. Porém a menor intensidade luminosa utilizada pelos autores ($58 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-2}$) pode ter ocasionado o menor conteúdo proteico.

Semelhantemente, a microalga *Chlorella vulgaris* LEB 112 quando cultivada na condição heterotrófica resultou em maior conteúdo de carboidratos (22,7%) e com a condição 12 h claro/escuro esta microalga apresentou maior conteúdo proteico (64,1%). Liang; Sarkany e Cui (2009) verificaram que porcentagem de carboidratos na biomassa da *Chlorella vulgaris* é capaz de aumentar em modo heterotrófico variando de acordo com a fonte de carbono utilizada, obtendo 44% quando suplementado com glicose. Entretanto os autores não utilizaram o modo de batelada alimentada para adição de glicose, o que pode ter ocasionado maior acúmulo de carboidratos devido estresse microalgal causado pela saturação de glicose no meio.

Logo, pode-se observar que no presente estudo a ausência de luz e utilização de glicose como fonte de carbono incrementou o conteúdo de carboidratos das biomassas microalgais do gênero *Chlorella*. Porém ocasionou em conteúdos de proteínas significativamente menores em relação a outras condições estudadas. De acordo com Perez-Garcia et al. (2011), a síntese de transportadores proteicos pelas microalgas é reduzida na presença de glicose, o que pode justificar o menor teor proteico obtido nos cultivos heterotróficos das 5 microalgas estudadas.

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi a única espécie que apresentou conteúdo proteico significativamente igual nas condições 12 h claro/escuro e 24 h de luz. Esta microalga também apresentou maior conteúdo de carboidratos, concentração de biomassa e produtividade máxima de biomassa com luz contínua, mostrando a melhor adaptação desta espécie na presença de luz em relação as demais microalgas cultivadas. Entretanto, as concentrações dos fitohormônios *t*-Z e AIA não foram maiores nesta condição. O fato de serem obtidos maiores concentrações de biomassa e conteúdos proteicos, não está relacionado diretamente com o aumento das concentrações de fitohormônios, como relataram Stirk et al. (2014).

Assim como ocorrido nos cultivos da microalga *Spirulina* sp LEB 18, os conteúdos de carboidratos nas biomassas de *S. obliquus* LEB 117 e *S. nidulans* LEB 115, foram significativamente maiores com a presença de luz contínua. Entretanto, o conteúdo de proteínas permaneceu maior na condição 12 h claro/escuro. Sukenik (1999) relatou que quando as

microalgas estão sob condições ótimas de crescimento, como no cultivo 12 h claro/escuro realizado neste estudo, as células microalgais irão sintetizar proteínas que serão utilizadas para o crescimento. Porém, a velocidade de crescimento é reduzida por fatores limitantes como nutrientes, temperatura, excesso ou falta de luz, podendo ocasionar maior produção de lipídios, carboidratos e outros metabólitos.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18 foram capazes de produzir AIA e *trans*-zeatina endógenos nas três condições avaliadas (autotrófico 12 h claro/escuro, autotrófico 24 h claro e heterotrófico). A maior concentração de AIA, 56,45 nmol g⁻¹ foi obtida por microalga *C. fusca* LEB 111 na condição 12 h claro/escuro, enquanto que a maior concentração de *t*-Z foi 35,52 pmol g⁻¹ por *S. nidulans* LEB 115 na condição heterotrófica. As condições de cultivo foram capazes de incrementar o crescimento celular, as concentrações de carboidratos e proteínas. Logo, as condições de cultivo e a espécies microalgais utilizadas, apresentaram resultados promissores. Além disso, as maiores concentrações de AIA e *t*-Z foram obtidas por espécies de microalgas (*Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115) que ainda não haviam sido investigadas para este fim. Portanto, as informações e resultados apresentados neste estudo, demonstraram o potencial das microalgas utilizadas para a produção dos principais fitohormônios com ação biofertilizante. Substâncias que são consideradas essenciais para a substituição dos produtos agroquímicos utilizados na agricultura, e assim, contribuindo com alternativas para a redução de problemas ambientais e garantindo segurança alimentar para a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-DIAS, G.; ROCHA, R. H. C.; LOPES-ARAÚJO, J.; LIMA F.J.; GUEDES, A. S. W. Growth, yield and postharvest quality in eggplant produced under different foliar fertilizers (*Spirulina platensis*) treatments. **Ciencias Agrárias**, v.37, p.3893–3902, 2016.
- ANITHA, L.; CHANDRALEKA, K. Effect of supplementation of *Spirulina* on Blood Glucose, Glycosylated Hemoglobin and Lipid Profile of Male Non-Insulin Dependent Diabetics. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**., v.1, n.11, p.36-46, 2010.

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

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**, 2018.

CHOKSHI, K.; PANCHI, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 60, 2017.

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

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.

DUARTE, J.; COSTA, J. A. V.; *Synechococcus nidulans* from a thermoelectric coal power plant as a potential CO₂ mitigation in culture medium containing flue gas wastes. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 21-24, 2017.

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

ELARROUSSI, H.; ELMERNISSI, N.; BENHIMA, R.; KADMIRI, M. I.; BENDAOU, N.; SMOUNI, A.; WAHBY, I. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. **Journal of Algal Biomass**, v.7, p.55-63, 2016.

FAHEED, F.; FATTAH, Z. A. E. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.4, p.166-116, 2008.

JIRÁSKOVÁ, D., POULÍČKOVÁ, A., NOVÁK, O., SEDLAKOVA, K., HRADECKÁ, V., & STRNAD, M. High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. **Journal of phycology**, v. 45, 2009.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology letters**, v.31, n.7, p.1043-1049, 2009.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

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

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Cell Press**, v. 20. n. 5. p. 273-282, 2015.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574-576, 1966.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426- 428, 1959.

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.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 6, p. 986–992, 2010.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v.52, n.10, p.3132-3136, 2011.

RAVEN, J. A. Sensing pH? Plant, **Cell and Environment**, v. 13, p. 721-729, 1990.

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 Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, v.215, n.2, p.229-238, 2002

SHI, W. Q.; LI, S. D.; LI G.R.; WANG, W. H.; CHEN, Q. X.; LI, Y. Q.; LING, X. W. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*. **Optik-International Journal for Light and Electron Optics**, v. 127, n. 16, p. 6688-6694, 2016.

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

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J.; NOVÁK, O.; DOLEŽAL, K.; STRNAD, M.; DOBREV, P. I.; BALINT, P. changes in endogenous cytokinin concentrations in *chlorella* (*chlorophyceae*) in relation to light and the cell cycle. **Journal of phycology**, v.47, n.2, p.291-301, 2011.

STIRK, W. A. P.; BÁLINT P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; MARÓTI, G.; LJUNG K.; TURECKOVÁ V.; STRNAD, M.; ÖRDÖG V.; VAN STADEN, J. Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 66-76, 2014.

SUKENIK, A. **Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis***. In: COHEN, Z. Chemicals from Microalgae. London: Taylor e Francis, 1999.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cyanophycee**: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. 1966. Thesis (Ph.D.) - University of Paris, Paris, 1966.

ŽIŽKOVÁ, E.; KUBES, M.; DOBREV, P. I.; PAVEL, P.; SIMURA, J.; ZAHAJSKÁ, L.; DRÁBKOVÁ, L. Z.; NOVÁK, O.; MOTYKA, V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. **Annals of Botany**, v. 119, p. 151-166 2017.

ARTIGO II:
INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE FITOHORMÔNIOS ENDÓGENOS ÁCIDO 3-
INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA NO CULTIVO DE
Chlamydomonas reinhardtii CC1021

RESUMO

Microalgas podem representar potenciais alternativas para o melhoramento e proteção de cultivos agrícolas, pois possuem em sua composição compostos que atuam como promotores do desenvolvimento vegetal. Estes compostos, também chamados de fitohormônios, desempenham um papel importante na mediação do crescimento e respostas ao estresse nas plantas. Entre os principais fitohormônios estudados, estão a auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z). No cultivo de microalgas, a luz e o modo de cultivo são fatores que podem influenciar a produção de fitohormônios por estes micro-organismos. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do fotoperíodo e de modos de cultivo no crescimento, composição da biomassa e na produção fitohormônios AIA e *t*-Z por *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021. Assim, foram realizados cultivos autotróficos com fotoperíodo 12 h claro/escuro e com luz contínua e cultivo heterotrófico em modo batelada alimentada com adição de glicose. Os resultados mostraram que *C. reinhardtii* foi capaz de produzir AIA e *t*-Z nas três condições avaliadas. Entretanto, com o cultivo heterotrófico foi possível obter as maiores concentrações de AIA (20237,34 nmol g⁻¹) e *t*-Z (2593,89 nmol g⁻¹). Além disso, o maior conteúdo de lipídios neutros também foi obtido na condição heterotrófica (7,75 mg 10⁻⁶ cél). Portanto, o uso da biomassa de *C. reinhardtii* na agricultura pode ser uma alternativa sustentável para a minimização dos problemas ambientais causados pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

Palavras-chave: Auxinas. Citocininas. Cultivo heterotrófico. Microalgas.

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas apontaram que a população mundial aumentará em média 50% neste século, alcançando cerca de 11,2 bilhões até 2100 (UNITED NATIONS, 2017). Este aumento populacional implicará em maior demanda por alimentos, resultando na necessidade de expansão do sistema agrícola e maior demanda pelo uso de agroquímicos para produção de cultivos vegetais. Neste sentido, há uma busca crescente pelo desenvolvimento de estratégias ecologicamente corretas para produção de culturas agrícolas com alto rendimento, envolvendo menores danos ambientais. Estas estratégias têm como base a redução ou substituição do uso de insumos químicos, especialmente fertilizantes e pesticidas, por substâncias naturais ou biológicas (PLAZA, 2018; GOMIERO, 2017).

As microalgas são micro-organismos amplamente utilizados na alimentação humana, pois possuem biomassa rica em proteínas, carboidratos e lipídios (VAZ et al., 2016; SANTOS et al., 2016; LUCAS et al., 2018). Além disso, estes micro-organismos fotossintéticos são produtores de substâncias naturais promotoras de crescimento vegetal (fitohormônios), como a auxina ácido 3-indolacético e a citocinina *trans*-zeatina (STIRK et al, 2013; LU; XU, 2015). O gênero *Chlamydomonas* têm biomassa rica em proteínas, com média de 50% de seu peso seco, composto por esta macromolécula, além de apresentar uma concentração relevante de carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais, clorofila e fitohormônios (BECKER, 2007; ŽIŽKOVÁ et al., 2017).

Estudos visando a obtenção de fitohormônios a partir de microalgas estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar quais gêneros são capazes de sintetizar estas substâncias. Stirk et al. (2013) avaliaram a produção de fitohormônios em 24 espécies de microalgas. Os autores verificaram que todas as cepas estudadas foram capazes de produzir fitohormônios, como auxinas e citocininas. Entretanto, novos estudos são necessários a fim de esclarecer as vias de produção e otimizar a síntese de destes biocompostos por microalgas. (LU; XU, 2015).

As microalgas utilizam a luz como fonte de energia durante a fotossíntese para produzir diversos compostos. Os mecanismos envolvidos na fotossíntese, como a ativação ou inativação de sistemas fotossintéticos, podem ser modulados por modificações na presença e periodicidade da luz (fotoperíodo). Além disso, algumas microalgas podem crescer na ausência de luz, nos cultivos chamados heterotróficos, em que as microalgas usam compostos orgânicos, como a glicose, como energia e fonte de carbono. Essas modificações são consideradas estratégias eficientes para estimular o crescimento de microalgas e o acúmulo de biomoléculas

específicas (KRZEMINSKA et al., 2014). Além disso, essas modificações podem estimular o acúmulo de compostos, como auxinas e citocininas (STIRK et al, 2014; LU; XU, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar o crescimento, composição de biomassa e produção de fitohormônios ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina endógenos em cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 quando submetidos a diferentes fotoperíodos e modos de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 (Spreitzer; Mets, 1981), adquirida do Banco de cepas “*Chlamydomonas Resource Center*”. As culturas de *C. reinhardtii* cresceram em meio Tris Acetato Fosfato (TAP) líquido durante 7 d para dar início aos experimentos. Após este período, as culturas foram recolhidas por centrifugação a 500 *g* por 5 min e ressuspensas em meio de cultivo TAP.

Os experimentos foram realizados em duplicata em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume de 0,5 L (volume útil de 0,4 L) e mantidos em câmara incubadora a 25°C com agitação orbital de 100 rpm, durante 10 d. Os cultivos conduzidos em condições autotróficas de crescimento foram realizados com fotoperíodo 12 h claro/escuro e luz contínua (24:0), ambos com intensidade luminosa de aproximadamente 70 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os experimentos em condições heterotróficas foram realizados durante 10 d, conduzidos na ausência de luz em modo batelada alimentada com adição de fonte de carbono orgânica (Stirk et al., 2014), sendo mantida em 0,5 g L⁻¹ a concentração de glicose no meio de cultivo.

2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.2.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada diariamente a partir de uma curva padrão correspondente a microalga, que relaciona a concentração celular e a massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002). A contagem celular foi realizada diariamente com auxílio de

hemacitômetro (*Neubauer- Brigh Line*, BOECO, Alemanha), e visualização com auxílio de microscópio ótico (AxioCan ERc 5s Microscope camera, Zeiss, Alemanha)

2.2.2 Consumo de glicose

O consumo de glicose foi verificado diariamente pelo método de determinação de açúcares redutores utilizando ácido 3,5-dinitrossalícílico (MILLER, 1959). O sistema de cultivo foi realizado em batelada alimentada, sendo mantida em $0,5 \text{ g L}^{-1}$ a concentração da fonte de carbono no meio de cultivo, completando diariamente de acordo com o consumo, a partir de uma solução estoque de glicose com concentração de 40 g L^{-1} .

2.2.3 Extração e quantificação de fitohormônios

A extração dos fitohormônios foi realizada de acordo com metodologia descrita por Chokshi et al. (2017), na qual 1 mL de cultivo foi coletado nos tempos 0, 6 e 10 d de cada experimento e centrifugado (Eppendorf, Microcentrifuge 5410, Alemanha). Após, o sobrenadante foi descartado e a biomassa homogeneizada (COLE PARMER CPX 130 - Illinois - EUA) com tampão de extração produzido com ácido clorídrico, 2-propanol e H_2O destilada segundo Pan, Welti e Wang (2010). Os fitohormônios foram separados da mistura pela adição de diclorometano (P. A.), concentrados em atmosfera de nitrogênio e ressuspensos em metanol (P.A.). As concentrações dos fitohormônios auxina (ácido 3-indolacético) e citocinina (*trans*-zeatina) extraídos das biomassas microalgais foram determinadas em ensaio ELISA utilizando kits de detecção de imunoenensaio de reguladores de crescimento de plantas (ácido 3-indolacético - AS11 1749, *trans*-zeatina - AS11 1784, Agrisera Antibodies, Suécia) de acordo com as instruções descritas pelo fabricante.

Os fitohormônios foram quantificados em placas ELISA 96 poços e as densidades ópticas (D.O.) foram registradas a 405 nm em leitor de placas (*Gen5 Microplate Reader and Imager Software*, BIOTEK, EL808, EUA). As concentrações dos fitohormônios foram calculadas por meio de curva padrão de ácido 3-indolacético e *trans*-zeatina, utilizando a seguinte equação para padrões e amostras: % Ligação (L%) = [Padrão ou Amostra (D.O.) / Controle Positivo (D.O.) x 100]. Os resultados foram expressos em relação a concentração de biomassa de cada amostra nos tempos 0, 6 e 10 d.

2.2.4 Concentração de lipídios neutros

A quantificação de lipídios neutros nas células microalgais foi realizada de acordo com o método de fluorescência utilizando *Nile red* como agente corante. Para tal, alíquotas de 100 µL de cultivo foram diretamente coradas com o mesmo volume de solução de 0,1 µL mL⁻¹ de *Nile red* (concentração final da solução de trabalho dissolvido em DMSO a 50% (v v⁻¹)), e mantidas no escuro por 10 min. O sinal de *Nile red* foi capturado utilizando comprimento de excitação entre 515 e 560 nm e a emissão medida em 580 nm (WANG et al., 2009). O teor lipídico (µg/10⁶ células) foi calculado aplicando a seguinte Equação: Teor lipídico = [(0,0004 * F_D - 0,0038) / número de células], onde F_D é a diferença entre as fluorescências emitidas pelas células antes e após adição do corante *Nile red* (DENG et al., 2011).

2.2.5 Perfil de proteínas

Para determinação do perfil de proteínas 1 mL de cultivo líquido foi coletado nos tempos 0, 6 e 10 d de experimentos. As proteínas foram extraídas pela adição de tampão de amostra de dodecil sulfato de sódio (SDS) e posterior aquecimento por 5 min a 100°C, seguido de centrifugação a 10.000 *g* por 1 min. As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS descontínua (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (1970), utilizando um gel de concentração de acrilamida a 5% e um gel de separação de acrilamida a 12,5%.

2.3 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

No final dos cultivos, a biomassa foi recuperada por centrifugação (HITACHI, himac CR-GIII, Japão) a 9000 *g* por 20 min, ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada por 20 min nas mesmas condições para melhor remoção de sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada a -80 °C (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) por 48 h e depois liofilizada (LAB CONCO, EUA). As amostras liofilizadas foram armazenadas a -20 °C para posterior caracterização.

2.3.1 Concentração de carboidratos, proteínas e lipídios

A quantificação das concentrações de carboidratos e proteínas foi realizada na biomassa final dos experimentos. Para tal, foram preparados extratos contendo 5 mg de biomassa liofilizada e 10 mL de água destilada e após submetidos a sonda ultrassônica com 10 ciclos de funcionamento (59 s ligada e 59 s desligada) (COLE PARMER CPX 130 - Illinois - EUA). A concentração total de carboidratos na biomassa foi determinada de acordo com o método fenol-sulfúrico, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O teor de proteínas na biomassa foi determinado de acordo com o método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951), com etapa de pré-tratamento térmico e alcalino com hidróxido de sódio para solubilização de proteínas insolúveis, e quantificação por meio de curva padrão de albumina de soro bovino. A concentração lipídica na biomassa liofilizada foi determinada também ao final dos experimentos pelo método colorimétrico proposto por Marsh e Weinstains (1966), usando clorofórmio e metanol como solventes para extração e quantificação mediante curva padrão de tripalmitina.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas de teste de Tukey para comparação entre as médias, ao nível de 95% de confiança.

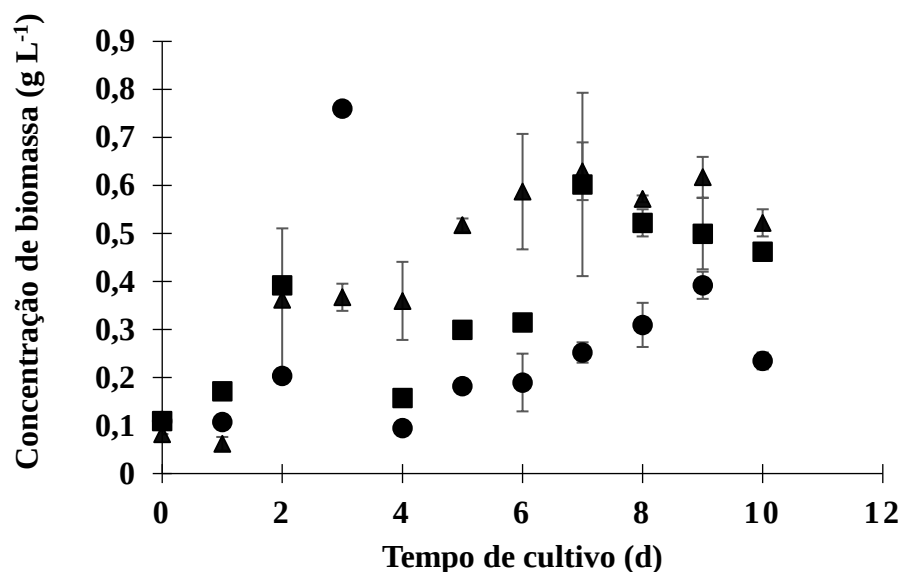
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento da microalga *C. reinhardtii* CC1021 nos ensaios com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, 24 h claro e heterotrófico. Não ocorreu diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os valores de concentração máxima de biomassa obtidos no cultivo heterotrófico ($0,76 \text{ g L}^{-1}$), 12 h claro/escuro ($0,60 \text{ g L}^{-1}$) e 24 h claro ($0,63 \text{ g L}^{-1}$). Entretanto, a concentração máxima de biomassa foi alcançada no 3º d no cultivo heterotrófico e no 7º para os cultivos conduzidos com fotoperíodo 12 h claro/escuro e 24 h de luz. Este incremento no crescimento celular obtido no início dos ensaios heterotróficos, pode ser

explicado devido ao fato que esta espécie apresenta elevada velocidade específica de crescimento celular e curto tempo de geração, desencadeando maior permeabilidade celular, juntamente com rápido consumo dos nutrientes fornecidos no meio de cultivo. Além disso, no cultivo heterotrófico a fonte de carbono adicionada (glicose) faz parte do metabolismo celular deste micro-organismo, facilitando sua absorção e elevando a taxa de crescimento mesmo sem a presença de luz (ZHANG et al., 2018).

Figura 1 - Perfil de crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 cultivada nas condições 12 h claro/escuro (■), luz contínua (▲) e heterotrófico (●).



3.2 CONTEÚDO DE ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO E *trans*-ZEATINA

C. reinhardtii CC1021 apresentou conteúdos de auxina ácido 3-indolacético (AIA) e a citocinina *trans*-zeatina (*t*-Z) em todas condições estudadas. Entretanto, no cultivo heterotrófico houve incremento significativo ($p \leq 0,05$) nas concentrações destes fitohormônios em relação as demais condições avaliadas (Tabela 1). No cultivo heterotrófico, em relação ao dia 0, ocorreu aumento médio de auxinas de 113,0% de AIA no 6º d e de 709,0% de AIA no 10º d dos experimentos. Além disso, também no cultivo heterotrófico, em relação ao dia 0, ocorreu aumento médio de citocinininas de 315,8% de *t*-Z no 6º d e de 165,4% de *t*-Z no 10º d dos experimentos.

Stirk et al. (2014) ao avaliarem o efeito da luz no cultivo de *Chlorella minutissima* verificaram que as maiores concentrações de AIA foram obtidas no cultivo heterotrófico com adição de 5 g L⁻¹ de glicose (649,4 pg mg⁻¹ de AIA), em comparação aos cultivos com presença

de luz e com e ausência de luz sem adição de glicose. Além disso, foi verificado aumento de precursores de AIA ao longo do tempo, como triptofano e indol-3-acetamida (21520,4 e 3974,7 pg mg⁻¹), respectivamente, o que ocasionou aumento das concentrações de AIA. Os resultados verificados pelos autores vão ao encontro dos resultados observados no presente estudo com a cepa *C. reinhardtii*, demonstrando que a condução dos cultivos em modo heterotrófico favoreceu a produção de fitohormônios, como auxinas e citocininas.

Tabela 1 -Conteúdo de Ácido 3-indolacético (AIA) (nmol g⁻¹) e *trans*-zeatina (*t*-Z) (nmol g⁻¹) de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 cultivada em diferentes condições.

Tempo (d)	AIA (nmol g ⁻¹)	<i>t</i> -Z (nmol g ⁻¹)
0	2501,55 ^c ±0,07	623,85 ^c ±0,07
Claro/escuro (12:12)		
6	1305,55 ^f ±0,07	145,25 ^e ±0,07
10	905,83 ^g ≤ 0,01	137,23 ^f ±0,05
Luz contínua (24:0)		
6	1846,57 ^d ≤0,01	174,66 ^d ±0,08
10	1835,82 ^e ≤0,01	59,04 ^g ±0,06
Heterotrófico		
6	5327,55 ^b ≤0,01	2593,89 ^a ±0,13
10	20237,34 ^a ±0,06	1655,87 ^b ±0,10

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna, correspondem à diferença significativa (p≤0,05) para a mesma resposta.

As auxinas desempenham papel importante na regulação da divisão celular em plantas vasculares e podem ter um papel similar nas microalgas (WOODWARD; BARTEL, 2005). Em estudo realizado por de Stirk et al. (2013) com 24 espécies de microalgas, foi verificado que cepas de rápido crescimento apresentam maiores teores de auxinas comparado a cepas de crescimento mais lento. *C. reinhardtii*, considerada de rápido crescimento, obteve melhores resultados quanto a produção de fitohormônios neste estudo de Stirk et al. (2013), cerca de 19,1 pmol g⁻¹ da citocinina *t*-Z e aproximadamente 40 nmol g⁻¹ da auxina AIA. Estes resultados mostraram que as condições de cultivo utilizadas no presente estudo foram capazes de incrementar as concentrações de AIA e *t*-Z em *C. reinhardtii* (Tabela 1).

Stirk et al. (2014) ao realizarem estudo com *Chlorella minutissima*, também verificaram que as concentrações de citocininas foram maiores no cultivo

claro/escuro, entretanto na condição escuro contínuo+glicose, foi obtida a maior concentração da citocinina *t-Z* ($3,9 \text{ pmol mg}^{-1}$). No presente estudo, as maiores concentrações de citocinina *t-Z* produzidas por *C. reinhardtii* também foram verificadas no cultivo heterotrófico (Tabela 1), corroborando com os resultados obtidos no estudo de Stirk et al. (2014).

Os autores Stirk et al. (2014) também relataram que após um período inicial em que as culturas heterotróficas estavam ajustando seu metabolismo para utilizar a glicose como fonte energia, a biossíntese de citocinina foi iniciada, assim como verificado (Tabela 1) no presente estudo. Estes resultados mostraram que somente a luz não é um requisito para a biossíntese de citocininas, mas sim a presença de reservas de energia suficientes, como a glicose.

3.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

Os resultados de composição de biomassa obtidos (Tabela 2), mostram que as variações de cultivo estudadas foram capazes de modificar os conteúdos de macromoléculas na biomassa de *C. reinhardtii*. Assim, o maior conteúdo de carboidratos foi obtido na condição heterotrófica, enquanto que o maior conteúdo de proteínas foi obtido no fotoperíodo 12 h claro/escuro. Em relação ao conteúdo de lipídios, não houve diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) entre os fotoperíodos 12 h claro/escuro e 24 h claro, porém em ambos fotoperíodos, foram obtidos maiores conteúdos de lipídios que na condição heterotrófica.

Tabela 2 - Conteúdos de carboidratos ($\% \text{ m m}^{-1}$), proteínas ($\% \text{ m m}^{-1}$), lipídios ($\% \text{ m m}^{-1}$) e lipídios neutros ($\mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$) (média $\pm$ desvio padrão) de *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 cultivada em diferentes condições.

Respostas	Claro/escuro	Luz contínua	Heterotrófico
Carboidratos ($\% \text{ m m}^{-1}$)	$16,1^b \pm 0,2$	$15,3^b \pm 1,9$	$37,5^a \pm 1,2$
Proteínas ($\% \text{ m m}^{-1}$)	$63,1^a \pm 3,6$	$48,7^b \pm 3,3$	$20,8^c \pm 2,5$
Lipídios ($\% \text{ m m}^{-1}$)	$35,3^a \pm 2,8$	$39,0^a \pm 1,9$	$19,1^b \pm 2,1$
Lipídios neutros ($\text{mg } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$)	Dia 0	Dia 0	Dia 0
	$0,52^C \leq 0,01$	$0,52^C \leq 0,01$	$0,52^C \leq 0,01$
	Dia 6	Dia 6	Dia 6
	$0,1^C \leq 0,01$	$0,07^C \pm 0,03$	$7,75^A \pm 0,07$
	Dia 10	Dia 10	Dia 10
	$0,05^C \pm 0,03$	$0,02^C \leq 0,01$	$2,14^B \pm 0,37$

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha e letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha e coluna correspondem à diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a mesma resposta.

Em relação ao conteúdo de carboidratos na biomassa de *C. reinhardtii*, a maior concentração desta macromolécula foi obtida na condição heterotrófica (37,5% m m^{-1}) (Tabela 2). De acordo com Liang, Sarkany e Cui (2009), a composição bioquímica da biomassa de microalgas pode ser influenciada pela fonte e pela concentração de carbono no meio de cultivo. Estes autores verificaram que o conteúdo de carboidratos na biomassa da *Chlorella vulgaris* variou de acordo com a fonte de carbono utilizada, sendo obtidas concentrações de 23% m m^{-1} e 44% (m m^{-1}) quando o meio de cultivo foi suplementado com acetato e glicose, respectivamente.

Quanto a concentração de proteínas e lipídios na biomassa de *C. reinhardtii*, foi possível observar que os cultivos autotróficos com fotoperíodo de 12 h claro/ escuro e luz contínua apresentaram incremento significativo ($p \leq 0,05$) destas biomoléculas em relação ao observado no cultivo heterotrófico. No cultivo autotrófico com fotoperíodo 12 h claro/escuro foi verificado a máxima concentração de proteínas (63,1% m m^{-1}), sendo este resultado 202% superior ao verificado no experimento em condição heterotrófica. Sukenik (1999) relatou que microalgas cultivadas sob condições ótimas de crescimento, como no cultivo 12 h claro/escuro realizado no presente estudo, tem sua rota metabólica desviada para a síntese de proteínas, as quais serão utilizadas para a manutenção do crescimento celular. Por outro lado, quando condições de estresse são aplicadas, como limitação de nutrientes, temperatura, excesso ou falta de luz, isso pode ocasionar a redução da velocidade de crescimento e maior produção de compostos como lipídios, carboidratos e outros metabólitos.

Quando utilizada a condição de 24 h claro, o conteúdo de proteínas em *C. reinhardtii* foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) ao verificado no cultivo com fotoperíodo 12 h claro/escuro. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Xu, Cheng e Wang (2018), em que os autores obtiveram 59% (m m^{-1}) de proteínas quando os cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* foram expostos a luz contínua. Estes resultados mostraram que a luz contínua pode ter ocasionado condição de estresse para a microalga e diminuição da síntese proteica.

O cultivo heterotrófico de *C. reinhardtii* apresentou a menor concentração de proteínas em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). De acordo com Perez-Garcia et al. (2011), a síntese de transportadores proteicos nas células microalgais é reduzida na presença de glicose, o que pode justificar o menor teor proteico obtido nos cultivos heterotróficos.

Em relação ao conteúdo de lipídios, os maiores resultados foram obtidos para as condições de 12 h claro/ escuro e 24 h claro (35,3 e 39,0%, respectivamente), concentrações significativamente ($p \leq 0,05$) maiores que as obtidas na condição heterotrófica. Estes resultados foram superiores aos obtidos por Xu, Cheng e Wang (2018) que obtiveram cerca de 15% de

lipídios em cultivo de uma cepa selvagem de *C. reinhardtii* em condições de cultivo semelhantes às de 24 h de luz realizada neste estudo. Outro fator a ser destacado, é a adição de glicose como fonte de carbono no cultivo heterotrófico, o que pode ter ocasionado redução na síntese de lipídios e incremento na síntese de carboidratos, como observado no estudo de Liang, Sarkany e Cui (2009). Estes autores avaliaram os efeitos das condições autotróficas, mixotróficas e heterotróficas de crescimento nos cultivos de *Chlorella vulgaris*, e a menor concentração de lipídios ($21\% \text{ m m}^{-1}$) foi obtida em modo heterotrófico com adição de glicose como fonte de carbono orgânica.

3.4 CONTEÚDO DE LIPÍDIOS NEUTROS

Em relação ao conteúdo de lipídios neutros, as maiores concentrações foram obtidas no cultivo heterotrófico (Tabela 2). Semelhante às plantas superiores, os lipídios microalgais são compostos de lipídios neutros e lipídios polares. Lipídios neutros consistem em triacilgliceróis (TAG) e éster, principalmente nas formas de TAG (HARWOOD, 1998). Deng, Fei e Li (2011) relataram que sob condições ambientais favoráveis, microalgas sintetizam principalmente lipídios polares, como glicolipídios e fosfolipídios. Entretanto, quando as condições ambientais são desfavoráveis para o crescimento celular, microalgas tendem a acumular lipídios neutros como forma de armazenamento de carbono e energia.

O acúmulo de lipídios neutros também está associado com baixa produção de biomassa, devido ao fato que as condições de cultivo realizadas para este fim são geralmente relacionadas à limitação de nutrientes essenciais para o crescimento microalgal. Logo, uma alternativa seria adicionar uma fonte de carbono como glicose ou sacarose no meio de cultivo, para aumentar o crescimento microalgal e manter o incremento na concentração de lipídios neutros. Com variações na concentração de nitrogênio em cultivo de *C. reinhardtii* Deng, Fei e Li (2011) alcançaram uma concentração de lipídios neutros de $2,0 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$ após o 5º d de experimento, resultado inferior ao alcançado no presente estudo para o mesmo período (Tabela 2). Dessa forma, no presente estudo o cultivo heterotrófico proporcionou uma condição de estresse celular que pode ter ocasionado incremento na concentração de lipídios neutros ($7,75 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$) significativamente ($p \leq 0,05$) superior as demais condições estudadas, porém sem comprometer o crescimento microalgal (Figura 1), visto que foi adicionada glicose como fonte de carbono.

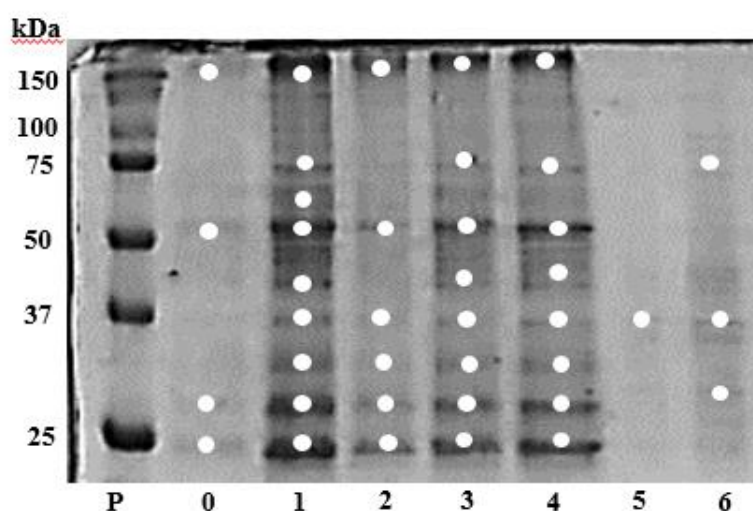
Também é possível observar que nas condições fotoautotróficas, que são favoráveis ao crescimento celular, foram obtidas concentrações de lipídios neutros estatisticamente iguais

($p > 0,05$), porém em relação ao cultivo heterotrófico, essas concentrações foram menores (Tabela 2). Este fato pode estar relacionado com maior produção de lipídios polares nas condições 12h claro/escuro e de luz contínua, como mostram os estudos de Deng, Fei e Li (2011).

3.5 PERFIL DE PROTEÍNAS

Com as mudanças obtidas no conteúdo total de proteínas das diferentes condições estudadas de *C. reinhardtii* (Tabela 1), foi interessante abordar o perfil destas proteínas em cada condição, utilizando SDS-PAGE, que fornece valores aproximados do peso molecular das proteínas. O perfil de proteínas observado por SDS-PAGE para cada condição nos dias 0 (controle), 6 e 10 (Figura 2), mostram que os níveis de proteínas foram alterados de acordo com a mudança realizada em relação ao inóculo (dia 0).

Figura 2 -Perfil de proteínas em *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 em diferentes tempos e condições de cultivo da microalga. P: padrão; 0: inóculo no 0 d; 1: 12 h claro/escuro no 6º d; 2: 12 h claro/escuro no 10º d; 3: 24 h claro no 6º d; 4: 24 h claro no 10º d; 5: heterotrófico no 6º d; 6: heterotrófico no 10º d. Pontos brancos indicam variação na expressão de proteínas.



No 6º dia de cultivo da condição autotrófica com fotoperíodo 12 h claro/escuro foi observado bandas das proteínas com maiores intensidades e menor degradação destas. O gel desta condição mostra proteínas de diferentes pesos moleculares de até 150 kDa. Em relação ao 10º d de cultivo desta condição, observou-se degradação das proteínas na faixa entre 25 e 150 kDa. Em relação a Figura 2, também é possível observar que as maiores intensidades das

bandas foram obtidas para 50 kDa e um pouco acima de 25 kDa em ambas condições autotróficas (12 claro/escuro e 24 h claro).

A ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase /oxigenase (Rubisco) é uma enzima estável sob condições normais. No entanto, sob condições de estresse, é rapidamente degradável. Esta enzima, responsável pela assimilação do CO₂ atmosférico, localiza-se nos cloroplastos das células fotossintéticas (ANDERSSON; BACKLUND, 2008).

Os níveis de proteínas nos ensaios com a presença de luz (12 h claro/escuro e 24 h claro) apresentaram incremento da enzima Rubisco, que corresponde a um peso molecular de aproximadamente 56 kDa, indicando que para estes períodos pode ter ocorrido maior taxa fotossintética. Também foi verificado que a banda que apresentou maior incremento da enzima Rubisco, foi no 6º d do experimento 12 h claro/escuro. Na condição 12 h claro/escuro, também foram obtidos maior perfil proteico e bandas mais intensas. Entretanto, no cultivo heterotrófico, a ausência de luz pode ter ocasionado menores taxas fotossintéticas, o que pode explicar a degradação da enzima Rubisco.

A energia absorvida pelas microalgas é refletida pelos componentes do núcleo do fotossistema II. Neste fotossistema, as subunidades D1 e D2 são responsáveis por transportar elétrons através da membrana do tilacoide (MELIS et al., 2000). Portanto, é possível observar que em todas as condições avaliadas pode ter ocorrido a presença das subunidades D1 (38 kDa) e D2 (39 kDa). O aumento nas proteínas D1 e D2 (38–39 kDa) pode indicar um período de maior atividade fotossintética, logo assim como ocorrido para a enzima Rubisco, no cultivo heterotrófico, pode ter ocorrido uma maior degradação das subunidades D1 e D2.

As condições autotróficas testadas (12 h claro/escuro e 24 h claro) tiveram efeito positivo no perfil protéico, estimulando a produção de enzimas responsáveis pela organização do aparato fotossintético. Essas enzimas, correspondem ao complexo LHCB (Complexo de captação de luz) (MELIS et al., 2000). Entretanto, as alterações nos perfis de enzimas do LHCB (24–28 kDa), como no cultivo heterotrófico, podem ter ocorrido como resposta às condições impostas de estresse (ausência de luz).

No cultivo autotrófico submetido a luz contínua foi observado a presença das mesmas bandas de proteínas que na condição 12 h claro/escuro. Entretanto, é possível verificar menor intensidade das bandas e que não houve considerável variação na intensidade entre os tempos 6 e 10 d, ao contrário da condição anterior. Por outro lado, para o cultivo heterotrófico, no 6º d de cultivo apenas uma banda de proteína de baixa intensidade com peso molecular de aproximadamente 37 kDa foi observada, que pode estar relacionada com a presença de proteínas D1 e D2, como discutido anteriormente. No 10º d de cultivo desta condição, bandas

com menores intensidades e com pesos moleculares menores que 100 kDa foram obtidas, mostrando que o cultivo heterotrófico apresenta perfil com proteínas de menores pesos moleculares, além de apresentar maior degradação de proteínas em relação as demais condições, como mostram os resultados.

Em relação à associação de auxinas e citocininas com o perfil proteico, estudos mostraram que os hormônios vegetais de plantas ou fitohormônios são moléculas com peso molecular extremamente baixo (menor que 1000 kDa), entretanto na maioria dos casos os fitohormônios se ligam/conjugam a moléculas de maior peso molecular, como proteínas e polissacarídeos, chamadas de carreadores (LOSSO et al., 1993).

Estudos bioquímicos mostraram que existe a conjugação do AIA a muitos tipos de moléculas, e estas ligações fazem parte de um mecanismo regulador para controlar os níveis de AIA nas células de plantas. O AIA nas plantas ocorre tanto nas formas conjugadas quanto nas formas livres, e há evidências crescentes de que a proporção de AIA livre para conjugado é controlada por processos específicos e regulados pelo desenvolvimento celular. Ensaio de ligação *in vitro* verificaram que existe uma proteína de ligação de auxina (ABP1) existente em plantas e microalgas, capaz de se ligar ao AIA, e resultar em um peso molecular de aproximadamente 5,106 kDa (TROMAS; PAPONOV; PERROT-RECHENMANN, 2010). Com isso, não foi possível obter estas frações proteicas na técnica utilizada, visto que o padrão utilizado apresentava o menor peso molecular de 25 kDa.

Em relação às citocininas, ocorre o mesmo fato, seria necessária a identificação de ligação/conjugação a algum carreador de maior peso molecular. Entretanto, os carreadores e derivados deste fitohormônio (O-glicosídeos, N-glicosídeos) também apresentam peso molecular menor que 25 kDa e não poderiam ser identificados por esta técnica (SDS-PAGE) (DOBRÁ et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021 foi capaz de produzir ácido 3-indolacético (AIA) e *trans*-zeatina (*t*-Z) nas três condições avaliadas (autotrófico 12 h claro:escuro, autotrófico 24 h claro e heterotrófico+glicose). O cultivo autotrófico 12 h claro:escuro apresentou o maior conteúdo proteico (63,1%) e mais frações proteicas em comparação as demais condições testadas. Entretanto, no cultivo heterotrófico foi possível obter maior conteúdo de carboidratos (37,5%) e as maiores concentrações de AIA (20237,34 nmol g⁻¹) e *trans*-zeatina (2593,89 nmol g⁻¹),

mostrando que a luz não é essencial para biossíntese destes fitohormônios para essa espécie microalgal. Portanto, o cultivo de *C. reinhardtii* em modo heterotrófico possibilitou a maior concentração de promotores crescimento vegetal, além disso, conclui-se que o uso da biomassa de *C. reinhardtii* na agricultura pode ser uma alternativa sustentável para a minimização dos problemas ambientais causados pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, I. BACKLUND, A. Structure and function of rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, p.275–291, 2008.

BECKER, E. W. Microalgae as a source of nutraceuticals. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.

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

CHOKSHI, K.; PANCHI, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 60, 2017.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.

DENG, X.; FEI, X.; LI, Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 260-270, 2011.

DOBRÁ, J.; ČERNÝ, M.; ŠTORCHOVÁ, H.; DOBREV, P.; SKALÁK, J.; JEDELSKÝ, P. L.; VANEK, T. The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in *Arabidopsis*. **Plant science**, v.231, p.52-61, 2015.

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

GOMIERO, T. Agriculture and degrowth: State of the art and assessment of organic and biotech-based agriculture from a degrowth perspective. **Journal of Cleaner Production**, v.197, n.2, p.1823-1839, 2017.

HARWOOD J.L. Membrane lipids in algae. In **Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics**. Springer, Dordrecht, p. 53-64, 1998.

JIRÁSKOVÁ, D., POULÍČKOVÁ, A., NOVÁK, O., SEDLAKOVA, K., HRADECKÁ, V., & STRNAD, M. (2009). High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. **Journal of phycology**, v. 45, 2009.

KRZEMINSKA, I., PAWLIK-SKOWRONSKA, B., TRZCINSKA, M., TYS, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.37, p.735–741, 2014.

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

LOSSO, J. N.; KUMMER, A.; LI-CHAN, E. NAKAI, S. Development of a particle concentration fluorescence immunossay for the quantitative determination of IgG in bovine milk. **Journal of agriculture and food chemistry**. v.41, p. 682-686, 1993.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Cell Press**, 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. **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, n. 4, p. 574-576, 1966.

MELIS, A.; ZHANG, L.; FORESTIER, M.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant physiology**, v.122, n.1, p.127-136, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426- 428, 1959.

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. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 6, p. 986–992, 2010.

PLAZA, B. M.; GÓMEZ-SERRANO, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; JIMENEZ-BECKER, S. Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

SANTOS, M. D. O. D.; MARTINS, M. A.; COIMBRA, J. S. D. R.; GATES, R. S.; CORRÊDO, L. D. P. Rheological behavior of *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultures in different biomass concentrations. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 5, p. 1063-1071, 2013.

SPREITZER, R. J.; METS, L. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. **Plant physiology**, v. 67, n. 3, p. 565-569, 1981.

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

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.; JÄGER, K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalga. **Journal of Applied Phycology**, v.14, p.215-221, 2002.

STIRK, W. A. P.; BÁLINT P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; MARÓTI, G.; LJUNG K.; TURECKOVÁ V.; STRNAD, M.; ÖRDÖG V.; VAN STADEN, J. Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 66-76, 2014.

SUKENIK, A. **Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis***. In: COHEN, Z. Chemicals from Microalgae. London: Taylor e Francis, 1999.

TROMAS, A.; PAPONOV, I.; PERROT-RECHENMANN, C. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. **Trends in plant science**, v. 15, n. 8, p. 436-446, 2010.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects: The 2017 Revision**. 2015. Disponível em: <https://population.un.org/wpp/publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf>. Acesso em: 05 nov 2018.

WANG, Z. T.; ULLRICH, N.; JOO, S.; WAFFENSCHMIDT, S.; GOODENOUGH, U. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 12, p. 1856-1868, 2009.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of botany**, v.95, n.5, p. 707-735, 2005.

XU, L.; CHENG, X.; WANG, Q. Effect of co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* on hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22713-22719, 2017.

ZHANG, Z.; TAN, Y.; WANG, W.; BAI, W.; FAN, J.; HUANG, J.; LI, Y. Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, p.1-10, 2018.

ŽIŽKOVÁ, E.; KUBES, M.; DOBREV, P. I.; PAVEL, P.; SIMURA, J.; ZAHAJSKÁ, L.; DRÁBKOVÁ, L. Z.; NOVÁK, O.; MOTYKA, V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. **Annals of Botany**, v. 119, 2017.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, as microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021, *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Synechococcus nidulans* LEB 115 e *Spirulina* sp. LEB 18 foram capazes de produzir AIA e *trans*-zeatina endógenos nas três condições estudadas (autotrófico 12 h claro/escuro, autotrófico 24 h claro e heterotrófico).

A maior concentração de biomassa ($3,39 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida com *Spirulina* sp. LEB 18 na condição de luz contínua. As concentrações de AIA variaram de 1,94 a $56,45 \text{ nmol g}^{-1}$. Enquanto que as concentrações de *t*-Z obtidas variaram de 0,06 a $35,52 \text{ pmol g}^{-1}$. As maiores concentrações de AIA e *t*-Z foram obtidas por espécies de microalgas (*Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115) que ainda não haviam sido investigadas para este fim. Sendo a maior concentração de AIA, $56,45 \text{ nmol g}^{-1}$ obtida pela microalga *C. fusca* LEB 111 na condição 12 h claro/escuro, e a maior concentração de *t*-z obtida foi $35,52 \text{ pmol g}^{-1}$ pela microalga *S. nidulans* LEB 115 na condição heterotrófica.

Em relação ao estudo de *C. reinhardtii* CC1021, com o cultivo heterotrófico se obteve as maiores concentrações de AIA ($20237,34 \text{ nmol g}^{-1}$) e *trans*-zeatina ($2593,89 \text{ nmol g}^{-1}$), resultado superior em relação as demais microalgas estudadas, mostrando que a microalga *C. reinhardtii* recebe destaque para a biossíntese das principais auxinas e citocininas. Além disso, as condições de cultivo utilizadas foram capazes de incrementar os conteúdos de proteínas e carboidratos na biomassa de todas as microalgas estudadas.

Portanto, as informações e resultados apresentados neste estudo, demonstraram o potencial das microalgas utilizadas para a produção dos principais fitohormônios com ação biofertilizante. Conclui-se que a utilização da biomassa de microalgas em cultivos vegetais pode ser uma alternativa sustentável para a minimização dos problemas ambientais causados pelo uso de insumos químicos sintéticos na agricultura.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes condições de cultivo e diferentes espécies de microalgas da coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica para a identificação de fitohormônios.
- Realizar a identificação de diferentes classes de fitohormônios em microalgas.
- Estudar diferentes métodos de quantificação de fitohormônios em microalgas e realizar a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos.
- Estudar os melhores tempos de cultivo de microalgas para obtenção de biomassa e fitohormônios.
- Avaliar o efeito do uso de outras fontes de carbono orgânico no cultivo heretotrófico, bem como a realização de cultivos mixotróficos.
- Estudar o perfil de produção de fitohormônios por microalgas, realizando a quantificação diária dos mesmos.
- Estudar o efeito da aplicação da biomassa de microalgas ricas em fitohormônios em cultivos vegetais.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Agricultural importance of algae. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 54, p. 11648-11658, 2012.
- AGRISERA. **Auxin ELISA quantitation kit**. 2018. Disponível em:<
<https://www.agrisera.com/en/artiklar/iaa-auxin-elisa-quantitation-kit.html>>. Acesso em:16
abril 2018.
- AHMED, M.; STAL, L.; HASNAIN, S. Production of indole-3-acetic acid by the cyanobacterium *Arthrospira platensis* strain MMG-9. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 1259-1265, 2010.
- ALVES-DIAS, G.; ROCHA, R. H. C.; LOPES-ARAÚJO, J.; LIMA F.J.; GUEDES, A. S. W. Growth, yield and postharvest quality in eggplant produced under different foliar fertilizers (*Spirulina platensis*) treatments. **Ciencias Agrárias**, v.37, p.3893–3902, 2016.
- ANDERSSON, I. BACKLUND, A. Structure and function of rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.46, p.275–291, 2008.
- ANITHA, L.; CHANDRALEKA, K. Effect of supplementation of *Spirulina* on Blood Glucose, Glycosylated Hemoglobin and Lipid Profile of Male Non-Insulin Dependent Diabetics. **Asian J. Exp. Biol. Sci.**, v.1, n.11, p.36-46, 2010.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochemistry**, v.70, n.8, p.957-969, 2009.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761-776, 2008.
- BARRAGÁN-OCAÑA, A.; VALLE-RIVERA, M. C. Rural development and environmental protection through the use of biofertilizers in agriculture: An alternative for underdeveloped countries? **Technology in Society**, v. 46, p. 90-99, 2016.
- BECKER, E. W. Microalgae as a source of nutraceuticals. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.
- BEZERRA, P. S. G.; GRANGEIRO, L. G.; NEGREIROS, M. Z., MEDEIROS, J. F. Utilização de bioestimulante na produção de mudas de alface. **Científica**, Jaboticabal, v.35, n.1, p.46-50, 2007.
- BIDYARANI, N.; PRASANNA, R.; BABU, S.; HOSSAIN, F.; SAXENA, A. K. Enhancement of plant growth and yields in chickpea (*Cicer arietinum* L.) through novel cyanobacterial and biofilmed inoculants. **Microbiological research**, v.188, p.97-105, 2016.

BORDOLOI, N.; BARUAH, K. K.; THAKUR, A. J. Effectiveness of plant growth regulators on emission reduction of greenhouse gas (nitrous oxide): An approach for cleaner environment. **Journal of Cleaner Production**, v.171, p.333-344, 2018.

BRASIL. Decreto Lei nº 6.323 de 27 de dezembro de 2007. Dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2007.

CARDIAS, B. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. CO₂ 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.

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**, 2018.

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

CHEN, G. Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 607-616, 2006.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green alga *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1649-1655, 2011.

CHOKSHI, K.; PANCHAL, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 60, 2017.

CHOW, T. J.; SU, H. Y.; TSAI, T. Y.; CHOU, H. H.; LEE, T. M.; CHANG, J. S. Using recombinant cyanobacterium (*Synechococcus elongates*) with increased carbohydrate productivity as feedstock for bioethanol production via separate hydrolysis and fermentation process. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 33-41, 2015.

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

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; CRUZ, C. G.; SILVEIRA, J.; MORAIS, M. G. Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p.1-10, 2019. doi:10.1080/03601234.2019.1571366.

DARCY-VRILLON, B. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 23-35, 1993.

- DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.
- DENG, X.; FEI, X.; LI, Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 260-270, 2011.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. DE; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DOBŘÁ, J.; ČERNÝ, M.; ŠTORCHOVÁ, H.; DOBREV, P.; SKALÁK, J.; JEDELSKÝ, P. L.; VANEK, T. The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in *Arabidopsis*. **Plant science**, v.231, p.52-61, 2015.
- DUARTE, J.; COSTA, J. A. V.; *Synechococcus nidulans* from a thermoelectric coal power plant as a potential CO₂ mitigation in culture medium containing flue gas wastes. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 21–24, 2017.
- DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V.; Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p.472-475, 2017.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ELARROUSSI, H.; ELMERNISSI, N.; BENHIMA, R.; KADMIRI, M. I.; BENDAOU, N.; SMOUNI, A.; WAHBY, I. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. **Journal of Algal Biomass**, v.7, p.55–63, 2016.
- FACHINELLO, J.C; NACHTIGAL, J.C; KERSTEN, E. **Fruticultura: Fundamentos e Práticas**. Pelotas: UFPel, 2007. 280p.
- FAHEED, F. A.; FATTAH, Z. A. Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. **Journal of Agriculture and Social Sciences**, v.4, n.4, p.165–169, 2008.
- FAO. **Blue-green for rice production**. FAO Soils Bulletin. Rome, 1981.
- FARIED, M. et al. Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 893-913, 2017.
- GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of applied phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051-1061, 2016.
- GEMIM, L. G. **Aplicações foliares de suspensões da microalga *Scenedesmus subspicatus* como biofertilizante no cultivo orgânico do tomateiro**. 2016. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GOMIERO, T. Agriculture and degrowth: State of the art and assessment of organic and biotech-based agriculture from a degrowth perspective. **Journal of Cleaner Production**, 2017. doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.237.

GRZESIK, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z. Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with Cyanobacteria and Microalgae. **Polish Journal of Environmental Studies**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 1147-1153, 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

HARWOOD J.L. Membrane lipids in algae. In **Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics**. Springer, Dordrecht, p. 53-64, 1998.

HU, J. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology advances**, 2017.

HUSSAIN, A.; KRISCHKE, M.; ROITSH, T. HASNAIN, S. Rapid Determination of Cytokinins and Auxin in Cyanobacteria. **Current Microbiology**, v. 61, p.361–369, 2016.

ISLAM, M. A.; HEIMANN, K.; BROWN, R. J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1160-1170, 2017.

JENSEN, S. KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 5, p. 495-504, 1993.

JIRÁSKOVÁ, D.; POULÍČKOVÁ, A.; NOVÁK, O.; SEDLAKOVA, K., HRADECKÁ, V., & STRNAD, M. High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. **Journal of phycology**, v.45, n.1, p.108-118, 2009.

KARABAGHLI-DEGRON, C.; SOTTA, B.; BONNET, M.; GAY, G.; LE TACON, F. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of *Norway spruce* (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v.140, n.4, p. 723-733, 1998.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial cell factories**, v.17, n.1, p. 36, 2018.

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.

KRIKORIAN, A. D. **Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación**. In:ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-78.

KRZEMINSKA, I., PAWLIK-SKOWRONSKA, B., TRZCINSKA, M., TYS, J., 2014. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.37, p.735–741, 2014.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F.X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

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

LANZ, B.; DIETZ, S.; SWANSON, T. The expansion of modern agriculture and global biodiversity decline: An integrated assessment. **Ecological Economics**, v. 144, p. 260-277, 2018.

LEM, N. W.; GLICK, B. R. Biotechnological uses of cyanobacteria. **Biotechnology advances**, v. 3, n. 2, p. 195-208, 1985.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology letters**, v.31, n.7, p.1043-1049, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

LOSSO, J. N.; KUMMER, A.; LI-CHAN, E. NAKAI, S. Development of a particle concentration fluorescence immunossay for the quantitative determination of IgG in bovine milk. **Journal of agriculture and food chemistry**. v.41, p. 682-686, 1993.

LOWRY, O. H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Cell Press**, 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. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 270-276, 2018.

LUO, Y.; SHI, H. Direct Regulation of Phytohormone Actions by Photoreceptors. **Trends in plant science**, v. 24, n. 2, p. 105-108, 2019.

MADEIRA, M. S.; CARDOSO, C.; LOPES, P. A.; COELHO, D.; AFONSO, C.; BANDARRA, N. M; PRATES, J. A. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111-121, 2017.

MANJUNATH, M.; KANCHAN, A.; RANJAN, K.; VENKATACHALAM, S.; PRASANNA, R.; RAMAKRISHNAN, B.; SINGH, B. Beneficial cyanobacteria and

eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. **Heliyon**, v.2, n.2, 2016.

MAPA. Instrução normativa conjunta SDA/SDC nº 2, de 12 de julho de 2013. Especificações de referência de produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2013.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574-576, 1966.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3 ed. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍZEK, M. **Photosynthesis in microalgae**. In: A. RICHMOND, Q. HU. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2 ed. Israel: Blackwell Publishing Ltd., 2013.

MELIS, A.; ZHANG, L.; FORESTIER, M.; GHIRARDI, M. L.; SEIBERT, M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant physiology**, v.122, n.1, p.127-136, 2000.

MERCHANT, S. S.; KROPAT, J.; LIU, B.; SHAW, J.; WARAKANONT, J. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 352–363, 2012.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426- 428, 1959.

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, 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. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) –Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of phototrophic cells: a method of achieving continuous cells growth under light/dark cycles. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 65–72, 1998, 1998.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; STADEN, J. V.; NOVÁK, O.; STRNAD, M. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 1, p. 88-95, 2004.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 6, p. 986–992, 2010.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

PLAZA, B. M.; GÓMEZ-SERRANO, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; JIMENEZ-BECKER, S. Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

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.

PRAVEENKUMAR, R.; SHAMEERA, K.; MAHALAKSHMI, G.; AKBARSHA, M.A.; THAJUDDIN, N. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. **Biomass and Bioenergy**, n. 37, p. 60-66, 2012.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v.52, n.10, p.3132-3136, 2011.

RADMER, R. J.; PARKER, B. C. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 93–98, 1994.

RAVEN, J. A. Sensing pH? Plant, **Cell and Environment**, v. 13, p. 721-729, 1990.

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.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1986, 528p.

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 Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

ROSSI, F.; OLGUÍN, E. J.; DIELS, L.; PHILIPPIS, R. Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. **New biotechnology**, v.32, n.1, p.109-120, 2015.

RUSSO, A.; LORENZO, V.; FELICI, C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFANI, A. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2/5 plants. **Journal of Biotechnology**, v.134, p.312-319, 2008.

SANCHEZ, M. D. M.; MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ, E. O.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from

- Synechococcus* sp. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 323-329, 2007.
- SANTOS, M. D. O. D.; MARTINS, M. A.; COIMBRA, J. S. D. R.; GATES, R. S.; CORRÊDO, L. D. P. Rheological behavior of *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultures in different biomass concentrations. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 5, p. 1063-1071, 2013.
- SATHASIVAM, R. et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.
- SCHERER, E. E.; VERONA, L. A. F.; SIGNOR, G.; VARGAS, R.; INNOCENTE, B. Produção agroecológica de morango no Oeste Catarinense. Florianópolis: **Agropecuária Catarinense**, v. 16, n. 1, 2003.
- SERGEeva, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, v.215, n.2, p.229-238, 2002
- SHAABAN, M. M.; EL-SAADY, A. K. M.; EL-SAYED, A. E. K. B. Green microalgae water extract and micronutrients foliar application as promoters to nutrient balance and growth of wheat plants. **Journal of American Science**, v.6, n.9, p. 631-636, 2010.
- SHI, W. Q.; LI, S. D.; LI G.R.; WANG, W. H.; CHEN, Q. X.; LI, Y. Q.; LING, X. W. Investigation of main factors affecting the growth rate of *Spirulina*. **Optik-International Journal for Light and Electron Optics**, v. 127, n. 16, p. 6688-6694, 2016.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Vol. 2 – Engenharia Bioquímica. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.
- SIGMA-ALDRICH. **Plant Growth Regulator Immunoassay Detection Kits**. 2019. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pgr1bul.pdf>>. Acesso em: 12 de fev. 2019.
- SMETANA, Sergiy et al. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource technology**, v. 245, p. 162-170, 2017.
- SONG, D.; FU, J.; SHI, D. Exploitation of Oik-bearing Microalgae for Biodiesel. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 341-348, 2008.
- SPREITZER, R. J.; METS, L. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. **Plant physiology**, v. 67, n. 3, p. 565-569, 1981.
- STEHLÉ, S.; SCHULZ, R. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5750-5755, 2015.
- STIRK, W. A.; VAN STADEN, J.; NOVÁK, O.; DOLEŽAL, K.; STRNAD, M.; DOBREV, P. I.; BALINT, P. changes in endogenous cytokinin concentrations in *chlorella (chlorophyceae)* in relation to light and the cell cycle. **Journal of phycology**, v.47, n.2, p.291-301, 2011.

STIRK, W. A. P.; BÁLINT P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; MARÓTI, G.; LJUNG K.; TURECKOVÁ V.; STRNAD, M.; ÖRDÖG V.; VAN STADEN, J. Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 66-76, 2014.

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

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.; JÄGER, K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalga. **Journal of Applied Phycology**, v.14, p.215–221, 2002.

SUKENIK, A. **Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis***. In: COHEN, Z. Chemicals from Microalgae. London: Taylor e Francis, 1999.

TREDICI, M.R.; BIONDI, N.; PONIS, E.; RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G. **Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses**. In: BURNELL, G.; ALLAN, G. New technologies in aquaculture. New York, CRC Press, 2009.

TROMAS, A.; PAPONOV, I.; PERROT-RECHENMANN, C. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. **Trends in plant science**, v. 15, n. 8, p. 436-446, 2010.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects: The 2015 Revision**. 2015. Disponível em: < https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf >. Acesso em: 05 nov 2018.

VONSHAK, A. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. [S.I.] CRC Press, 1997.

ZARROUK, C. **Contribution a letude dune cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. 1966. Thesis (Ph.D.) - University of Paris, Paris, 1966.

ŽIŽKOVÁ, E.; KUBES, M.; DOBREV, P. I.; PAVEL, P.; SIMURA, J.; ZAHAJSKÁ, L.; DRÁBKOVÁ, L. Z.; NOVÁK, O.; MOTYKA, V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. **Annals of Botany**, v. 119, 2017.

WANG, S. C.; KHIN, M. C.; CHUA; P. Q. D.; LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p.59-64, 2016.

WEAVER, R. J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la Agricultura**. México, Editorial Trillas, 1976. 622p.

WOODWARD, A. W., BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 707-735, 2005.

XU, L.; CHENG, X.; WANG, Q. Effect of co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* on hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22713-22719, 2017.

ZHANG, Z.; TAN, Y.; WANG, W.; BAI, W.; FAN, J.; HUANG, J.; LI, Y. Efficient heterotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, p.1-10, 2018.

ŽIŽKOVÁ, E.; KUBES, M.; DOBREV, P. I.; PAVEL, P.; SIMURA, J.; ZAHAJSKÁ, L.; DRÁBKOVÁ, L. Z.; NOVÁK, O.; MOTYKA, V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae. **Annals of Botany**, v. 119, 2017.

APÊNDICES

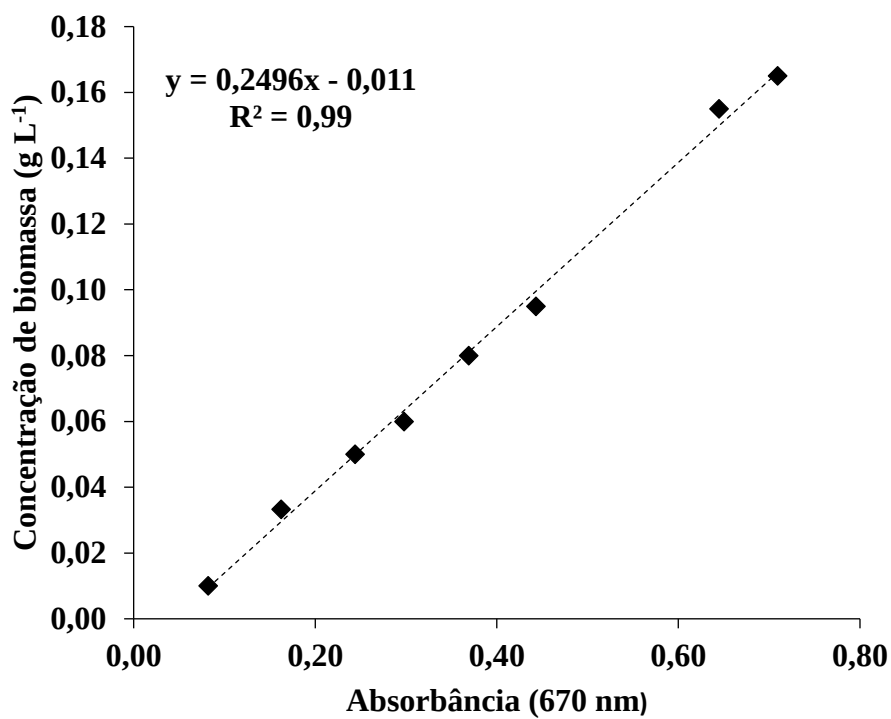
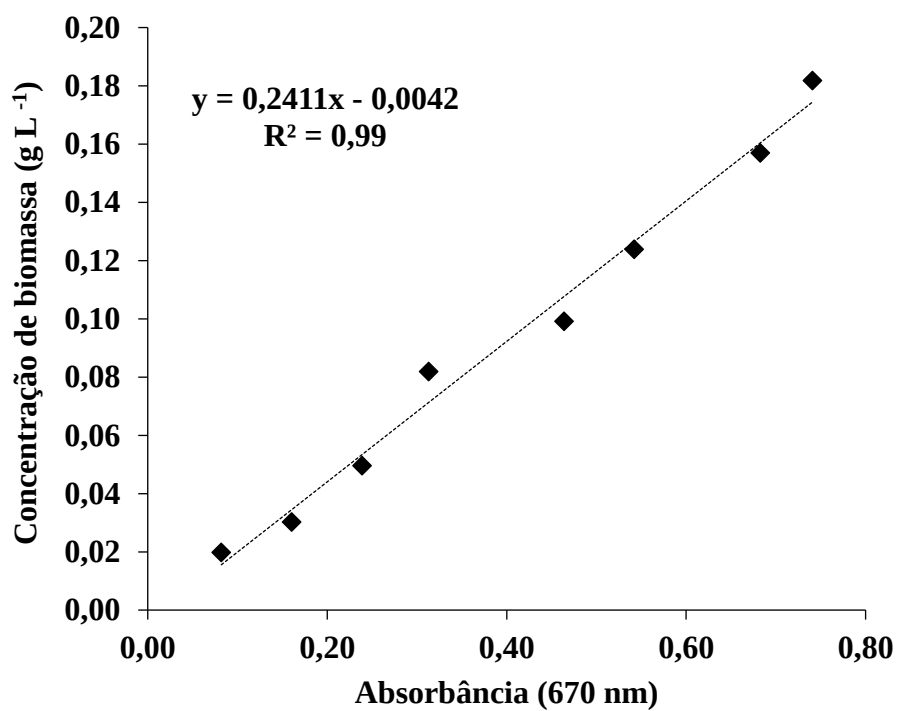
Figura 1 - Curva padrão da microalga *Chlorella fusca* LEB 111.Figura 2 - Curva padrão da microalga *Chlorella vulgaris* LEB 112.

Figura 3 - Curva padrão da microalga *Scenedesmus obliquus* LEB 117.

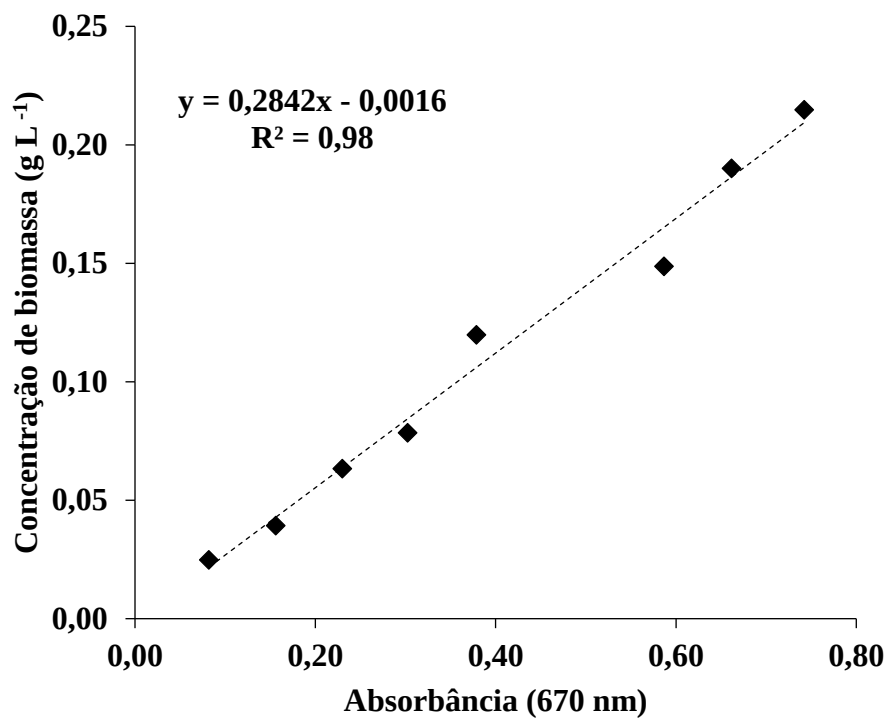


Figura 4 - Curva padrão da microalga *Synechococcus nidulans* LEB 115.

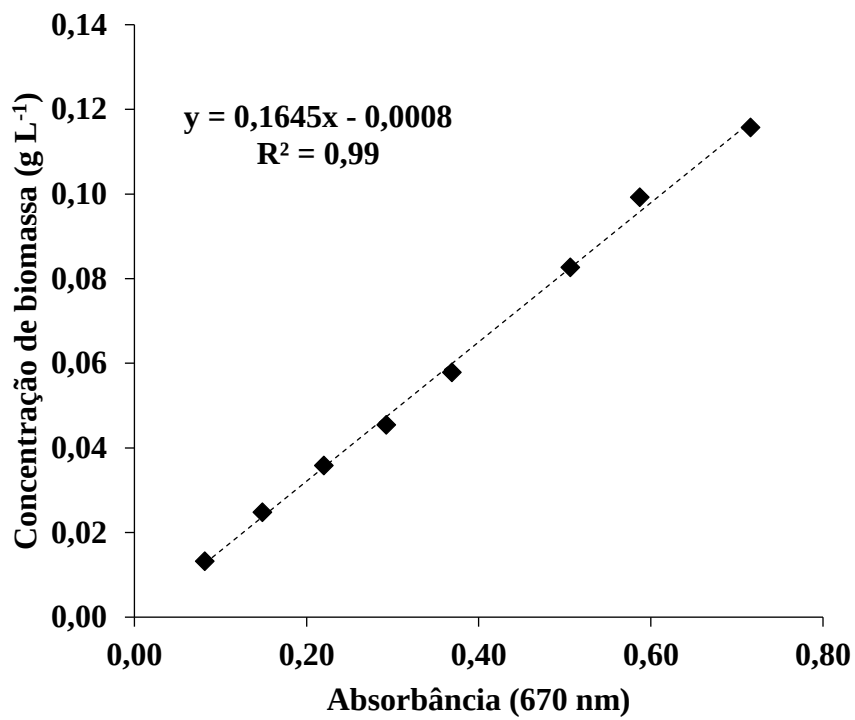


Figura 5 - Curva padrão da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

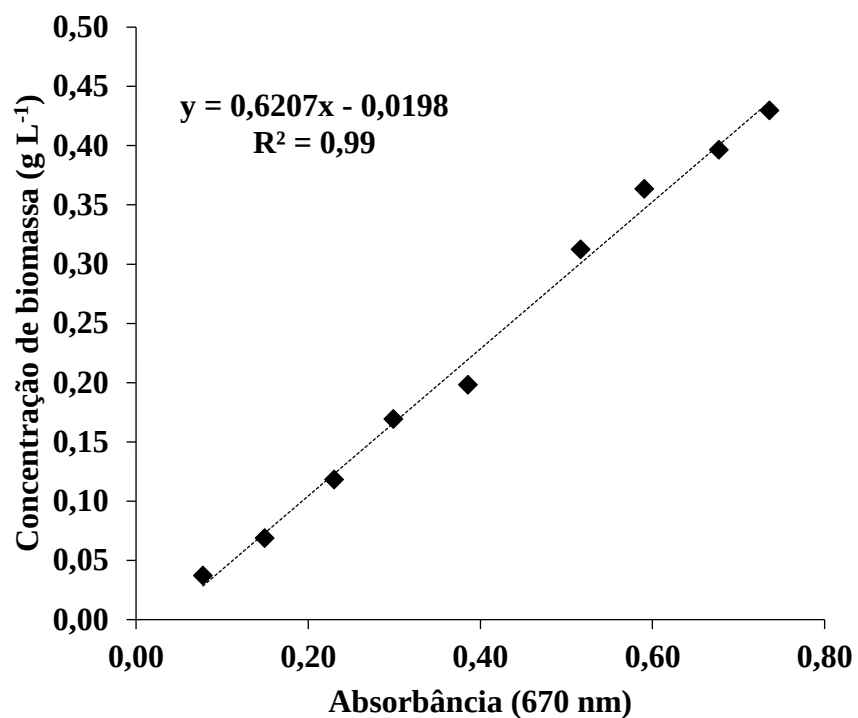


Figura 6 - Curva padrão da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021.

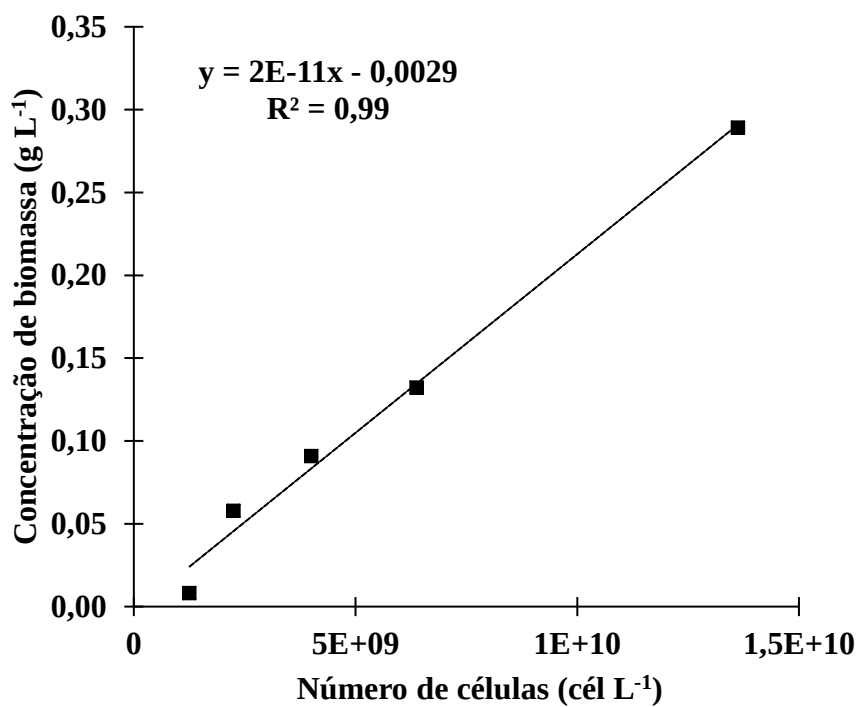


Figura 7 - Disposição dos fotobiorreatores *Erlenmeyer* nos ensaios realizados com as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 em estufa termostataizada com fotoperíodo 12 h claro/escuro.



Figura 8 - Disposição dos fotobiorreatores *Erlenmeyer* nos ensaios realizados com as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 em estufa termostataizada com fotoperíodo 24 h claro.



Figura 9 - Disposição dos fotobiorreatores *Erlenmeyer* nos ensaios realizados com as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlorella vulgaris* LEB 112, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 em estufa termostatizada em modo heterotrófico.



Figura 10 - Disposição dos fotobiorreatores *Erlenmeyer* em um dos ensaios realizados com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CC1021.



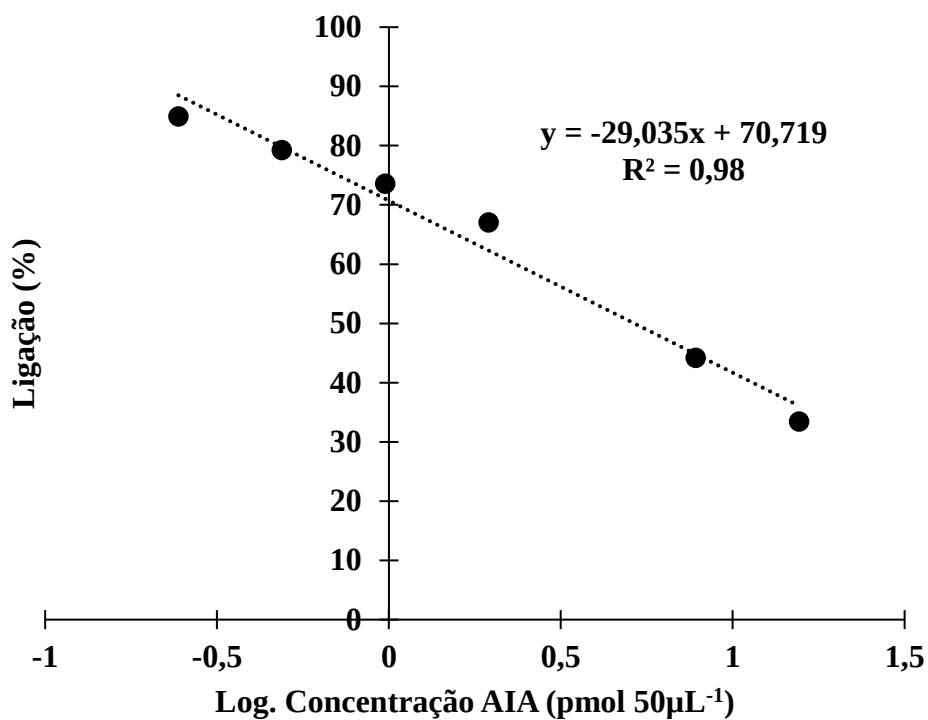
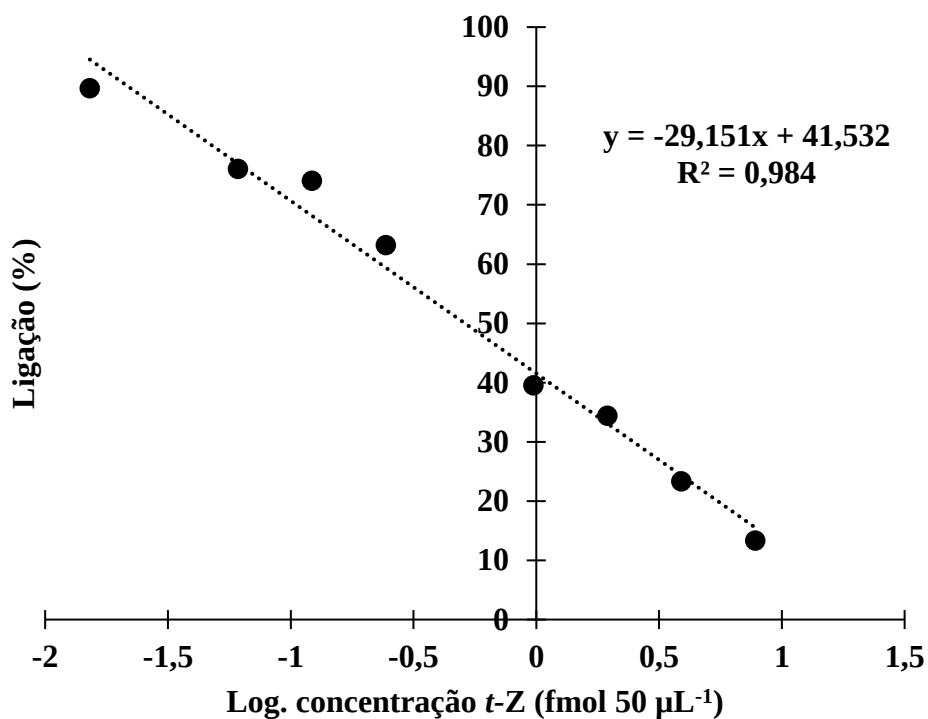
Figura 11 - Curva padrão de ácido 3-indolacético.**Figura 12** - Curva padrão de *trans*-zeatina.

Figura 13 - Amostra de fitohormônios após a extração a partir da biomassa microalgal.

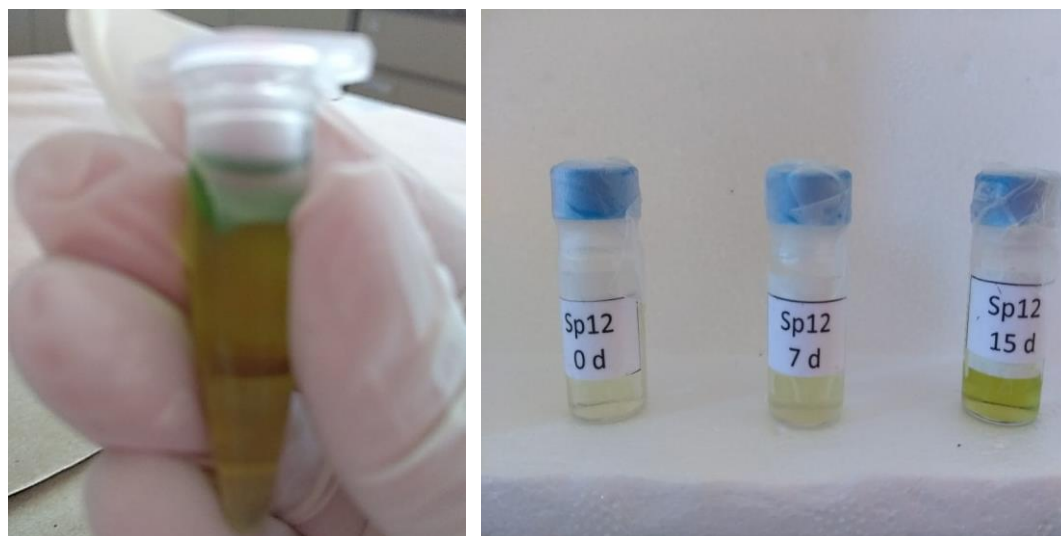


Figura 14 - Concentrações de ficocianina obtidas nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com fotoperíodo 12 h claro/escuro e 24 h claro.

