



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

PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS A PARTIR DO CULTIVO DE *Spirulina* sp.
LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO COM LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO

ENG. BIOQUÍMICA ROBERTA DA COSTA KOSINSKI

Prof^a. Dr^a. Michele Greque de Moraes
Orientadora

Dr^a. Juliana Botelho Moreira
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2020



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

PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS A PARTIR DO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB
18 EM DUPLO ESTÁGIO COM LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO

ENG. BIOQUÍMICA ROBERTA DA COSTA KOSINSKI

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

Prof^a. Dr^a. Michele Greque de Moraes
Orientadora

Dr^a. Juliana Botelho Moreira
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2020

Ficha Catalográfica

K86

Kosinski, Roberta da Costa.

Produção de macromoléculas a partir do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em duplo estágio com limitação de nitrogênio / Roberta da Costa Kosinski. – 2020.

112 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Michele Greque de Moraes.

Coorientadora: Dra. Juliana Botelho Moreira.

1. Biomassa 2. Biorrefinaria 3. Biotecnologia Microalgal
4. Composição Proximal 5. Limitação de Nitrogênio 6. PHB I. Moraes, Michele Greque de II. Moreira, Juliana Botelho III. Título.

CDU 338.45

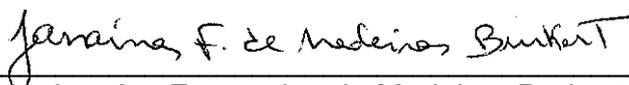
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

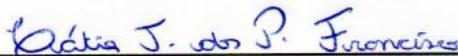
Dissertação defendida por Roberta da Costa Kosinski, com orientação da Profa. Dra. Michele Greque de Moraes e co-orientação da Dra. Juliana Botelho Moreira e aprovada em 22 de junho de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



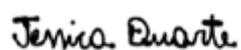
Profa. Dra. Michele Greque de Moraes - FURG



Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco – UFFS



Dra. Jéssica Hartwig Duarte – Western University

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele não teria chegado até aqui. Agradeço por me dar forças para completar mais esta etapa, por estar sempre ao meu lado e ser o meu melhor amigo.

Aos meus pais, Dayse e Oberdan, que sempre me apoiaram. Não há palavras suficientes que expressem toda minha gratidão. Obrigada por todo amor e cuidado durante toda vida, pelos ensinamentos e por serem meus exemplos!

Aos meus irmãos, Júnior, Pâmela e Diego, que enchem minha vida de alegria. Obrigada Diego pelas inúmeras vezes que me fez sorrir, obrigada Júnior por me presentear este ano com um lindo sobrinho, e obrigada Pâmela por encher minha vida com tua beleza.

Às minhas amigas, Joceli, Jucilene e Sarah, pelas orações e por sempre terem uma palavra para me abençoar. A amizade de vocês me deu força para sempre seguir em frente.

Aos meus amigos, Leandro e Regiani, por me proporcionarem momentos de descontração e diversão. Vocês preencheram minha vida quando mais precisei.

À Allana, que me ajudou muito nas análises do segundo artigo, permanecendo até tarde no laboratório comigo. Muito obrigada!

Ao Vagner, por ser um ótimo amigo que mesmo distante sempre me ajudou!

À Cariany, minha IC, pelas horas de trabalho disponibilizadas e amizade.

A minha coorientadora, Juliana, pela amizade, incentivo e inúmeras horas dedicadas na correção deste trabalho. Agradeço por sempre estar disposta a me ajudar. Você é maravilhosa!

À minha orientadora, Prof. Michele Morais, pela excelente orientação. Te admiro como profissional e aprendi muito com você. Só tenho a te agradecer por ter sido tão boa para mim.

Ao Prof. Jorge Alberto Vieira Costa, por disponibilizar o Laboratório de Engenharia Bioquímica-LEB para a realização deste trabalho.

Aos colegas do MIBI e LEB, que de boa vontade explicavam minhas dúvidas, mesmo as mais óbvias.

À Prof.^a Eliana Furlong, Thaisa Duarte, Jéssica Duarte, Prof.^a Janaína Burkert e Prof.^a Cátia Passos pelas correções e sugestões que contribuíram para a elaboração desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Federal do Rio Grande, pelo ensino público e de qualidade.

RESUMO

As microalgas viabilizam o desenvolvimento de novos produtos a partir da síntese de macromoléculas aplicadas no setor alimentício, farmacêutico e de cosméticos. Quando a microalga é submetida a condições de estresse pode acumular lipídios, carboidratos e biopolímeros. Esta produção pode ser elevada pela realização do cultivo em duplo estágio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estratégia de duplo estágio em cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 visando elevadas produtividades de biomassa e macromoléculas. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores fechados do tipo tubular de 2 L, utilizando a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com 0,5 g L⁻¹ de concentração inicial de biomassa. Os cultivos foram realizados a 30 °C em câmara termostatizada, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e luminosidade de 41,6 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata por 20 d, com cultivo em duplo estágio, em que no primeiro estágio foi utilizado o meio Zarrouk modificado, contendo 50% de carbono (NaHCO₃, 8,4 g L⁻¹) e 100% de nitrogênio (NaNO₃, 2,5 g L⁻¹). Após, as células foram lavadas com água estéril por centrifugação para substituição do meio de cultivo. O meio contendo 10% de nitrogênio (NaNO₃, 0,25 g L⁻¹) e 50% de carbono foi adicionado para iniciar o segundo estágio no 5°, 10° ou 15° d de cultivo. Também foi avaliado a adição de meio com ausência de nitrogênio nestas mesmas condições. A cada 5 d foi analisada a composição da biomassa referente aos carboidratos, lipídios, proteínas e PHB. Para os ensaios com meio contendo 10% de nitrogênio, a estratégia do cultivo em duplo estágio proporcionou maior crescimento a microalga, atingindo 2,77 g L⁻¹ no ensaio com redução de nitrogênio no 15° d. O maior teor de carboidratos (0,54 g L⁻¹) foi obtido no cultivo com 10% de nitrogênio no 10° ou 15° d, cultivado por 20 d, e a maior concentração de lipídios (0,62 g L⁻¹) produzida no ensaio com redução de nitrogênio no 5° d, por 15 d. O maior teor proteico (1,60 g L⁻¹) foi obtido no ensaio com redução de nitrogênio no 15° d, cultivado por 20 d. A síntese de PHB foi influenciada pela disponibilidade de nitrogênio no meio, atingindo 0,39 g L⁻¹ no 20° d do ensaio com redução de nitrogênio no 5° d. Para os ensaios com ausência de nitrogênio no segundo estágio, a maior concentração de biomassa (3,1 g L⁻¹) foi obtida no ensaio sem nitrogênio a partir do 15° d. A melhor condição para produção de carboidratos (0,84 g L⁻¹) foi o cultivo com ausência de nitrogênio no 10° d, por 20 d, enquanto que, o maior rendimento de proteínas (1,6 g L⁻¹) e lipídios (0,66 g L⁻¹) foi obtido no ensaio com restrição de nitrogênio no 15° d, cultivado por 15 e 20 d, respectivamente. Portanto, a estratégia de duplo estágio aliada a redução da fonte de nitrogênio maximiza o crescimento microalgal e a composição da biomassa, promovendo maior produção de macromoléculas.

Palavras-chave: Biomassa. Biorrefinaria. Biotecnologia microalgal. Composição proximal. Limitação de nitrogênio. PHB.

PRODUCTION OF MACROMOLECULES FROM THE CULTIVATION OF *Spirulina* sp. LEB 18 IN TWO-STAGE WITH NITROGEN LIMITATION

ABSTRACT

The microalgae enable the development of new products from the synthesis of macromolecules applied in the food, pharmaceutical and cosmetics sector. When the microalgae are subjected to stressful conditions, it can accumulate proteins, lipids, carbohydrates, and biopolymers. This production can be optimized by carrying out the two-stage cultivation. Thus, the objective of this work was to evaluate the dual stage strategy in cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 aiming at high productivity of biomass and macromolecules. The experiments were performed in tubular photobioreactors (working volume of 1.6 L), using *Spirulina* sp. LEB 18 with 0.5 g L⁻¹ of initial biomass concentration. Cultivations were carried out at 30 °C in a thermostatic chamber, 12 h light/dark photoperiod and luminance of 41.6 μmol photons m⁻² s⁻¹. The cultivations were maintained in triplicate for 20 d, in two-stage, which in the first stage was used the modified Zarrouk medium, containing 50% carbon (NaHCO₃, 8.4 g L⁻¹) and 100% nitrogen (NaNO₃, 2.5 g L⁻¹). Therefore, the cells were washed with sterile water and centrifugated to replace the culture medium. The culture medium containing 10% nitrogen (NaNO₃, 0.25 g L⁻¹) and 50% carbon was added to start the second stage at the 5th, 10th or 15th d of cultivation. The addition of nitrogen-free medium was also evaluated under these same conditions. Every 5 d, the biomass composition of carbohydrates, lipids, proteins, and PHB was analyzed. For the experiments with culture medium containing 10% nitrogen, the two-stage cultivation strategy provided greater microalga growth, reaching 2.77 g L⁻¹ in the assay with nitrogen reduction in the 15th d. The highest carbohydrate content (0.54 g L⁻¹) was obtained in double stage cultivation with 10% nitrogen in the 10th or 15th d, cultivated for 20 d, and the highest concentration of lipids (0.62 g L⁻¹) produced in the test with nitrogen reduction in the 5th d, for 15 d. The highest concentration of proteins (1.60 g L⁻¹) was obtained in the assay with nitrogen reduction in the 15th d, cultivated for 20 d. PHB synthesis was influenced by the availability of nitrogen in the medium, reaching 0.39 g L⁻¹ on the 20th d of the assay with nitrogen reduction on the 5th d. For tests with no nitrogen in the second stage, the highest concentration of biomass (3.1 g L⁻¹) was obtained in the second stage of the test without the nitrogen source from the 15th d. The best condition for carbohydrate production (0.84 g L⁻¹) was cultivation with no nitrogen in the 10th d, for 20 d, whereas, the highest yield of proteins (1.6 g L⁻¹) and lipids (0.66 g L⁻¹) was obtained in the assay with nitrogen restriction in the 15th d, cultivated for 15 and 20 d, respectively. Therefore, the two-stage strategy combined with the reduction of the nitrogen source optimizes microalgal growth and biomass composition, promoting greater production of macromolecules.

Keywords: Biomass. Biorefinery. Microalgal biotechnology. Nitrogen limitation. PHB. Proximal composition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m m ⁻¹	Concentração percentual em massa
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
NADPH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato
NaNO ₃	Nitrato de sódio
<i>p</i>	Nível de significância
pH	Potencial hidrogênio iônico
PHB	Polihidroxibutirato
P _{máx}	Máximo valor de produtividade volumétrica de biomassa
ppm	Partes por milhão
<i>t</i>	Tempo
<i>t</i> ₀	Tempo inicial
<i>t</i> _g	Tempo de geração
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
<i>X</i>	Concentração de biomassa
<i>X</i> ₀	Concentração de biomassa inicial
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Síntese de PHB por micro-organismos em cultivo com diferentes fontes de carbono.....	36
--	----

CAPÍTULO III

3.1 CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO COM REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Tabela 1 – Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$, g L ⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d ⁻¹) e tempo de geração (t_g , d) da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO ₃ no meio.....	54
---	----

Tabela 2 – Composição da biomassa (%) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO ₃ no meio.....	58
---	----

3.2 PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO PARA ESTIMULAR ELEVADA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$, g L ⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d ⁻¹) e tempo de geração (t_g , d) da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO ₃ no meio.....	76
---	----

Tabela 2 – Composição da biomassa (%) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO ₃ no meio.....	79
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 – Cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 realizados em fotobiorreatores tubulares verticais.....	26
Figura 2 – Vias metabólicas participantes da biossíntese lipídica de microalgas eucarióticas exibidas em preto e suas respectivas enzimas em vermelho.....	30
Figura 3 – Metabolismo de microalgas eucarióticas, exibindo (h) cloroplasto, (t) tilacóide lúmen, (v) vacúolo, (m) mitocôndria, (g) glioxissomo e (c) citosol.....	32
Figura 4 – Ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com cadeias laterais distintas (grupos R)	33
Figura 5 – Células da bactéria <i>Azotobacter chroococcum</i> contendo grânulos de polímero biodegradável.....	34
Figura 6 – Estrutura química do PHB.....	35
Figura 7 – Via sintética responsável pela produção de PHB por <i>Spirulina</i>	37
Figura 8 – Cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com meio de cultura contendo 100% e ausência de nitrogênio, respectivamente.....	38

CAPÍTULO III

3.1 CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO COM REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Figura 1 – Representação dos experimentos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com (—) 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), (---) 10% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO ₃ no meio.....	49
Figura 2 – Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com (○) 100% de NaNO ₃ em único estágio, (□) 10% de NaNO ₃ em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com 10% de NaNO ₃ no meio.....	52
Figura 3 – Produtividade volumétrica de biomassa (a), pH (b) e concentração de nitrogênio (c) dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 realizados com (○) 100% de NaNO ₃ em único estágio, (□) 10% de NaNO ₃ em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com 10% de NaNO ₃ no meio.....	56

3.2 PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO PARA ESTIMULAR ELEVADA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Figura 1 - Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com (○) 100% de NaNO ₃ em único estágio, (□) ausência de NaNO ₃ em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com ausência de NaNO ₃ no meio.....	75
Figura 2 – Produtividade volumétrica de biomassa (a), pH (b) e concentração de nitrogênio (c) dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 realizados com (○) 100% de NaNO ₃ em único estágio, (□) ausência de NaNO ₃ em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com ausência de NaNO ₃ no meio.....	77

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão de biomassa <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	105
APÊNDICE 2 - Curva padrão de albumina para determinação de proteínas.....	105
APÊNDICE 3 - Curva padrão de glicose para determinação de carboidratos.....	106
APÊNDICE 4 - Curva padrão de poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol% HB e 12 mol% HV (Sigma Aldrich).....	106
APÊNDICE 5 – Composição da biomassa (g L ⁻¹) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO ₃ no meio.....	107
APÊNDICE 6 - Cromatograma da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 5,1 (3HV).....	108
APÊNDICE 7 – Composição da biomassa (g L ⁻¹) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO ₃ em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO ₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO ₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO ₃ no meio.....	109

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Objetivo geral.....	22
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO II.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 MICROALGAS.....	25
2.2 CULTIVO DE MICROALGAS.....	26
2.3 BIORREFINARIA DE MICROALGAS.....	28
2.4 MACROMOLÉCULAS OBTIDAS A PARTIR DE MICROALGAS.....	29
2.4.1 Lipídios.....	29
2.4.2 Carboidratos.....	31
2.4.3 Proteínas.....	33
2.4.4 Polímeros.....	34
2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS.....	37
2.5.1 Nutrientes e parâmetros de cultivo.....	37
2.5.2 Estratégia de cultivo em duplo estágio.....	39
CAPÍTULO III.....	41
3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	43
3.1 CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO COM REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE CELULAR E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS.....	45
3.1.1 Introdução.....	47
3.1.2 Material e métodos.....	48
3.1.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo.....	48
3.1.2.2 Determinações analíticas e parâmetros cinéticos.....	49
3.1.2.3 Análise de nitrogênio.....	50
3.1.2.4 Composição proximal da biomassa microalgal.....	50
3.1.2.5 Quantificação e rendimento de PHB na biomassa.....	50
3.1.2.6 Análise estatística.....	51
3.1.3 Resultados e discussão.....	51
3.1.3.1 Crescimento microalgal e parâmetros cinéticos.....	51
3.1.3.2 Produção de macromoléculas.....	57
3.1.4 Conclusão.....	64
Referências.....	64
3.2 PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO PARA ESTIMULAR ELEVADA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS.....	69
3.2.1 Introdução.....	71
3.2.2 Material e métodos.....	72
3.2.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo.....	72
3.2.2.2 Determinações analíticas e parâmetros cinéticos.....	72
3.2.2.3 Análise de nitrogênio.....	73
3.2.2.4 Composição proximal da biomassa microalgal.....	73
3.2.2.5 Análise estatística.....	74
3.2.3 Resultados e discussão.....	74

3.2.3.1 Crescimento microalgal e parâmetros cinéticos.....	74
3.2.3.2 Síntese de macromoléculas.....	78
3.2.4 Conclusão.....	82
Referências.....	82
CAPÍTULO IV.....	85
CONCLUSÃO GERAL.....	87
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
CAPÍTULO V.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
CAPÍTULO VI.....	103
APÊNDICES.....	105

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As microalgas viabilizam o desenvolvimento de novos produtos a partir da síntese de compostos de interesse para aplicações industriais. Estes micro-organismos, produtores de lipídios e carboidratos, são considerados fonte potencial para a produção de biocombustíveis, e apresentam elevada eficiência fotossintética, alta taxa de crescimento celular, capacidade para cultivo em larga escala e não competem com alimentos em áreas agrícolas (NARALA et al., 2016). Contudo, aumentar o teor de lipídios e carboidratos em microalgas sem reduzir a produção de biomassa é um desafio para melhorar a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis oriundos deste micro-organismo (AZIZ et al., 2020).

Além de lipídios e carboidratos, as microalgas sintetizam outras macromoléculas de importância, como polímeros e proteínas. As proteínas podem ser aplicadas no setor alimentício, a fim de contribuir no valor nutricional dos alimentos. O nitrogênio quando assimilado pelas microalgas contribui para o crescimento celular, e seu excesso geralmente é empregado para síntese de proteínas. A capacidade das microalgas em armazenar nitrogênio possibilita a multiplicação celular deste micro-organismo mesmo em meios de cultura contendo reduzidas concentrações de minerais (CASTRO et al., 2015).

Os polímeros derivados de microalgas são potenciais substitutos aos plásticos de origem petroquímica, uma vez que possuem propriedades semelhantes e rápida degradação. Estima-se que os plásticos de origem petroquímica ocasionem mundialmente cerca de 1 milhão de mortes de animais por ano, incluindo desde aves à mamíferos. Com isso, os biopolímeros colaboram para a redução da poluição ambiental causada pelo descarte inadequado de plásticos. Desta forma, destaca-se o polihidroxibutirato (PHB), um poliéster biodegradável que pode ser produzido pela microalga *Spirulina* (KAVITHA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016).

As microalgas são consideradas fonte potencial de biomassa e para aumentar esta produção, estes micro-organismos podem ser submetidos a condições de estresse que proporcionem o acúmulo de lipídios, carboidratos e biopolímeros. Para aumentar a síntese destes compostos pelas microalgas, a variação nas concentrações de nitrogênio disponíveis no cultivo microalgal tem sido estudada (BRAGA et al., 2018; COSTA et al., 2018). No entanto, condições de estresse afetam o crescimento microalgal. Assim, elevadas concentrações dessas macromoléculas produzidas em condição de escassez de nutriente estão vinculadas à baixa produtividade de biomassa (HU et al., 2019). A fim de maximizar a produção de biomassa juntamente com acúmulo de macromoléculas de interesse, surge a estratégia de duplo estágio,

que consiste em um modo de cultivo em duas etapas. No primeiro estágio ocorre elevada produtividade de biomassa devido às condições ótimas do meio de cultura e, no segundo estágio ocorre acúmulo de macromoléculas, devido à alteração na concentração de nutrientes específicos, como nitrogênio (NAGAPPAN et al., 2019; NAYAK et al., 2019; RA et al., 2015).

Portanto, sabe-se que alcançar elevada concentração de bioprodutos mantendo alta produtividade de biomassa é um campo importante da pesquisa e necessita ser mais explorado. Para isto, deve-se conciliar as condições ótimas para atingir produtividades máximas de biomassa juntamente com o teor de compostos desejados, uma vez que as condições ideais para maximizar a biomassa as vezes são contraditórias às condições necessárias para aumentar o teor de lipídios, carboidratos, proteínas e PHB. Desta forma, espera-se que a partir da aplicação do cultivo em duas etapas seja possível obter maior produtividade em biomassa seguido de maior concentração de macromoléculas. Esta é a principal vantagem do duplo estágio, uma vez que, é importante obter elevadas concentrações dos bioprodutos de interesse e alta produtividade de biomassa para aplicação em bioprocessos (NAYAK et al., 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estratégia de duplo estágio em cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 visando elevadas produtividades de biomassa e macromoléculas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em duplo estágio com redução de nitrogênio em diferentes dias de cultivo;
- Verificar a influência da redução da fonte nitrogenada em diferentes dias de cultivo, em duplo estágio para síntese de carboidratos, lipídios, proteínas e PHB;
- Avaliar a produção de carboidratos, lipídios, proteínas e PHB ao longo dos cultivos realizados em duplo estágio;
- Definir o melhor estágio do cultivo para obter alta produtividade de biomassa e produção de proteínas, lipídios, carboidratos e PHB.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são micro-organismos unicelulares e predominantemente aquáticos, que podem ser procariontes ou eucariontes de acordo com sua estrutura. Estes micro-organismos apresentam alta taxa de crescimento e não dependem de terras aráveis para o cultivo (ENDRES; ROTH; BRÜCK, 2018). Além disso, as microalgas favorecem a redução do principal gás causador do efeito estufa (CO₂), pois são capazes de realizar a fixação deste gás, que é liberado pelos veículos e indústrias (BRAGA et al., 2018). Este processo utiliza o carbono do CO₂ para síntese de biomassa, ocorrendo na etapa química da fotossíntese, na qual utiliza indiretamente a energia solar, na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) produzidos na etapa fotoquímica (CAMPBELL; FARREL, 2006).

Há grande interesse pelas microalgas como matéria-prima para obtenção de produtos de valor agregado, como biopolímeros, lipídios, ficocianina, proteínas e carboidratos (KHANRA et al., 2018). Estes produtos são aplicados principalmente nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica. Os biopolímeros podem ser utilizados como alternativa aos polímeros derivados do petróleo (SILVA; COSTA; MORAIS, 2018), enquanto os lipídios obtidos da microalga podem ser destinados à produção de biodiesel (COSTA; MORAIS, 2011). A ficocianina pode ser utilizada como corante natural em razão da cor azul, sendo aplicada principalmente nas indústrias alimentícia e cosmética (KHANRA et al., 2018). As proteínas podem ser hidrolisadas a peptídeos bioativos para aplicação no setor de saúde e alimentício (LUPATINI, 2016), enquanto que os carboidratos obtidos de microalgas podem ser convertidos em açúcares fermentáveis para produção de bioetanol (KHAN et al., 2018).

Spirulina é uma microalga filamentosa que apresenta alta taxa de crescimento e adaptação ao meio de cultura, sendo possível o controle das condições de cultivo para produção de biocompostos. Este micro-organismo possui tricomas cilíndricos multicelulares em forma helicoidal em hélice aberta (JESÚS et al., 2018, ZHU et al., 2018). O avanço da biotecnologia permitiu a expansão na produção mundial de *Spirulina*, possibilitando o seu cultivo em larga escala e conseqüentemente, gerando alta produtividade (ZHU et al., 2018). Além disso, este micro-organismo dispõe de alta taxa de fixação de CO₂ por meio da fotossíntese e rápida produção de compostos, podendo utilizar o carbono do CO₂ em diferentes rotas metabólicas (KAVITHA et al., 2016).

A microalga *Spirulina* possui alta concentração de proteínas, podendo alcançar 63% do seu peso seco, destacando-se entre alimentos como carne e soja, que possuem cerca de 22% e 30%, respectivamente. Esta microalga possui 20% de ficocianina na fração proteica, além de conter ácidos graxos essenciais, linoleico e γ -linolênico na fração lipídica. Desta forma, torna-se possível sua adição em alimentos, suplementos e rações (LUPATINI, 2016). Em relação a isto, pode-se afirmar que a *Spirulina* é classificada como micro-organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), quando cultivada sob condições adequadas, o que indica a ausência de toxicidade e patogenicidade (WU et al., 2016).

2.2 CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo microalgal pode ser realizado em sistemas aberto e fechado. Nos reatores fechados é possível obter maior controle de parâmetros de cultivo, como pH, iluminação e temperatura, alcançando maior rendimento de biomassa. Os fotobiorreatores mais utilizados são os tubulares, placas planas, coluna *airlift* e tanque agitado (ENDRES; ROTH; BRÜCK, 2018; MAGRO et al., 2016). Os fotobiorreatores do tipo tubulares apresentam vantagens em sua utilização, como elevada superfície de iluminação, baixo custo, melhor solubilização de CO₂, baixos níveis de contaminação, esterilidade do processo e alta produtividade de biomassa (GUIMARÃES, 2012). Estes reatores consistem em tubos transparentes que geralmente são produzidos com plástico, acrílico ou vidro, podendo ser horizontais, inclinados ou verticais, como mostrado na Figura 1 (SLEGGERS et al., 2013).

Figura 1 - Cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 realizados em fotobiorreatores tubulares verticais.



Os reatores tubulares utilizam luz artificial ou natural, na qual a intensidade da luz é elevada em toda superfície do tubular, facilitando a absorção de luz pelo micro-organismo fotossintetizante (MOROCHO-JÁCOME et al., 2012). Os cultivos de microalgas com concentração de biomassa acima de 1 g L^{-1} tendem a passar pela fotolimitação, que consiste no efeito de sombreamento provocado pelo crescimento das células, na qual impede que parte da cultura absorva luz. Assim, a luz é absorvida somente por uma fina camada de células nos biorreatores. Para *Spirulina*, a concentração celular ideal para que a máxima eficiência fotossintética seja atingida é de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ a $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ (MORAIS et al., 2009).

Segundo Metsoviti et al. (2020) a intensidade da luz pode influenciar a produção de biomassa, lipídios e proteínas. Os autores investigaram a intensidade de radiação solar no cultivo aberto de *Chlorella vulgaris* e de irradiação artificial (420 a 520 nm / 580 a 680 nm) fornecida por lâmpadas LED vermelhas e brancas em fotobiorreator fechado. A partir dos resultados obtidos, verificaram que a taxa de multiplicação celular e produção de lipídios aumentaram conforme o aumento da irradiação em cultivo aberto. No fotobiorreator fechado houve aumento da taxa de multiplicação celular e produção de biomassa, proteínas e lipídios.

A injeção de ar por meio de bomba na parte inferior do tubular é muito utilizada em fotobiorreatores verticais, pois este processo de circulação mantém o meio homogêneo e permite que todas as células fiquem em suspensão e recebam iluminação similar, impedindo sua decantação (MAGRO et al., 2016). O CO_2 pode ser injetado juntamente com o ar, possibilitando sua adequada solubilização. Além do sistema de circulação celular, o crescimento de micro-organismos fotossintéticos em fotobiorreatores tubulares também depende do tamanho dos tubos, mistura de cultura (GUIMARÃES, 2012) e nutrientes necessários à microalga, como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro, cobre, molibdênio e zinco (MAGRO et al., 2016).

O carbono é um dos elementos mais importantes para o desenvolvimento da *Spirulina*, uma vez que está diretamente ligado a síntese de carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, proteínas e lipídios. Consequentemente, a biomassa microalgal contém alta concentração de carbono, alcançando até 50% da massa seca. Em cultivo de microalga a fonte de carbono mais utilizada é o bicarbonato, sendo convertido em CO_2 . Este CO_2 é utilizado no processo de fotossíntese, na qual será convertido em carbonato. Quando o carbonato é liberado no meio, há aumento no pH do cultivo microalgal (MAGRO et al., 2016).

Entre 2011 e 2012, o Brasil emitiu cerca de 17,1 bilhões de kg de CO_2 por meio da fermentação alcoólica, quantidade suficiente para produzir em torno de 9,3 bilhões de kg de

biomassa fotossintética anualmente (MOROCHO-JÁCOME et al., 2015). Devido ao crescente aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, estima-se que até 2020 serão liberados 3.236 milhões de toneladas de CO₂. Assim, o aproveitamento de resíduo gasoso (CO₂) no cultivo microalgal contribui na redução da poluição ambiental (BRAGA et al., 2018). Além disso, a suplementação de CO₂ no meio de cultivo da *Spirulina* promove maior eficiência fotossintética, e consequentemente, maior taxa de crescimento (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Outro parâmetro importante no cultivo microalgal é a temperatura, pois influencia na taxa metabólica celular, interferindo na síntese de biomassa. A taxa de crescimento da microalga aumenta com a elevação da temperatura, até que um nível ótimo seja atingido (MAGRO et al., 2016). O pH também afeta a taxa de crescimento das microalgas, como a *Spirulina* que sobrevive em ambientes altamente alcalinos com pH entre 8 e 11 (MEYER, 2016). Valores altos de pH no cultivo promovem maior produtividade das espécies em estudo, evitando contaminação por meio do crescimento de micro-organismos indesejados (NAGAPPAN et al., 2019). De acordo com Ismaiel; El-Ayouty; Piercey-Normore (2016), o pH pode afetar a produtividade e atividade antioxidante das microalgas. Neste estudo, *Spirulina platensis* apresentou maior teor de clorofila e carotenoides (0,01 e 0,002 g g⁻¹, respectivamente) em pH 8,5, maior produção de biomassa, aumento de 567% nas atividades antioxidantes e síntese de ficobiliproteínas (0,16 g g⁻¹) em pH 9,0 e maior teor fenólico (0,01 g de ácido gálico equivalente (GAE) g⁻¹) em pH 9,5.

2.3 BIORREFINARIA DE MICROALGAS

O conceito de biorrefinaria pode ser descrito como o processo de conversão de biomassa em produtos de alto valor agregado por meio da extração em fracionamento de compostos destinados a produção de biocombustíveis, produtos químicos, cosméticos, e alimentos para humanos e animais. Pode-se dizer que uma biorrefinaria de microalgas é similar as refinarias de petróleo, sendo que os compostos obtidos das frações são proteínas, lipídios, carboidratos, polímeros, pigmentos, entre outros (PARIMI et al., 2015; VISCONTE et al., 2019).

As biorrefinarias são influenciadas pelas cepas de microalgas, nutrientes como nitrogênio e fósforo, suprimento da fonte de carbono e iluminação. Estes fatores estão diretamente relacionados ao crescimento das microalgas. Para fins de aplicações médicas ou farmacêuticas, as condições de cultivo devem ser controladas para que não ocorra aparecimento de impurezas e contaminações microbiológicas. Neste caso, os reatores fechados são mais

adequados devido a apresentarem maior controle da temperatura, pH e concentração de CO₂. Diversos produtos são obtidos a partir das biorrefinarias, uma vez que elas podem ser construídas em escala industrial. Além disso, por meio delas é possível alcançar a redução da emissão de gases de efeito estufa, quando são aplicadas como alternativa as refinarias de petróleo (CHEW et al., 2017).

As técnicas de biorrefinaria são importantes para separar as frações sem que haja danos físicos e químicos aos produtos. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias de ruptura, extração, separação e purificação de compostos torna-se essencial para manter a qualidade final do produto (CHEW et al., 2017). Estas tecnologias devem ser adequadas conforme a espécie de microalga utilizada. Geralmente, executa-se a ruptura celular, para depois realizar a extração e divisão das diferentes frações de proteínas, lipídios e carboidratos. Em seguida, realiza-se uma separação complementar das frações para obter produtos específicos, como por exemplo, os ácidos graxos saturados (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

2.4 MACROMOLÉCULAS OBTIDAS A PARTIR DE MICROALGAS

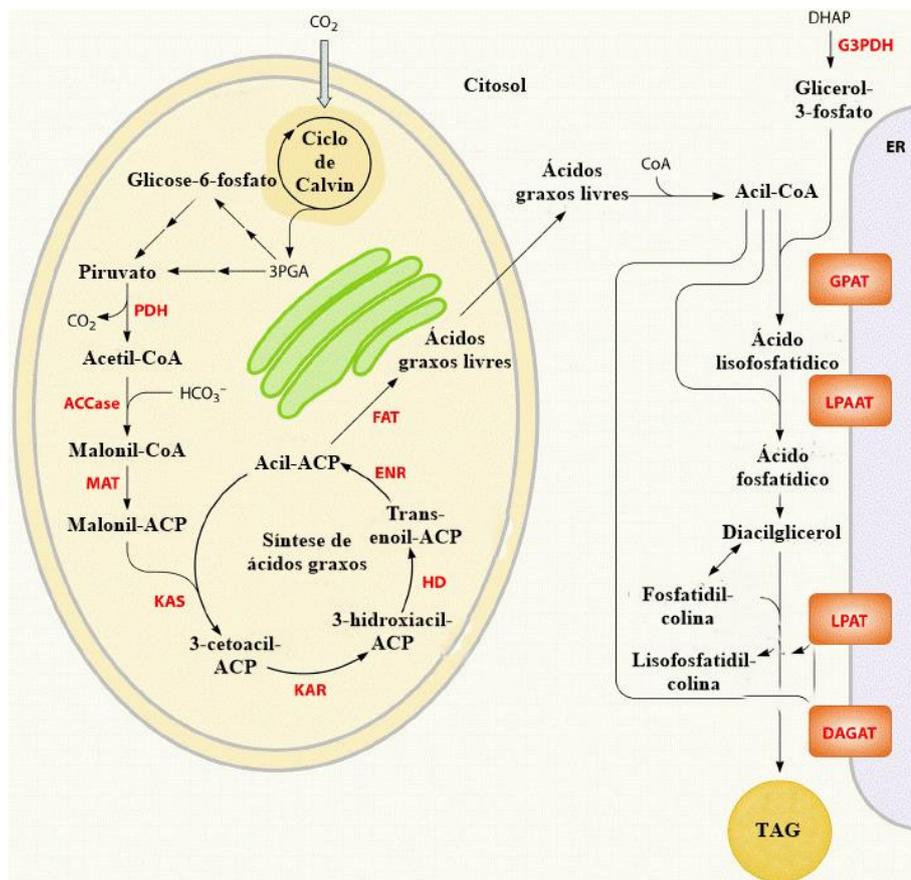
2.4.1 Lipídios

Os lipídios podem ser acumulados em até 50% (m m⁻¹) em microalgas, sendo sua concentração influenciada pelas condições de cultivo, como a quantidade de nutrientes presentes no meio. Diversos parâmetros de estresse podem promover o acúmulo de lipídios nas células microalgais, como alteração no pH, temperatura elevada, alta concentração de sais e limitação de nitrogênio. O aumento da produção de lipídios e seu respectivo acúmulo por meio da redução de nitrogênio ocorre conforme a concentração deste nutriente no meio se aproxima ao esgotamento. Os lipídios encontrados na biomassa microalgal podem ser classificados como polares e neutros. Lipídios neutros incluem mono, di e triglicerídeos, ceras e isoprenoides, enquanto que lipídios polares incluem fosfolipídios e glicolipídios (CHEW et al., 2017). Os lipídios obtidos da microalga podem ser matéria-prima para o setor energético e alimentício, podendo ser convertidos em biodiesel (COSTA; MORAIS, 2011), ou aplicados na área nutracêutica, como óleos essenciais e compostos funcionais, sendo os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 de maior interesse (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Diversas vias metabólicas estão vinculadas a síntese de lipídios devido à diversidade das moléculas lipídicas. Os ácidos graxos livres são sintetizados no cloroplasto,

enquanto os triacilgliceróis (TAGs) podem ser produzidos no retículo endoplasmático (ER), conforme a Figura 2, onde diacilglicerol aciltransferase (DAGAT); fosfato de dihidroxiacetona (DHAP); glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH); glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT); 3-hidroxiacil ACP desidratase (HD); 3-cetoacil-ACP redutase (KAR); 3-cetoacil-ACP sintase (KAS); aciltransferase de ácido liso-fosfatídico (LPAAT); liso-fosfatidilcolina-aciltransferase (LPAT); malonil-CoA: transacilase ACP (MAT); complexo de piruvato desidrogenase (PDH). (RADAKOVITS et al., 2010).

Figura 2 – Vias metabólicas participantes da biossíntese lipídica de microalgas eucarióticas exibidas em preto e suas respectivas enzimas em vermelho.



Fonte: Radakovits et al. (2010).

A síntese de lipídios utiliza como substrato inicial a molécula de acetil-CoA. Para obter esta molécula, alguns processos metabólicos devem ocorrer no interior da célula. Primeiramente, as microalgas fixam CO_2 e o convertem em 3-fosfoglicerato por meio da fotossíntese. A partir da 3-fosfoglicerato são produzidas moléculas de piruvato pela via metabólica da glicólise, e posteriormente, devido as reações de descarboxilação catalisadas pela enzima piruvato desidrogenase, forma-se a molécula de acetil-CoA. A via metabólica da síntese

de novos ácidos graxos inicia com a reação de conversão da acetil-CoA em malonil-CoA pelo complexo de enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase). Após, o grupo malonil é transferido da coenzima-A (CoA) para um co-fator proteico, o ACP. Em seguida, o acetil-CoA é condensado e forma o grupo acetoacetil-ACP, que é reduzido a D-beta-hidroxiacetil-ACP. Esta molécula é submetida a desidratação para liberar uma dupla ligação no produto trans-(Δ)²-butenoil-ACP, que é reduzido pela atuação da enoil-ACP redutase (ENR) gerando o butiril-ACP. A síntese de ácidos graxos é finalizada quando o grupo acilo é removido do ACP por uma acil-ACP tioesterase (FAT), que hidrolisa os acil-ACP e libera ácidos graxos livres (RAN et al., 2019).

A partir dos ácidos graxos produzidos, as microalgas podem acumular triglicerídeos. O L- α -fosfoglicerol é obtido da fosfohidroxiacetona, um produto gerado na glicólise. O hidroxilo do L- α -fosfoglicerol reage com o acetil-CoA para formar o ácido lisofosfatídico e após, se combina com outro acetil-CoA para formar o ácido fosfatídico. Nas etapas seguintes, este ácido é hidrolisado gerando um diglicerídeo, que em seguida é condensado com um terceiro acetil-CoA para completar a biossíntese de triglicerídeos (RAN et al., 2019).

2.4.2 Carboidratos

Os carboidratos produzidos pelas microalgas apresentam as funções estrutural, onde atuam como componentes na parede celular e, e de armazenamento de energia, em que fornecem energia essencial para as rotas metabólicas dos micro-organismos e permitem a sobrevivência temporária dos mesmos em condições de escassez de nutrientes. As microalgas podem atingir cerca de 50% ($m\ m^{-1}$) de carboidratos, o que facilita sua aplicação no setor industrial. Os carboidratos obtidos destes micro-organismos são glicose, amido, celulose e diversos tipos de polissacarídeos. A glicose e o amido são utilizados principalmente para a produção de biocombustíveis, enquanto que os polissacarídeos são aplicados como aditivos em cosméticos, compostos alimentares e agentes terapêuticos naturais (CHEW et al., 2017).

A síntese de carboidratos pelas microalgas ocorre por meio da fotossíntese. A fotossíntese é a principal rota de fixação de carbono pelas microalgas, porém depende de fatores internos e externos. Os fatores internos são a espécie da microalga e estágio de crescimento celular. Os parâmetros externos incluem níveis de oxigênio, carbono inorgânico disponível, nutrientes, pH, temperatura e luminosidade. Estes fatores controlam a quantidade e atividade das enzimas responsáveis pela fotossíntese e biofixação de CO₂ (MORAIS, 2006). As

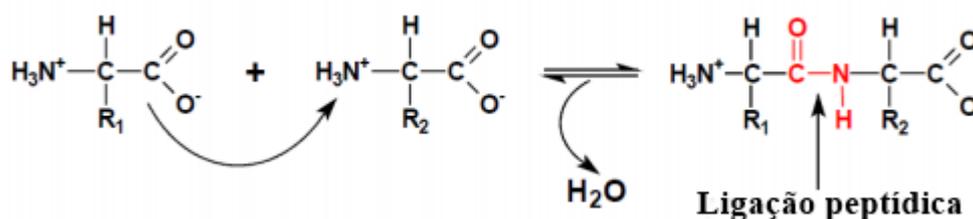
carboidratos, que ocorre no cloroplasto de microalgas eucariontes e no citosol de microalgas procariontes (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

2.4.3 Proteínas

As proteínas atingem cerca de 50 a 70% da composição das microalgas, sendo consideradas um dos componentes mais importantes das biorrefinarias. A partir dessas macromoléculas produtos com diferentes atividades biológicas são formados, como hormônios, anticorpos, enzimas, transportadores e fibras musculares (CHEW et al., 2017). Comparada as fontes proteicas convencionais, como farinha de soja, ovos e carnes, as microalgas apresentam altos níveis nutricionais, pois produzem proteínas em elevadas concentrações, sendo o cultivo microalgal uma das estratégias mais eficientes para obtenção de proteínas. As microalgas produzem de 2,5 a 7,5 ton/Ha/ano de proteínas (KHAN et al, 2018; PARIMI et al., 2015).

As proteínas são formadas por 21 aminoácidos, no entanto, podem apresentar ausência de uma ou mais destas unidades. A presença e quantidade de aminoácidos indicam a qualidade das proteínas, assim como a sequência de aminoácidos determina as variedades estruturais e funcionais destas macromoléculas (LUPATINI, 2016). Por meio das diferentes sequências de aminoácidos e do comprimento da cadeia polipeptídica, torna-se possível a síntese de diversas proteínas com propriedades únicas. As proteínas são constituídas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Estas ligações estabelecem a união do grupo amino (-NH₂) de um aminoácido com o grupo carboxila (-COOH) de outro aminoácido, gerando uma amida (Figura 4) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 4 - Ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com cadeias laterais distintas (grupos R).



Fonte: Damodaran; Parkin; Fennema (2010).

As proteínas extraídas de microalgas apresentam potencial para aplicações médicas, farmacêuticas, nutrição humana e animal (CHEW et al., 2017). As microalgas, como a *Spirulina platensis*, apresentam em sua composição ficobiliproteínas, pigmentos coloridos que atuam

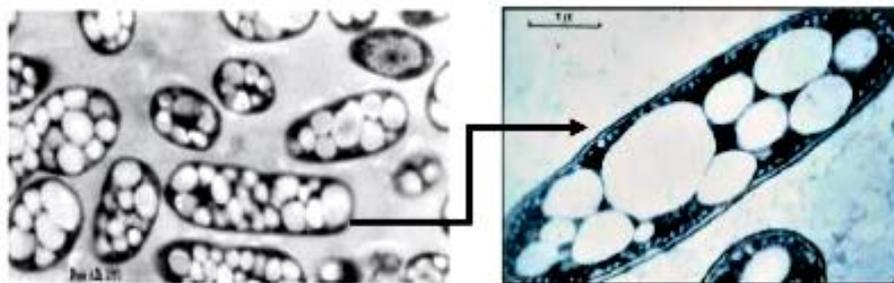
como receptores de luz durante a fotossíntese. Dentre eles, estão a ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina. Devido a coloração azulada, a ficocianina é amplamente aplicada como corante natural nas indústrias de alimentos e cosméticos, sendo uma alternativa aos pigmentos sintéticos. Além disso, apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante e propriedades que previnem cânceres (LUPATINI, 2016).

As proteínas são promissoras no aumento de valor nutricional dos alimentos, possuindo diversos aminoácidos essenciais, o que contribui para sua utilização em alimentos com a finalidade de prevenir doenças. Algumas proteínas possuem efeitos terapêuticos na saúde, sendo fundamentais as células. As proteínas podem ser hidrolisadas a peptídeos bioativos, que atuam como precursores no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos (KHAN et al, 2018; SHABANA et al., 2017). Os peptídeos bioativos apresentam atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antiviral, antiproliferativo, anticoagulante, antidiabética e antiobesidade (LUPATINI, 2016;).

2.4.4 Polímeros

Os materiais mais utilizados para a produção de plásticos são polietileno, polipropileno e policloreto de vinila, que emitem gases causadores do efeito estufa (SINGH et al., 2017). A utilização de plásticos no Brasil ultrapassa 200 milhões de toneladas, aumentando 5% ao ano. Deste volume, mais de 40% é aplicado na produção de embalagens. A baixa degradabilidade dos plásticos faz com que esses materiais permaneçam cerca de 400 anos no ambiente, contribuindo para a poluição ambiental (MASOOD et al., 2018). Assim, destacam-se os biopolímeros, que são uma alternativa aos polímeros sintéticos, pois possuem propriedades poliméricas semelhantes e capacidade de degradação rápida, podendo ser sintetizados por microalgas, fungos e bactérias (Figura 5) (SILVA; COSTA; MORAIS, 2018).

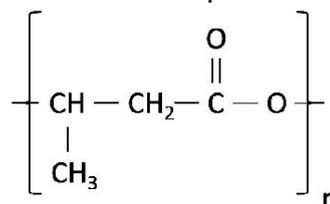
Figura 5 - Células da bactéria *Azotobacter chroococcum* contendo grânulos de polímero biodegradável.



Fonte: Ferreira (2015).

Os biopolímeros, como os polihidroxicanoatos (PHAs), apresentam em sua maioria cadeias lineares constituídas por unidades de ácido hidroxialcanóico. O grupo carboxila deste ácido forma ligação éster com o grupo hidroxila da próxima unidade monomérica. Os PHAs são classificados conforme o comprimento da cadeia, em PHA de cadeia curta, média e longa. O PHB é um PHA de cadeia curta que pode ser utilizado como alternativa aos plásticos petroquímicos devido à sua não toxicidade, pureza óptica, hidrofobicidade, biodegradabilidade e compatibilidade com tecidos (ANSARI; FATMA, 2016; SINGH et al., 2017). Além disso, apresentam propriedades físicas similares aos polímeros sintéticos, como maleabilidade, cristalinidade e barreira luminosa (SILVA; COSTA; MORAIS, 2018). Este polímero natural é um poliéster termoplástico, com 60-70% de cristalinidade, que atua como composto de armazenamento, na qual sua função é a reserva de carbono e energia. O PHB é composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono e grupo alquila metil ligado no radical R, conforme a Figura 6 (KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018).

Figura 6 - Estrutura química do PHB.



Fonte: Santos et al. (2017).

O PHB é produzido em condições de excesso de carbono e estresse, como redução dos nutrientes nitrogênio e fósforo (KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018). Conforme a espécie da microalga produtora, o acúmulo intracelular de PHB pode variar ao longo do cultivo. Segundo estudo realizado por Martins et al. (2017), a microalga *Nostoc ellipsosporum* produziu 19,3% de PHB no 10º d do cultivo contendo meio BG-11, a *Cyanobium* sp. produziu 3.7% de PHB no 5º d do cultivo em meio BG-11, enquanto que a *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em meio Zarrouk produziu 20,6% no 15º d. As microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Nostoc ellipsosporum* apresentam maior acúmulo de PHB durante a fase exponencial. A Tabela 1 apresenta a produção de PHB por diferentes micro-organismos e suas respectivas fontes de carbono.

Tabela 1 - Síntese de PHB por micro-organismos em cultivo com diferentes fontes de carbono.

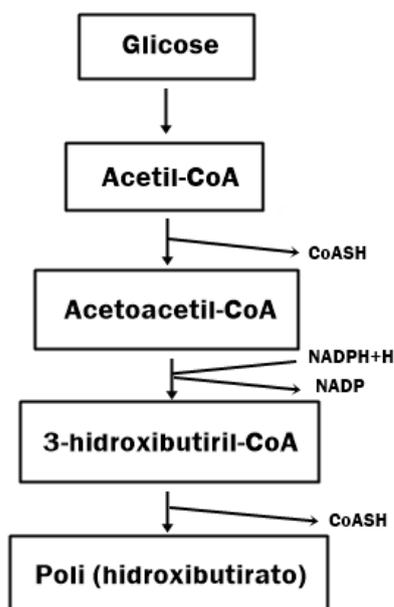
Micro-organismo	Gênero	Fonte de Carbono	PHB (%)	Referências
Bactéria Gram-positiva	<i>Streptomyces sp.</i>	Torta de óleo (resíduo agrícola)	23,0	Sivakumar; Gandhi; Palani, 2017
Bactéria Gram-positiva	<i>Bacillus subtilis</i>	Frutose	87,0	Saranya; Radha, 2014
Bactéria Gram-negativa	<i>Cupriavidus necator</i>	Glicerol (Subproduto do biodiesel)	82,3	Salakkam; We bb, 2018
Microalga	<i>Nostoc muscorum</i>	Glicose	6,4	Ansari; Fatma, 2016
Microalga	<i>Spirulina sp.</i> LEB 18	Resíduos de extração de biopolímeros	10,6	Silva; Costa; Morais, 2018
Microalga	<i>Spirulina sp.</i> LEB 18	Bicarbonato de sódio	44,2	Martins et al., 2014
Microalga	<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	Xilose	17,4	Cassuriaga et al., 2018

Para que ocorra a síntese de PHB por microalgas, é necessário que a célula tenha disponível moléculas de piruvato. O piruvato pode ser produzido por meio da degradação de aminoácidos ou via glicolítica. A glicólise é uma via metabólica que tem por objetivo produzir ATP e fornecer precursores para outras vias metabólicas, como a síntese de lipídios. Este processo anaeróbico ocorre no citosol e a partir de uma molécula de glicose são produzidas 4 moléculas de ATP. No entanto, são gastas 2 moléculas de ATP durante o processo, resultando em 2 moléculas de ATP, 2 moléculas de piruvatos e 2 moléculas de NADH. O piruvato formado no citosol pela glicólise é convertido a acetil-CoA na face interna da membrana plasmática, pela reação de descarboxilação oxidativa. A reação é catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase, ocorrendo redução do NAD^+ a NADH e saída de CO_2 (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

A síntese de PHB pela microalga *Spirulina* envolve reações catalisadas por enzimas (Figura 7). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela ação da enzima β -cetotiolase, originando o acetoacetil-CoA. Em seguida, ocorre a reação catalisada pela enzima PHA-redutase, na qual a molécula de acetoacetil-CoA é hidrogenada, formando o monômero (R)-3-hidroxitiril-CoA. A última reação consiste na

polimerização do (R)-3-hidroxi-butiril-CoA, pela atuação de uma PHA sintase (enzima PHB-polimerase), onde o biopolímero PHB é produzido (SINGH et al., 2017).

Figura 7 - Via sintética responsável pela produção de PHB por *Spirulina*.



Fonte: Adaptado de Balaji, Gopi e Muthuvelan (2013).

O PHB pode ser empregado em embalagens de alimentos, materiais agrícolas e de construção, sacolas, recipientes, produtos sanitários e como anti-incrustante para indústrias navais, equipamentos industriais e oleodutos submarinos. O PHB também é compatível com os tecidos do corpo, e assim, pode ser utilizado na área médica, como suturas cirúrgicas, curativos de feridas, dispositivos oculares, placas ósseas (KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018) e *scaffolds* para regeneração de tecidos (STEFFENS et al., 2014). De acordo com Morais et al. (2015), a utilização do PHB sintetizado pela *Spirulina* sp. LEB 18 no desenvolvimento de nanofibras para aplicação como *scaffolds* melhora as propriedades mecânicas, resultando em maior elasticidade, alongamento e resistência à tração, quando comparado ao PHB comercial.

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

2.5.1 Nutrientes e parâmetros de cultivo

Alterações nos parâmetros do meio de cultivo, como modificação na concentração da fonte de nitrogênio e carbono, influenciam a produção de PHB pelas microalgas. Diversos

nutrientes são limitados para induzir o acúmulo de PHB, como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, nitrogênio, ferro e oxigênio (KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018). Estudos relatam que a síntese de PHB por *Spirulina* é influenciada pela injeção de CO₂ (MOREIRA et al., 2016) e redução de nitrogênio (SILVA; COSTA; MORAIS, 2018).

As fontes de nitrogênio mais utilizadas nos meios de cultivo microalgal são os sais de nitrato, como nitrato de sódio e nitrato de potássio, sais de amônio, como o cloreto de amônio e sulfato de amônio, e ureia. O nitrogênio é um elemento essencial na constituição de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. A concentração destas substâncias é elevada na célula à medida que o suprimento de nitrogênio aumenta no meio de cultivo. No entanto, baixas concentrações de nitrogênio reduzem o teor desses compostos, que são quebrados para serem utilizados como fonte de nitrogênio. Além disso, as clorofilas são produzidas em menor quantidade, resultando na mudança de cor do meio para verde amarelado, enquanto os carotenoides são produzidos em maior concentração (Figura 8) (LISBOA, 2014; MOROCHO-JÁCOME et al., 2015).

A ausência de nitrogênio inibe as rotas sintéticas de aminoácidos, principalmente a reação de conversão do ácido α -cetoglútarico em ácido glutâmico. O ácido glutâmico atua como fator principal nas reações de transaminação. Consequentemente, a utilização de moléculas de NADPH diminui. Este NADPH residual pode ser responsável pelo aumento do acúmulo de PHB intracelular (SINGH et al., 2017).

Figura 8 – Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com meio de cultura contendo 100% e ausência de nitrogênio, respectivamente.



De acordo com Nagappan et al. (2019), o teor de lipídios nas microalgas pode ser elevado por meio do corte de fornecimento de nitrogênio às células, que direciona o carbono para outra rota metabólica, produzindo lipídios e carboidratos, em vez de proteínas. Bertozzini et al. (2014) e Cakmak et al. (2012) relataram redução do teor proteico juntamente com aumento de triglicerídeos após a limitação de nitrogênio no cultivo.

O estresse causado pela limitação de nitrogênio em cultivo microalgal realizado em duas etapas proporciona diversas vantagens, como elevada produtividade de lipídios e carboidratos, propriedades aprimoradas de biodiesel e produção de um alto nível de metabólitos de biorrefinarias. Este estresse pode ser intensificado a partir da alteração dos parâmetros de cultivo, como aumento da luminosidade (NAGAPPAN et al., 2019). Go et al., (2012) estudaram a intensidade luminosa no cultivo de *Tetraselmis suecica*, submetendo esta microalga primeiramente a meio com concentração de nitrato adequada ao crescimento, e em seguida, no segundo estágio à privação de nitrogênio. As intensidades luminosas avaliadas foram 108,9 e 133,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, resultando em aumento do teor lipídico, de 0,01 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ para 0,02 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (7,6% para 17,3%).

2.5.2 Estratégia de cultivo em duplo estágio

Na literatura são relatados diversos estudos sobre a influência da limitação de nutrientes no meio de cultura microalgal para produção de compostos desejados, como os polímeros, porém condições estressantes costumam ter impactos negativos no crescimento de microalgas. Assim, surge a importância na determinação de condições de cultivo que superem esses efeitos negativos, destacando-se a estratégia de duplo estágio (AZIZ et al., 2020). O primeiro estágio envolve condições nutricionais ótimas para crescimento da microalga, resultando no aumento da produção de biomassa. No segundo estágio, ocorre a redução de um nutriente específico, para estimular o acúmulo de lipídios, carboidratos e biopolímeros (MONSHUPANEE; NIMDACH; INCHAROENSAKDI, 2016).

Aziz et al. (2020) relataram que as condições estressantes do segundo estágio promovem acúmulo de lipídios, assim como Mathimani et al. (2018) demonstraram que a utilização do duplo estágio é eficaz no aumento do teor lipídico das microalgas. *Anabaena variabilis* acumulou 0,07 g L^{-1} de PHB quando cultivada em meio BG-11 com privação de fosfato em duplo estágio. Esta concentração de PHB atingiu em torno do dobro do PHB sintetizado no ensaio controle (0,03 g L^{-1}). *Microcystis aeruginosa* também duplicou a

produção de PHB em cultivo de duplo estágio com privação da fonte de fosfato ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) quando comparada ao ensaio controle ($0,03 \text{ g L}^{-1}$), constatando que a estratégia de duplo estágio aliada ao estresse nutricional influencia na síntese de PHB (DEB; MALLICK; BHADORIA, 2019).

A fim de produzir combustível, uma pesquisa utilizando *Tetraselmis* sp. promoveu o cultivo em duplo estágio, submetendo a microalga a um fotobiorreator fechado de 1200L no primeiro estágio contendo nutrientes adequados e cultivo em lago de pista aberto de 1000 L no segundo estágio havendo escassez de nutrientes. A partir deste estudo os autores relataram maior produção de lipídios na estratégia de dois estágios do que os cultivos monofásicos (NARALA et al., 2016). Um estudo realizado com *Isochrysis galbana* para investigar a estratégia de duas etapas em cultivo obteve 47% de lipídios reduzindo a fonte de sal no segundo estágio. O aumento desta macromolécula nas células foi obtido pelo estresse realizado por 2 d, limitando o NaCl de 30 para 10 psu (RA et al., 2015).

A *Neochloris oleoabundans* HK-129 teve sua produção de triglicerídeos e carboidratos aumentada por meio do estresse causado no cultivo em duplo estágio. Primeiramente, esta microalga foi cultivada com 2,94 mM de nitrato de sódio, 30 μM de cloreto férrico e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa. No segundo estágio houve mudanças nas condições de cultivo para síntese dos compostos desejados, assim o micro-organismo foi submetido a ausência de nitrogênio, 0,037 mM de cloreto férrico e 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz. Neste estudo foram produzidos $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de triglicerídeos e $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de carboidratos (SUN et al., 2014).

A possibilidade de controle do metabolismo das microalgas permite que compostos de interesse sejam produzidos por meio da influência das condições ambientais ou desfavoráveis, como deficiência de nitrogênio, pH, temperatura, intensidade luminosa, concentração de sais e de ferro (HU et al., 2019). Wensel et al., (2014) demonstraram que a aplicação de condições extremas no segundo estágio do cultivo, como elevado pH e alta concentração de bicarbonato de sódio, impedem o crescimento de micro-organismos contaminantes, e assim melhoram o crescimento celular das espécies desejadas.

CAPÍTULO III

3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A dissertação está dividida em 2 artigos, conforme descrito a seguir:

Artigo 1: Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em duplo estágio com redução de nitrogênio para aumento da produtividade e síntese de macromoléculas.

Artigo 2: Privação de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em duplo estágio para estimular elevada produtividade e síntese de macromoléculas.

3.1 CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO COM REDUÇÃO DE NITROGÊNIO PARA AUMENTO DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Resumo

As microalgas têm recebido destaque na produção de biocompostos, que podem ser aplicados no setor alimentício, farmacêutico e químico. O aproveitamento de diferentes frações da biomassa através das biorrefinarias as torna matérias-primas de grande potencial. Alterações nas condições de cultivo das microalgas podem promover maior síntese de macromoléculas de interesse, como lipídios, proteínas, carboidratos e biopolímeros. A estratégia de duplo estágio no cultivo também pode estimular o acúmulo destas macromoléculas pela microalga, o qual promove produtividade de biomassa e acúmulo de compostos de interesse. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de macromoléculas pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em duplo estágio. Os cultivos foram realizados em duplo estágio, em que no tempo zero até um tempo predefinido onde foi disposto um aporte nutricional completo para o crescimento da microalga, e após, novo meio com limitação de nitrogênio foi adicionado ao cultivo visando estimular a síntese de macromoléculas. No primeiro estágio utilizou-se meio Zarrouk modificado, contendo 100% de nitrogênio (NaNO_3 , $2,5 \text{ g L}^{-1}$) e 50% de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$). No segundo estágio, houve a substituição do meio de cultivo pelo meio com redução de 90% da fonte de nitrogênio (NaNO_3 , $0,25 \text{ g L}^{-1}$) no 5°, 10° ou 15° d de cultivo. Após, foi avaliado qual tempo de início deste estágio proporcionou maior acúmulo de macromoléculas pela microalga ao longo dos cultivos. A estratégia do cultivo em duplo estágio proporcionou maior crescimento a microalga, atingindo $2,77 \text{ g L}^{-1}$ no ensaio com redução de nitrogênio no 15° d. A redução de 90% da fonte de nitrogênio e a estratégia de duplo estágio alteraram a composição da biomassa. O ensaio com redução de nitrogênio no 5° d atingiu o maior teor de lipídios ($0,62 \text{ g L}^{-1}$) no 15° d e produziu $0,39 \text{ g L}^{-1}$ de PHB no 20° d do cultivo. A maior concentração de carboidratos ($0,54 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida no cultivo conduzido em duplo estágio com 10% de nitrogênio no 10° ou 15° d, cultivado por 20 d. A obtenção de maior conteúdo proteico ($1,60 \text{ g L}^{-1}$) foi atingida no ensaio em duplo estágio com redução de nitrogênio no 15° d, cultivado por 20 d. Desta forma, este estudo contribui para determinação de condições de cultivo que envolvam a maximização da produção de lipídios, carboidratos, proteínas e PHB por *Spirulina* sp. LEB 18, destacando a biotecnologia microalgal para o desenvolvimento de diferentes bioprodutos. Além disso, a estratégia de duplo estágio é importante para manter a produtividade de biomassa dos cultivos, e aliada a limitação de nitrogênio, contribui para reduzir os problemas ambientais ao sintetizar polímeros biodegradáveis a partir de microalgas.

Palavras-chave: Biorrefinaria. Biotecnologia microalgal. Composição proximal. PHB.

3.1.1 Introdução

Há muitas perspectivas em relação às microalgas, para aplicações biotecnológicas, devido ao seu potencial de produzir diversas macromoléculas de interesse, como proteínas, lipídios, carboidratos, polímeros, vitaminas, pigmentos e antioxidantes (HORNES et al, 2010). As biorrefinarias têm emergido como um novo conceito na conversão de biomassa em produtos de alto valor agregado, biocombustíveis e/ou energia de forma integrada, o que reduz os impactos ambientais e explora de forma maximizada o potencial da matéria prima (CHEW et al., 2017).

No contexto de uma biorrefinaria de microalgas, as proteínas obtidas da biomassa podem ser utilizadas na área alimentícia a fim de aumentar o valor nutricional dos alimentos, assim como os ácidos graxos de cadeia longa podem ser utilizados como suplemento alimentar. Os carboidratos podem ser aplicados como fonte de carbono nas indústrias de fermentação para produção de etanol, enquanto que os lipídios podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel (CHEW et al., 2017). Os polímeros degradáveis sintetizados pelas microalgas podem atuar como substitutos aos plásticos petroquímicos (ANSARI; FATMA, 2016).

A estratégia do cultivo em duplo estágio pode influenciar positivamente na síntese de macromoléculas pela microalga e reduzir o tempo de cultivo. O primeiro estágio envolve condições ótimas para o crescimento, resultando no aumento da produtividade de biomassa. No segundo estágio ocorre redução de um nutriente específico do meio de cultivo, como o nitrogênio, podendo estimular o acúmulo de lipídios, carboidratos ou biopolímeros pela microalga. Assim, a principal vantagem da utilização do cultivo em duplo estágio é a obtenção de elevada produtividade em biomassa simultaneamente à alta concentração de macromoléculas de interesse (MONSHUPANEE; NIMDACH; INCHAROENSAKDI, 2016).

O composto nitrogenado é um dos componentes mais importantes no cultivo microalgal, pois interfere diretamente no direcionamento do metabolismo celular. Dependendo do fornecimento de nitrogênio, será proporcionado maior ou menor síntese de proteínas, carboidratos, lipídeos e/ou polihidroxibutirato (PHB). Desta forma, este estudo de cultivo realizado em duplo estágio, com a limitação de nitrogênio, é pioneiro na definição do melhor período para início de alteração no aporte nutricional da microalga e do tempo total de cultivo visando maximizar a produção de proteínas, carboidratos, lipídeos e PHB. Portanto, o objetivo

deste trabalho foi avaliar a produção de macromoléculas pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em duplo estágio.

3.1.2 Material e métodos

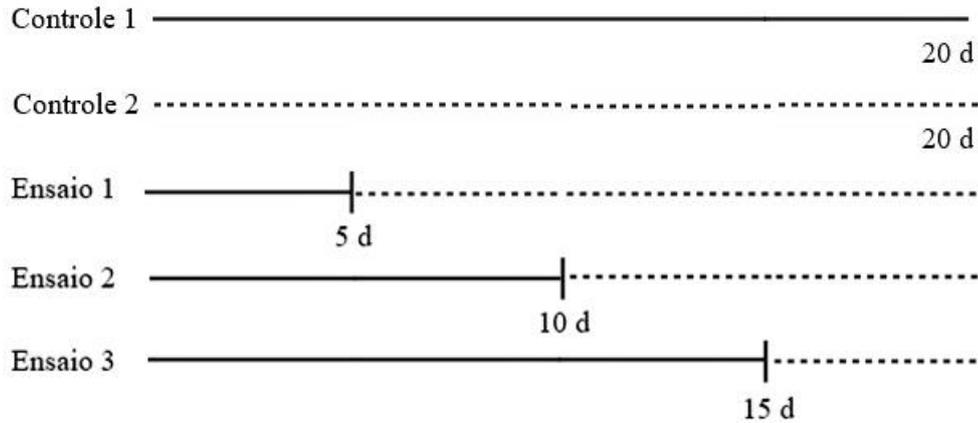
3.1.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, foi isolada da Lagoa Mangueira, localizada no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar – RS (MORAIS et al., 2008). O inóculo foi mantido em frasco Erlenmeyer de 6 L com meio Zarrouk modificado, contendo 50% da fonte de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$) por 10 d.

Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores fechados do tipo tubular de 2 L, com volume útil de 1,6 L, contendo $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de concentração inicial de biomassa. Os cultivos foram realizados a 30° C em câmara termostatizada, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e luminosidade de $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A agitação foi contínua por meio da injeção de ar estéril e os experimentos foram realizados em triplicata por 20 d. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) modificado com 50% de carbono (MARTINS et al., 2014).

Os ensaios controle foram realizados em um único estágio contendo 100% ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) e 10% ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) da fonte original de nitrogênio (NaNO_3) do meio de cultivo. Os ensaios em duplo estágio foram realizados com meio contendo concentração original do meio Zarrouk, incluindo o nitrogênio (NaNO_3 , $2,5 \text{ g L}^{-1}$) no primeiro estágio do cultivo. O segundo estágio teve início nos tempos 5, 10 ou 15 d dos cultivos, no qual foi realizado a substituição de meio com redução de nitrogênio (NaNO_3 , $0,25 \text{ g L}^{-1}$), conforme representado pela Figura 1. Para a troca do meio de cultura, correspondente ao segundo estágio, os cultivos foram submetidos a centrifugação (Refrigerated Centrifuge CR22GIII, Japão) a 15.200 g , 20° C por 30 min. As células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril para remoção dos sais do meio por centrifugação a 15.200 g , 20° C por 10 min. Em seguida, foi adicionado meio Zarrouk com redução de 90% da fonte de nitrogênio (NaNO_3 , $0,25 \text{ g L}^{-1}$), mantendo a mesma concentração de biomassa. O volume dos ensaios foi mantido constante devido adição diária de água estéril que supriu as perdas por evaporação.

Figura 1 – Representação dos experimentos de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (—) 100% de NaNO₃ em único estágio (Controle 1), (---) 10% de NaNO₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO₃ no meio.



3.1.2.2 Determinações analíticas e parâmetros cinéticos

Diariamente foram retiradas alíquotas de 4 mL dos cultivos para acompanhamento do pH, com auxílio de pHmetro (Even, PHS-3E, Brasil), e determinação da concentração de biomassa, utilizando o espectrofotômetro (Spectrophotometer UVmini-1240, Shimadzu). A medida de densidade ótica foi realizada a 670 nm (COSTA et al., 2002), sendo previamente realizado uma curva padrão relacionando densidade ótica com massa seca (Apêndice 1).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹) (SCHMIDELL et al., 2001) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹) foram determinadas a partir dos valores de concentração de biomassa. A concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g L⁻¹) foi o máximo valor de concentração obtido ao longo do cultivo e o tempo de geração (t_g , d) foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga (BAILEY; OLLIS, 1986), de acordo com a Equação 1. A produtividade foi obtida segundo a Equação 2, sendo X_t a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t_0 (d). O máximo valor de produtividade encontrado no decorrer do cultivo correspondeu ao $P_{\text{máx}}$.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (1)$$

$$P = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

A $\mu_{\text{máx}}$ foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento logarítmica, conforme a Equação 3.

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

3.1.2.3 Análise de nitrogênio

O teor de nitrogênio foi determinado em intervalos de 3 dias pela adição da solução de 0,8 mL de 5% de ácido salicílico em ácido sulfúrico e 19 mL de hidróxido de sódio 2 N à 0,2 mL de amostra. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 410 nm e os valores de absorvância foram correlacionados com a curva padrão (CATALDO et al., 1975).

3.1.2.4 Composição proximal da biomassa microalgal

Em todos os experimentos foram retiradas amostras de 100 mL de cada reator tubular a cada 5 d para realização da composição, e então a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi separada do meio líquido por centrifugação (HITACHI HIMAC CR-GIII, Japão) a 4.600 g por 30 min. Em seguida, a biomassa foi ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada por mais duas vezes, por 10 min, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -80 °C por 48 h e após foi liofilizada por 48 h. Em seguida, a amostra liofilizada foi armazenada a -18 °C para posterior utilização nas análises (ROSA et al., 2016).

A concentração de lipídios foi determinada pelo método espectrofotométrico de Marsh e Weinstein (1966), utilizando curva padrão de tripalmitina. O teor de proteínas e carboidratos foi determinado a partir do pré-tratamento da biomassa microalgal (0,005 g) em 10 mL de água destilada, que foram sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130- Illinois, USA) para liberação do material intracelular de *Spirulina* sp. LEB 18 no meio líquido. Este procedimento utilizou 10 ciclos de funcionamento, com alternância de 1 min ligado e 1 min desligado. A concentração de proteínas na biomassa foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951), a partir da curva padrão de albumina (Apêndice 2). A concentração de carboidratos foi determinada conforme o método de fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose (Apêndice 3).

3.1.2.5 Quantificação de PHB na biomassa

A cromatografia gasosa foi realizada para determinar a concentração de PHB na biomassa nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 d. Primeiramente, a biomassa liofilizada (0,015 g) foi submetida a extração dos pigmentos por meio da adição de álcool metílico 99,8 % (v v⁻¹) conforme método descrito por Lichtenthaler (1987). Em seguida, foi submetida a secagem em

estufa a 105 °C por 24 h, e então foi realizada a metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). O cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão), equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID), foi utilizado para analisar os grupos metil éster. A operação foi realizada a 250 °C para injetor e detector. Para separar os metil ésteres foi utilizada a programação de 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C min⁻¹ até atingir 180 °C. Para a construção da curva padrão (Apêndice 4), foi utilizado o poli (3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

3.1.2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias dos resultados foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey com nível de confiança de 95 %.

3.1.3 Resultados e discussão

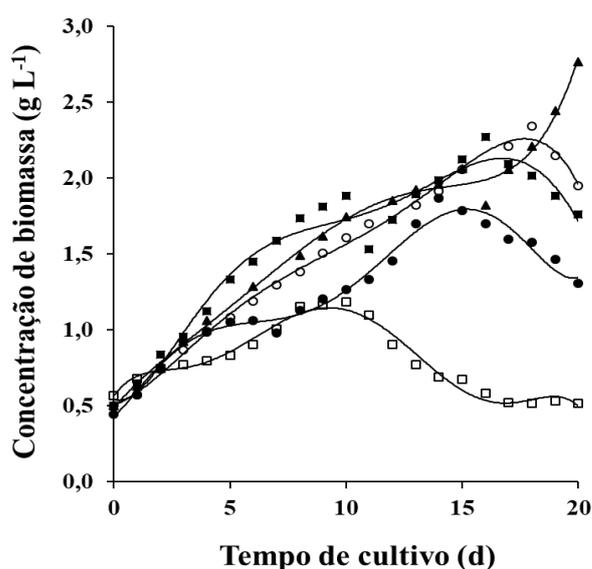
3.1.3.1 Crescimento microalgal e parâmetros cinéticos

Todos os experimentos apresentaram ausência da fase de latência (Figura 2), uma vez que o inóculo foi previamente adaptado ao meio Zarrouk modificado contendo 50% da fonte de carbono (NaHCO₃, 8,4 g L⁻¹). Durante esta fase de crescimento, enzimas essenciais para a utilização dos componentes do meio de cultivo foram produzidas, o que eliminou o tempo da fase de latência dos experimentos, sendo verificado, portanto, o crescimento exponencial (SCHIMIDELL et al., 2001).

Os ensaios controle realizados com 10 e 100% da fonte original de nitrogênio apresentaram crescimento celular até o 10º d e 18º d, respectivamente. Logo, é possível observar que a ausência deste nutriente impede ou reduz o crescimento celular. Isso pode ser explicado uma vez que no experimento com 100% de NaNO₃ o suprimento de nitrogênio não foi limitado (Figura 3c), sendo utilizado pela célula para produzir compostos essenciais ao crescimento, como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. No ensaio com 10% da fonte de nitrogênio o crescimento celular cessou quando não houve mais concentração deste nutriente no meio de cultivo. Segundo Castro et al. (2014), os sais de nitrato promovem maior

concentração de biomassa quando comparado a outras fontes de nitrogênio, destacando-se o NaNO_3 , sendo este o motivo de sua aplicação no meio Zarrouk. Estudos evidenciaram que esta fonte de nitrogênio pode ser reduzida em aproximadamente 25% nos meios de cultura sem que haja redução da concentração da biomassa microalgal (COLLA et al., 2007). Assim, a ausência deste nutriente impede ou reduz o crescimento celular.

Figura 2 - Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (○) 100% de NaNO_3 em único estágio, (□) 10% de NaNO_3 em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO_3 e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com 10% de NaNO_3 no meio.



Os experimentos realizados em duplo estágio apresentaram multiplicação celular até o momento da substituição do meio de cultura inicial, pelo meio com limitação de nitrogênio e após, as células passaram por um período de adaptação, que variou de 1 a 2 d. Esta queda no crescimento pode estar relacionada ao estresse causado às células pela centrifugação realizada para separação do meio de cultivo inicial, deixando as células injuriadas, e pela nova condição nutricional ao qual foram submetidas. Após esta adaptação, a microalga apresentou novamente fase de crescimento linear, por período de 7 d para o ensaio com redução de nitrogênio no 5º d, 5 d para o ensaio com redução de nitrogênio no 10º d e 5 d para o ensaio com redução no 15º d, que foi encerrado aos 20 d de cultivo.

Os ensaios em duplo estágio e o controle com 100% de nitrogênio não apresentaram fase estacionária, havendo declínio celular logo após a fase de crescimento linear. A fase de morte celular dos ensaios com início do segundo estágio em 5 e 10 d foi no 15º e 17º d de cultivo, respectivamente, enquanto que o ensaio controle com 10% de nitrogênio apresentou esta fase no 11º d. Braga et al. (2019) cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 em meio com limitação

de nitrogênio ($0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3) e obtiveram a fase de morte celular no 13º d do cultivo. Assim, foi possível observar que a realização do duplo estágio prolongou a fase linear de crescimento. O ensaio controle com 100% de nitrogênio apresentou declínio celular no 19º d e o ensaio com início do segundo estágio em 15 d não apresentou fase de morte celular, pois houve produtividade celular até o 20º d do cultivo.

O ensaio controle com 10% da fonte de nitrogênio obteve menor tempo de multiplicação celular, iniciando a fase de declínio no 11º d de cultivo. No entanto, a redução de nitrogênio, nos tempos 5, 10 e 15 d de experimento, não impediu o crescimento celular. Nestas condições, possivelmente o nitrogênio fornecido foi utilizado pela célula para produção dos compostos necessários ao crescimento e armazenado para posterior utilização. Segundo Nayak et al. (2019), o nitrogênio é o elemento responsável pela síntese de aminoácidos e proteínas, contribuindo para a produção da biomassa.

Todos os ensaios realizados em duplo estágio apresentaram concentração máxima de biomassa maior após a redução de nitrogênio. O fornecimento de meio de cultivo novo com redução de nitrogênio disponibilizou nutrientes importantes que contribuíram para o crescimento celular, como fósforo e carbono. O experimento controle cultivado com 10% de nitrogênio obteve a menor concentração máxima de biomassa quando comparado aos experimentos em duplo estágio, evidenciando a vantagem de se realizar esta estratégia de cultivo em duplo estágio para alcançar maior produtividade de biomassa.

Os ensaios com redução de nitrogênio no 10º e 15º d, e o controle com 100% de nitrogênio, obtiveram as maiores concentrações de biomassa (Tabela 1), provavelmente devido ao nitrogênio estar disponível durante toda fase exponencial, garantindo melhor multiplicação celular (Figura 3c). De acordo com Martín-Juárez et al. (2017), o nitrogênio é o segundo componente mais abundante da biomassa, sendo requerido para obter alta produtividade em biomassa.

A menor concentração de biomassa dos ensaios em duplo estágio foi obtida com a redução de nitrogênio no 5º d de cultivo. Ainda assim, este valor é maior quando comparado aos resultados obtidos por Braga et al. (2019), que também cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 com 10% da fonte de nitrogênio ($0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3). Os autores atingiram como maior $X_{\text{máx}}$ o valor de $0,56 \text{ g L}^{-1}$ utilizando injeção de CO_2 a cada 1 min e 120 ppm de cinzas. Com isso, é possível afirmar que a realização do duplo estágio contribuiu para o crescimento microalgal, pois, nos primeiros 5 d de cultivo a microalga dispunha de nitrogênio para produção de

macromoléculas essenciais para o seu desenvolvimento, havendo crescimento nos 7 d seguintes após a limitação deste nutriente.

Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d) da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO₃ em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO₃ no meio.

Ensaio	Estágio	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$	t_g
Controle 1	Único	2,34±0,23 ^{ab}	0,15±0,02 ^{bc}	0,22 ± 0,04 ^a	2,87±0,28 ^a
Controle 2	Único	1,18±<0,01 ^c	0,11±0,02 ^c	0,10±<0,01 ^b	6,53±0,56 ^b
Ensaio 1	1º	1,05±0,01 ^c	0,16±0,01 ^{bc}	0,25±0,01 ^a	2,78±0,16 ^a
	2º	1,87±0,10 ^b	0,11±<0,01 ^c	0,15±0,04 ^b	5,47±1,22 ^b
Ensaio 2	1º	2,03±0,19 ^b	0,19±0,02 ^b	0,22±0,01 ^a	3,30±<0,01 ^a
	2º	2,27±0,02 ^{ab}	0,19±0,04 ^b	0,09±<0,01 ^b	7,37±0,41 ^b
Ensaio 3	1º	2,06±0,22 ^b	0,15±<0,01 ^{bc}	0,20±<0,01 ^a	3,39±0,01 ^a
	2º	2,77±0,07 ^a	0,31±0,01 ^a	0,08±<0,01 ^b	8,62±0,20 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em todas as condições avaliadas, a velocidade específica máxima de crescimento foi maior no primeiro estágio dos cultivos quando comparada ao segundo estágio, devido ao suprimento da fonte de nitrogênio no primeiro estágio. Não houve diferença estatística nas velocidades de crescimento entre os primeiros estágios dos ensaios, bem como entre os segundos estágios, uma vez que estavam nas mesmas condições nutricionais. Tanto para os experimentos controle quanto para os ensaios em duplo estágio, a velocidade específica máxima de crescimento foi maior nos primeiros 5 d de cultivo (fase exponencial). Isto pode ter ocorrido devido a incidência de luminosidade uniforme às células microalgais neste período do cultivo, uma vez que a concentração de biomassa é menor. Segundo Caprio et al. (2016), as microalgas crescem utilizando a luz, porém o aumento da concentração celular impede que a luminosidade penetre na suspensão, resultando na redução da multiplicação celular. Conseqüentemente, há redução na velocidade específica máxima de crescimento.

O aumento da velocidade específica máxima de crescimento ocasiona redução no tempo de geração. De acordo com Braga et al. (2019), as microalgas são capazes de duplicar a concentração de biomassa em 1 a 7 d. Os experimentos realizados em duplo estágio com

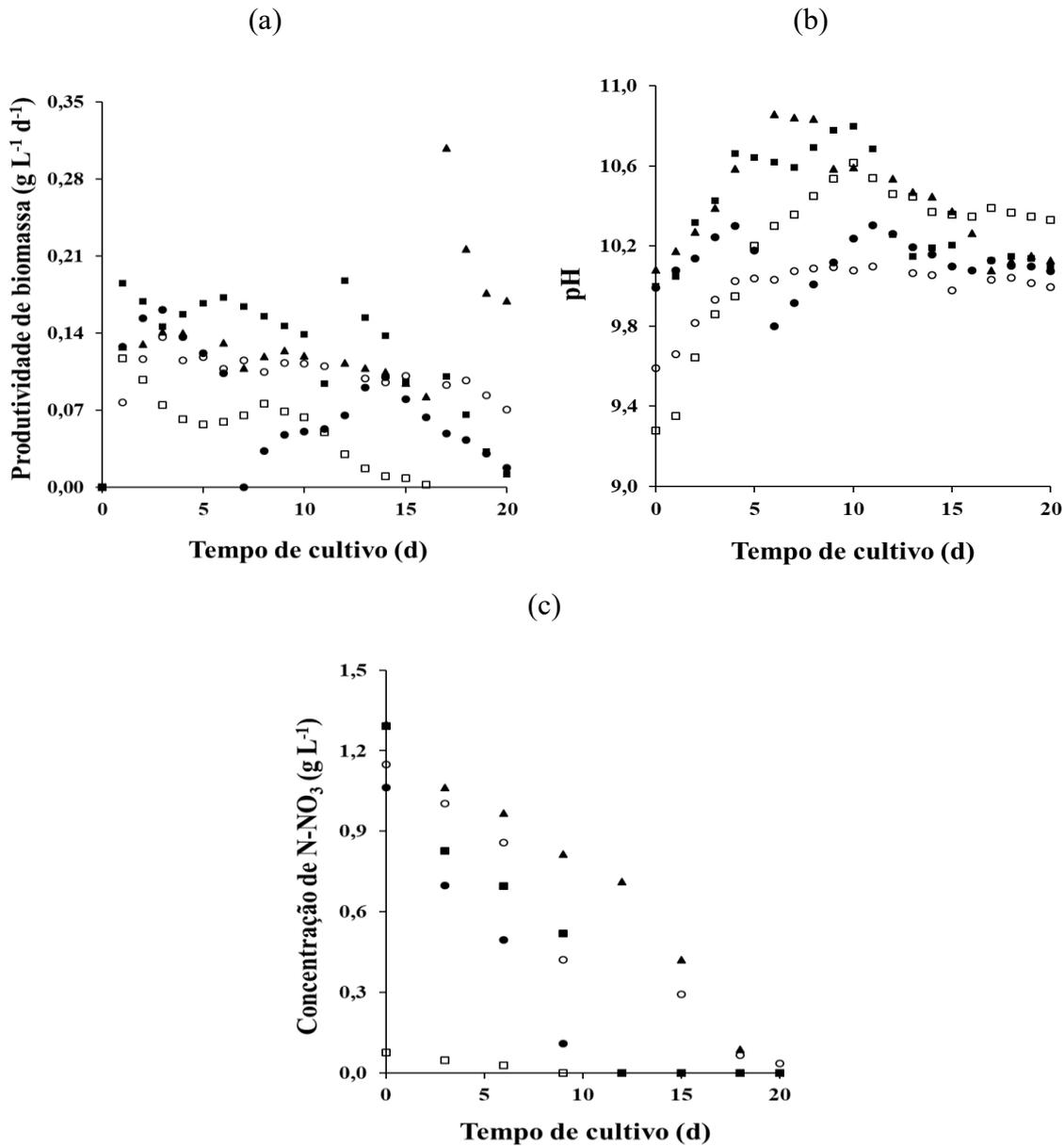
redução de nitrogênio no 5º, 10º e 15º d demonstraram maior taxa de velocidade de crescimento no primeiro estágio do cultivo, o que resultou menor tempo de geração quando comparado ao segundo estágio dos ensaios.

Todos os ensaios em duplo estágio apresentaram queda na produtividade no período de 2-3 dias após o início do segundo estágio, devido a adaptação às novas condições nutricionais. Após essa adaptação, ocorreu aumento brusco na produtividade, provavelmente devido ao suprimento de nutrientes (Figura 3a). A partir do 15º d de cultivo, os ensaios com limitação de nitrogênio no 5º e 10º d exibiram redução na produtividade. O controle com 10% de nitrogênio apresentou maior produtividade nos dois primeiros dias de cultivo, se mantendo constante até o 10º d. A partir do 11º d houve queda da produtividade celular atingindo zero no 16º d, possivelmente devido à escassez do nitrogênio, uma vez que este nutriente é essencial para o desenvolvimento celular. Por sua vez, pode-se inferir que o controle com 100% de nitrogênio exibiu aumento na produtividade nos primeiros 3 d de experimento, mantendo-se constante ao longo do cultivo, com queda somente nos dois últimos dias.

Entre os ensaios realizados em duplo estágio, a maior produtividade máxima foi observada no segundo estágio com substituição de meio no 15º d, devido a renovação de vários nutrientes do meio Zarrouk, enquanto que a menor produtividade máxima foi observada no ensaio com substituição de meio no 5º d. Este fato ocorreu porque a redução de nitrogênio foi realizada em seguida ao início do cultivo, sendo assim, a maior parte da fase exponencial ocorreu sem a presença deste nutriente (Figura 3c). Desta forma, pode-se inferir que quanto mais próximo ao início da fase de morte celular for a substituição do meio de cultura, maior será a produtividade máxima, uma vez que todos os nutrientes, incluindo o nitrogênio, estiveram disponíveis por 15 d, resultando em maior concentração de biomassa microalgal.

Moraes et al. (2018) avaliaram o efeito da concentração de NaNO_3 na cinética de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Os autores obtiveram $X_{\text{máx}} = 1,60 \text{ g L}^{-1}$, $P_{\text{máx}} = 0,109 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} = 0,208 \text{ d}^{-1}$, quando utilizaram $1,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 . Comparando estes resultados com os obtidos nos ensaios realizados em duplo estágio, percebe-se a vantagem da aplicação desta estratégia de cultivo para o crescimento microalgal e produção de biomassa. Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em duplo estágio proporcionaram maior produtividade em todas condições experimentais, quando comparado ao estudo desenvolvido por Moraes et al. (2018), mesmo que a redução de nitrogênio tenha sido maior em nossos experimentos ($0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3).

Figura 3 – Produtividade volumétrica de biomassa (a), pH (b) e concentração de nitrogênio (c) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 realizados com (○) 100% de NaNO_3 em único estágio, (□) 10% de NaNO_3 em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO_3 e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com 10% de NaNO_3 no meio.



Conforme ocorreu o crescimento da *Spirulina* sp. LEB 18, houve variação no pH dos cultivos (Figura 3b). O pH ideal para o cultivo desta microalga está entre 8,3 e 11,0, pois nesta faixa há maior disponibilidade de carbonato e bicarbonato, o que proporciona condições ótimas de crescimento para a microalga (COSTA et al, 2002). A fixação do CO_2 durante a respiração das microalgas ocasiona maior dissociação do carbonato, promovendo a liberação de íons hidroxila (OH^-), que gera aumento no pH (LI et al., 2011). Martins et al. (2014), realizaram o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando como fonte de carbono: bicarbonato de

sódio, glicose e acetato de sódio. A maior concentração de biomassa encontrada por esses autores foi obtida com o bicarbonato de sódio, devido à microalga apresentar enzimas fotossintéticas atuantes na assimilação do carbono.

Tanto os ensaios controles quanto os ensaios realizados em duplo estágio apresentaram aumento do pH de acordo com a utilização de bicarbonato pela microalga para seu desenvolvimento. No entanto, a substituição de meio de cultivo acarretou decréscimo da concentração de biomassa da microalga por 2 d, e a partir deste momento houve diminuição no pH, o que confirma a fase de adaptação da *Spirulina* sp. LEB 18 ao meio novo. Ao longo do cultivo, o pH aumentou conforme crescimento da microalga.

A distribuição das espécies químicas de carbono é determinada pelo pH (MANGAN et al., 2016). Quando o cultivo microalgal apresenta pH abaixo de 6, o ácido carbônico está presente em maior quantidade no meio, enquanto que em pH 6 a 10,5 o bicarbonato é predominante. Em cultivo com pH superior a 10,5 encontra-se o carbonato em maior concentração. Desta forma, quanto maior o pH do meio, maior a possibilidade do CO₂ disponível ser convertido a carbonato (HILLE et al., 2013). O pH dos cultivos em único e duplo estágio (9,6 a 10,9) permaneceram dentro da faixa ótima de pH para esta microalga, o que promoveu o crescimento celular.

3.1.3.2 Produção de macromoléculas

A partir da composição proximal da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 pode-se observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de proteínas, carboidratos e lipídios nos tempos 0 e 5 d dos cultivos em duplo estágio quando comparados ao controle com 100% de nitrogênio (Tabela 2), pois a microalga estava submetida às mesmas condições nutricionais.

Sabe-se que o nitrogênio compõe cerca de 10% do peso seco das microalgas e é um componente fundamental utilizado pelas células para a síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila e outros pigmentos acessórios, como as ficobilinas (DANESH et al., 2018). A concentração de nitrogênio presente no meio de cultura está relacionada com o teor de proteínas produzidas pela célula. Desta forma, quanto menos nitrogênio houver disponível no meio de cultivo, menor será a síntese de proteínas pela microalga. O nitrogênio é capaz de limitar o crescimento microbiológico quando fornecido em pequenas concentrações, tanto em ambientes naturais como artificiais. As microalgas assimilam os nutrientes existentes no cultivo

incorporando-os à sua biomassa, resultando em um produto rico nutricionalmente, que pode ser utilizado como suplemento alimentar. A presença de micro e macronutrientes no meio afeta a composição das macromoléculas, como lipídios, proteínas e carboidratos (HORNES et al., 2010; MATOS et al., 2015).

Tabela 2 – Composição da biomassa (%) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO₃ em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO₃ no meio.

Tempo (d)	Controle 1	Controle 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Proteínas (% m ⁻¹)					
0	53,5±1,5 ^{ba}	50,2±2,3 ^{aA}	56,6±1,6 ^{aA}	53,3±1,2 ^{ba}	51,4±3,4 ^{ba}
5	55,9±0,1 ^{ba}	49,7±1,4 ^{ab}	57,4±1,9 ^{aA}	54,9±0,3 ^{ba}	55,3±0,8 ^{ba}
10	66,8±0,3 ^{aA}	29,9±2,4 ^{bc}	43,5±0,7 ^{bb}	73,8±2,2 ^{aA}	69,1±1,3 ^{aA}
15	67,2±2,1 ^{aA}	23,3±2,2 ^{bc}	38,6±1,9 ^{bcB}	59,7±2,1 ^{ba}	69,7±0,2 ^{aA}
20	67,3±0,6 ^{aA}	20,0±1,0 ^{dc}	36,4±0,8 ^{cc}	54,9±2,3 ^{bb}	57,9±1,0 ^{bb}
Lipídios (% m m ⁻¹)					
0	13,2±0,8 ^{aA}	14,5±1,2 ^{aA}	17,0±0,9 ^{cA}	14,1±0,9 ^{abA}	14,9±1,2 ^{aA}
5	14,8±1,3 ^{aA}	15,7±0,2 ^{abA}	18,3±0,8 ^{cA}	15,1±0,8 ^{abA}	14,8±1,3 ^{aA}
10	14,8±0,2 ^{aB}	14,7±1,0 ^{abB}	25,8±0,2 ^{ba}	15,8±0,6 ^{aB}	14,9±0,1 ^{aB}
15	15,7±1,3 ^{aB}	11,9±0,7 ^{bcB}	34,6±1,7 ^{aA}	12,6±1,2 ^{abB}	15,3±0,9 ^{aB}
20	13,9±1,8 ^{aC}	9,6±0,4 ^{cc}	37,0±0,5 ^{aA}	11,1±1,6 ^{bc}	19,4±1,7 ^{aB}
Carboidratos (% m m ⁻¹)					
0	8,3±0,4 ^{cA}	8,5±0,7 ^{eA}	7,4±0,2 ^{ba}	8,8±0,3 ^{cA}	7,5±0,2 ^{cA}
5	8,6±0,3 ^{cb}	18,5±0,8 ^{da}	7,8±0,0 ^{bb}	8,9±0,2 ^{cb}	8,2±0,4 ^{cb}
10	10,6±0,4 ^{bb}	35,9±2,4 ^{ca}	7,8±0,1 ^{bb}	9,5±0,0 ^{cb}	10,4±0,1 ^{cb}
15	15,1±0,5 ^{ab}	47,7±3,1 ^{ba}	7,7±0,3 ^{bc}	14,4±1,3 ^{bb}	14,8±0,2 ^{bb}
20	16,1±0,4 ^{aC}	58,1±0,8 ^{aA}	15,8±1,3 ^{aC}	26,1±1,3 ^{aB}	19,6±1,8 ^{aC}

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo ensaio e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre ensaios de condições diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Segundo Hinai et al. (2019) *Spirulina platensis* possui em sua composição 50 a 75% de proteína. Desta forma, pode-se afirmar que todos os resultados obtidos para os experimentos controles e experimentos em duplo estágio permaneceram dentro da faixa de teor de proteínas esperada nos tempos 0 e 5 d dos cultivos. No entanto, devido à limitação de nitrogênio, todos

experimentos realizados em duplo estágio apresentaram decréscimo na concentração de proteínas imediatamente após a limitação do nutriente. O ensaio com redução no 5º d diminuiu o teor de proteínas a partir do 10º d de cultivo, enquanto que o ensaio com redução no 10º d obteve queda no conteúdo proteico a partir do 15º d e o ensaio com redução no 15º d exibiu declínio na concentração de proteínas no 20º d do cultivo.

No segundo estágio, os ensaios com redução de nitrogênio no 10º e 15º d não apresentaram diferença significativa entre si no conteúdo proteico. No entanto, o ensaio com redução de nitrogênio no 5º d apresentou menores concentrações de proteínas comparado aos ensaios citados acima. Por outro lado, o ensaio com redução de nitrogênio no 5º d apresentou teor de proteínas maior quando comparado ao controle com 100% de nitrogênio, mostrando que, para a produção desta macromolécula, é importante realizar o primeiro estágio com 100% de nitrogênio. O controle com 100% de nitrogênio apresentou a menor concentração de proteínas, uma vez que não havia disponível em quantidade necessária um elemento essencial (nitrogênio) para a síntese de proteínas (Figura 3c). Os ensaios com redução de nitrogênio no 10º e 15º d, e controle com 100% de nitrogênio apresentaram concentração de proteínas crescente até o 10º d. A partir deste dia, se o nitrogênio não for reduzido o teor proteico se mantém, porém se este nutriente for limitado o conteúdo da macromolécula reduz.

O ensaio controle com 100% de nitrogênio foi o que obteve maior teor de proteínas ao final do cultivo, pois recebeu concentração de nitrogênio original do meio Zarrouk, sem haver limitação deste nutriente ao longo do cultivo. Neste ensaio, não houve diferença significativa entre o teor de proteínas sintetizada no 10º e 20º d do cultivo, assim como não houve diferença significativa entre a concentração de proteínas sintetizada no 10º d do controle com 100% de nitrogênio quando comparado ao 10º d de cultivo dos ensaios em duplo estágio com redução de nitrogênio no 10º e 15º d, uma vez que estavam nas mesmas condições nutricionais. Assim, o ideal seria reduzir o tempo de cultivo para diminuir custos, cultivando a microalga em 10 d, com meio de cultura contendo 100% de nitrogênio, para obtenção de proteínas (73,8%). No entanto, o ensaio com redução de nitrogênio no 15º d apresentou elevada concentração de biomassa no 20º d de cultivo, e conseqüentemente, isto resultou em maior rendimento de proteínas (Apêndice 5), visto que neste dia a produção desta macromolécula, em porcentagem, foi alta. Assim, pode-se inferir que, para a produção de proteínas a partir da *Spirulina* sp. LEB 18, a melhor condição foi o cultivo em duplo estágio com redução de nitrogênio no 15º d, sendo que a extração desta macromolécula deve ser realizada no 20º d, onde se obteve 1,60 g L⁻¹.

A microalga necessita de nitrogênio para o crescimento, porém quando não recebe este suprimento a multiplicação celular reduz ou cessa, então começa a acumular compostos de reserva. A mudança na condição nutricional pela limitação de nitrogênio por longo período induz a célula a produzir lipídios, pois estes são utilizados lentamente pela célula. Assim, quando a microalga é submetida a condições de estresse, por longos períodos, produz maiores concentrações de lipídios (SUN et al., 2018). Isto é observado no ensaio com redução de nitrogênio no 5º d (Tabela 2), pois durante os 15 d de cultivo do segundo estágio, o meio de cultura disponível para a microalga estava com limitação de nitrogênio, necessitando de uma reserva de energia que fosse consumida a longo prazo.

A concentração de lipídios obtida no ensaio com limitação de nitrogênio no 5º d foi superior ao encontrado nos ensaios com redução de nitrogênio no 10º e 15º d. Isto ocorreu devido a diferença de tempo em que os ensaios foram mantidos após a limitação de nitrogênio. O ensaio que foi submetido a redução no 5º d permaneceu mais tempo em cultivo com a escassez deste nutriente (Figura 3c). Os ensaios com redução de nitrogênio no 10º e 15º d permaneceram com a fonte de nitrogênio limitada durante 10 e 5 d, respectivamente, sendo um intervalo de tempo menor quando comparado ao ensaio com redução de nitrogênio no 5º d.

Nayak et al. (2019) avaliaram o duplo estágio como estratégia de cultivo para maximizar a produtividade de lipídios na *Chlorella* sp. HS2. A ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio pelos autores, sendo deficiente na segunda etapa do cultivo. Os autores alcançaram como maior teor lipídico 36,7%, resultado próximo ao encontrado no experimento com *Spirulina* sp. LEB 18, submetido a redução de nitrogênio no 5º d de cultivo (37,0%). Neste estudo, o segundo estágio do cultivo apresentou as maiores concentrações de lipídios, sendo esta a melhor condição para produção desta macromolécula. Como não houve diferença significativa entre a concentração de lipídios produzida no 15º (34,6%) e no 20º d (37,0%) do cultivo, o melhor tempo de cultivo a fim de diminuir custos e produzir máxima concentração de lipídeos foi 15 d. Neste tempo de cultivo também foi obtido o maior rendimento de lipídios, que atingiu 0,62 g L⁻¹ (Apêndice 5), devido a influência da concentração de biomassa. Através da Figura 3c pode-se observar que nesta condição o N-NO₃ ficou reduzido a zero a partir do 12º d de cultivo, totalizando 3 d sem nitrogênio remanescente até o período de máxima concentração lipídica.

O experimento com redução de nitrogênio no 15º d apresentou no primeiro estágio do cultivo (0, 5, 10 e 15 d) concentração de lipídios sem diferença significativa dos valores obtidos para o controle com 100% de nitrogênio. Isto ocorreu devido a microalga estar submetida às mesmas condições de nutrientes em ambos. No entanto, o teor de lipídios neste

experimento em duplo estágio foi maior no segundo estágio quando comparado ao controle com 100% de nitrogênio, devido a limitação do nutriente no 15º d.

Quando a célula necessita de uma reserva de energia para ser utilizada a curto prazo, ela segue a rota metabólica de produção de carboidratos. Neste processo, todo carboidrato produzido é rapidamente consumido pela célula como fonte de energia (SUN et al., 2018). No 10º d de cultivo a microalga estava na fase linear, período no qual ocorre crescimento celular, sendo assim, a redução de nitrogênio neste tempo fez com que a microalga necessitasse de fonte de energia para consumo rápido, para manter a multiplicação celular, o que resultou em maior produção de carboidratos quando comparada aos experimentos com redução de nitrogênio no 5º e 15º d (Tabela 2). Este acúmulo na concentração de carboidratos aliado a elevada concentração de biomassa no 20º d do cultivo, resultou no rendimento de 0,46 g L⁻¹ de carboidratos (Apêndice 5). O experimento com redução de nitrogênio no 5º d não exibiu diferença significativa de carboidratos ao final do cultivo em relação ao controle com 100% de nitrogênio, visto que no experimento em duplo estágio a microalga apresentou desvio da rota metabólica para produção de lipídios.

Segundo Becker et al. (2007), *Spirulina platensis* possui de 8 a 14% de carboidratos em sua composição. Isto corrobora com os resultados encontrados no tempo 0 e 5 dos cultivos em único e duplo estágio. No entanto, estudos afirmam que esta microalga pode acumular teores maiores de carboidratos a partir da limitação de nutrientes, como o nitrogênio. Salla et al. (2016) cultivaram a microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído (20%), com adição de resíduos contendo proteína de soro de leite, e alcançaram teor de carboidratos de 58,0%. Braga et al. (2019) constataram que a redução de nitrogênio (10% de NaNO₃), juntamente com a injeção de CO₂ e adição cinzas ao cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, proporcionou acúmulo da macromolécula em até 63,3%. Os resultados alcançados por estes autores foram semelhantes ao encontrado ao final do experimento controle com 10% de nitrogênio (58,1%). Através da Figura 3c pode se observar que nesta condição o N-NO₃ ficou reduzido a zero a partir do 6º d de cultivo, totalizando 14 d sem nitrogênio remanescente, até o dia 20 quando se obteve máxima concentração de carboidratos. Em todos os ensaios, o conteúdo de carboidratos foi maior no 20º d de cultivo, podendo haver possibilidade de aumentar esta concentração se o cultivo for mantido por tempo maior.

O experimento com redução de nitrogênio no 15º d não apresentou diferença significativa da concentração de carboidratos no primeiro estágio do cultivo, quando comparado ao controle com 100% de nitrogênio. Isto ocorreu devido a microalga estar

submetida às mesmas condições de nutrientes em ambos. No entanto, o teor de carboidratos neste experimento em duplo estágio foi maior no segundo estágio quando comparado ao controle com 100% de nitrogênio, devido a limitação do nutriente no 15º d. Este acúmulo na concentração de carboidratos aliado a elevada concentração de biomassa no 20º d do cultivo, resultou no rendimento de 0,54 g L⁻¹ de carboidratos (Apêndice 5), sem diferença estatística quando comparado ao ensaio com redução de nitrogênio no 10º d de cultivo. Assim, a partir deste estudo pode-se afirmar que para obter maior conteúdo de carboidratos pela *Spirulina* sp. LEB 18, a melhor condição foi o cultivo em duplo estágio com redução de nitrogênio no 10º ou 15º d, durante 20 d.

As macromoléculas dependentes de nitrogênio, como proteínas, foram sintetizadas mais rápidas (10 d), quando comparadas às macromoléculas, como lipídios e carboidratos, que demoram mais a serem produzidas (15 e 20 d). Esta afirmação pode ser justificada considerando que moléculas como carboidratos e lipídios são compostos de reserva, acumuladas ao final do cultivo quando há estresse por escassez de nutrientes. Embora o ensaio com redução de nitrogênio no 15º d de cultivo tenha atingido maior produção de biomassa, não houve síntese de PHB. Nesta condição de cultivo, as células se multiplicaram ao longo de todo cultivo, indicando que havia todos nutrientes necessários ao crescimento microalgal disponíveis no meio. Por outro lado, o ensaio com redução de nitrogênio no 5º d produziu PHB, provavelmente pelo fato de que permaneceu por maior tempo em cultivo após a limitação do nutriente. Quando a limitação de nitrogênio foi realizada no 5º d do cultivo, houve morte celular 4 d antes, comparado ao controle com 100% de nitrogênio, o que corrobora a produção de PHB, pois conforme há escassez do nitrogênio ocorre queda na concentração de biomassa, e consequentemente acúmulo de PHB como reserva de carbono e energia.

A partir do cromatograma obtido para a quantificação do PHB, foi possível observar a ocorrência dos polímeros 3HB (3-hidroxibutirato) e 3HV (3-hidroxivalerato), uma vez que estes monômeros apresentam tempo de retenção igual ao encontrado, 3,9 e 5,1 min, respectivamente (Apêndice 6). O conteúdo de PHB (29,6%) foi alcançado no 20º d do cultivo em duplo estágio da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, com redução de nitrogênio no 5º d, o que pode ser confirmado pela alta concentração lipídica encontrada neste tempo do experimento. A produção desta macromolécula ocorreu devido à microalga estar com escassez de nitrogênio há 15 d, e assim produziu lipídios como reserva de energia para uso a longo prazo. Através da Figura 3c pode-se observar que na condição de máxima produção de PHB o N-NO₃ ficou reduzido a zero a partir do 12º d de cultivo, totalizando 8 d sem nitrogênio remanescente até o período de máxima concentração desta macromolécula.

Segundo Schimidell et al. (2001), os níveis de coenzima A (CoA) livre estão altos quando todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano estão disponíveis. Isto ocorre devido à grande demanda por grupos acetil para produção de esqueletos carbônicos e a geração de energia pelo ciclo de Krebs. Quando ocorre a limitação de algum nutriente, a demanda por acetil diminui, com isso os níveis de CoA livre são reduzidos, diminuindo também a inibição sobre a β -*acetotiolase*, o que desencadeia a síntese de PHB.

A limitação de nitrogênio nos cultivos corresponde com o acúmulo de PHB nas células, pois conforme a concentração de nitrogênio alcança valores mínimos, a produção de PHB aumenta. Portanto, o processo de síntese de PHB pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em duplo estágio ocorreu em duas etapas, na qual a primeira consistiu na presença de nutrientes que estão em quantidade suficiente para multiplicação celular, e na segunda, devido à exaustão do nutriente essencial (nitrogênio), a microalga acumulou este polímero biodegradável como reserva energética. Além disso, a baixa concentração de nitrogênio alterou a coloração das células, uma vez que este nutriente faz parte da composição de pigmentos, provavelmente reduzindo o teor de clorofila. Com isso, houve mudança na rota metabólica para acúmulo de compostos lipídicos, como o PHB, e o cultivo adquiriu cor levemente amarelada.

Martins et al. (2017) avaliaram o potencial de microalgas para a produção de biopolímeros. Neste estudo, a *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada por 15 d em meio Zarrouk padrão e atingiu 20,6% de biopolímeros. Costa et al. (2018) também avaliaram a limitação de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 para a produção de polímero. Os autores obtiveram acúmulo de 12% de PHA no 15º d do cultivo, limitando 70% de nitrogênio do meio Zarrouk. Assim, é possível afirmar que a estratégia de cultivo em duplo estágio contribui para maior produção de polímero, atingindo primeiramente maior concentração de biomassa, para depois acumular o bioproduto de interesse.

Os experimentos em duplo estágio com redução de nitrogênio no 10º e 15º d não apresentaram pico no cromatograma no primeiro estágio, exibindo o pico característico de PHB somente após a limitação de nitrogênio. Porém, nestes cultivos a produção de PHB ocorreu em concentrações inferiores a 1%. O ensaio controle com 10% de nitrogênio apresentou nos tempos de cultivo 0, 5, 10 e 15 d teor de PHB menor que 1%, não exibindo pico do polímero no 20º d. O ensaio controle com 100% de nitrogênio não sintetizou PHB até o 15º d de cultivo, havendo obtenção de 0,03% do polímero somente no 20º d de cultivo. Esta produção pode ter sido influenciada pela escassez de nitrogênio presente ao final do cultivo. Resultados similares a estes foram encontrados para a microalga *Spirulina platensis* por Campbell et al. (1982), que

obtiveram 0,06 % de PHB em cultivo com injeção de 5% de CO₂, e Jau et al. (2005) que alcançaram 0,03% de PHB em condições mixotróficas em meio com exaustão de nitrogênio, 9 g L⁻¹ de NaHCO₃ e injeção de 0,5% de CO₂.

3.1.4 Conclusão

Neste estudo, verificou-se que a realização do primeiro estágio, contendo 100% de nitrogênio, no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, promoveu elevada concentração de biomassa (2,77 g L⁻¹), produtividade de biomassa (0,31 g L⁻¹ d⁻¹) e síntese proteica (73,8%). Enquanto que a realização do segundo estágio acarretou na renovação de nutrientes, estimulando um novo aumento da produtividade. Verificou-se também que para alcançar a máxima produção de lipídeos (34,6%), carboidratos (58,1%) e PHB (29,6%) é necessário que o nitrogênio tenha sido totalmente consumido a 3, 14 e 8 dias, respectivamente. No entanto, a melhor condição para obtenção de maior rendimento de proteínas (1,60 g L⁻¹) foi o ensaio em duplo estágio com redução de nitrogênio no 15º d, cultivado por 20 d, enquanto que a melhor condição para a produção de carboidratos (0,54 g L⁻¹) foi o ensaio em duplo estágio com redução de nitrogênio no 10º ou 15º d, cultivado por 20 d. A melhor condição para obter o maior rendimento de lipídios (0,62 g L⁻¹) e PHB (0,39 g L⁻¹) foi o ensaio com redução de nitrogênio no 5º d, cultivado por 15 e 20 d, respectivamente. Desta forma, o estudo realizado em duplo estágio, com 100% do composto nitrogenado no primeiro estágio, seguido de redução para 10% de nitrogênio no segundo estágio, se mostrou estratégia de obtenção concomitante de elevada produtividade celular, paralelamente à altas concentrações de macromoléculas.

Referências

- ANSARI, S.; FATMA, T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1–20, 2016.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.
- BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Enhancement of the carbohydrate content in *Spirulina* by applying CO₂, thermoelectric fly ashes and reduced

nitrogen supply. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1241-1247, 2019.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–1982, 1988.

CAMPBELL, J.; STEVENS JR, E.; BALKWILL. Accumulation of poli- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361–363, 1982.

CAPRIO, F.; VISCA, A.; ALTIMARI, P.; TORO, L.; MASCIOCCHI, B.; IAQUANIELLO, G.; PAGNANELLI, F. Two stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 415–420, 2016.

CASTRO, G. F. P. S.; RIZZO, R. F.; PASSOS, T. S.; SANTOS, B. N. C.; DIAS, D. S.; DOMINGUES, J. R.; ARAÚJO, K. G. L. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. **Food Science Technology**, v. 35, n. 1, p. 18–24, 2015.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975

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

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489–1493, 2007.

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

COSTA, A. S.; MIRANDA, A. L.; ANDRADE, B. B.; ASSIS, D. J.; SOUZA, C. O.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552-562, 2018.

DANESH, A. F.; MOOIJ, P.; EBRAHIMIL, S.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. V. Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 1152–1160, 2018.

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

- HILLE, R. V.; FAGAN, M.; BROMFIELD, L.; POTT, R. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.
- HINAI, M. A.; KALBANI, A. A.; RUBKHI, B. A.; KALBANI, U. A.; WALKE, S. Protein Extraction from *Spirulina platensis*. **International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering**, v. 8, n. 12, 2019.
- HORNES, M.; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Influence of nitrogen compounds on the protein concentration of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Science Food Technology**, v. 30, n. 2, p. 364–371, 2010.
- JAU, M. H.; YEW, S. P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C. CHU, W. L. PHANG, S. M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.
- LI, Y.; CHEN, Y. F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138–5144, 2011.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.
- LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.
- MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 36, p. 5354–5362, 2016.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 574–576, 1966.
- MARTÍN-JUÁREZ, J.; MARKOU, G.; MUYLAERT, K.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO, S. Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, p. 183–207, 2017.
- MARTINS, R. G., GONÇALVES, I. S., MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by cyanobacterium *Spirulina strain* LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, p. 1–6, 2014.
- MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S. MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. New technologies from the bioworld: selection of biopolymer-producing microalgae. **Polymer**, v. 27, n. 4, p. 285–289, 2017.

MATOS, A. P.; MORIOKA, L. R. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. cultivated in residual concentrated desalination. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 364–370, 2015.

MONSHUPANEE, T.; NIMDACH, P.; INCHAROENSAKDI, A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37121, p. 1–9, 2016.

MORAES, L.; ROSA, G. M.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation and production of *Spirulina* sp. LEB 18 biomass with different concentrations of NaNO₃ and NaCl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1–10, 2018.

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. **Zeitschrift für Naturforsch.**, v. 63, p. 144–150, 2008.

NAYAK, M.; SUH, W. I.; CHANG, Y. K.; LEE, B. Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 110–118, 2019.

ROSA, G. M.; MORAES, L. SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528-534, 2016.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, v. 2, 2001.

SUN, X. M.; REN, L. J.; ZHAO, Q. Y.; JI, X. J.; HUANG, H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 272, n. 11, p. 1–16, 2018.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler**. Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

3.2 PRIVAÇÃO DE NITROGÊNIO NO CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM DUPLO ESTÁGIO PARA ESTIMULAR ELEVADA PRODUTIVIDADE E SÍNTESE DE MACROMOLÉCULAS

Resumo

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos capazes de assimilar o dióxido de carbono para produzir compostos de interesse, como proteínas, lipídios e carboidratos. Estas macromoléculas podem ter suas concentrações ampliadas por meio de acúmulo sob condições de estresse, como ausência de nitrogênio. Além disso, a estratégia de duplo estágio no cultivo também pode estimular a síntese destas macromoléculas pela microalga, o qual promove produtividade de biomassa e acúmulo de compostos de interesse. Através das biorrefinarias de microalgas é possível alcançar o aproveitamento das diferentes frações da biomassa. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de macromoléculas pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em duplo estágio com ausência de nitrogênio. Os ensaios foram conduzidos em duplo estágio, em que no primeiro estágio a microalga dispôs de aporte nutricional completo para o crescimento, e no segundo estágio, meio sem a fonte de nitrogênio foi adicionado aos cultivos, a fim de estimular a produção de macromoléculas. O primeiro estágio foi realizado com meio Zarrouk modificado, contendo 100% de nitrogênio (NaNO_3 , $2,5 \text{ g L}^{-1}$) e 50% de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$). O segundo estágio iniciou com a substituição do meio de cultivo pelo meio com 50% de carbono e ausência de NaNO_3 no 5º, 10º ou 15º d de cultivo. A ausência de nitrogênio aliada ao cultivo em duplo estágio promoveu o crescimento celular e mudança na composição da biomassa. O ensaio com ausência de nitrogênio no 10º d atingiu o maior teor de carboidratos ($0,84 \text{ g L}^{-1}$) no 20º d. A melhor condição para a produção de lipídios ($0,66 \text{ g L}^{-1}$) foi o cultivo em duplo estágio com ausência de nitrogênio no 15º d por 20 d, enquanto que a maior concentração de proteínas ($1,6 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida no primeiro estágio do cultivo com restrição de nitrogênio no 15º d. Assim, este trabalho contribui para a definição de estratégias de cultivo que envolvam a maximização da síntese de lipídios, carboidratos e proteínas pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, que se destaca devido ao seu alto valor nutricional.

Palavras-chave: Biomassa. Biorrefinaria. Biotecnologia microalgal. Nutrientes.

3.2.1 Introdução

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos capazes de assimilar o dióxido de carbono para produzir compostos de interesse, sendo fonte promissora de proteínas, lipídios e carboidratos. A biotecnologia microalgal explora diferentes aplicações destes micro-organismos, como a produção de biocombustíveis e a aplicação em alimentos. Dentre as microalgas, a *Spirulina* é uma das mais estudadas devido ao seu alto valor nutricional e à presença de diversos biocompostos de interesse. As macromoléculas microalgais destacam-se como matéria-prima sustentável para as biorrefinarias, sendo amplamente empregadas em indústrias de alimentos, ração animal e biocombustíveis (RAN et al., 2019). Para viabilizar economicamente a produção de microalgas, é imprescindível a utilização maximizada dos diferentes bioprodutos obtidos da biomassa, que pode ser alcançada por meio da biorrefinaria (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Os compostos de interesse, oriundos das microalgas, podem ter suas concentrações ampliadas, pois suas rotas de transformação de substratos em produtos são afetadas por meio de condições de estresse, como alterações no fornecimento de nitrogênio. Assim, esses compostos são sintetizados pela célula para atuarem como reserva de carbono e energia, como os carboidratos e lipídios. A ausência de nitrogênio influencia a composição bioquímica e a velocidade de crescimento das microalgas, uma vez que este nutriente é fundamental para a síntese de aminoácidos, proteínas, DNA, RNA, enzimas e vitaminas (DANESH et al., 2018). No entanto, se as condições de estresse por nutrientes diminuem o crescimento celular, a produção da macromolécula de interesse não é maximizada. Desta forma, o cultivo em duplo estágio pode propiciar elevada produtividade de biomassa e conteúdo do composto desejado (AZIZ et al., 2020; FAROOQ et al., 2013).

A estratégia de duplo estágio envolve duas etapas, no qual o primeiro estágio ocorre sob condições ótimas de crescimento, resultando no aumento da produtividade de biomassa. O segundo estágio consiste na ausência de um nutriente particular do meio de cultura, podendo estimular o acúmulo de macromoléculas pela microalga (AZIZ et al., 2020; MONSHUPANEE; NIMDACH; INCHAROENSAKDI, 2016). Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em duplo estágio, com ausência de nitrogênio, visando obter elevada produtividade de biomassa, bem como, definir o tempo de cultivo para obtenção de máxima concentração de macromoléculas de interesse.

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, foi isolada da Lagoa Mangueira, localizada no extremo sul do Brasil, na cidade de Santa Vitória do Palmar – RS (MORAIS et al., 2008). O inóculo foi mantido em frasco erlenmeyer de 6 L com meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) modificado, contendo 50% da fonte de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$) por 10 d.

Para a realização dos experimentos foram utilizados fotobiorreatores fechados do tipo tubular de 2 L, com volume útil de 1,6 L, contendo $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de concentração inicial de biomassa. Os cultivos foram conduzidos a 30°C em câmara termostatizada, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e luminosidade de $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A agitação foi contínua por meio da injeção de ar estéril e os experimentos foram realizados em triplicata por 20 d. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada em todos ensaios com 50% de carbono no meio Zarrouk modificado (MARTINS, 2014).

No primeiro estágio do cultivo, os experimentos foram submetidos ao meio Zarrouk modificado contendo 50% de carbono e 100% de nitrogênio (NaNO_3 , $2,5 \text{ g L}^{-1}$). O segundo estágio teve início nos tempos 5, 10 ou 15 d dos cultivos, no qual foi realizada a substituição do meio, com ausência de nitrogênio. Os ensaios controle foram realizados em um único estágio com ausência e 100% da fonte original de nitrogênio (NaNO_3) do meio de cultivo.

O segundo estágio dos cultivos iniciou a partir da centrifugação (Refrigerated Centrifuge CR22GIII, Japão) a 15.200 g , 20°C por 30 min para a substituição de meio. Para remoção dos sais do meio, as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, seguido de centrifugação a 15.200 g , 20°C por 10 min. Após esse processo foi adicionado meio Zarrouk sem nitrogênio. A concentração de biomassa foi mantida a mesma no início do segundo estágio e o volume dos ensaios foi constante devido adição diária de água estéril que supriu as perdas por evaporação.

3.2.2.2 Determinações analíticas e parâmetros cinéticos

A concentração de biomassa foi determinada pela medida de densidade ótica a 670 nm (COSTA et al., 2002), utilizando o espectrofotômetro (Spectrophotometer UVmini-1240, Shimadzu). O pH foi determinado por meio de pHmetro (Even, PHS-3E, Brasil). Ambas análises foram realizadas diariamente com alíquotas de 4 mL retiradas dos cultivos.

A partir dos valores de concentração de biomassa foram determinadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) (SCHMIDELL et al., 2001) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$). O tempo de geração (t_g , d) foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga (BAILEY; OLLIS, 1986), de acordo com a Equação 1, e o maior valor de concentração obtido no decorrer do cultivo foi considerado concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g L^{-1}). O maior valor de produtividade encontrado ao longo do cultivo correspondeu ao $P_{\text{máx}}$, sendo a produtividade obtida segundo a Equação 2, em que X_t é a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t_0 (d). A $\mu_{\text{máx}}$ foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento logarítmica, conforme a Equação 3.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (1)$$

$$P = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

3.2.2.3 Análise de nitrogênio

A cada 3 d determinou-se o teor de nitrogênio pela adição de 0,8 mL da solução de 5% de ácido salicílico em ácido sulfúrico (PA) e 19 mL de hidróxido de sódio 2 N à 0,2 mL de amostra. Conforme Cataldo et al. (1975), a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 410 nm e os valores de absorvância foram correlacionados com a curva padrão.

3.2.2.4 Composição proximal da biomassa microalgal

Em intervalos de 5 d foi retirado amostra de cada reator tubular para realização da composição, e então a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi separada do meio líquido por centrifugação (HITACHI HIMAC CR-GIII, Japão) a 4.600 g por 30 min. Após, a biomassa foi ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada por mais duas vezes, por 10 min, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -80 °C por 48 h e após foi liofilizada por 48 h. Em seguida, a amostra liofilizada foi armazenada a -18 °C para posterior utilização nas análises (ROSA et al., 2016).

A concentração de lipídios foi determinada pelo método espectrofotométrico de Marsh e Weinstein (1966), utilizando curva padrão de tripalmitina. A concentração de proteínas na biomassa foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951), a partir da curva padrão de albumina (Apêndice 2). A concentração de carboidratos foi determinada conforme o método de fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose (Apêndice 3).

3.2.2.5 Análise estatística

As médias dos resultados dos ensaios realizados em triplicata foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey com nível de confiança de 95 %.

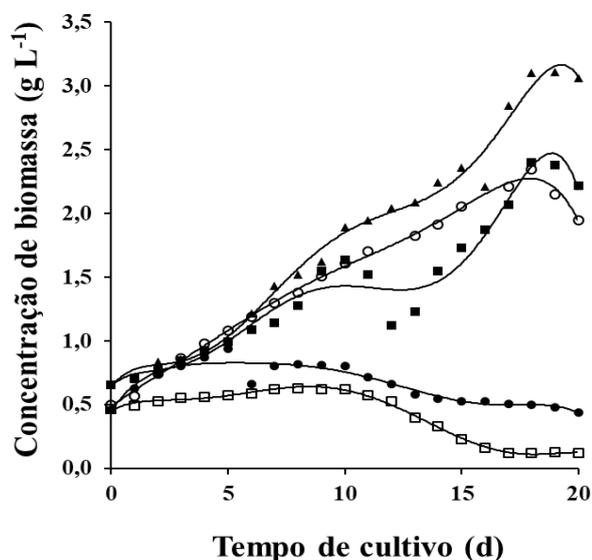
3.2.3 Resultados e discussão

3.2.3.1 Crescimento microalgal e parâmetros cinéticos

A ausência de nitrogênio não impediu o crescimento celular dos cultivos em duplo estágio, visto que inicialmente foi realizado o suprimento deste nutriente no primeiro estágio, o que possibilitou crescimento posterior. As células são capazes de armazenar nitrogênio, podendo utilizá-lo em casos de estresses como ausência do mesmo. Todos os ensaios exibiram ausência da fase de latência (Figura 1), uma vez que o inóculo estava previamente adaptado ao meio Zarrouk modificado, contendo 50% da fonte de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$). Segundo Schimidell et al. (2001), enzimas necessárias para a utilização dos componentes do meio de cultivo são produzidas durante a fase de crescimento. Entretanto, com a adaptação do inóculo estas enzimas são sintetizadas, sendo eliminado o tempo da fase de latência, havendo diretamente a fase exponencial.

Todos os ensaios realizados em duplo estágio apresentaram crescimento celular até o dia da substituição do meio, havendo queda na concentração de biomassa por 1 d para os ensaios com ausência de nitrogênio no 5º e 15º d. Para o ensaio com ausência de nitrogênio no 10º d foi observada queda na concentração de biomassa por 2 d (Figura 1). Isto ocorreu devido à adaptação das células referente à troca de meio e por ficarem injuriadas pela centrifugação. Após essa adaptação, as células retornaram a fase de crescimento linear. Este aumento na concentração é devido à renovação dos nutrientes do meio Zarrouk, exceto o nitrogênio.

Figura 1 - Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com (○) 100% de NaNO₃ em único estágio, (□) ausência de NaNO₃ em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com ausência de NaNO₃ no meio.



Para o ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d, após esta adaptação houve aumento da concentração de biomassa seguido de fase estacionária por 4 d e declínio celular. O ensaio com ausência de nitrogênio no 10º d apresentou crescimento celular por 6 d, e em seguida declínio celular, enquanto o ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d cresceu por 2 d, exibindo logo após fase estacionária por 3 d. De acordo com Danesh et al. (2018), o nitrogênio é utilizado para produzir compostos essenciais à multiplicação celular, como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes, o que justifica o menor crescimento celular obtido no ensaio controle com ausência de nitrogênio quando comparado aos demais ensaios.

A maior concentração de biomassa foi obtida no ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d (Tabela 1). Este crescimento está relacionado ao nitrogênio estar disponível durante toda fase exponencial e fase linear de crescimento, promovendo melhor multiplicação celular. A menor concentração de biomassa foi encontrada no ensaio controle com ausência de nitrogênio, uma vez que as células não dispunham deste nutriente essencial ao seu crescimento, limitando a produção de proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes. Desta forma, pode-se inferir que quanto mais próximo do início da fase de morte celular for a substituição do meio de cultura, maior será a concentração de biomassa microalgal. Assim, todos os nutrientes, incluindo o nitrogênio, estiveram disponíveis ao longo do crescimento.

O ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d apresentou produtividade volumétrica máxima e velocidade específica máxima de crescimento maiores no primeiro estágio, quando comparado ao segundo estágio. O tempo de geração desse experimento no primeiro estágio foi menor que no segundo estágio. Isto mostra a relação de dependência da multiplicação celular com o suprimento de nitrogênio.

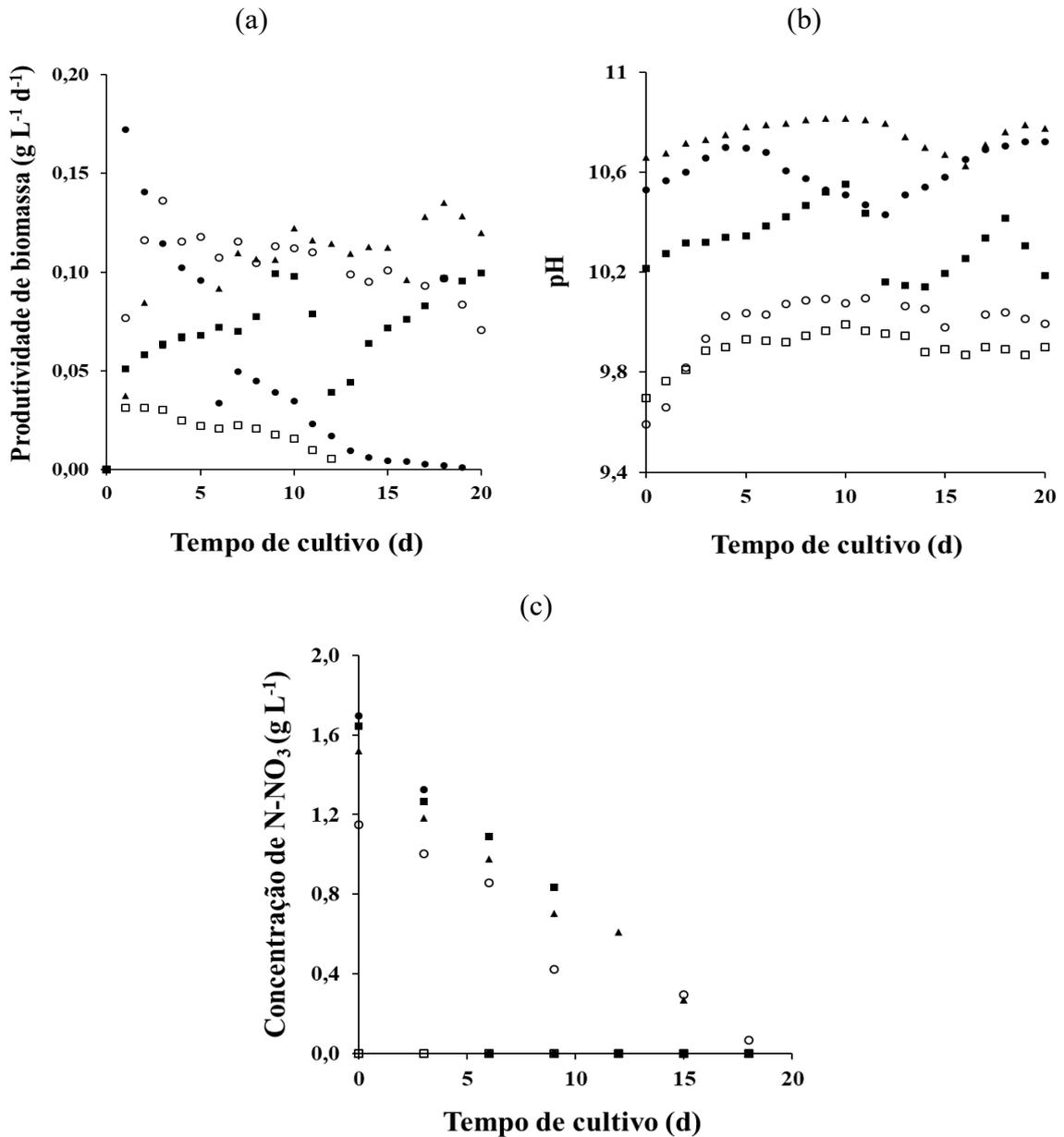
Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d) da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO₃ em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO₃ no meio.

Ensaio	Estágio	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$	t_g
Controle 1	Único	2,34±0,23 ^b	0,15±0,02 ^{ab}	0,22±0,04 ^a	2,87±0,29 ^a
Controle 2	Único	0,63±0,03 ^d	0,04±0,01 ^d	0,06<0,01 ^c	11,59±0,81 ^d
Ensaio 1	1º	0,94±0,05 ^d	0,17±0,02 ^a	0,18<0,01 ^{ab}	3,79±0,09 ^{ba}
	2º	0,82±0,01 ^d	0,05<0,01 ^{cd}	0,08<0,01 ^c	9,26±0,52 ^d
Ensaio 2	1º	1,63±0,16 ^c	0,10±0,01 ^{bc}	0,12±0,02 ^{bc}	5,76±0,77 ^{bc}
	2º	2,43±0,05 ^b	0,10±0,01 ^{bc}	0,14±0,02 ^{abc}	4,99±0,78 ^{bca}
Ensaio 3	1º	2,36±0,04 ^b	0,12<0,01 ^{ab}	0,14±0,02 ^{abc}	5,08±0,65 ^{bca}
	2º	3,11±0,17 ^a	0,14±0,01 ^{ab}	0,11±0,02 ^{bc}	6,50±1,02 ^c

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os ensaios realizados em duplo estágio apresentaram queda na produtividade durante o período de adaptação relacionado à troca de meio de cultura. Após, houve aumento da produtividade devido ao suprimento de nutrientes do meio adicionado (Figura 2a). Em seguida, ocorreu declínio celular, uma vez que dentre estes nutrientes, o nitrogênio não estava disponível. As maiores produtividades foram observadas no controle com 100% de nitrogênio e no primeiro estágio do ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d, devido à presença de nitrogênio no cultivo. Também foi observada alta produtividade no ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d, tanto no primeiro quanto no segundo estágio, pois o nitrogênio só foi removido ao final do cultivo. As menores produtividades foram observadas no controle com ausência de nitrogênio e no ensaio submetido à ausência de nitrogênio no início do cultivo (5º d), que permaneceu por mais tempo na escassez deste nutriente quando comparado aos ensaios com substituição de meio no 10º e 15º d.

Figura 2 – Produtividade volumétrica de biomassa (a), pH (b) e concentração de nitrogênio (c) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 realizados com (○) 100% de NaNO_3 em único estágio, (□) ausência de NaNO_3 em único estágio, e primeiro estágio com 100% de NaNO_3 e início do segundo estágio em (●) 5 d, (■) 10 d ou (▲) 15 d com ausência de NaNO_3 no meio.



À medida que ocorreu o crescimento da microalga, houve alteração no pH dos cultivos (Figura 2b). De acordo com Costa et al, (2002) o pH ótimo para o cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 varia entre 8,3 e 11,0, pois neste intervalo há maior disponibilidade de carbonato e bicarbonato, o que promove o crescimento da microalga. Pelizer et al. (2003) relacionaram o aumento do pH ao consumo de carbonato do meio e relataram que, conforme a microalga utiliza o carbonato para o seu crescimento, ocorre elevação do pH. Isto é observado

nos experimentos deste trabalho, pois todos os experimentos apresentaram aumento do pH conforme a microalga assimilou carbonato e bicarbonato durante o crescimento. No entanto, a ausência de nitrogênio no meio de cultura ocasionou decréscimo da concentração de biomassa por 1 a 2 d, o que resultou em redução do pH neste período. O decréscimo do pH na substituição do meio de cultura comprova a fase de adaptação da microalga ao meio novo e a redução do pH ao final dos cultivos corrobora com a fase de morte celular.

A partir da análise de nitrogênio foi possível observar a relação do consumo de nitrato pela microalga (Figura 2c) e a multiplicação celular. À medida que o crescimento celular foi aumentando, a concentração de nitrogênio no meio diminuiu. O mesmo foi observado por Pelizer et al. (2003), que relataram melhor resultado de crescimento celular com o maior consumo de nitrogênio.

3.2.3.2 Síntese de macromoléculas

O ensaio controle em único estágio com ausência de nitrogênio diminui custos com nutrientes e pode produzir macromoléculas de interesse em altas concentrações, porém não atinge o mesmo teor de proteínas, lipídios e carboidratos obtidos no ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d (Tabela 2). O controle com ausência de nitrogênio foi cultivado por 15 d, não havendo biomassa para analisar no 20º d devido morte celular. Conforme Monshupanee; Nimdach; Incharoensakdi (2016), para que seja possível a aplicação do bioproduto em escala industrial é imprescindível que haja produtividade celular, juntamente com a concentração do composto de interesse.

A concentração de proteína sintetizada pela microalga está associada ao nitrogênio disponível no meio de cultura. Assim, quanto menor a concentração de nitrogênio, menor será a produção de proteínas pela microalga. A *Spirulina platensis* é constituída de 50 a 75% de proteína (HINAI et al., 2019). Todos os ensaios exibiram teores de proteína, dentro desse intervalo, no tempo 0 d dos cultivos. Além disso, tanto os experimentos com ausência de nitrogênio no segundo estágio quanto o controle sem fonte de nitrogênio apresentaram baixa concentração de proteínas, devido ao nitrogênio ser essencial para a síntese das mesmas. Estes ensaios exibiram decréscimo contínuo no conteúdo proteico a partir da ausência de nitrogênio, sendo o controle, sem fonte de nitrogênio, o ensaio que atingiu menor concentração de proteínas (13,3%), por não iniciar o cultivo com suprimento de nitrogênio. Conforme Castro et al. (2015), as células são capazes de armazenar nitrogênio na forma de compostos nitrogenados e utilizá-los quando houver escassez de nitrogênio no meio de cultura. Assim, quando este nutriente é

fornecido no início do cultivo, gera maior síntese de proteínas, ainda que haja ausência de nitrogênio ao longo do cultivo.

Tabela 2 – Composição da biomassa (%) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO₃ em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO₃ em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO₃ e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO₃ no meio.

Tempo (d)	Controle 1	Controle 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Proteínas (% m ⁻¹)					
0	53,5±1,5 ^{bA}	52,4±1,5 ^{aA}	55,9±1,6 ^{aA}	53,7±1,6 ^{bcA}	53,8±2,2 ^{bA}
5	55,9±0,1 ^{bA}	35,2±0,1 ^{bB}	57,4±1,3 ^{aA}	59,1±1,3 ^{bA}	58,2±1,7 ^{bA}
10	66,8±0,3 ^{aA}	20,0±1,0 ^{cC}	39,9±0,4 ^{bB}	66,5±0,9 ^{aA}	70,9±2,7 ^{aA}
15	67,2±2,1 ^{aA}	13,3±0,9 ^{dD}	23,4±1,8 ^{cC}	49,5±2,0 ^{cB}	68,1±0,3 ^{aA}
20	67,3±0,6 ^{aA}	-	19,7±0,7 ^{cD}	35,0±2,3 ^{dC}	40,4±0,5 ^{cB}
Lipídios (% m m ⁻¹)					
0	13,2±0,8 ^{aA}	14,3±0,5 ^{cA}	13,9±0,4 ^{bA}	12,9±0,7 ^{bA}	13,8±1,0 ^{bA}
5	14,8±1,3 ^{aA}	17,7±0,7 ^{bcA}	15,5±1,7 ^{bA}	14,6±1,2 ^{bA}	14,8±0,8 ^{bA}
10	14,8±0,2 ^{aB}	21,1±0,3 ^{bA}	15,9±0,8 ^{bB}	14,9±0,2 ^{bB}	14,0±0,8 ^{bB}
15	15,7±1,3 ^{aB}	26,4±2,1 ^{aA}	14,8±2,5 ^{bB}	17,5±1,1 ^{aB}	16,2±0,4 ^{bB}
20	13,9±1,8 ^{aB}	-	32,2±3,0 ^{aA}	20,0±0,4 ^{aB}	21,6±1,6 ^{aB}
Carboidratos (% m m ⁻¹)					
0	8,3±0,1 ^{cB}	14,3±0,2 ^{dA}	12,6±1,4 ^{dA}	13,9±1,4 ^{cA}	13,0±0,6 ^{bA}
5	8,6±0,3 ^{cC}	33,8±0,6 ^{cA}	14,5±1,4 ^{dB}	15,7±0,9 ^{cB}	14,1±0,1 ^{bB}
10	10,6±0,4 ^{bD}	40,9±0,9 ^{bA}	36,8±1,3 ^{cB}	15,8±0,3 ^{cC}	13,4±0,5 ^{bCD}
15	15,0±0,5 ^{aD}	49,3±1,7 ^{aB}	60,1±0,3 ^{aA}	21,7±0,6 ^{bC}	14,9±0,4 ^{bD}
20	16,1±0,4 ^{aD}	-	45,7±1,6 ^{bA}	38,0±1,1 ^{aB}	22,6±0,8 ^{aC}

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo ensaio e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre ensaios de condições diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); - amostra insuficiente para realização da análise.

Braga et al. (2019) cultivaram a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em meio com 0,25 g L⁻¹ de NaNO₃ e injeção de CO₂ a cada 1 min, obtendo 21,7% de proteínas. Este resultado foi próximo ao encontrado no ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d (19,7%), no 20º d. Embora neste trabalho o nitrogênio tenha sido retirado totalmente a partir do 5º d, no primeiro estágio 100% de NaNO₃ foram disponibilizados para a microalga, o que pode ter compensado

para que alcançasse a mesma concentração de um experimento realizado com 10% de nitrogênio. Além disso, no 10º d de cultivo este ensaio acumulou 39,9% de proteínas, destacando a vantagem do primeiro estágio com suprimento de nitrogênio para a produção de proteínas.

Quanto maior o tempo de cultivo da microalga em meio com disponibilidade de nitrogênio, maior será o teor de proteínas obtido ao final do cultivo. Isto é observado nos ensaios deste trabalho, visto que o controle com 100% de nitrogênio obteve o maior teor proteico no 20º d, uma vez que foi o único ensaio com disponibilidade de nitrogênio durante todo o cultivo microalgal. Avaliando o 20º d dos cultivos, é possível colocar os ensaios em ordem crescente de aumento do conteúdo proteico, que ocorreu conforme o tempo da microalga na presença da fonte de nitrogênio: controle com ausência de nitrogênio, cultivo com redução de nitrogênio no 5º d, cultivo com redução de nitrogênio no 10º d, cultivo com redução de nitrogênio no 15º d, e controle com 100% de nitrogênio.

No tempo de cultivo de 10 d, o controle com 100% de nitrogênio produziu concentração de proteínas igual, estatisticamente, aos ensaios com ausência de nitrogênio no 10º e 15º d (70,9%), visto que ambos estavam nas mesmas condições nutricionais neste tempo do cultivo. A concentração de proteínas obtida nestes ensaios foi maior quando comparada aos ensaios com restrição de nitrogênio no 5º d e o controle sem a fonte de nitrogênio. No entanto, considerando a concentração de biomassa, foi obtido maior rendimento de proteínas (1,6 g L⁻¹) no ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d (Apêndice 7), sendo esta a melhor condição para obtenção desta macromolécula.

Quando a fonte de nitrogênio é reduzida a teores baixos, a célula tem pouco nitrogênio disponível. Com isso, a célula necessita de reserva de energia que será utilizada à medida em que a concentração de nitrogênio presente no meio de cultura diminuir. No entanto, quando não há nitrogênio no meio de cultura, há urgência na produção de compostos que atuem como reserva de energia e sejam consumidos imediatamente. Dessa forma, a célula altera sua rota metabólica de produção de macromoléculas. Segundo Sun et al. (2018), tanto lipídios quanto carboidratos são moléculas sintetizadas como reserva de energia, porém os lipídios são consumidos a longo prazo, enquanto os carboidratos são produzidos pelas microalgas para consumo imediato.

Neste trabalho não houve diferença significativa na síntese de lipídios entre os ensaios com ausência de nitrogênio no 10º d e 15º d. O estresse causado pela ausência de nitrogênio no controle induziu a célula a acumular lipídios no 15º d, sem diferença estatística em relação ao resultado obtido no 20º d (32,2%) do ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d

do cultivo, sendo estes os maiores valores obtidos para lipídios. Dessa forma, observa-se a importância da restrição do suprimento inicial de nitrogênio para a síntese de lipídios. No entanto, a melhor condição para o acúmulo de lipídios foi o ensaio em duplo estágio com ausência de nitrogênio no 15º d, cultivado por 20 d, pois, devido a concentração de biomassa neste tempo, alcançou 0,66 g L⁻¹ de lipídios, resultando em maior rendimento desta macromolécula (Apêndice 7).

Hu et al. (2019) maximizaram a produtividade lipídica pela *Chlorella vulgaris* em reator *air-lift*, submetendo-a a estratégia de duplo estágio. O primeiro estágio foi realizado com concentração adequada de nutrientes para crescimento celular e no segundo estágio houve privação de nutrientes para aumento da produção de lipídios pela microalga, atingindo 54,2% desta macromolécula. Farooq et al. (2013) também realizaram cultivo em duplo estágio com *Chlorella vulgaris*. No primeiro estágio os autores utilizaram condição fotoautotrófica com águas residuais de cervejaria. No segundo estágio foi realizado cultivo fotoheterotrófico com adição de glicose como fonte de carbono. Esta condição obteve aumento no teor de lipídios de 0,03 para 0,11 g/L d.

A *Spirulina platensis* é constituída de 8 a 14% de carboidratos (BECKER et al., 2007). Os resultados obtidos nos tempos 0 e 5 d dos cultivos em duplo estágio e controle com 100% de nitrogênio ficaram dentro da faixa esperada. Porém, as microalgas podem acumular teores maiores de carboidratos se submetidas a condições de estresse, como limitação de nutrientes. O experimento com ausência de nitrogênio no 5º d acumulou maior teor de carboidratos ao final do cultivo quando comparado ao ensaio com ausência de nitrogênio no 10º d. Por outro lado, o ensaio com ausência de nitrogênio no 10º d produziu maior concentração de carboidratos que o ensaio com ausência de nitrogênio a partir do 15º d, uma vez que permaneceu na ausência de nitrogênio por mais tempo (10 e 5 d, respectivamente). Conforme o tempo de escassez de nitrogênio no cultivo, ocorreu maior acúmulo de carboidratos. Logo, pode-se afirmar que para a síntese de carboidratos pela *Spirulina* sp. LEB 18, quanto antes limitar o nitrogênio, maior será o acúmulo desta macromolécula. No entanto, a concentração de biomassa deve ser levada em consideração, pois vai influenciar no rendimento da macromolécula.

Caprio et al. (2016) descreveram uma mudança metabólica observada nas células quando os carboidratos metabolizáveis disponíveis no meio de cultivo diminuem à medida que são utilizados pelas células, então os carboidratos são armazenados de forma intracelular e em seguida, são convertidos em lipídios. Esta mudança metabólica é observada no ensaio com

ausência de nitrogênio no 5º d, em que o teor de carboidratos produzidos no 15º d apresentou um decréscimo de aproximadamente 15% no 20º d, enquanto que a concentração de lipídios no 15º d para o 20º d aumentou 17,4%.

Neste estudo, o ensaio com redução de nitrogênio no 10º d, cultivado por 20 d, alcançou a maior concentração de carboidratos, atingindo 0,84 g L⁻¹ (Apêndice 7). A estratégia de duplo estágio se mostrou indicada para a produção de carboidratos, pois houve obtenção desta macromolécula e produtividade de biomassa superiores ao ensaio controle sem nitrogênio. Assim, a melhor condição para o acúmulo de carboidratos foi o cultivo em duplo estágio por 20 d com ausência de nitrogênio no 10º d.

3.2.4 Conclusão

A partir deste estudo verificou-se que a realização do cultivo em duplo estágio proporcionou maior crescimento a microalga, atingindo concentração de biomassa de 3,1 g L⁻¹ no segundo estágio do ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d. Ao mesmo tempo que a renovação de nutrientes neste estágio estimulou novo aumento da produtividade de 0,14 g L⁻¹ d⁻¹. A ausência de nitrogênio aliada à estratégia de duplo estágio promoveu teor de carboidratos de 60,1% no ensaio com ausência de nitrogênio no 5º d por 15 d e teor de lipídios de 32,2% no 20º d. Quando cultivada em estágio único com 100% de nitrogênio por 10 d, a microalga acumulou 70,9% de proteínas, visto a relação de síntese dessa macromolécula com o nitrogênio. Contudo, a concentração de biomassa interfere diretamente no rendimento das macromoléculas, logo, a melhor condição para a obtenção de proteínas (1,60 g L⁻¹) e lipídios (0,66 g L⁻¹) foi o ensaio com restrição de nitrogênio no 15º d, cultivado por 15 e 20 d, respectivamente. Enquanto que, a melhor condição para acumular carboidratos foi o cultivo com ausência de nitrogênio no 10º d, por 20 d, que produziu 0,84 g L⁻¹ desta macromolécula. Portanto, esta pesquisa colabora para a definição das condições de cultivo que envolvam a maximização da produção de macromoléculas pela *Spirulina* sp. LEB 18.

Referências

AZIZ, M. M. A.; KASSIM, K. A.; SHOKRAVI, Z.; JAKARNI, F. M.; LIEU, H. Y.; ZAINI, N.; TAN, L. S.; ISLAM, A. B. M. S.; SHOKRAVI, H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, 2020.

- CASTRO, G. F. P. S.; RIZZO, R. F.; PASSOS, T. S.; SANTOS, B. N. C.; DIAS, D. S.; DOMINGUES, J. R.; ARAÚJO, K. G. L. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. **Food Science Technology**, v. 35, n. 1, p. 18–24, 2015.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 603–607, 2002.
- DANESH, A. F.; MOOIJ, P.; EBRAHIMIL, S.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. V. Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 1152–1160, 2018.
- FAROOQ, W.; LEE, Y.-C.; RYU, B.-G.; KIM, B.-H.; KIM, H.-S.; CHOI, Y.-E.; YANG, J.-W. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.
- HU, X.; LIU, B.; DENG, Y.; BAO, X.; YANG, A.; ZHOU, J. A novel two-stage culture strategy used to cultivate *Chlorella vulgaris* for increasing the lipid productivity. **Separation and Purification Technology**, v. 211, p. 816-822, 2019.
- NAYAK, M.; SUH, W. I.; CHANG, Y. K.; LEE, B. Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 110–118, 2019.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371–375, 2003.
- RAN, W.; WANG, H.; LIU, Y.; QI, M.; XIANG, Q.; YAO, C.; ZHANG, Y.; LAN, X. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by Nutrients. **Bioresource Technology**, v. 291, 2019.
- MONSHUPANEE, T.; NIMDACH, P.; INCHAROENSAKDI, A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37121, p. 1–9, 2016.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler.** Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A partir deste estudo foi possível verificar que a estratégia de cultivo em duplo estágio influencia diretamente o crescimento e a composição da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Esta condição promoveu aumento da produção de biomassa uma vez que o primeiro estágio do cultivo possuía todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento da microalga. Com isso, obteve-se elevada concentração de biomassa ($3,1 \text{ g L}^{-1}$) no segundo estágio do ensaio com ausência de nitrogênio no 15º d e aumento da produtividade de biomassa ($0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) no segundo estágio do ensaio com 10% de nitrogênio a partir do 15º d. Esta elevada produtividade é decorrente da renovação de nutrientes pela substituição do meio de cultivo. Os cultivos contendo 100% de nitrogênio apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento, sendo o controle com $0,22 \text{ d}^{-1}$ e o primeiro estágio do ensaio com redução de 90% de nitrogênio no 5º d com $0,25 \text{ d}^{-1}$. Estes ensaios apresentaram os menores tempos de geração, 2,87 d e 2,78 d, respectivamente.

Devido ao duplo estágio, concomitante à multiplicação celular, ocorreu o acúmulo de macromoléculas de interesse, atingindo 29,6% de PHB ao final do ensaio submetido a redução de 90% da fonte de nitrogênio no 5º d. Houve elevado acúmulo de carboidratos no ensaio em duplo estágio cultivado por 15 d com ausência de nitrogênio no 5º d, que produziu 60,1%, enquanto que o conteúdo lipídico foi obtido em maior teor (34,6%) no ensaio em duplo estágio cultivado por 15 d com redução de 90% de nitrogênio no 5º d. O conteúdo proteico foi reduzido gradativamente a partir da limitação de nitrogênio, porém na presença deste nutriente foi sintetizado 73,8% de proteínas no 10º d de cultivo.

No entanto, a concentração de biomassa influencia diretamente no rendimento das macromoléculas. Assim, para os cultivos com redução de 90% da fonte de nitrogênio, a melhor condição para obtenção de proteínas foi o cultivo em duplo estágio com redução de nitrogênio no 15º d, sendo que a extração desta macromolécula deve ser realizada no 20º d, onde se obteve $1,60 \text{ g L}^{-1}$. A condição que obteve maior rendimento de lipídios e PHB foi o ensaio com limitação de nitrogênio no 5º d, que atingiu $0,62 \text{ g L}^{-1}$ de lipídios no 15º d e $0,39 \text{ g L}^{-1}$ de PHB no 20º d. A melhor condição para alcançar elevado conteúdo de carboidratos foi o cultivo em duplo estágio com redução de nitrogênio no 10º ou 15º d, durante 20 d, que produziu $0,54 \text{ g L}^{-1}$.

A partir deste estudo foi possível afirmar que, para os ensaios realizados com ausência de nitrogênio, considerando a concentração de biomassa, a melhor condição para se

obter rendimento de lipídios ($0,66 \text{ g L}^{-1}$) foi o ensaio em duplo estágio com restrição de nitrogênio no 15º d, cultivado por 20 d, enquanto que a condição que acumulou maior teor de carboidratos ($0,84 \text{ g L}^{-1}$) foi o cultivo em duplo estágio com ausência de nitrogênio no 10º d, por 20 d. A melhor condição para se obter rendimento de proteínas ($1,6 \text{ g L}^{-1}$) foi o primeiro estágio do cultivo com restrição de nitrogênio no 15º d, por 15 d.

Diante do exposto, foi evidenciado que esta pesquisa contribui para a definição das condições de cultivo que envolvam a maximização da produção de compostos de interesse pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18. A estratégia de utilizar dois estágios se mostrou eficiente para obter alta produtividade celular paralela a elevadas concentrações de lipídios, carboidratos e biopolímeros, que podem ser aplicados na produção de alimentos e biocombustíveis.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o cultivo em duplo estágio com ausência e redução de 90% da fonte de nitrogênio (NaNO_3 , $0,25 \text{ g L}^{-1}$) e 50% de carbono (NaHCO_3 , $8,4 \text{ g L}^{-1}$) visando aumento no acúmulo de macromoléculas por *Chlorella*.
- Avaliar a ausência da fonte de nitrogênio e injeção de CO_2 como fonte de carbono em cultivo em duplo estágio para obter elevada produtividade e síntese de macromoléculas.
- Avaliar diferentes concentrações da fonte de fósforo em cultivo em duplo estágio para estimular a produção de PHB por *Spirulina* e *Chlorella*.
- Estudar a influência de diferentes períodos à exposição de luz e intensidades luminosas na composição da microalga cultivada em duplo estágio.
- Estudar as melhores condições de cultivo em duplo estágio estabelecidas neste trabalho para a produção de lipídios, carboidratos e proteínas em reatores tipo raceway.
- Investigar a utilização de lipídios e carboidratos obtidos neste trabalho para produção de biodiesel e bioetanol, respectivamente.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, S.; FATMA, T. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1–20, 2016.
- AZIZ, M. M. A.; KASSIM, K. A.; SHOKRAVI, Z.; JAKARNI, F. M.; LIEU, H. Y.; ZAINI, N.; TAN, L. S.; ISLAM, A. B. M. S.; SHOKRAVI, H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, 2020.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 278–285, 2013.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207–210, 2007.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous bluegreen alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419, 1973.
- BERTOZZINI, E.; GALLUZZI, L.; PENNA, A.; MAGNANI, M. Enhancing neutral lipid content in *Skeletonema marinoi* through multiple phase growth in a bench photobioreactor. **Algal Research**, v. 5, p.32–36, 2014.
- BRAGA, V. D. S.; MASTRANTONIO, D. J. D. S.; COSTA J. A. V.; MORAIS, M. G. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 221–226, 2018.
- BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Enhancement of the carbohydrate content in *Spirulina* by applying CO₂, thermoelectric fly ashes and reduced nitrogen supply. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1241-1247, 2019.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–1982, 1988.
- CAKMAK, T.; ANGUN, P.; OZKAN, A. D.; CAKMAK, Z.; OLMEZ, T. T.; TEKINAY, T. Nitrogen and sulfur deprivation differentiate lipid accumulation targets of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioengineered**, v. 3, n. 6, p. 343–346, 2012.
- CAMPBELL, J.; STEVENS JR, E.; BALKWILL. Accumulation of poli- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361–363, 1982.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica** - Tradução da 5ª ed. Norte-americana, ed. Thomson Learning Edições Ltda, v. 3, p. 717–741, 2006.

CAPRIO, F.; VISCA, A.; ALTIMARI, P.; TORO, L.; MASCIOCCHI, B.; IAQUANIELLO, G.; PAGNANELLI, F. Two Stage Process of Microalgae Cultivation for Starch and Carotenoid Production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 415-420, 2016.

CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 1994.

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

CASTRO, G. F. P. S.; RIZZO, R. F.; PASSOS, T. S.; SANTOS, B. N. C.; DIAS, D. S.; DOMINGUES, J. R.; ARAÚJO, K. G. L. Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. **Food Sci. Technol**, v. 35, n. 1, p. 18–24, 2015.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.

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

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489–1493, 2007.

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

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

COSTA, A. S.; MIRANDA, A. L.; ANDRADE, B. B.; ASSIS, D. J.; SOUZA, C. O.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552-562, 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed. p. 900, 2010.

DANESH, A. F.; MOOIJ, P.; EBRAHIMIL, S.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. V. Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, p. 1152–1160, 2018.

DEB, D.; MALLICK, N.; BHADORIA, P. B. S. Analytical studies on carbohydrates of two cyanobacterial species for enhanced bioethanol production along with poly-b-

hydroxybutyrate, C-phycocyanin, sodium copper chlorophyllin, and exopolysaccharides as co-products. **Journal of Cleaner Production**, v. 221, p. 695–709, 2019.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chorella fusca* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

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

ENDRES, C. H.; ROTH, A.; BRÜCK, T. B. Modeling microalgae productivity in industrial-scale vertical flat panel photobioreactors. **Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5490–5498, 2018.

FAROOQ, W.; LEE, Y.-C.; RYU, B.-G.; KIM, B.-H.; KIM, H.-S.; CHOI, Y.-E.; YANG, J.-W. Two-stage cultivation of two *Chlorella* sp. strains by simultaneous. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 230–238, 2013.

FERREIRA, E. M. **Potencial de bactérias do rio Madeira na produção de biopolímeros**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2015.

GO, S.; LEE, S.; JEONG, G.; KIM, S. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 145–150, 2012.

GUIMARÃES, L. P. C. **Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade do Minho, Braga, 2012.

HINAI, M. A.; KALBANI, A. A.; RUBKHI, B. A.; KALBANI, U. A.; WALKE, S. Protein Extraction from *Spirulina Platensis*. **International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering**, v. 8, n. 12, 2019.

HILLE, R. V.; FAGAN, M.; BROMFIELD, L.; POTT, R. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.

HORNES, M.; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Influence of nitrogen compounds on the protein concentration of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nægeli*. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 364–371, 2010.

HU, X.; LIU, B.; DENG, Y.; BAO, X.; YANG, A.; ZHOU, J. A novel two-stage culture strategy used to cultivate *Chlorella vulgaris* for increasing the lipid productivity. **Separation and Purification Technology**, v. 211, p. 816–822, 2019.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 298–304, 2016.

- JAU, M. H.; YEW, S. P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C. CHU, W. L. PHANG, S. M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.
- JESÚS, C. S.; UEBEL, L. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E. G.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.
- 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. 36, p. 1-21, 2018.
- KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and Bioprocess Processing**, v. 110, p. 60-84, 2018.
- KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; ARAVIND, R.; SHREE, C. G.; ARTHI, K.; PALANI, P.; KAVIYARASAN, V.; RENGASAMY, R. Mass cultivation of UV-B adapted *Arthrospira platensis* RRGK under open raceway pond for the production of Poly- β -hydroxy butyrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1304-1316, 2016.
- KAVITHA, G.; RENGASAMY, R.; INBAKANDAN, D. Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 102-108, 2018.
- KUNTZER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008-1014, 2018.
- LANDIM, A. P. M.; BERNARDO, C. O.; MARTINS, I. B. A.; FRANCISCO, M. R.; SANTOS, M. B.; MELO, N. R. Sustainability regarding food packaging in Brazil. **Polymers**, v. 26, p. 82-92, 2016.
- LI, Y.; CHEN, Y. F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138-5144, 2011.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LISBOA, F. C. **Viabilidade técnica e análise de custos de diferentes meios para o cultivo de *Arthrospira platensis***. Dissertação (Mestrado em Inovação Tecnológica) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2014.

LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.

LUPATINI, A. L. **Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2016.

MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Bioethanol production using microalgae: A review. **Exact and Technological Sciences**, v. 37, n. 1, p. 159–174, 2016.

MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 36, p. 5354–5362, 2016.

MARGARITES, A. C. F. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

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

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

MARTÍN-JUÁREZ, J.; MARKOU, G.; MUYLAERT, K.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO, S. Breakthroughs in bioalcohol production from microalgae: Solving the hurdles. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, p. 183–207, 2017.

MARTINS, R. G., GONÇALVES, I. S., MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by cyanobacterium *Spirulina strain* LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, p. 1–6, 2014.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S. MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. New technologies from the bioworld: selection of biopolymer-producing microalgae. **Polymers**, v. 27, n. 4, p. 285–289, 2017.

MASOOD, F.; AZIZ, M.; HAIDER, H.; SHAKIL, O.; YASIN, T.; HAMEED, A. Biodegradation of gamma irradiated poly-3-hydroxybutyrate/sepiolite nanocomposites. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 1–9, 2018.

MATOS, A. P.; MORIOKA, L. R. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. cultivated in residual concentrated desalination. **Rural Science**, v. 45, n. 2, p. 364–370, 2015.

MCKEEN, L. W. **Film Properties of Plastics and Elastomers**. 3 ed., 2012.

METSOVITI, M. N.; PAPAPOLYMEROU, G.; KARAPANAGIOTIDIS, I. T.; KATSOULAS, N. Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. **Plants**, v. 9, 2020.

MEYER, M. E. *Spirulina*. Survival food for a new era: Amazing healing success with the blue-green alga, p. 31, 2016.

MONSHUPANEE, T.; NIMDACH, P.; INCHAROENSAKDI, A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37121, p. 1–9, 2016.

MORAES, L.; ROSA, G. M.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation and production of *Spirulina* sp. LEB 18 biomass with different concentrations of NaNO₃ and NaCl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1–10, 2018.

MORAES, L.; ROSA, G. M. R.; CARDIAS, B. B.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.

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

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. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144–150, 2008.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Biofunctionalized Nanofibers Using *Arthrospira* (*Spirulina*) Biomass and Biopolymer. **Biomed**, v. 1, p. 1–8, 2015.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 691–698, 2016.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* using exhausted medium treated with granular activated carbon. **Journal of Hydrology**, v. 522, p. 467–474, 2015.

NAGAPPAN, S.; DEVENDRAN, S.; TSAI, P.; DAHMS, H.; E, PONNUSAMY, V. K. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. **Fuel**, v. 252, p. 339–349, 2019.

NAYAK, M.; SUH, W. I.; CHANG, Y. K.; LEE, B. Exploration of two-stage cultivation strategies using nitrogen starvation to maximize the lipid productivity in *Chlorella* sp. HS2. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 110–118, 2019.

PARIMI, N. S.; SINGH, M.; KASTNER, J. R.; DAS, K. C.; FORSBERG, L. S.; AZADI, P. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product

and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content. **Frontiers in Energy Research**, v. 3, n. 30, 2015.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371–375, 2003.

RA, C. H.; KANGA, C.; KIM, N. K.; LEE, C.; KIM, S. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. **Renewable Energy**, v. 80, p. 117–122, 2015.

RADAKOVITS, R.; JINKERSON, R. E.; DARZINS, A.; POSEWITZ, M. C. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 4, p. 486–501, 2010.

RAMOS, N. F.; GOMES, J. C.; CASTILHOS JR., A. B.; GOURDON, R. Development of a tool for environmental diagnosis of municipal solid waste dumps in Brazil. **Sanitary and Environmental Engineering**, v. 22, n. 6, p. 1233–1241, 2017.

RAN, W.; WANG, H.; LIU, Y.; QI, M.; XIANG, Q.; YAO, C.; ZHANG, Y.; LAN, X. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by Nutrients. **Bioresource Technology**, v. 291, 2019.

ROSA, G. M.; MORAES, L. SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

SALAKKAM, A.; WEBB, C. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a complete feedstock derived from biodiesel by-products (crude glycerol and rapeseed meal). **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 358–364, 2018.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133–141, 2016.

SANTOS, A. J.; VALENTINA, L. V. O. D.; SCHULZ, A. A. H.; DUARTE, M. A. T. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. **Ingeniería y Ciencia**, v. 13, n. 26, p. 269–298, 2017.

SARANYA, S.; RADHA, K. V. Preparation and characterization of native poly (3-hydroxybutyrate) microspheres from *Bacillus subtilis* MTCC 9763. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 29, n. 2, p. 152–164, 2014.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo, v. 2, 2001.

SHABANA, E. F.; GABR, M. A.; MOUSSA, H. R.; EL-SHAER, E. A.; ISMAIEL, M. M. S. Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. **Food Chemistry**, v. 214, p. 550–555, 2017.

SILVA, C. K.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 Using Biopolymer Extraction Waste. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 822–833, 2018.

SIVAKUMAR, K.; GANDHI, C. D.; PALANI, S. P. Polyhydroxybutyrate by *Streptomyces* sp.: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1165–1171, 2017.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, S. J.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 1629–1634, 2007.

SINGH, A. K.; SHARMA, L.; MALLICK, N.; MALA, I. Progress and challenges in the production of polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. **Journal of applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1213–1232, 2017.

SLEGGERS, P. M.; BEVEREN, P. V.; WIJFFELS, R. H.; STRATEN, G. V.; BOXTE, A. J. B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and highvalue product**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

STEFFENS, D.; LEONARDI, D.; P. R. L.; LERSCH, M.; ROSA, A.; CRESTANI, T.; SCHER, C.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. PRANKE, P. Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model. **Burns**, v. 40, p. 1650–1660, 2014.

SUN, X. M.; REN, L. J.; ZHAO, Q. Y.; JI, X. J.; HUANG, H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. **Biotechnol Biofuels**, v. 11, n. 272, p. 1–16, 2018.

TIBOCHA-BONILLA, J. D.; ZUÑIGA, C.; GODOY-SILVA, R. D.; ZENGLER, K. Advances in metabolic modeling of oleaginous microalgae. **Biotechnol Biofuels**, v. 241, n. 11, 2018.

TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; NOVELO, E.; REVAH, S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 652–658, 2013.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.

VISCONTE, G. S.; SPICER, A.; CHUCK, C. J.; ALLEN, M. J. The microalgae biorefinery: a perspective on the current status and future opportunities using genetic modification. **Applied Sciences**, v. 9, n. 4793, 2019.

WENSEL, P.; HELMS, G.; HISCOX, B.; DAVIS, W. C.; KIRCHHOFF, H.; BULE, M.; YU, L.; CHEN, S. Isolation, characterization, and validation of oleaginous, multi-trophic, and

haloalkaline-tolerant microalgae for two-stage cultivation. **Algal Research**, v. 4, p. 2–11, 2014.

WU, Q.; LIU, L.; MIRON, A.; KLÍMOVÁ, B.; WAN, D.; KUČA, K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 2016.

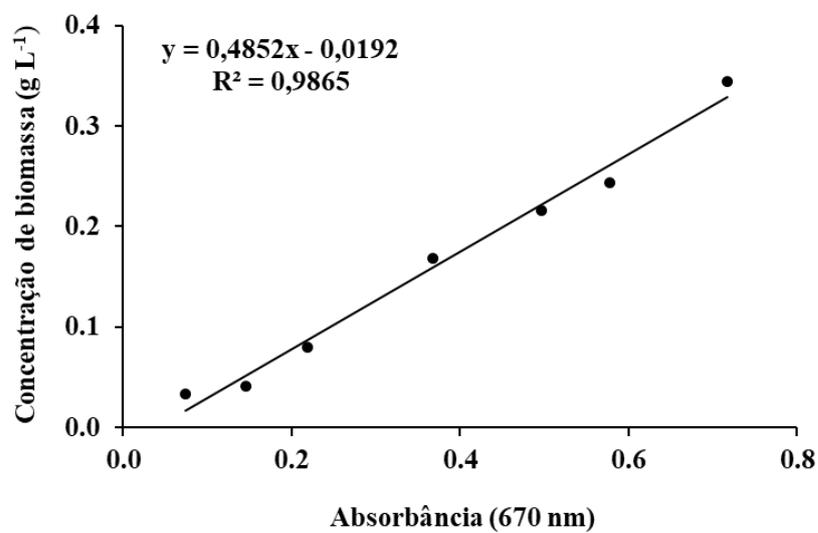
ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

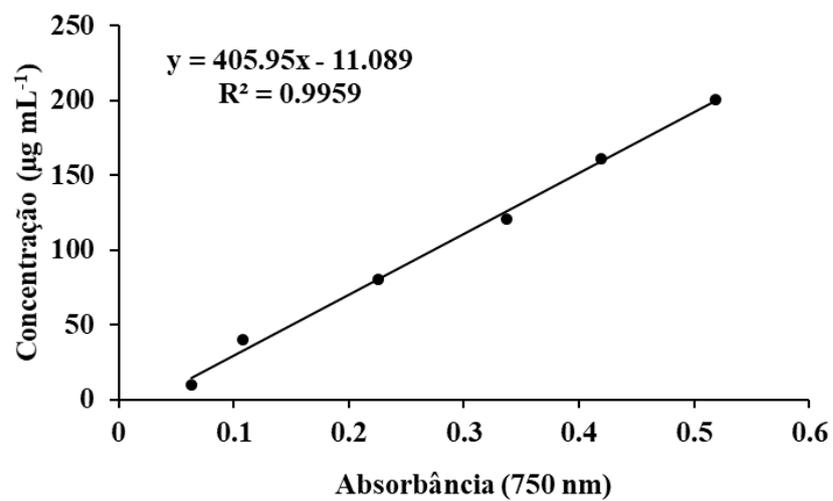
ZHU, C.; ZHAI, X.; WANG, J.; HAN, D.; LI, Y.; XI, Y.; TANG, Y.; CHI, Z. Large-scale cultivation of *Spirulina* in a floating horizontal photobioreactor without aeration or an agitation device. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8979–8987, 2018.

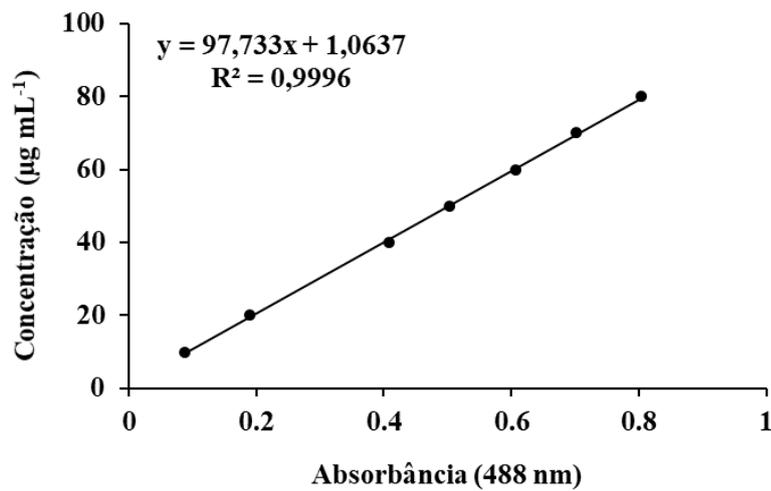
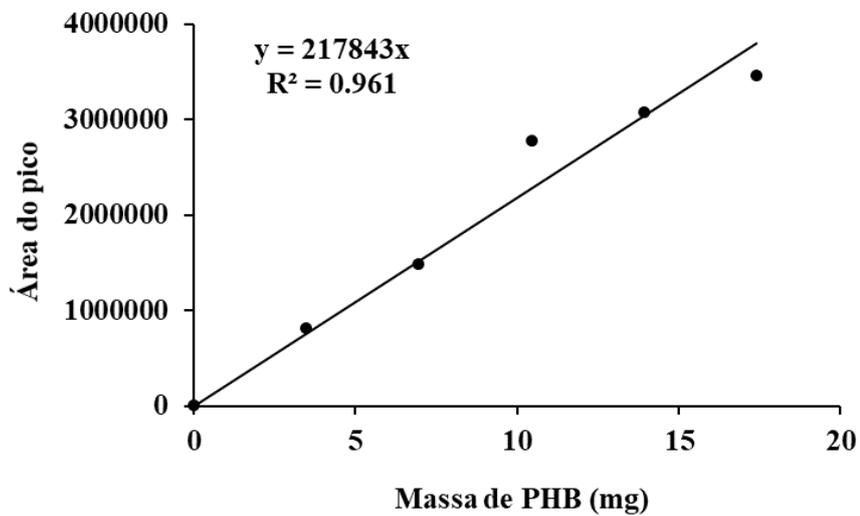
CAPÍTULO VI

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão de biomassa *Spirulina* sp. LEB 18.

APÊNDICE 2 - Curva padrão de albumina para determinação de proteínas.



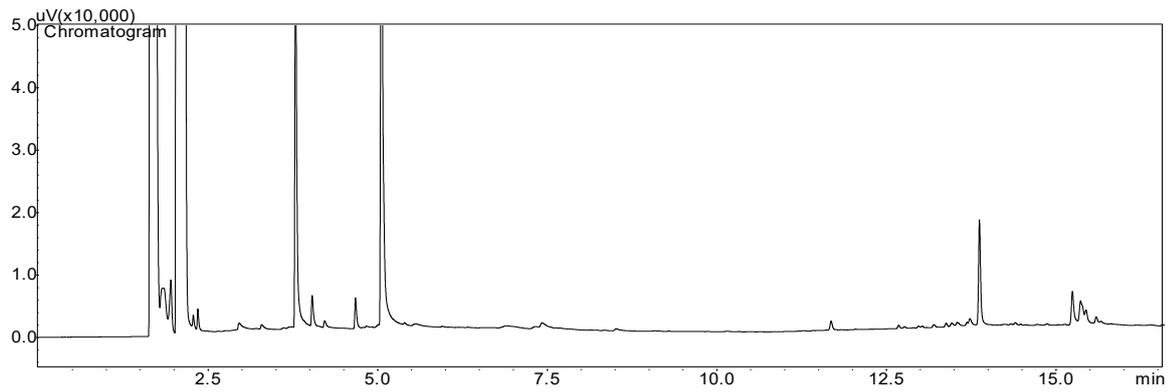
APÊNDICE 3 - Curva padrão de glicose para determinação de carboidratos.**APÊNDICE 4** - Curva padrão de poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol% HB e 12 mol% HV (Sigma Aldrich).

APÊNDICE 5 – Composição da biomassa (g L^{-1}) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO_3 em único estágio (Controle 1), 10% de NaNO_3 em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO_3 e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com 10% de NaNO_3 no meio.

Tempo (d)	Controle 1	Controle 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Proteínas (g L^{-1})					
0	0,27±0,01 ^{dA}	0,28±0,01 ^{bA}	0,25±0,01 ^{dA}	0,27±0,01 ^{dA}	0,26±0,02 ^{eA}
5	0,60<0,01 ^{cB}	0,41±0,01 ^{aC}	0,60±0,03 ^{abB}	0,73±0,01 ^{cA}	0,65±0,01 ^{dB}
10	1,07±0,01 ^{bC}	0,35±0,02 ^{bE}	0,55±0,01 ^{bcD}	1,39±0,06 ^{aA}	1,21±0,03 ^{cB}
15	1,38±0,06 ^{aA}	0,16±0,01 ^{cC}	0,69±0,05 ^{aB}	1,27±0,06 ^{aA}	1,44±0,01 ^{bA}
20	1,31±0,02 ^{aB}	0,10<0,01 ^{cE}	0,48±0,01 ^{cD}	0,97±0,06 ^{bC}	1,60±0,04 ^{aA}
Lipídios (g L^{-1})					
0	0,07<0,01 ^{cA}	0,08±0,01 ^{bA}	0,08<0,01 ^{eA}	0,07<0,01 ^{cA}	0,07±0,01 ^{dA}
5	0,16±0,01 ^{bA}	0,13<0,01 ^{aB}	0,19±0,01 ^{dA}	0,20±0,01 ^{bA}	0,17±0,02 ^{cdA}
10	0,24<0,01 ^{abB}	0,17±0,01 ^{aC}	0,33<0,01 ^{cA}	0,30±0,01 ^{aA}	0,26±0,02 ^{bcB}
15	0,32±0,03 ^{aB}	0,08<0,01 ^{bC}	0,62±0,03 ^{aA}	0,27±0,03 ^{abB}	0,32±0,02 ^{bB}
20	0,27±0,04 ^{aB}	0,05<0,01 ^{cC}	0,48±0,01 ^{bA}	0,20±0,03 ^{bB}	0,54±0,05 ^{aA}
Carboidratos (g L^{-1})					
0	0,04<0,01 ^{dAB}	0,05<0,01 ^{dAB}	0,03<0,01 ^{dB}	0,04<0,01 ^{dA}	0,04<0,01 ^{dAB}
5	0,09<0,01 ^{cBC}	0,15<0,01 ^{cA}	0,08<0,01 ^{cC}	0,12<0,01 ^{cA}	0,10<0,01 ^{cdBC}
10	0,17±0,01 ^{bB}	0,42±0,02 ^{aA}	0,10<0,01 ^{cC}	0,18<0,01 ^{cB}	0,18<0,01 ^{cB}
15	0,31±0,01 ^{aA}	0,32±0,01 ^{bA}	0,14±0,01 ^{bB}	0,31±0,03 ^{bA}	0,31<0,01 ^{bA}
20	0,31±0,01 ^{aB}	0,30<0,01 ^{bB}	0,21±0,02 ^{aC}	0,46±0,02 ^{aA}	0,54±0,05 ^{aA}

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo ensaio e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre ensaios de condições diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

APÊNDICE 6 - Cromatograma da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 5,1 (3HV).



APÊNDICE 7 – Composição da biomassa (g L^{-1}) de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com 100% de NaNO_3 em único estágio (Controle 1), ausência de NaNO_3 em único estágio (Controle 2), e primeiro estágio com 100% de NaNO_3 e início do segundo estágio em 5 d (Ensaio 1), 10 d (Ensaio 2) ou 15 d (Ensaio 3) com ausência de NaNO_3 no meio.

Tempo (d)	Controle 1	Controle 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Proteínas (g L^{-1})					
0	0,27±0,01 ^{dB}	0,24±0,01 ^{aB}	0,26±0,01 ^{dB}	0,35±0,01 ^{eA}	0,36±0,01 ^{eA}
5	0,60<0,01 ^{cA}	0,20<0,01 ^{bC}	0,54±0,01 ^{aB}	0,59±0,01 ^{cAB}	0,59±0,02 ^{dAB}
10	1,07±0,01 ^{bB}	0,12±0,01 ^{cD}	0,32<0,01 ^{bC}	1,09±0,01 ^{aB}	1,34±0,05 ^{bA}
15	1,38±0,06 ^{aB}	0,03<0,01 ^{dD}	0,12±0,01 ^{cD}	0,86±0,03 ^{bC}	1,61±0,01 ^{aA}
20	1,31±0,02 ^{aA}	-	0,09<0,01 ^{dC}	0,78±0,05 ^{dB}	1,24±0,02 ^{cA}
Lipídios (g L^{-1})					
0	0,07<0,01 ^{cB}	0,07<0,01 ^{cB}	0,06<0,01 ^{cB}	0,08<0,01 ^{dAB}	0,09±0,01 ^{dA}
5	0,16±0,01 ^{bA}	0,10<0,01 ^{bB}	0,15±0,02 ^{bcAB}	0,14±0,01 ^{cAB}	0,15±0,01 ^{cAB}
10	0,24<0,01 ^{abA}	0,13<0,01 ^{aB}	0,13±0,01 ^{bB}	0,24<0,01 ^{bA}	0,26±0,01 ^{cA}
15	0,32±0,03 ^{aAB}	0,06<0,01 ^{cC}	0,08±0,01 ^{bC}	0,30±0,02 ^{aB}	0,38±0,01 ^{bA}
20	0,27±0,04 ^{aC}	-	0,14±0,01 ^{aD}	0,44±0,01 ^{aB}	0,66±0,05 ^{aA}
Carboidratos (g L^{-1})					
0	0,04<0,01 ^{dC}	0,07<0,01 ^{dABC}	0,06±0,01 ^{eBC}	0,09±0,01 ^{eA}	0,09<0,01 ^{eAB}
5	0,09<0,01 ^{cC}	0,19<0,01 ^{bA}	0,14±0,01 ^{dB}	0,16±0,01 ^{dB}	0,14<0,01 ^{dB}
10	0,17±0,01 ^{bC}	0,25±0,01 ^{aB}	0,30±0,01 ^{cA}	0,26±0,01 ^{cB}	0,25±0,01 ^{cB}
15	0,31±0,01 ^{aB}	0,11<0,01 ^{cC}	0,32<0,01 ^{aB}	0,38±0,01 ^{bA}	0,35±0,01 ^{bA}
20	0,31±0,01 ^{aC}	-	0,20±0,01 ^{bD}	0,84±0,02 ^{aA}	0,69±0,03 ^{aB}

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de um mesmo ensaio e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre ensaios de condições diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).