



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

CULTIVO DE MICROALGAS EM ÁGUA MARINHA E SUBTERRÂNEA SALOBRA  
COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

Priscilla Quenia Muniz Bezerra

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Orientador

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ITACIARA LARROZA NUNES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2021



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

CULTIVO DE MICROALGAS EM ÁGUA MARINHA E SUBTERRÂNEA SALOBRA  
COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS

Priscilla Quenia Muniz Bezerra

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

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Orientador

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ITACIARA LARROZA NUNES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2021

### Ficha Catalográfica

B574c Bezerra, Priscilla Quenia Muniz.

Cultivo de microalgas em água marinha e subterrânea salobra com potencial na produção de biocompostos / Priscilla Quenia Muniz Bezerra. – 2021.  
139 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Coorientadora: Dra. Itaciara Larroza Nunes.

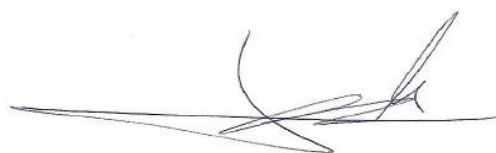
1. Bioprodutos 2. Biorremediação 3. Carboidratos  
4. Cianobactérias 5. Clorófitas I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Nunes, Itaciara Larroza III. Título.

CDU 639.64

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

## APROVAÇÃO

Tese defendida por Priscilla Quenia Muniz Bezerra, com orientação do Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, aprovada em 13 de julho de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



---

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



---

Prof. Dr. Mariano Michelin - FURG

*Jessica Duarte*

---

Dra. Jessica Hartwig Duarte – Pond Technologies

*Vandré Brião*

---

Dr. Vandré Barbosa Brião – UPF



## AGRADECIMENTOS

A minha **família** pelo incentivo, amor e carinho. Obrigada por sempre apoiarem minhas escolhas e serem a minha base! Sem vocês nada disso seria possível! Obrigada por tudo!

Ao meu orientador **Jorge Alberto Vieira Costa**, obrigada pela oportunidade de trabalhar junto ao grupo de pesquisa no LEB, carinho, paciência e confiança. Sou imensamente grata por todas orientações e oportunidades. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora **Itaciara Larroza Nunes**, obrigada por toda a parceria, carinho e ensinamentos que foram indispensáveis para chegar até aqui. Você é minha referência de mulher na pesquisa! Obrigada por tudo

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

Às amigas **Bruna Cardias, Jessica Silveira, Camila, Ana Paula, Kricelle, Etiele e Suelen** pela parceria, cuidado, amor, cumplicidade, paciência e companheirismo em todos os momentos. Vocês são incríveis! Amo vocês!

À minha amiga **Bruna Cardias** pela cumplicidade e cuidado. Obrigada por todos momentos especiais que dividimos juntas, obrigada por toda ajuda e amizade!

Ao meu iniciante científico **Tarcísio** pela cumplicidade, parceria, cuidado, respeito e dedicação. Obrigada por toda ajuda! Você é muito especial!

A minha “mãe científica” **Luiza Moraes** pelo cuidado, paciência e altruísmo. Obrigada pela parceria, apoio e incentivo. Obrigada por acreditar que eu seria capaz! Você é incrível e muito especial na minha vida.

Aos amigos do **LEB/MIBI** por todos momentos compartilhamos juntos, obrigada por toda ajuda e parceria.

À minha amiga **Janaína Gonçalves** pelo cuidado, acolhimento e por sempre me incentivar a voar mais longe. Você é muito especial na minha vida!

A minha amiga **Marcia Filgueiras**, pelo cuidado, parceria, incentivo. Obrigada por sempre ser presente e amiga.

Ao professor **Janice Druzian**, por me receber tão bem na Bahia durante a realização da minha mobilidade acadêmica e abrir as portas do seu laboratório, contribuindo assim no enriquecimento deste trabalho. Agradeço aos colegas do grupo LAPESCA pela receptividade e ajuda!

Ao meu amigo **Roque** pelo carinho, paciência e cuidado que sempre teve comigo. Muito obrigada por tudo!

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

À **FURG** disponibilizar ensino de qualidade e gratuito e ao **PPGECA** pelo excelente trabalho de ensino e pesquisa.

Muito obrigada a todos





## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Cultivo de microalgas: fatores físico-químicos, produção de biocompostos e aplicação comercial .....                    | 27 |
| <b>Figura 2-</b> Emprego de água subterrânea salobra e água do mar como alternativas hídricas e nutricionais no cultivo de microalgas 38 |    |
| <b>Figura 3-</b> Biorregulação (a) e biodessalinização (b) em células microalgais .....                                                  | 44 |

### ARTIGO I

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Composição e características físico-químicas da água do mar (AM0) .....                                                            | 57 |
| <b>Figura 2-</b> Perfil de concentração de biomassa (a) e pH (b) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 nos ensaios controle, AM100, AM50, AM25 e AM0 ..... | 57 |

### ARTIGO II

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Esquema experimental da elaboração dos meios de cultivo com água do mar (AM) para os ensaios com <i>Chlorella fusca</i> LEB 111. BG11 total (g L <sup>-1</sup> ): Nitrogênio (1,5; NaNO <sub>3</sub> ), fósforo (0,04; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), sulfato de magnésio (0,075; MgSO <sub>4</sub> ), cloreto de cálcio (0,036; CaCl <sub>2</sub> ) ferro (0,006; C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O), EDTA dissódico (0,001), carbonato de sódio (0,02; Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) e ácido cítrico (0,006; C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ) + micronutrientes: H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 2,86 g L <sup>-1</sup> ; MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O: 1,81 g L <sup>-1</sup> ; ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 0,222 g L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O: 0,39 g L <sup>-1</sup> ; CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O: 0,079 g L <sup>-1</sup> ; Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O: 0,0494 g L <sup>-1</sup> ..... | 69 |
| <b>Figura 2-</b> Perfil de crescimento (X) (a), produtividade de biomassa (P <sub>x</sub> ) (b) e pH (c) dos meios de cultivo de <i>C. fusca</i> LEB 111 em função do tempo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 73 |
| <b>Figura 3-</b> Eficiência de remoção de nutrientes por <i>C. fusca</i> LEB 111 nos ensaios AM100P, AM50P: água do mar (AM) suplementada com 100% e 50% das concentrações de BG11-parcial; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100% e 50% das concentrações de BG11-total; AM0: Água do mar sem adição de nutrientes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 77 |
| <b>Figura 4-</b> Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios (em base seca) (%), m m <sup>-1</sup> ), produtividade de carboidratos e lipídios (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) (a) Perfil de ácidos graxos (%), m m <sup>-1</sup> ) (b) da biomassa de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 nos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0. AM100P, AM50P: água do mar (AM) suplementada com 100% e 50% das concentrações de BG11-parcial; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100% e 50% das concentrações de BG11-total; AM0: Água do mar sem adição de nutrientes. 16:0 (Ácido palmítico); 18:0 (Ácido esteárico); 17:1 ω5 (Ácido heptadecanóico); 18:2ω6c (ácidos linoleico); 18:3ω3(α linolênico). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 80 |

### ARTIGO III

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1–</b> Meios de cultivo elaborados com água subterrânea salobra (AS) para as culturas de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Chlorella fusca</i> LEB 111. .... | 93 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 2-</b> Concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ) e produtividade final ( $P_{\text{final}}$ ) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a) e <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 (b) nos ensaios (teste) controle, AS50, AS25 e AS0. (a) - AS50 e AS25: água subterrânea (AS) suplementada com 50% e 25% das concentrações das fontes de C, N, P, Fe e EDTA do meio Zarrouk. (b) - AS50 e AS25: água subterrânea (AS) suplementada com 50% e 25% das concentrações das fontes de C, N, P, Fe, EDTA e ácido cítrico do meio BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes. .... | 96  |
| <b>Figura 3-</b> Perfil de concentração de biomassa (a), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) (b), Carbono Inorgânico Dissolvido (CID) (c) e perfil de pH (d) de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 nos ensaios controle, AS0 e AS25. AS25: água subterrânea (AS) suplementada com 25% das concentrações de Zarrouk/BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes .                                                                                                                                                                                                                          | 100 |
| <b>Figura 4-</b> Perfil de concentração de biomassa (a), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) (b), Carbono Inorgânico Dissolvido (CID) (c) e perfil de pH (d) de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 nos ensaios controle, AS0 e AS25. AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 25% das concentrações dos nutrientes dos meios de cultivo Zarrouk e BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes .....                                                                                                                                                                        | 101 |
| <b>Figura 5-</b> Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios (em base seca) ( $\%$ , $\text{m m}^{-1}$ ) (a) e produtividade de carboidratos e lipídios ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 nos ensaios controle, AS25 e AS0 (b). AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 25% das concentrações dos nutrientes dos meios de cultivos Zarrouk e BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes. ....                                                                                 | 103 |

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

**Tabela 1-** Composição química da água do mar (AM) utilizada no cultivo de microalgas.....35

#### ARTIGO I

**Tabela 1-** Resultados médios da concentração máxima de biomassa ( $X_{\max}$ ), produtividade máxima de biomassa ( $P_{\max}$ ), produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ), velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), tempo de geração ( $t_g$ ), concentração de proteínas, carboidratos e lipídios e produtividade de carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada nos ensaios controle, AM100, AM50, AM25 e AM0 .....59

#### ARTIGO II

**Tabela 1-** Resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\max}$ ), produtividade máxima ( $P_{\max}$ ) e final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0. ....74

#### ARTIGO III

**Tabela 1-** Composição e características físico-químicas da água subterrânea salobra (AS) 96

**Tabela 2-** Resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\max}$ ), produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ) e produtividade máxima de biomassa ( $P_{\max}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AS25 e AS0.....102



## SUMÁRIO

|                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO I.....</b>                                                                                        | <b>15</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                           | <b>17</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                                       | <b>22</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                                                                      | 22        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                               | 22        |
| <b>CAPÍTULO II .....</b>                                                                                      | <b>24</b> |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                           | <b>26</b> |
| 3.1 MICROALGAS E INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....                                                                | 26        |
| 3.1.1 <i>Spirulina</i> .....                                                                                  | 26        |
| 3.1.2 <i>Chlorella</i> .....                                                                                  | 28        |
| 3.2 FATORES NUTRIONAIS NO CULTIVO DE MICROALGAS .....                                                         | 29        |
| 3.3 ÁGUA DO MAR E SUBTERRÂNEA SALOBRA: ALTERNATIVAS HÍDRICAS E NUTRICIONAIS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS..... | 31        |
| 3.3.1 Água do mar .....                                                                                       | 32        |
| 3.3.2 Água subterrânea salobra .....                                                                          | 36        |
| 3.4 POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE NUTRIENTES POR MICROALGAS.....                                             | 37        |
| 3.4.1 Processos de biorregulação osmótica em microalgas e alteração bioquímica da biomassa.....               | 40        |
| 3.5 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA .....                                                                      | 43        |
| <b>CAPÍTULO III.....</b>                                                                                      | <b>47</b> |
| <b>4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....</b>                                                                    | <b>49</b> |
| <b>ARTIGO I.....</b>                                                                                          | <b>50</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                           | <b>52</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                      | <b>52</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                              | <b>53</b> |
| 2.1 MICRO-ORGANISMO, COLETA E PRÉ-TRATAMENTO DA ÁGUA DO MAR .....                                             | 53        |
| 2.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....                                              | 54        |
| 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....                                                                            | 54        |
| 2.3.1 Caracterização da água do mar .....                                                                     | 54        |
| 2.3.2 Concentração de biomassa, pH e características morfológicas .....                                       | 55        |
| 2.5 RESPOSTAS DO CULTIVO AVALIADAS .....                                                                      | 55        |
| 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....                                                             | 55        |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                  | 56        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                          | <b>56</b> |
| 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARAMETROS CINÉTICOS E PH.....                                                     | 56        |
| 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA .....                                                                     | 58        |
| <b>4. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                     | <b>61</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                       | <b>61</b> |
| <b>ARTIGO II .....</b>                                                                                        | <b>64</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                                           | <b>65</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                      | <b>66</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                              | <b>68</b> |
| 2.1 MICRO-ORGANISMO E COLETA DA ÁGUA DO MAR .....                                                             | 68        |
| 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....                                                                                 | 68        |
| 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....                                                                            | 69        |

|                                                                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.3.1 Caracterização dos meios de cultivo e eficiência de remoção de nutrientes .....                                                                      | 69         |
| 2.3.2 Concentração de biomassa e pH.....                                                                                                                   | 70         |
| 2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....                                                                                                         | 70         |
| 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....                                                                                                          | 70         |
| 2.5.1 Determinação de proteínas, carboidratos, lipídios e umidade .....                                                                                    | 71         |
| 2.5.2 Identificação e quantificação de ácidos graxos .....                                                                                                 | 71         |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                                                               | 71         |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                      | <b>72</b>  |
| 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS, PH E EFICIÊNCIA DE<br>REMOÇÃO DE NUTRIENTES NOS MEIOS CULTIVOS DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> LEB<br>111 ..... | 72         |
| 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA .....                                                                                                                  | 78         |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                    | <b>82</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                    | <b>83</b>  |
| <b>ARTIGO III .....</b>                                                                                                                                    | <b>87</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                                         | <b>89</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                  | <b>89</b>  |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                          | <b>91</b>  |
| 2.1 MICRO-ORGANISMOS E COLETA DA ÁGUA SUBTERRÂNEA SALOBRA (AS). 91                                                                                         |            |
| 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....                                                                                                                              | 92         |
| 2.2.1 Ensaios de seleção .....                                                                                                                             | 92         |
| 2.2.2 Ensaios em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv) .....                                                                                        | 92         |
| 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....                                                                                                                         | 93         |
| 2.3.1 Caracterização da água subterrânea salobra (AS).....                                                                                                 | 93         |
| 2.3.2 Concentração de biomassa, alcalinidade, pH e Carbono Inorgânico Dissolvido<br>(CID) .....                                                            | 94         |
| 2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....                                                                                                         | 94         |
| 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....                                                                                                          | 94         |
| 2.5.1 Determinação de proteínas, carboidratos e lipídios .....                                                                                             | 95         |
| 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                                                                               | 95         |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                      | <b>95</b>  |
| 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS, PH E CID NOS MEIOS<br>CULTIVOS DE <i>SPIRULINA</i> SP. LEB 18 E <i>CHLORELLA FUSCA</i> LEB 111 .....      | 95         |
| 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA .....                                                                                                                  | 99         |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                    | <b>106</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                    | <b>106</b> |
| <b>CAPÍTULO IV.....</b>                                                                                                                                    | <b>113</b> |
| <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>                                                                                                                               | <b>115</b> |
| <b>CAPÍTULO V .....</b>                                                                                                                                    | <b>116</b> |
| <b>RESÍDUOS GERADOS E DESTINO .....</b>                                                                                                                    | <b>118</b> |
| <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                                                                                                              | <b>118</b> |
| <b>CAPÍTULO VI.....</b>                                                                                                                                    | <b>120</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                    | <b>122</b> |
| <b>APÊNDICES .....</b>                                                                                                                                     | <b>137</b> |





## **CAPÍTULO I**

Resumo, abstract, Introdução e objetivos



## RESUMO

O cultivo de microalgas tem sido considerado uma alternativa promissora para a obtenção de biomassa de alto valor agregado de importante aplicação industrial e biotecnológica. Os sistemas de cultivo desses micro-organismos necessitam comumente de água doce e alta demanda nutricional. Assim, estratégias de cultivo de caráter sustentável e de baixo custo tem sido investigadas, com foco na preservação dos recursos hídricos e ambientais. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego de água do mar (AM) e subterrânea salobra (AS), com e sem suplementação de nutrientes, como estratégia de aproveitamento hídrico para a produção de biomassa e biomoléculas a partir de microalgas. Os ensaios foram divididos em três etapas: (1) Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, (2) *Chlorella fusca* LEB 111 em meios preparados com AM e (3) Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 realizados em AS. Para os experimentos realizados com *Spirulina* sp. LEB 18 em AM, esta foi suplementada com 100 (AM100), 50 (AM50) e 25% (AM25) das concentrações das fontes de nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA dissódico (Zarrouk). Para os experimentos com *Chlorella fusca* LEB 111, a AM foi suplementada com 100% e 50% das concentrações das fontes de nitrogênio, fósforo, ferro, EDTA e ácido cítrico (BG11). Além disso, a AM foi adicionada com todos os componentes do meio de cultivo BG11 em 100% (AM100T) e 50% (AM50T). Os experimentos com AS para ambas as microalgas foram suplementados com 25% das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA dissódico/ácido cítrico dos meios Zarrouk/BG11. Nas três etapas a AM e AS também foram utilizadas como meios de cultivo (AM0; AS0). A condição AM0 contribuiu para aumento do teor de carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e incremento na concentração da  $P_{\text{carboidratos}}$  em 203% e 52%, respectivamente, quando comparado ao cultivo controle. *C. fusca* LEB 111 quando cultivada em AM50T apresentou os maiores resultados de  $X_{\text{máx}}$  ( $1,72 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $P_{\text{máx}}$  ( $149,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), bem como maior teor ( $44,6\% \text{ m m}^{-1}$ ) e  $P_{\text{carboidratos}}$  ( $44,47 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), sendo estes 98,2% e 118,6%, respectivamente, superiores a condição controle. Além disso, a biomassa obtida apresentou perfil de ácidos graxos com potencial para a produção de biodiesel e eficiência de remoção de Ca ( $>60\%$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $>40\%$ ) e P ( $>96\%$ ) do meio de cultivo. Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *C. fusca* LEB 111 realizados em AS sem adição de nutrientes promoveram o crescimento ( $X_{\text{máx}} = 1,22^{(11^{\text{ºd})}} \text{ g L}^{-1}$  e  $0,92^{(9^{\text{ºd})}} \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e maiores resultados no teor ( $68,1\% \text{ m m}^{-1}$ ) e produtividade de carboidratos ( $35,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e elevado teor ( $56,45\% \text{ m m}^{-1}$ ) e produtividade de lipídios ( $13,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) em *C. fusca* LEB 111. Portanto, a AM e AS apresentaram potencial para serem utilizadas associadas a reduzida demanda nutricional em cultivos de *Spirulina* e *Chlorella*, contribuindo para a preservação da água doce e redução de custos do processo, com vantagem adicional de produção de biomassa para aplicação em biocombustíveis.

Palavras-chave: Bioprodutos. Biorremediação. Carboidratos. Cianobactérias. Clorófitas.



## ABSTRACT

### CULTIVATION OF MICROALGAE IN MARINE AND BRACKISH GROUNDWATER WITH POTENTIAL IN THE PRODUCTION OF BIOCOMPOSITES

Microalgae cultivation has been considered a promising alternative for obtaining high value-added biomass of important industrial and biotechnological applications. Cultivation systems for these microorganisms commonly require fresh water and high nutritional demand. Thus, sustainable and low-cost cultivation strategies have been investigated to preserve water and environmental resources. In this sense, this study aimed to evaluate the use of seawater (SW) and brackish groundwater (BGW), with and without nutrient supplementation, as a water use strategy for the production of biomass and biomolecules from microalgae. The assays were divided into three stages: (1) Cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 and (2) *Chlorella fusca* LEB 111 in medium prepared with SW, (3) Cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 performed in BG. The experiments performed with *Spirulina* sp. LEB 18 in SW were supplemented with 100 (SW100), 50 (SW50), and 25% (SW25) of the sources concentrations of nitrogen, phosphorus, iron, and disodium EDTA (Zarrouk). For the experiments with *Chlorella fusca* LEB 111, SW was supplemented with 100% and 50% of the concentrations of the sources of nitrogen, phosphorus, iron, EDTA, and citric acid (BG11). In addition, SW was added with all components of the BG11 culture medium at 100% (SW100T) and 50% (SW50T). The BGW experiments for both microalgae were supplemented with 25% of the sources of carbon, nitrogen, phosphorus, iron, and disodium EDTA/citric acid from the Zarrouk/BG11 mediums. In the three stages, SW and BGW were also used as culture mediums (SW0; BGW0). The SW0 condition contributed to increase the carbohydrate content in the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 and increase in the concentration of  $P_{\text{carbohydrates}}$  by 203% and 52%, respectively, when compared to the control culture. *C. fusca* LEB 111 when cultivated in SW50T showed the highest results for  $X_{\text{max}}$  ( $1.72 \text{ g L}^{-1}$ ) and  $P_{\text{max}}$  ( $149.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), as well as the highest content ( $44.6\% \text{ m m}^{-1}$ ) and  $P_{\text{carbohydrates}}$  ( $44.47 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), which are 98.2% and 118.6%, respectively, superior to the control condition. In addition, the biomass obtained showed a fatty acid profile with potential for the production and removal efficiency from sources of Ca ( $>60\%$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $>40\%$ ) and P ( $>96\%$ ) from the culture medium. In the cultivations of *Spirulina* sp. LEB 18 and *C. fusca* LEB 111 carried out in BGW, without nutrient addition promoted growth ( $X_{\text{max}}$   $1.22^{(11^{\text{d}})} \text{ g L}^{-1}$  and  $0.92^{(9^{\text{d}})} \text{ g L}^{-1}$ , respectively), and higher results in the content ( $68.1\% \text{ m m}^{-1}$ ) and carbohydrate productivity ( $35.33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) in the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 and high content ( $56.45\% \text{ m m}^{-1}$ ) and lipid productivity ( $13.50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) in *C. fusca* LEB 111. Therefore, SW and BGW are potential sources as culture mediums associated with reduced nutritional demand for *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111, contributing to preserving fresh water and cost reduction in culture systems, with the additional advantage of producing biomass for use in biofuels.

Keywords: Bioproducts. Bioremediation. Carbohydrates. Cyanobacteria. Chlorophytes.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas tem despertado interesse comercial devido sua elevada produtividade de biomassa e de biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos graxos essenciais e pigmentos (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). Contudo, os sistemas de cultivo comumente necessitam de água doce e demandam quantidade de nutrientes que podem representar até 35% dos custos operacionais de produção (COSTA et al 2019; HOFFMAN et al., 2017). Nesse segmento, pesquisas têm voltado seus objetivos para estratégias de cultivo que utilizem outras fontes de água e menor demanda de nutrientes (DUARTE et al., 2020; MATA et al., 2020).

A preocupação com a disponibilidade e gerenciamento de água doce está atribuída ao seu atual cenário de estresse e escassez em escala global (WWAP, 2020). O aumento no padrão de consumo tende a crescer de forma constante a uma taxa de ~1% ao ano, o que ameaça o direito humano de acesso à água e impacta diretamente os setores econômicos, industriais e ecossistema. Nesse contexto, estimular o desenvolvimento de estratégias que minimizem a utilização desse recurso hídrico infere na sua preservação. Assim, o foco mais recente é explorar o oceano e outras fontes de água em culturas de microalgas de modo a produzir biomassa de elevado valor comercial (LIM et al., 2021; PATEL et al., 2021).

A água do mar (salinidade >3,0‰) e subterrânea salobra (salinidade 0,05-3,0‰) possuem elevada salinidade quando comparadas a água doce (<0,05‰) (BROWN et al., 1995; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). Estas apresentam-se favoráveis para o metabolismo de microalgas devido as suas características físico-químicas (LEEMA et al., 2010; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). A água marinha possui em sua composição em maior concentração o cloreto de sódio (NaCl) e elementos como, carbono, magnésio, cálcio, ferro e nitrogênio (LÉCUYER, 2016). A água salobra, oriunda de subsolos, contém minerais inorgânicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), outros nutrientes, como nitrogênio, fósforo, e elementos traços (Si,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) (MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

Sob essa perspectiva, estudos destacam os gêneros *Spirulina* e *Chlorella* em culturas elaboradas com água do mar, bem como resultados promissores quanto ao acúmulo de carboidratos e lipídios na biomassa, despertando o interesse dessas matrizes biológicas para produção de biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel (LEEMA et al., 2010; OTAKI et al., 2019). Entretanto, esses estudos evidenciam a necessidade de práticas de diluição da água do mar em água doce (AFFAN et al., 2015; OTAKI et al., 2019), adição de nutrientes (AFFAN et al., 2015; FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979; LAMELA; MÁRQUEZ-

ROCHA, 2000; LEEMA et al., 2010; MATERASSI et al., 1984; VASQUEZ-VILLALOBOS et al., 2014) e etapas de pré-tratamento (FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979).

O emprego de água subterrânea salobra no cultivo de microalgas ainda é limitado, principalmente em espécies de *Chlorella*. Duarte et al. (2020) cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 com água salobra subterrânea com suplementação de diferentes concentrações de nutrientes (100, 75, 50 e 25%) do meio de cultivo Zarrouk. Os autores destacaram que a adição em 25% de todos os nutrientes resultou na produção de carboidratos 4 vezes maior que a cultura realizada em água doce. Cabe destacar que os trabalhos disponíveis na literatura, em sua maioria, empregam água salobra artificial oriunda do processo de diluição de água do mar em água doce, que resulta em composição físico-química diferente das originadas em subsolo (SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019; TOYOSHIMA et al. 2014).

Dentro do contexto abordado, há lacunas a serem pesquisadas sobre a viabilidade do emprego de água do mar e subterrânea salobra como fonte única de nutrientes ou menor demanda nutricional complementar. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e conteúdo de biomoléculas das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 cultivadas em água do mar (AM) e subterrânea salobra (AS), com e sem suplementação de nutrientes, na perspectiva de utilizar essas alternativas hídricas como fonte de água e nutrientes aos meios de cultivo convencionais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego de água do mar e água subterrânea salobra como alternativa hídrica e nutricional para a produção de biomassa e de biomoléculas a partir de microalgas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento e o acúmulo de biomoléculas na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 quando cultivada em água do mar, com e sem suplementação de nutrientes;
- Determinar a influência da utilização da água do mar com e sem adição de nutrientes nos parâmetros de crescimento e na composição da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111;
- Mensurar a capacidade de dessalinização de *Chlorella fusca* LEB 111 quando cultivada em água do mar;
- Cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 em água subterrânea salobra, com e sem suplementação de nutrientes, para aumentar a produtividade de biomassa e de macromoléculas.





## **CAPÍTULO II**

Revisão da literatura



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MICROALGAS E INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

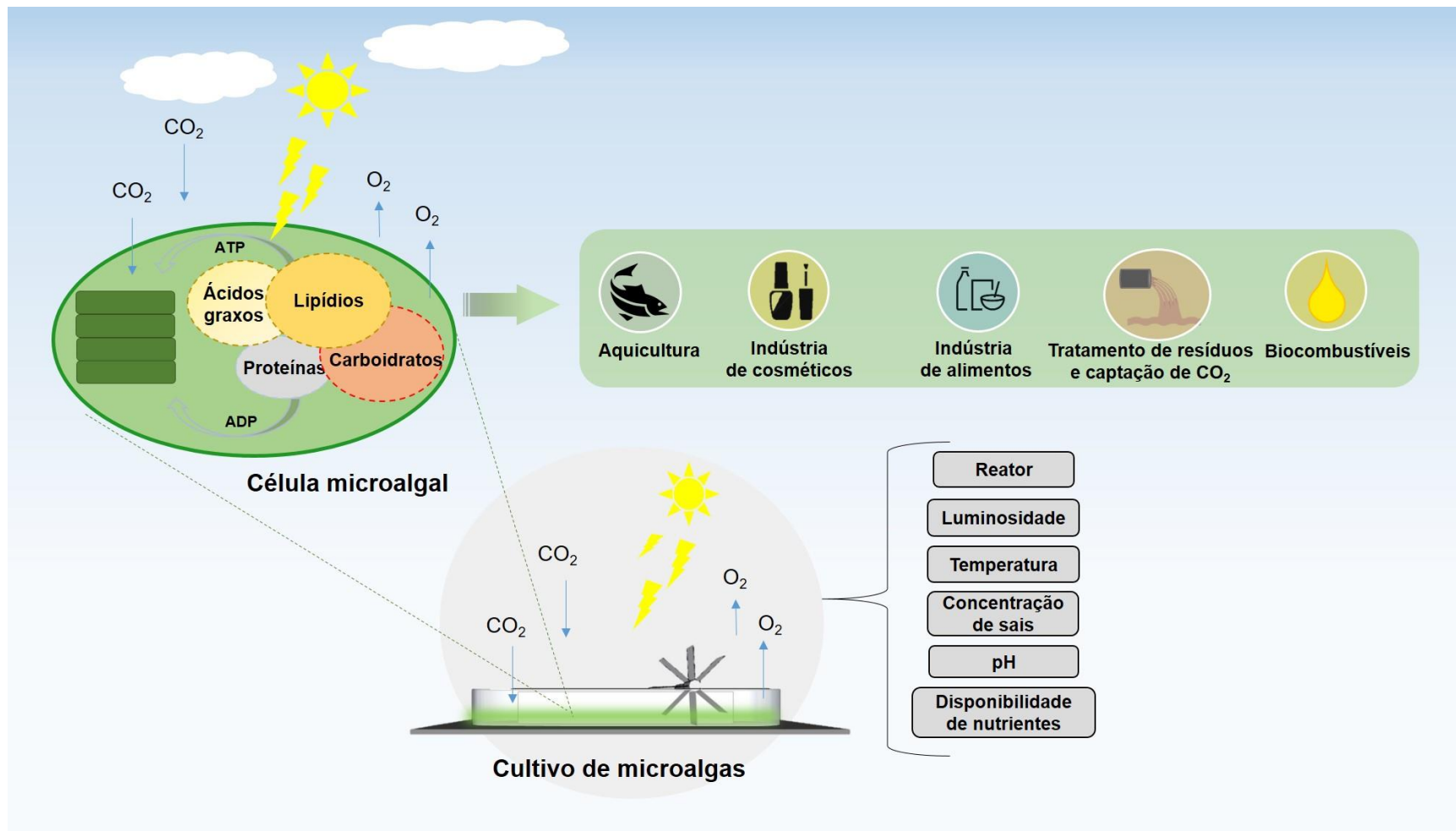
As microalgas são micro-organismos fotossintéticos habitualmente encontrados em água doce e marinha. Estes micro-organismos possuem como principal pigmento a clorofila, o que lhes confere a capacidade de converter dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em biomassa por meio da fotossíntese (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013). A composição da biomassa de microalgas depende da espécie e das condições de cultivo aplicadas. Alterações na luminosidade, temperatura, concentração de sais no meio, pH e disponibilidade de nutrientes podem influenciar não só o crescimento, como também a composição bioquímica da biomassa microalgal (GROBBELAAR, 2013) (Figura 1).

A biomassa microalgal possui elevado valor nutricional, principalmente conferido pela presença de carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos essenciais e pigmentos. Neste sentido, possui diversas aplicabilidades, podendo ser destinada à aquicultura como ração animal, no desenvolvimento de cosméticos e na alimentação humana como suplemento alimentar. Além disso, as microalgas apresentam potencial de mitigação de CO<sub>2</sub>, recuperação de resíduos com biorremediação simultânea (RIZWAN et al., 2018) e matéria prima de terceira geração para a produção de biocombustíveis (COSTA; MORAIS, 2011) (Figura 1). Entretanto, a produção de biomassa microalgal a nível comercial exige, em sua maioria, água doce e elevadas concentrações de nutrientes que podem representar até 35% dos custos operacionais de produção (COSTA et al., 2019). Nessa perspectiva, pesquisas tem estimulado sistemas de cultivo que utilizem alternativas hídricas como água subterrânea salobra (DUARTE et al., 2020), marinha (OTAKI et al., 2019) e residuais (MATA et al., 2020). Entre as microalgas mais estudadas, os gêneros *Spirulina* e *Chlorella* se destacam (COSTA et al., 2019; THIRUGNANASAMBANTHAM et al., 2020).

##### 3.1.1 *Spirulina*

*Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa, pertencente à classe de Cyanophyceae que cresce em corpos d'água tropicais e subtropicais em pH alcalino (9,0-10). Por se tratar de um micro-organismo procariótico, sua célula não possui núcleo delimitado por membrana, o material genético fica disperso por todo o citoplasma, onde realiza todas as reações metabólicas de síntese de carboidratos, lipídios e proteínas. Além disso, não possui esteroide

**Figura 1-** Cultivo de microalgas: fatores físico-químicos, produção de biocompostos e aplicação em diferentes setores



colesterol na membrana celular, sendo esta apenas composta por fosfolipídios (VONSHAK, 1997). A biomassa de *Spirulina* possui importante qualidade nutricional, composta principalmente por proteínas (60-70 % m m<sup>-1</sup>), carboidratos, lipídios, vitaminas (A, C e E) e minerais (ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco). Além disso, apresenta ácidos graxos essenciais (ácido  $\gamma$ -linolênico) e pigmentos (clorofila *a*, ficocianina e carotenoides) (BELAY, 2013; HABIB et al., 2008).

Estudos demonstraram a capacidade de *Spirulina* em biorremediar CO<sub>2</sub> atmosférico (ROSA et al, 2018; ROSA et al, 2015), gases de combustão (CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>; SO<sub>x</sub>) (RADMANN et al., 2011) e metais pesados (SAYADI; RASHKI; SHAHRI, 2019). Essa microalga também tem sido aplicada no tratamento de águas residuais (CARDOSO et al., 2020; MATA et al., 2020) e se destaca por apresentar capacidade de crescer em ambientes de elevada temperatura (DE JESUS et al., 2018; VONSHAK, 1997) e salinidade (>30 g L<sup>-1</sup>) (LEEMA et al., 2010). Essas condições adversas podem promover estresse nas células destes micro-organismos, que por sua vez, induzem o acúmulo de carboidratos intracelular, os quais vem despertando interesse biotecnológico como matriz energética para a produção de bioetanol (BRAGA et al., 2018; COSTA et al., 2019; MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012; ROSA et al., 2015; SALLA et al., 2016).

### 3.1.2 *Chlorella*

*Chlorella* é uma microalga eucariótica, unicelular, esférica (circundado por duas membranas), microscópica (diâmetro varia de 2-10  $\mu$ m), classificada como Chlorophyceae (algas verdes). Dependendo das condições de cultivo aplicadas, a biomassa de *Chlorella* pode apresentar até 70% (m m<sup>-1</sup>) de proteínas e acumular lipídios (>50%, m m<sup>-1</sup>), principalmente na forma de triacilglicerol (TAG), tornando-se um micro-organismo promissor como matéria prima para a produção de biodiesel (LIU; HU, 2013). Essa particularidade das células eucarióticas em acumular triacilglicerol, quando comparado aos organismos procariotos, é atribuído a presença dos cloroplastos, organela sítio de reações químicas para síntese deste metabólito (SENKIV et al., 2020). Além disso, o aprisionamento desse lipídio é facilitado pela presença de esteróis na membrana celular algal, que a torna menos permeável e favorável ao acúmulo deste lipídio no meio intracelular (ERDMANN; HAGEMANN, 2001; SENKIV et al., 2020).

Espécies de *Chlorella* se destacam por apresentarem elevada produtividade de biomassa e de macromoléculas frente a ambientes de elevado pH (> 9,0) (ROSA; MORAIS;

COSTA, 2018; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016), salinidade ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) (SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019), limitação de nutrientes (JUNG et al., 2015; BRAGA et al., 2019), variações de luminosidade (CASSURIAGA et al., 2018) e diferentes concentrações de absorventes químicos, como monoetanolamina (MEA) (ROSA; MORAIS; COSTA, 2018). Além disso, sob diferentes estratégias de cultivo, esse micro-organismo demonstra alta capacidade de biofixação de  $\text{CO}_2$  (YADAV et al., 2020) e remediação de nutrientes de águas residuais (MARYJOSEPH; KETHEESAN 2020; PERALTA; JEREZ; FIGUEROA, 2019),  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_x$  (YADAV et al., 2020) e contaminantes químicos (MARYJOSEPH; KETHEESAN, 2020; SAYADI; RASHKI; SHAHRI, 2019). A partir de todas as condições anteriores é possível a produção de biomoléculas de alto valor agregado na biomassa de *Chlorella* que estimulam seu papel como alternativa verde e natural em produtos farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos, biofertilizantes, biopolímeros e biocombustíveis (BRAGA et al., 2019; CASSURIAGA et al., 2018; DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019).

### 3.2 FATORES NUTRIONAIS NO CULTIVO DE MICROALGAS

As microalgas demandam alguns requisitos para que o seu crescimento ocorra de forma adequada. Os principais fatores que influenciam o metabolismo destes micro-organismos são o fornecimento de luz, nutrientes e a manutenção de condições de cultivo, como níveis de pH e temperatura (ACIÉN et al., 2017). A disponibilidade de nutrientes como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio ( $\text{K}^+$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) podem interferir no metabolismo fotossintético, produtividade e composição bioquímica da biomassa microalgal (HU, 2013).

O carbono (C) está entre os elementos de maior importância para a síntese de compostos orgânicos como proteínas, carboidratos, vitaminas, lipídios, entre outros. A concentração da fonte de carbono no meio de cultivo deve ser equilibrada a outros compostos (nitrogênio, fósforo, enxofre), a fim de permitir sua adequada assimilação pelas microalgas e prevenir alterações do pH, caso um sistema de tamponamento não seja estabelecido. As fontes de carbono frequentemente ofertadas ao meio de cultivo de microalgas estão na forma de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e  $\text{CO}_2$  (GROBBELAAR, 2013).

O nitrogênio (N) representa entre 7 e 10% do peso seco da biomassa microalgal, sendo considerado componente precursor da síntese de proteínas e pigmentos, como clorofilas e ficocianina. As fontes de nitrogênio comumente adicionadas aos cultivos de microalgas

estão na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), ureia e amônia ( $\text{NH}_3$ ) (HU, 2013). De acordo com Raoof, Kaushik e Prasanna (2006), a limitação de N pode comprometer a síntese proteica, uma vez que essa macromolécula apresenta compostos nitrogenados em suas estruturas moleculares. Neste sentido, a redução da concentração de N pode estimular a produção de biomoléculas, como lipídios e carboidratos (BRAGA et al., 2018; HU, 2013).

O fósforo (P) é outro nutriente essencial para o crescimento e processos metabólicos nas células microalgais, sendo constituinte de moléculas estruturais como açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. As fontes de P normalmente fornecidas aos cultivos de microalgas são os fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ou como pentóxido de fosfato ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Embora a biomassa contenha menos de 1% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de P, é frequentemente um dos mais importantes fatores limitadores de crescimento na biotecnologia microalgal (GROBBELAAR, 2013; HU, 2013). Segundo Markou et al. (2012), a redução das fontes de fósforo ( $\leq 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) nos cultivos de microalgas pode ocasionar estresse nas células de microalgas e induzir acúmulo de carboidratos e redução no teor de proteínas na biomassa.

O íon magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) atua na síntese de energia para o metabolismo celular das microalgas e compõe a estrutura molecular das clorofilas (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013). Nesse sentido, a deficiência deste íon no meio de cultura pode contribuir para o baixo crescimento celular e síntese de clorofilas, ocasionando o fenômeno chamado clorose (HO et al., 2018). O ferro (Fe) possui atividade oxidoreductora na célula microalgal que implica nos processos fotossintéticos, respiração celular, biofixação do nitrogênio e síntese de DNA. Assim, desempenha papel importante na composição bioquímica das microalgas. O excesso de ferro nas culturas de microalgas pode provocar estresse oxidativo e promover alterações fisiológicas celulares (HU, 2013).

Os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) participam da osmorregulação das células microalgais (HU, 2013). Segundo Church et al. (2017) o acúmulo dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no meio intracelular podem degradar enzimas precursoras de proteínas e redirecionar energia para acúmulo de osmorreguladores como lipídios e carboidratos. A limitação de nutrientes associado à elevada salinidade (principalmente dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) do meio podem atuar sinergicamente e promover alterações de produtividade de biomassa e de macromoléculas. Margarites et al. (2017) avaliaram o efeito sinérgico do aumento da concentração de  $\text{NaCl}$  ( $0,55 \text{ g L}^{-1}$ ) e redução de  $\text{NaNO}_3$  ( $0,62 \text{ g L}^{-1}$ ) nos cultivos de *S. platensis* LEB 52. Os autores observaram efeito de interação positivo destas variáveis no teor de carboidratos em 60,3%.



Cabe ressaltar que os gêneros *Spirulina* e *Chlorella* são comumente cultivados em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e BG11 (RIPPKA *et al.*, 1979), respectivamente (BRAGA *et al.*, 2018; BRAGA *et al.*, 2019; CASSURIAGA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019). Esses meios de cultivo representam uma das maiores parcelas dos custos com a produção destas microalgas em larga escala (RAOOF *et al.*, 2006). Neste contexto, estudos vêm sendo realizados a fim de não só substituir os componentes destes meios por outras fontes de nutrientes, como também reduzir as concentrações dos mesmos, objetivando superar a barreira econômica dos custos de produção de biomassa e incremento de biomoléculas (BRAGA *et al.*, 2018; LEEMA *et al.*, 2010; MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017).

### 3.3 ÁGUA DO MAR E SUBTERRÂNEA SALOBRA: ALTERNATIVAS HÍDRICAS E NUTRICIONAIS PARA O CULTIVO DE MICROALGAS

A disponibilidade de água doce no mundo representa 2,5% dos recursos hídricos e está presente em superfícies terrestres como lagos e rios, bem como em calotas polares e aquíferos subterrâneos (SHANNON *et al.*, 2008). Entretanto, mudanças hidrológicas induzidas por ação antrópica vêm contribuindo para alterações climáticas e resultando em crescentes desafios à gestão desse recurso hídrico, que já evidencia um cenário alarmante de estresse e escassez em várias regiões do mundo (WWAP, 2020). Além disso, o aumento populacional, desenvolvimento econômico e mudanças nos padrões de consumo tem contribuído para maior demanda global de água em seis vezes nos últimos cem anos, e continua a crescer de forma constante a uma taxa de ~1% ao ano. Esse panorama ameaça o direito humano à água para bilhões de pessoas e impacta diretamente o acesso a segurança alimentar, saúde humana, agricultura, produção de energia, desenvolvimento industrial e econômico e ecossistemas (WWAP, 2020).

Os dados do estresse hídrico são resultantes da relação entre a proporção anual de água doce utilizada pelos principais setores da economia e quantidade de recursos hídricos renováveis. Estima-se que desde 2018 mais de 2 milhões de pessoas vivem em países que vivenciam estresse hídrico e progridem para um quadro de escassez nos próximos anos (WWAP, 2019). Nessa perspectiva fica evidente a importância da realização de estudos que possam contribuir para a preservação e melhor gestão dos recursos hídricos.

Diante disso, a utilização de água do mar (AM) e salobra (AS) no cultivo de microalgas têm recebido atenção considerável (DUARTE et al., 2020; MATA et al., 2020). Entretanto, as pesquisas, em sua maioria, propõem a utilização destas fontes hídricas diluídas em água doce e/ou com suplementação de nutrientes (FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979; LEEMA et al., 2010; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). Neste sentido, há uma lacuna sobre os efeitos da utilização dessas águas como fonte única de nutrientes e também associadas à suplementação reduzida de componentes químicos, a fim de determinar a demanda nutricional ideal ao metabolismo de microalgas e minimizar os custos de produção de biomassa.

Cabe ressaltar que a definição de água salina, salobra e doce depende da concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de sais totais dissolvidos no meio. A água salina apresenta salinidade  $\geq 30 \text{ g L}^{-1}$ , a salobra  $< 30$  e  $> 0,5 \text{ g L}^{-1}$ , abaixo de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  a fonte hídrica é classificada como doce (CONAMA, 2005). Os cultivos de microalgas, em sua maioria, utilizam meios sintéticos elaborados com água doce, a fim de evitar variações das concentrações dos nutrientes (AIKAWA et al. 2014; ISHIKA et al., 2018; XIE et al., 2018). Os meios convencionais utilizados para o crescimento de microalgas apresentam, em sua maioria, características de meios salobros ( $\sim 1\text{-}20 \text{ g L}^{-1}$ ) e possuem C/N e P como elementos majoritários (RIPPKA et al., 1979; ZARROUK, 1966). Nesse contexto, para verificar a utilização de alternativas hídricas no cultivo de microalgas, fica evidente a importância de analisar a composição química da fonte hídrica utilizada, bem como a concentração ideal de nutrientes essenciais ao metabolismo de microalgas, como *Spirulina* e *Chlorella*.

### 3.3.1 Água do mar

A água do mar possui ampla distribuição territorial, representando 97% de toda água do planeta (SHANNON et al., 2008). Quanto a composição química, apresenta em média  $35 \text{ g kg}^{-1}$  de sais dissolvidos (3,5% de salinidade), estes na forma de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) em maiores concentrações ( $18$  e  $10 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente), seguido de magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e carbono ( $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ ). Além disso, elementos traços como, manganês, fósforo, ferro, zinco, cobre, entre outros, compõem a água do mar. Os gases nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) também podem estar dissolvidos (BROWN et al., 1995).

Poucos estudos realizam o cultivo de microalgas em água do mar. Estes, em sua maioria, se concentraram em utilizar água do mar artificial (LUANGPIPAT; CHISTI, 2017),

cultivo de cepas marinhas (ZHAO; QI; CHEN, 2015) e com cepas de água doce utilizam o processo de diluição (AFFAN et al., 2015). Além disso, não exploraram o potencial de emprego desta alternativa hídrica como fonte única de nutrientes, bem como a capacidade de dessalinização das microalgas. De acordo com Leema et al. (2010), a água do mar apresenta características físico-químicas promissoras para ser utilizada no cultivo de espécies de microalgas como *Spirulina platensis*. Os autores verificaram incremento de carboidratos em até 79% na biomassa da microalga quando cultivada em água do mar (salinidade total: 34,2 g L<sup>-1</sup>) com adição de 100% das fontes de C (NaHCO<sub>3</sub>; 19,5 g L<sup>-1</sup>), P (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup>), N (NaNO<sub>3</sub>; 3 g L<sup>-1</sup>) e Fe (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 g L<sup>-1</sup>; Fe<sub>2</sub>EDTA; 0,005 g L<sup>-1</sup>) do meio de cultivo Zarrouk. Similarmente Arora et al. (2017), Das et al. (2016), Ho et al. (2014), Ishika et al. (2018) e Luangpipat e Chisti (2017) observaram aumento na produtividade de carboidratos e/ou lipídios na biomassa de microalgas quando cultivadas em meio salino, o que segundo Borowitzka e Moheimani (2013), é fundamental para viabilizar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

A AM utilizada no cultivo de microalgas pode ser classificada como natural e artificial. A AM artificial é geralmente elaborada em laboratório e detém composição química definida, a qual não varia ao longo do tempo, exceto pelo teor de impureza dos sais utilizados. A AM natural é encontrada em abundância na região costeira, porém sua composição química pode variar quando coletada próxima da costa, devido a sazonalidade de chuvas e profundidade de coleta. Além disso, a AM localizada longe da costa, por ser oligotrófica, apresenta composição química mais constante durante o ano com salinidades que variam de 32 a 35 g L<sup>-1</sup> (HARRISON; BERGES, 2005).

A Tabela 1 apresenta a composição química da AM utilizada em alguns estudos no cultivo de microalgas. Sua salinidade é > 30 g L<sup>-1</sup> e apresenta maior concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> além de Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Segundo Harrison e Berges (2005) a pequena variação observada na salinidade dos diferentes estudos (18,9 a 35 g L<sup>-1</sup>) e na concentração dos íons: Na<sup>+</sup> (5,86 a 10,57 g L<sup>-1</sup>), Cl<sup>-</sup> (10,53 a 21,01 g L<sup>-1</sup>), Mg<sup>2+</sup> (0,67 a 1,33 g L<sup>-1</sup>), Ca<sup>2+</sup> (0,26 a 0,44 g L<sup>-1</sup>), K<sup>+</sup> (0,22 a 0,41 g L<sup>-1</sup>) e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1,40 a 2,79 g L<sup>-1</sup>) pode ser explicada pelas diferentes profundidades de coletas, distâncias da costa, sazonalidade de chuvas e localidade. A AM, quando coletada em profundidades > 200 m, em relação a superfície é chamada de AM profunda e apresenta maior concentração de nutrientes como N e P, essenciais para o cultivo de microalgas (CHEN et al., 2013; LIN; WU, 2017). O estudo de Lin e Wu (2017) comparou o cultivo de *Chaetoceros muelleri* em água da superfície e do fundo do mar sem adição de nutrientes, obtendo maior taxa de crescimento (0,11 d<sup>-1</sup>) e teor de lipídios (28,23% m m<sup>-1</sup>) no

cultivo realizado em água coletada do fundo do mar. Os pesquisadores atribuíram esses resultados as concentrações de nitratos (31,9  $\mu\text{M}$ ), fosfatos (3,2  $\mu\text{M}$ ) e silicatos (5,9 ppm) presentes nesta água, concentrações 7,8, 5,2 e 4,6 vezes maior que as encontradas na água da superfície. Batyrova et al. (2015) e Jung et al. (2014) não apresentam em seus estudos informações sobre a concentração das fontes de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , e micronutrientes como Br, Zn e Cu na AM, possivelmente por estarem em concentrações muito baixas (Tabela 1).

Cabe ressaltar que a utilização de AM no cultivo de microalgas, na maioria das vezes, exige um pré-tratamento para possibilitar a dissolução de nutrientes normalmente adicionados, como por exemplo os componentes do meio Zarrouk (FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979). O pré-tratamento consiste na adição de  $\text{NaHCO}_3$  e ajuste do pH para precipitar o excesso de íons  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  presentes naturalmente na água do mar (FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979). Por outro lado, estudos reportam que esta etapa de pré-tratamento pode ser dispensada quando a adição de nutrientes não evidenciar precipitação de sais no meio (MATHIMANI et al., 2018). Isso tem sido reportado em cultivos de *Chlorella* em água do mar com adição dos componentes químicos do meio de cultivo BG11 (CHEN et al., 2013). Além disso, métodos como esterilização podem ser exigidos a fim de permitir a redução de contaminantes presentes nessa água (FON SING et al. 2014; JEONG et al., 2015). Os métodos mais comuns utilizados para esterilização da água são: tratamento ultravioleta, tratamentos químicos com ozônio, cloretos ou coagulantes e tratamento com eletrólise (JEONG et al., 2015).

É importante destacar que, para tornar viável o cultivo de microalgas em AM é importante selecionar uma cepa que apresente alta resistência à salinidade (LUANGPIPAT; CHISTI, 2017), tendo em vista que a maioria dos cultivos em larga escala são realizados em biorreatores abertos, em que há aumento gradual da salinidade devido a evaporação e reposição do volume utilizando água salgada (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013). A alta salinidade do meio altera a pressão osmótica exercida sobre a célula modificando seu metabolismo e afetando a fluidez, estrutura e função da membrana celular (XIE et al., 2018) (Assunto aprofundado na seção 3.4.1). Diferentes cepas de microalgas do mesmo gênero ou espécie, apresentam graus de resistência à salinidade distintos. Luangpipat e Chisti (2017) reportaram diversos estudos que afirmaram que *Chlorella vulgaris* não apresenta capacidade de crescer em água do mar sem diluições. No entanto, estes autores cultivaram esta cepa em água do mar artificial (40 g  $\text{L}^{-1}$ ) e obtiveram produtividade de lipídios de  $\sim 37 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , sendo este valor  $\sim 2$  vezes superior à condição realizada em água doce,  $\sim 18,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

**Tabela 1-** Composição química da água do mar (AM) utilizada no cultivo de microalgas

| Parâmetro                             | Mar Negro Gelendzhik,<br>Russia       | Uslan, Koreaia<br>do Sul        | Kattegat,<br>Denmark         | Liverpool, Reino<br>Unido                                                                                                                            | Taiwan                                    |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                       | Água da<br>superfície do Mar<br>Negro | Água da superfície<br>do mar    | Água da superfície<br>do mar | Água da superfície<br>do mar                                                                                                                         | Água da<br>profundidade<br>(>200m) do mar |
| Salinidade (g L <sup>-1</sup> )       | 18,90                                 | 34,70                           | 35                           | 31                                                                                                                                                   | 32                                        |
| Na (g L <sup>-1</sup> )               | 5,86                                  | 10,56                           | 10,57                        |                                                                                                                                                      | 11,36                                     |
| K (g L <sup>-1</sup> )                | 0,22                                  | 0,38                            | 0,41                         |                                                                                                                                                      | 0,38                                      |
| Ca (g L <sup>-1</sup> )               | 0,26                                  | 0,40                            | 0,44                         |                                                                                                                                                      | 0,41                                      |
| Mg (g L <sup>-1</sup> )               | 0,67                                  | 1,27                            | 1,30                         |                                                                                                                                                      | 1,33                                      |
| Cl (g L <sup>-1</sup> )               | 10,53                                 | 19                              | 21                           |                                                                                                                                                      |                                           |
| SO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )  | 1,40                                  | 2,65                            | 2,79                         |                                                                                                                                                      | 2,69                                      |
| NO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) |                                       |                                 | 0,46                         | <0,01                                                                                                                                                | 0,75                                      |
| NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) |                                       |                                 |                              | <0,01                                                                                                                                                | 0,03                                      |
| PO <sub>4</sub> (µM)                  |                                       |                                 | 100,19                       | 0,09                                                                                                                                                 | 2,29                                      |
| Br (mg L <sup>-1</sup> )              |                                       |                                 |                              |                                                                                                                                                      | 65,5                                      |
| Zn (mg L <sup>-1</sup> )              |                                       |                                 | 0,16                         |                                                                                                                                                      | <0,01                                     |
| Cu (mg L <sup>-1</sup> )              |                                       |                                 |                              |                                                                                                                                                      | <0,01                                     |
| Microalga                             | <i>Chlorella</i> sp.                  | <i>Scenedesmus<br/>obliquus</i> | <i>Rhodomonas salina</i>     | <i>Dunaliella salina</i> ,<br><i>Nannochloropsis<br/>oculata</i> ,<br><i>Nannochloropsis<br/>salina</i> , and<br><i>Nannochloropsis<br/>gaditana</i> | <i>Chlorella<br/>sorokiniana</i> CY1      |
| Referência                            | Batyrova<br>et al. (2015)             | Jung et al. (2014)              | Jepsen e Thoisen<br>(2019)   | Liu (2015)                                                                                                                                           | Chen et al. (2013)                        |

Estudos ressaltam que nos cultivos de microalgas em água do mar, o estresse osmótico/iônico (Assunto aprofundado na seção 3.4.1) pode ser responsável pela redução do teor de proteínas e aumento do conteúdo de carboidratos ou lipídios na biomassa algal em comparação com o cultivo realizados em água doce (ARORA et al., 2017; GUCCIONE et al., 2014; LUANGPIPAT; CHISTI, 2016; UMMALYMA; SUKUMARAN; PANDEY, 2018). Isso reforça a viabilidade do emprego da AM na obtenção de biomassa com potencial de aplicação na produção de biocombustíveis.

### 3.3.2 Água subterrânea salobra

A água subterrânea é originada pelo contato prolongado entre a água da precipitação atmosférica e rochas cristalinas. A água da chuva penetra nas rochas e fissuras, carregando os minerais existentes, originando a água salobra/salinas, que devido à alta salinidade (comparada à água doce), torna-se imprópria ao consumo humano e utilização em sistemas agrícolas (CIRILO; MONTENEGRO; CAMPOS, 2010). Assim, necessita ser dessalinizada, resultando em altos custos operacionais com a implantação e manutenção das plantas dessalinizadoras (JONES et al., 2019). O processo de dessalinização separa a água de entrada em dois fluxos diferentes - um fluxo de água doce (água dessalinizada) e outro fluxo de resíduo salino (concentrado salino) (WENTEN et al., 2017). Um grande desafio desse processo é a geração de elevado volume de concentrado salino, que quando descartado inadequadamente, ocasiona impactos ambientais (JONES et al., 2019).

No Brasil, a região Nordeste, principalmente o semiárido (SA), conhecido como polígono da seca, é o local mais afetado com a crise da escassez água. Essa região apresenta condições climáticas (secas recorrentes) e geográficas (domínio hidrogeodinâmico cristalino e meio aquífero fissural) favoráveis ao depósito subterrâneo de água salobra (MCMAHON et al., 2015). Nesta região há instalações de sistemas de dessalinização (aproximadamente 1500) em operação, devido ao programa governamental lançado em 2004, denominado “Água Doce”.

A água subterrânea salobra apresenta minerais inorgânicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), outros nutrientes como nitrogênio, fósforo, e elementos traços ( $\text{Si}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) que podem ser metabolizados por microalgas e contribuir para seu processo de dessalinização (MATOS; MOECKE; SANT’ANNA, 2017). A partir disso, Duarte et al. (2020) cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 em AS com adição de 25, 50, 75 e 100% de todos os nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. Os pesquisadores demonstraram que a AS suplementada com 25% dos nutrientes

resultou em biomassa com concentração de carboidratos 4 vezes superior ao cultivo em meio padrão. Entretanto, há poucos estudos que reportem o cultivo do gênero *Spirulina* nesta água, bem como não há relatos de sua utilização em culturas de clorófitas como *Chlorella*.

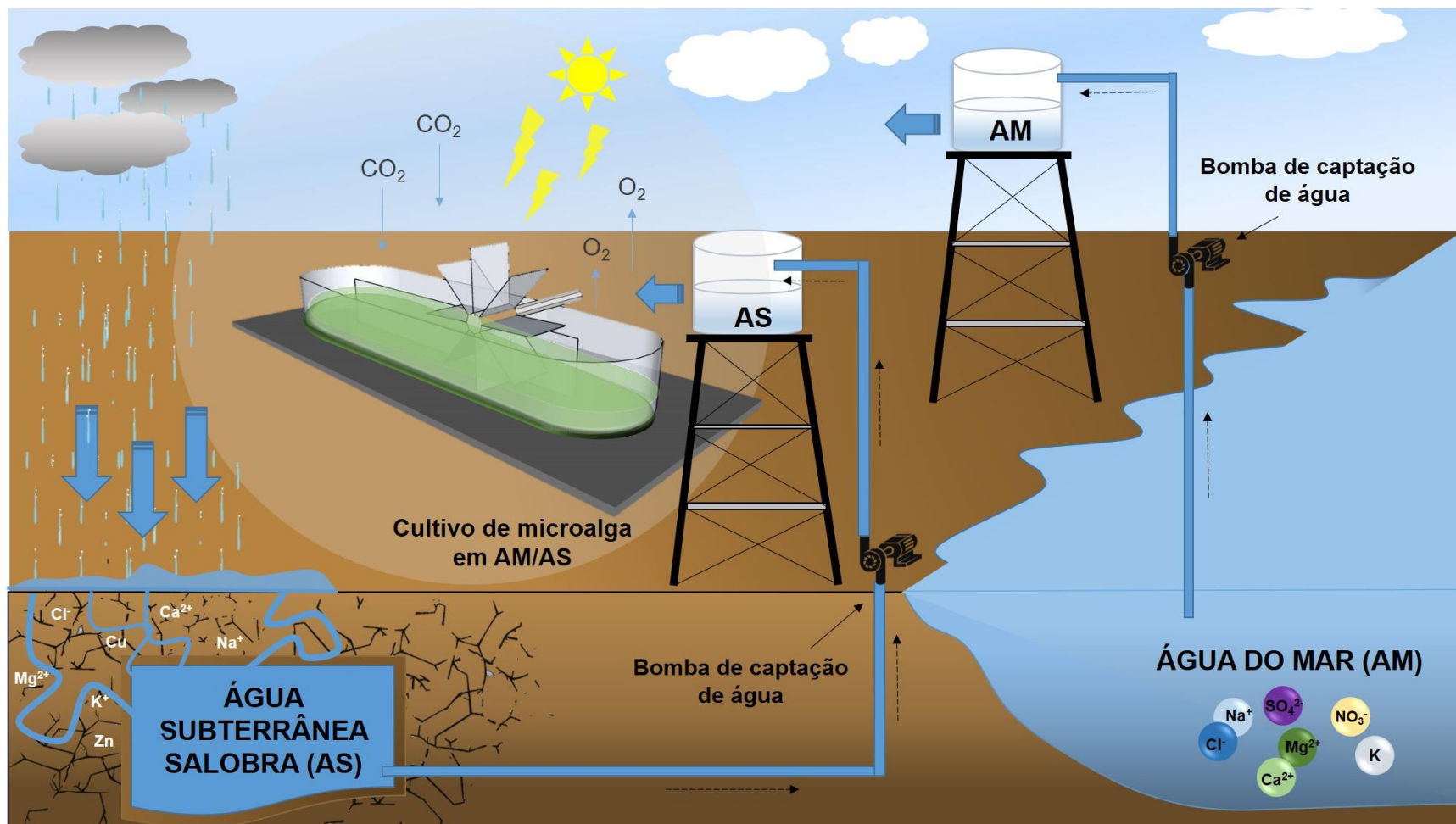
Os trabalhos nesta temática têm explorado cultivos de microalgas utilizando água salobra artificial ou oriundas da diluição de águas salinas/hipersalinas em água doce, bem como sob uso do concentrado de dessalinização (CD), originado do processo de dessalinização de AS (MATA et al., 2020; MATOS et al., 2015; MATOS et al., 2015b). A partir disso, resultados de acúmulo de lipídios e carboidratos na biomassa foram evidenciados em resposta ao estresse salino em cepas de *Dunaliella*, *Nannochloropsis* (MATOS et al., 2015), *Spirulina* (MATA et al., 2020; VOLKMANN et al., 2008) e *Chlorella* (MATOS et al., 2014; MATOS et al., 2015b).

Mata et al. (2020) demonstraram que *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em CD de AS com adição de 25% de todos os nutrientes do meio Zarrouk foi capaz de incrementar carboidratos (52,29%) e lipídios (12,79%) em sua biomassa, em comparação com o ensaio controle (47,91 e 7,59, respectivamente). Os pesquisadores atribuíram essa alteração da composição química na biomassa algal ao meio de cultivo salobro (salinidade total: 10,53 g L<sup>-1</sup>) rico em SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (452 mg L<sup>-1</sup>). Similarmente, Toyoshima et al. (2014) observam aumento no teor de carboidratos em até 52% na biomassa de *Spirulina platensis* quando cultivada em água salobra resultante da diluição de água do mar em água doce (salinidade de 7,9%), em comparação ao controle elaborado em água doce. Os autores justificaram que o incremento desta macromolécula pode estar associado a salinidade do meio que altera o equilíbrio osmótico na célula algal, induzindo a produção de osmorreguladores de baixo peso molecular como carboidratos, alteração metabólica está também descrita por Pancha et al. (2015) e Leema et al. (2010). Isso reforça analisar a AS como uso estratégico na produção de biomassa interessante a ser explorada na indústria de biocombustíveis. Sob perspectiva geral, sistemas inovadores de cultura de microalgas que exploram a AM e AS como alternativas hídricas podem ser implementados para obter produtos de alto valor comercial, com vantagem adicional de poupar água doce e reduzir a demanda de nutrientes (Figura 2).

### 3.4 POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE NUTRIENTES POR MICROALGAS

A capacidade de biorremediação de nutrientes por microalgas vem reforçando seu potencial para o tratamento de águas no processo de dessalinização (BOROWITZKA;

**Figura 2-** Emprego de água subterrânea salobra e água do mar como alternativas hídricas e nutricionais no cultivo de microalgas





MOHEIMANI, 2013; MATOS et al., 2017; SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019; TAWALBEH et al., 2020). O conceito de biodessalinização é novo, as pesquisas são mais evidentes em plantas aquáticas/macroalgas (PATEL et al., 2021). Segundo Patel et al. (2021), dessalinização por algas ocorre principalmente por meio de biossorção e ou bioacumulação, dependente de fatores bióticos e abióticos, por exemplo, temperatura, pH, luz e disponibilidade de nutrientes. Explorar esse potencial biológico tem sido foco recente de pesquisas, uma vez que evidencia características ambientalmente amigáveis que podem substituir parcial ou totalmente os processos físico-químicos de dessalinização tradicionais (PATEL et al., 2021; SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019).

Microalgas como *Spirulina* e *Chlorella* têm sido muito exploradas no tratamento de águas residuais na remoção de nutrientes orgânicos e inorgânicos (COSTA e al., 2019; MARYJOSEPH; KETHEESAN 2020; PERALTA; JEREZ; FIGUEROA, 2019). Além disso, podem ser promissoras na biorremediação de sais presentes na água do mar ou subterrânea salobra, por apresentam tolerância à elevada concentração e utilizam estes para o seu crescimento (DUARTE et al., 2020; LEEMA et al., 2010). No entanto, são limitados os estudos sobre a aplicação destes micro-organismos no processo de dessalinização. As pesquisas, em sua maioria, analisam a capacidade de remoção da salinidade total (%) do meio, ou se limitam em verificar apenas a remoção das concentrações de NaCl (DUARTE et al., 2020; EL-SAYED et al., 2010; GAN et al., 2016; MATA et al., 2020; SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019). Isso seria interessante analisar, ao passo que o sistema de cultivo microalgal poderia ser utilizado como alternativa às tecnologias convencionais de dessalinização, com vantagem adicional de permitir a produção de biomassa de alto valor agregado e não geração de efluentes nocivos à saúde humana/animal e meio ambiente (SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019; SÁNCHEZ; NOGUEIRA; KALID et al., 2015).

Sahle-Demessie; Hassan; Badawy (2019) examinaram o potencial de biodessalinização de espécies de *Scenedesmus* sp. e *Chlorella vulgaris* cultivadas em água do mar e salobra sintéticas (variação da salinidade 2 g L<sup>-1</sup> a 20 g L<sup>-1</sup> de NaCl). Durante a fase de crescimento das microalgas, o tempo de duplicação variou entre 0,63 e 1,81 dias para *Scenedesmus* sp. e 3,1 a 5,9 dias para *C. vulgaris*. Os autores reportam que a absorção inicial de sal seguiu a cinética de pseudo-primeira ordem (constante de taxa variou entre -3,58 e -7,68 d<sup>-1</sup>), atingindo até 30% de remoção de NaCl em um único ciclo. No estudo de El-Sayed et al. (2010) foi possível observar a capacidade de *Scenedesmus* sp. na remoção de até 25% da salinidade total do meio (35 g L<sup>-1</sup>). Resultado promissor foi observado por Gan et al. (2016)

quando cultivaram *Scenedesmus obliquus* em meio BG-11 sob diferentes concentrações de NaCl (1,2, 2,8, 4,8, 6,8 e 8,8 g L<sup>-1</sup>). Os autores observaram que o aumento da salinidade aumentou a taxa de dessalinização e a remoção de NaCl em até 30%.

De acordo com Mata et al. (2020), *Spirulina* sp. LEB 18 apresenta alta eficiência na remoção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (96,99%), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (83,11%) e Zn (96,43%) em CD de água subterrânea salobra com adição de 25% de todos os nutrientes do meio Zarrouk. Os autores justificaram a elevada eficiência de remoção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> a ação das enzimas nitrato e nitrito redutase, responsáveis pelo crescimento celular da microalga. No estudo de Luangpipat e Chisti (2017) a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio com base em água do mar apresentou taxa de consumo específica de PO<sub>4</sub> (0,107 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) ~20% menor e rendimento de biomassa/fosfato (0,292 g mg<sup>-1</sup>) ~27% maior do que os obtidos no meio com base em água doce (6,83 mg g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e 0,229 g mg<sup>-1</sup>). Segundo os autores, isso poderia indicar que a utilização de água do mar no cultivo de *Chlorella vulgaris* pode reduzir a demanda de fosfato na produção de biomassa e bioprodutos como lipídios. Assim, fica evidente a influência da biorremediação de nutrientes e simultânea alteração da atividade metabólica e composição bioquímica da biomassa de microalgas.

### 3.4.1 Processos de biorregulação osmótica em microalgas e alteração bioquímica da biomassa

Um desafio da utilização da AM e AS no cultivo de microalgas está na elevada concentração de NaCl, uma vez que, que este pode contribuir para diminuição da taxa de crescimento celular e comprometimento do conteúdo de macromoléculas como proteínas (CHOKSHI et al., 2017; PANCHIA et al., 2015). A salinidade é representada pela quantidade total de sais dissolvidos em uma amostra de água (BROWN et al., 1995). A alta salinidade, representada principalmente pela concentração de NaCl (>1g L<sup>-1</sup>), pode causar três tipos de estresse nas células das microalgas (iônico, osmótico e oxidativo) (CHOKSHI et al., 2017; CHURCH et al., 2017).

O estresse osmótico limita a captação de água e desencadeia reações moduladas por hormônios, que dificultam a abertura estomática e assimilação fotossintética do CO<sub>2</sub>. À medida que os íons Na<sup>+</sup> se acumulam no citosol é desencadeado o estresse iônico (desequilíbrio do balanço K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> no citosol), sendo a capacidade de adaptação associada ao equilíbrio destes íons no citosol (AFFENZELLER et al., 2009). A concentração de Na<sup>+</sup>, geralmente mais alta, pode afetar o seu crescimento e metabolismo, assim, para preservar

atividade metabólica, as microalgas facilitam processos de saída de  $\text{Na}^+$ , sob uso intensivo de energia (CHEN; JIANG, 2009). Durante o processo preliminar de adaptação, o sistema  $\text{K}^+$  citosólico/  $\text{Na}^+$  geralmente se torna polar, o que resulta no rápido influxo de  $\text{K}^+$  e efluxo de  $\text{Na}^+$  ativando a bomba de  $\text{K}^+$  (PATEL et al., 2021; CHEN et al., 2019) (Figura 3a).

Durante o processo de dessalinização por microalgas, o efluxo dos íons  $\text{Na}^+$  é pausado através do declínio de produção de ATP. No entanto, a energia gerada é utilizada por proteínas osmorreguladoras (halorrodopsina) para influxo íons cloreto. Posteriormente, o potencial negativo de membrana é gerado, facilitando o influxo de  $\text{Na}^+$  intramembrana, via proteínas permeáveis (LIM et al., 2021) (Figura 3b). O processo de biorremediação de sais por microalgas parece estar mais voltado para manter o equilíbrio osmótico da célula do que promover dessalinização do meio. Por isso, estudos sugerem que para aumentar a eficiência de dessalinização por microalgas, estratégias de cultivo devem inicialmente promover alta densidade celular antes de utilizar a energia armazenada para o influxo de  $\text{Na}^+$  (AMEZAGA et al., 2014; LIM et al., 2021).

A partir desse processo de adaptação, as células microalgais produzem substâncias osmorreguladoras como lipídios e carboidratos de baixo peso molecular (SENKIV et al., 2020) (Figura 3a). A produção destes osmorreguladores depende de características fisiológicas das células microalgais. Micro-organismos procarióticos como *Spirulina* não acumulam triacilgliceróis como substância osmorreguladora, pois não possuem esteróis na membrana celular e nem cloroplastos, organela sítio da síntese deste metabólito. Esta microalga tende a acumular carboidratos como estratégia de poupar energia metabólica e manter o equilíbrio osmótico. Por outro lado, células eucarióticas como gêneros de *Chlorella* possuem cloroplastos, os quais viabilizam a síntese de glicerol intracelular, além de triacilgliceróis (esteroides) intramembrana que facilita o acúmulo deste osmorregulador (SENKIV et al., 2020).

O estresse salino induz a produção de espécies reativas de oxigênio ( $\text{EROs}$ ) levando ao estresse oxidativo (AFFENZELLER et al., 2009; CHOKSHI et al., 2017) (Figura 3a). Esses  $\text{EROs}$  podem atuar juntamente com íons de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na célula, ativando os principais genes responsáveis pelo processo de adaptação celular (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). As microalgas desenvolvem estratégias adaptativas em resposta a esta condição de estresse oxidativo com a produção de moléculas sinalizadoras como aminoácidos (prolina, betaina e glicina), enzimas (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APx)) e antioxidantes (ascorbato, glutatona e polifenóis) atuantes no equilíbrio osmótico (CHOKSHI et al., 2017). Essas condições adaptativas promovem mudanças no

padrão morfológico, fisiológico e bioquímico das células microalgais, capazes de estimular importantes constituintes da membrana celular como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos fotossintéticos (CHOKSHI et al., 2017; ISHIKA; MOHEIMANI; BAHRI, 2017) e ácidos graxos essenciais (CHURCH et al., 2017) (Figura 3a).

Pesquisas anteriores reportaram que cultivos de microalgas em ambiente de elevada salinidade ( $>20 \text{ g L}^{-1}$ ) podem redirecionar a energia utilizada para a síntese proteica para a produção e acúmulo de osmorreguladores intracelulares como lipídios e carboidratos de baixo peso molecular (sacarose e trealose) (LAWTON et al., 2015; LEEMA et al., 2010; MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Normalmente, em condições ideais de crescimento, microalgas como *Spirulina* e *Chlorella* apresentam maior rendimento de biomassa e menores teores de lipídios (12–15%) (LIU; HU, 2013) e carboidratos (~15%) (DUARTE et al., 2020) quando comparado a cultivos expostos a condições de estresse salino. Quando cultivadas em condições de estresse salino, a biomassa pode apresentar concentrações de lipídios em até ~40% ( $\text{m m}^{-1}$ ) em espécies de *Chlorella* (SRIVASTAVA et al., 2017) e em até ~60% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de carboidratos para *Spirulina* (DUARTE et al., 2020).

Segundo Church et al. (2017) e Matos et al. (2015), o mecanismo osmorregulatório adaptativo frente a mudanças rápidas ou graduais de salinidade (0,03-0,01 %), principalmente sob elevadas concentrações de NaCl ( $45 \text{ g L}^{-1}$ ), podem modificar a permeabilidade da membrana celular das microalgas e contribuir para o acúmulo de lipídios e mudanças no perfil de ácidos graxos na biomassa. Segundo Matos et al. (2015), o cultivo de *Chlorella vulgaris* em concentrado salino resultou em biomassa com elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados, como linoleico e linolênico. No estudo de Duarte et al. (2020), *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em água subterrânea salobra e adição de 75% de todos os nutrientes do meio Zarrouk alterou o perfil lipídico na biomassa na produção de ácidos graxos poli-insaturados, 3,3 vezes maior que o cultivo controle realizado em água doce. De acordo com Kim et al. (2016), a alteração no perfil de ácidos graxos pode estar relacionada à elevada salinidade do meio no cultivo de *Chlorella sorokiniana* HS1, que em resposta a essa condição de estresse, as células podem estimular a síntese ou degradação de ésteres de ácidos graxos saturados e/ou insaturados para manter adequada permeabilidade e integridade da membrana.

Cabe destacar que, a limitação ou redução das fontes de N, P, Mg, Ca, combinado ao estresse salino vem sendo ressaltada por pesquisadores como efeito sinérgico indutor de osmorreguladores como carboidratos e lipídios (GUCCIONE et al., 2014; MARKOU et al. 2012; OTAKI et al., 2019). Porém, são poucos os estudos que analisam esse efeito combinado nas células de microalgas. No trabalho de Guccione et al. (2014), 4 cepas de *Chlorella* foram

selecionadas para cultivos *outdoor* em água do mar com e sem adição da fonte de nitrogênio. Em duas das cepas avaliadas de *Chlorella* foi observado aumento no teor de carboidratos (~50%), enquanto nas outras duas, aumento no teor de lipídios (40-45%). Isso indica a possibilidade de aumentar o teor de lipídios ou carboidratos nos cultivos em água do mar aplicando limitação de nutrientes durante o cultivo ou apenas na fase estacionária como realizado nos trabalhos de Lim et al. (2012) e Schwenk et al. (2013).

Margarites et al. (2017) observaram efeito positivo de interação entre o aumento da concentração de NaCl (0,55 g L<sup>-1</sup>) e redução de NaNO<sub>3</sub> (0,62 g L<sup>-1</sup>) em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 52, comparado a condição controle. Os autores observaram acúmulo de carboidratos em até 60,3% (m m<sup>-1</sup>) na biomassa da microalga. Markou et al. (2012b) observaram incremento de carboidratos (159%) em *Spirulina platensis* cultivada em meio Zarrouk modificado com redução da fonte de fósforo (0,01 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), quando comparado ao ensaio controle. O efeito sinérgico também foi observado por Kim et al. (2016) e Costa et al. (2018) ao verificaram que a alteração do perfil de ácidos graxos pode estar relacionada a elevada de salinidade do meio e ou a limitação de nitrogênio no cultivo de *Chlorella sorokiniana* HS1 e *Spirulina* sp. LEB 18, respectivamente.

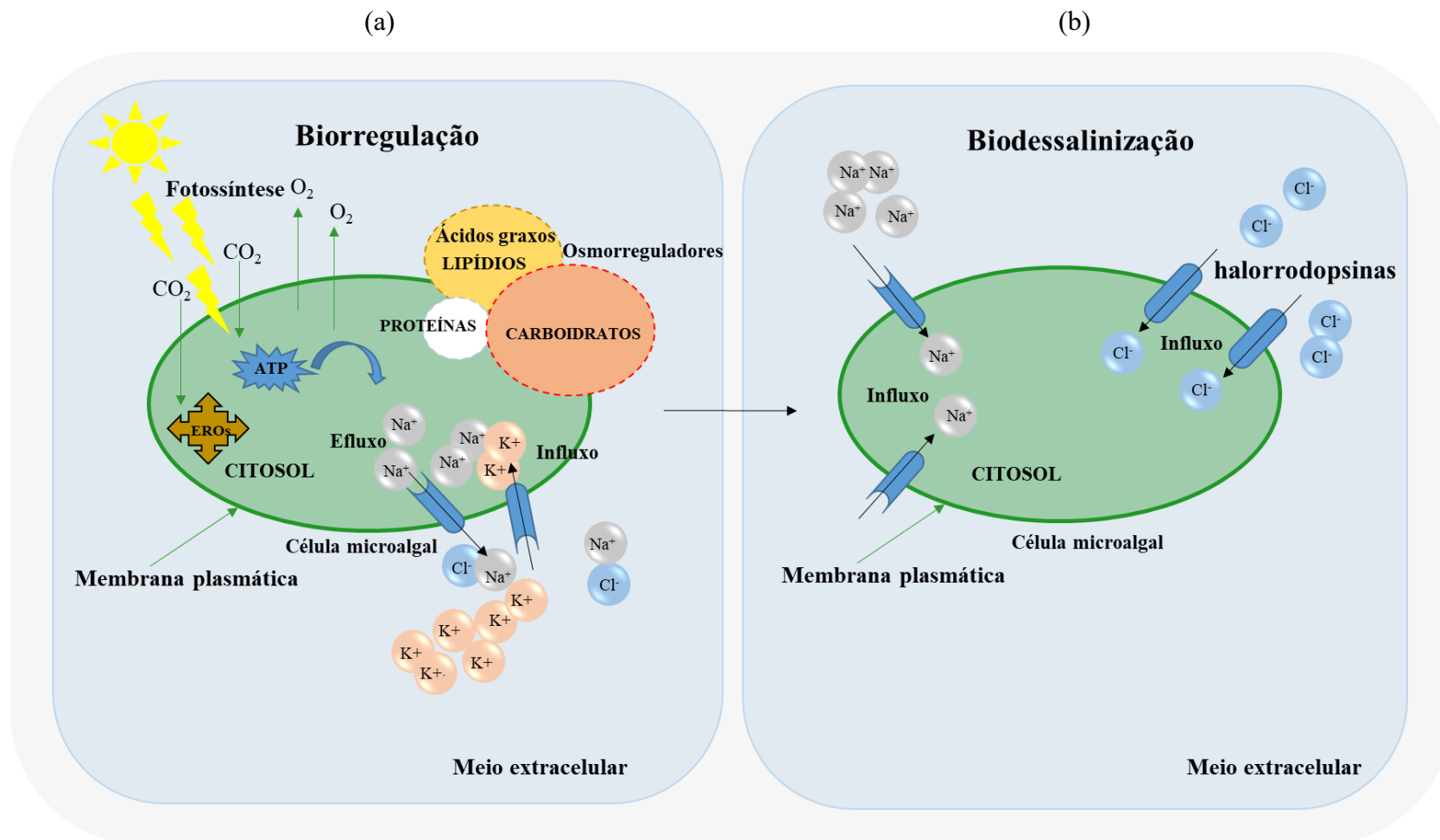
Diante destas abordagens, utilizar AM e AS no cultivo de microalgas pode contribuir para a preservação de água doce, até então majoritariamente empregada na cultura de microalgas. Somado a isso, biomassa pode ser produzida e utilizada como matriz energética na produção de biocombustíveis. Entretanto, essas estratégias requerem avanços significativos na pesquisa quanto ao uso dessas águas como substrato único e ou sob reduzida suplementação nutricional.

### 3.5 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), alocado na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), vem desenvolvendo pesquisas direcionadas a biotecnologia de microalgas desde 1996. Entre os aspectos investigados pelo grupo de pesquisa estão o desenvolvimento de novas estratégias de cultivo de microalgas que estimulem a obtenção de biomassa e biomoléculas para produção de alimentos, biocombustíveis e biocompostos de alto valor agregado.

Associado a isso, estratégias de cultivo de microalgas com caráter econômico e sustentável também têm sido desenvolvidas e englobam desde a utilização de fontes

**Figura 3-** Biorregulação (a) e biodessalinização (b) em células microalgais



Fonte: Adaptado de PATEL et al. (2021); PANCHAL et al. (2015)

alternativas de nutrientes capazes de minimizar os impactos ambientais (MORAES et al., 2019; ROSA; MORAIS; COSTA, 2018) ao uso de águas residuais como fonte de água e nutrientes (SALLA et al., 2016; DUARTE et al., 2020). O emprego de água subterrânea salobra no cultivo de microalgas faz parte de uma parceria entre a FURG e Universidade Federal da Bahia (UFBA) e demonstrou que sob suplementação nutricional pode promover incremento de carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, com potencial na produção de etanol (DUARTE et al., 2020). Nesse seguimento, torna-se interessante a realização de cultivos de microalgas em água do mar e subterrânea salobra sob menor demanda nutricional como alternativa aos cultivos convencionais a fim de contribuir para melhor gerenciamento dessas alternativas hídricas, até então pouco exploradas em sistemas de cultivo microalgais.





## **CAPÍTULO III**

Desenvolvimento do trabalho



#### 4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Esta tese de doutorado foi dividida em três artigos, correspondentes a cada etapa do trabalho e destinados a responder ao objetivo geral proposto. Os dois primeiros artigos avaliam o emprego de água do mar (AM), com e sem suplementação de nutrientes para a produção de biomassa e biomoléculas de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111. O terceiro artigo avalia o emprego da água subterrânea salobra nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e seu efeito na composição da biomassa de ambas microalgas. A água salobra utilizada nesta etapa foi coletada durante o período de mobilidade acadêmica da discente junto a Universidade Federal da Bahia (UFBA). Ademais, todas as atividades do trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica, na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Artigos desenvolvidos:

1. Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em água do mar e redução de nutrientes: estratégia de bioprocessamento para aumentar carboidratos na biomassa

**Artigo publicado:** BEZERRA, P. Q. M.; MORAES, L.; CARDOSO, L. G.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in seawater and reduced nutrients: Bioprocess strategy for increasing carbohydrates in biomass. **Bioresource Technology**, v. 316, n. 123883, 2020.

2. Água do mar como alternativa inovadora e sustentável para o cultivo de *Chlorella fusca*.

3. Aplicação inovadora de água subterrânea salobra em culturas de *Spirulina* e *Chlorella*: alternativa de bioeconomia para produção de carboidratos e lipídios.

## ARTIGO I

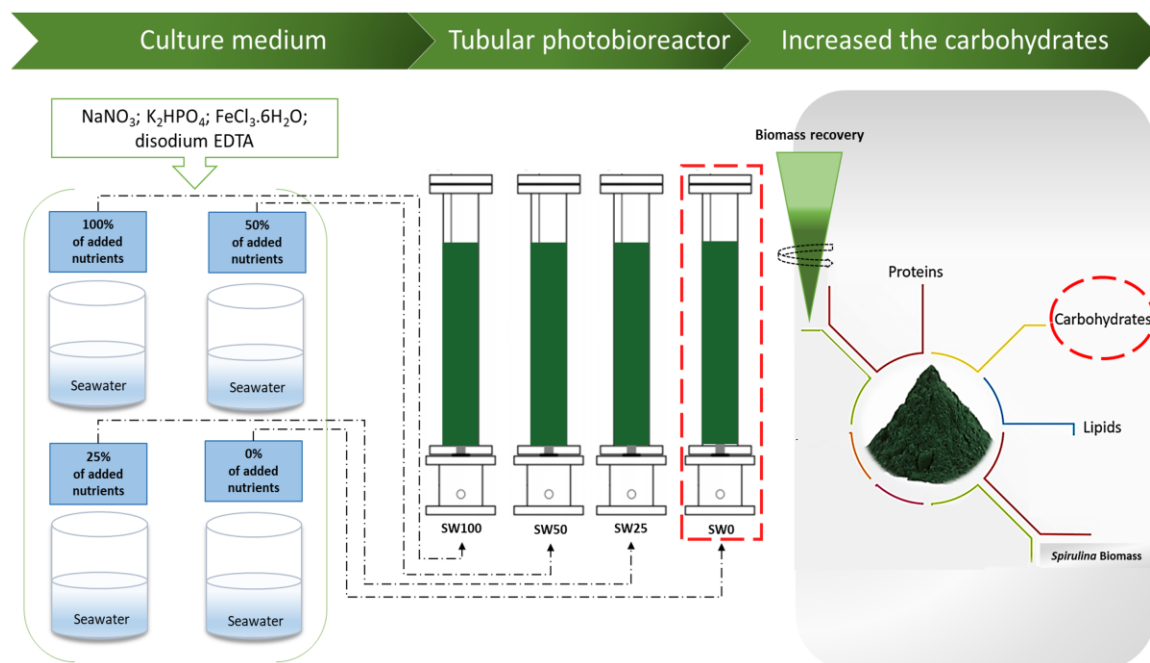
### CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM ÁGUA DO MAR E REDUÇÃO DE NUTRIENTES: ESTRATÉGIA DE BIOPROCESSO PARA AUMENTAR CARBOIDRATOS NA BIOMASSA

**Artigo publicado:** BEZERRA, P. Q. M.; MORAES, L.; CARDOSO, L. G.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in seawater and reduced nutrients: Bioprocess strategy for increasing carbohydrates in biomass.

**Bioresource Technology**, v. 316, n. 123883, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123883>

#### Graphical abstract publicado





## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento e a produção de biomoléculas por *Spirulina* sp. LEB 18 cultivado em água do mar. A água do mar foi utilizada sem adição de nutrientes (AM0) e também suplementada com 100% (AM100), 50% (AM50) e 25% (AM25) das concentrações de nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA dissódico que compõem o meio de cultivo Zarrouk. Quando cultivada em AM0, *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou concentração máxima de biomassa ( $2,17 \text{ g L}^{-1}$ ) no 11º dia de cultivo e incremento na concentração e na produtividade de carboidratos em 203% e 52%, respectivamente, quando comparado ao cultivo controle. Essa estratégia de cultivo demonstrou a viabilidade de utilizar a água do mar como alternativa à água doce nos cultivos bem como reduzir as necessidades nutricionais para a produção de biomassa e carboidratos.

Palavras-chave: Biomoléculas. Água marinha. Microalgas. Nutrientes. Salinidade.

## 1 INTRODUÇÃO

A escassez de água doce é uma situação cada vez mais alarmante em todo o mundo (WWAP, 2019). A redução deste recurso hídrico é um fator importante quando se considera o cultivo de microalgas, uma vez que um alto volume de água doce é necessário para esse processo (MAEDA et al., 2018). Outra consideração importante é a demanda nutricional necessária para o cultivo de microalgas, pois representa aproximadamente 10-15% do custo total de produção de biomassa (HOFFMAN et al., 2017).

A água do mar representa 97,5% de todos os recursos hídricos do planeta (SHANNON et al., 2008). Esta alternativa hídrica, quando comparado com a água doce, apresenta elevada salinidade ( $35 \text{ g kg}^{-1}$  de sais dissolvidos) e concentração de cloreto de sódio (NaCl), além de traços de carbono, lítio, bário, manganês, ferro, zinco, alumínio, cobre, selênio, entre outros. Os gases nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) também podem estar dissolvidos (LÉCUYER, 2016). A elevada salinidade da água do mar limita seu uso em sistemas agrícolas, no entanto, essa mesma propriedade reforça seu uso para o cultivo de microalgas.

*Spirulina* tem sido foco de estudos devido à resistência desta cianobactéria a ambientes de altas temperaturas (JESUS et al., 2018), elevada salinidade ( $34 \text{ g L}^{-1}$ ) e alcalinidade (LEEMA et al., 2010), e por apresentar elevada produtividade de biomassa de importante qualidade nutricional. A biomassa de *Spirulina* possui quantidades consideráveis de proteínas ( $65\text{-}70\% \text{ m m}^{-1}$ ), carboidratos, ácidos graxos essenciais e pigmentos. Assim, tem

potencial para ser utilizada em diversas aplicações nos diferentes setores, como nutracêuticos, alimentício, cosmético e farmacêutico (SONI et al., 2017).

Até o momento, poucos estudos investigaram o cultivo do gênero *Spirulina* em água do mar. Pesquisas com esse micro-organismo em água marinha vêm sendo desenvolvidas sob práticas de diluição de água do mar com água doce (AFFAN et al., 2015). Portanto, uma análise global do uso da água do mar como única fonte nutricional, bem como com a suplementação parcial de nutrientes para microalgas ainda é necessária. Tal análise poderia determinar a demanda nutricional ideal para o metabolismo de *Spirulina* e reforçar a água do mar como fonte alternativa de água para o cultivo de microalgas.

Os limitados estudos conduzidos com água do mar no cultivo de *Spirulina platensis* demonstraram seu potencial para a produção de carboidratos (LEEMA et al., 2010). O incremento de carboidratos por *Spirulina* reforçam sua viabilidade como substrato alternativo para a obtenção de biocombustíveis, como o bioetanol (MARKOU; NERANTZIS, 2013; SALLA et al., 2016). O acúmulo dessa macromolécula na biomassa foi observado em sistemas de cultivo com redução ou privação das fontes de nitrogênio (BRAGA et al., 2019) ou de fontes de fósforo (MARKOU et al., 2012b), bem como em meio de alta salinidade (AFFAN et al., 2015; LEEMA et al., 2010).

Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 em água do mar, com e sem suplementação de nutrientes, na perspectiva de utilizar esta água como fonte nutricional e alternativa aos cultivos que demandam água doce. Além disso, o acúmulo de biomoléculas na biomassa também foi avaliado, com foco principal no aumento de carboidratos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO, COLETA E PRÉ-TRATAMENTO DA ÁGUA DO MAR

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O inóculo foi mantido em meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966). A água do mar (AM) (pH 8,64) foi coletada na praia do Cassino (32°12'23" S – 52°10'30" W) no Rio Grande-RS, Brasil. Após a coleta, a água do mar foi filtrada em membrana de acetato de celulose (0,45 µm), esterilizada (121 °C/ 1,1 atm, 30 min) e armazenada a -20 °C até sua caracterização e utilização nos ensaios. Para ser utilizada no preparo de meios de cultivo, a AM foi pré-tratada para precipitar o excesso de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e

magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) de acordo com o método proposto por Faucher, Coupal, Leduy (1979). O pré-tratamento consistiu na adição de  $19,2 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) à água do mar e posterior ajuste do pH para 8,6.

## 2.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Neste estudo, a água do mar pré-tratada foi suplementada com 100% (AM100), 50% (AM50) e 25% (AM25) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e EDTA dissódico que constituem o meio de cultivo Zarrouk. Após a suplementação com nutrientes, para utilização nos ensaios, o meio de cultivo foi esterilizado por filtração em membrana de acetato ( $0,22 \mu\text{m}$ ) e o pH ajustado para 8,6. Além disso, foram realizados ensaios com água do mar sem pré-tratamento e sem adição de nutrientes (AM0) e ensaio controle, realizado em meio de cultivo padrão Zarrouk. Os ensaios foram realizados em duplicata, em modo descontínuo, em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L (com volume útil de 1,5 L) e mantidos a  $30^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h claro e 12 h de escuro com intensidade luminosa de  $44,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , utilizando lâmpadas fluorescentes por 15 d. A concentração inicial de biomassa utilizada foi de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  e a agitação dos cultivos foi realizada por borbulhamento de ar comprimido estéril a uma vazão de  $450 \text{ mL}_{\text{ar}} \text{min}^{-1}$  (ROSA et al., 2016).

## 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.3.1 Caracterização da água do mar

A água do mar com (AM) foi avaliada de acordo com os Métodos Padrão (MP) para o exame de água e efluentes (APHA, 2005) quanto a concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sódio (Na; SM 3120B), potássio (K; SM 3120B), cálcio (Ca; SM 3120B), magnésio (Mg; SM 3120B), ferro (Fe; SM 3120B) e fósforo (P; SM 4500 P). Além disso, também foram avaliadas a salinidade total ( $\text{g L}^{-1}$ ; SM 2520C), condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ; SM 2510A/B), alcalinidade total ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; SM 2320A/B), alcalinidade de carbonatos ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; SM 2320A/B), alcalinidade de bicarbonatos ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; SM 2320A/B), dureza total ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; SM 2340A/B/C) e sólidos totais dissolvidos ( $\text{g L}^{-1}$ ; SM 2540C). Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) foram determinados por cromatografia de troca iônica e cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) pelo método de Mohr (APHA, 2005).



### 2.3.2 Concentração de biomassa, pH e características morfológicas

A concentração de biomassa ( $X_b$ ) foi determinada a cada 24 h mediante medida de densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (Shimadzu UV/VIS UVMMini-1240, Japão) (ROSA et al., 2016), utilizando curva padrão de *Spirulina* sp. LEB 18 ( $X_b = 0,6207 \text{ abs} - 0,0198$ ,  $R^2 = 0,9938$ ). O pH dos cultivos foi determinado a cada 24 h por meio de medida em pH digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça).

As características morfológicas das células de *Spirulina* sp. LEB 18 foram avaliadas em 0, 6 e 15 d, para cada ensaio, em microscópio óptico (Optika B-500ABS, Alemanha), equipado com câmera digital (ZEISS Axiocam ERc 5s, Alemanha) e software ZEN 2 (Resultado apresentado como apêndice do trabalho).

## 2.5 RESPOSTAS DO CULTIVO AVALIADAS

A partir dos valores de concentração de biomassa foram obtidas a concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ , g L<sup>-1</sup>), produtividade volumétrica de biomassa ( $P_x$ , g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) e tempo de geração ( $t_g$ , d). A produtividade volumétrica de biomassa foi determinada de acordo com a Equação  $P_x = (X_t - X_0) / (t - t_0)$ , onde  $X_t$  é a concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  é a concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>) no tempo  $t_0$  (d). A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) foi determinada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento em um perfil ( $\ln X$  vs  $t$ ), onde a inclinação da reta foi considerada o valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . O tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos foi calculado de acordo com Equação  $t_g = \ln(2) / \mu_{\text{máx}}$ .

## 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa produzida no final dos ensaios foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio, Japão) a 15200 x g, 20°C por 10 min, ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada sob as mesmas condições. Esta etapa foi repetida duas vezes para a remoção dos sais do meio de cultivo aderidos as células. A biomassa microalgal concentrada foi congelada (-80 °C), liofilizada (48 h) e armazenada (-20 °C) para posterior caracterização (ROSA et al., 2015).

A concentração de proteínas total foi determinada por método descrito por Lowry et al. (1951), com prévia hidrólise térmica e alcalina. O teor de carboidratos foi determinado mediante método proposto por Dubois et al. (1956). A quantificação dos lipídios foi realizada de acordo com o método gravimétrico proposto por Folch, Lees e Stanley (1957). O teor de umidade na biomassa foi determinada de acordo com a AOAC (2000).

A produtividade de carboidratos ( $P_{\text{carboidratos}}$ ,  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) foi calculada de acordo com a Equação  $P_{\text{carboidratos}} = P_{\text{final}} * f_{\text{carboidratos}}$ , onde,  $P_{\text{final}}$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) é a produtividade final de biomassa e  $f_{\text{carboidratos}}$  ( $\text{mg}_{\text{carboidratos}} \text{mg}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ) é a concentração de carboidratos na biomassa final.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

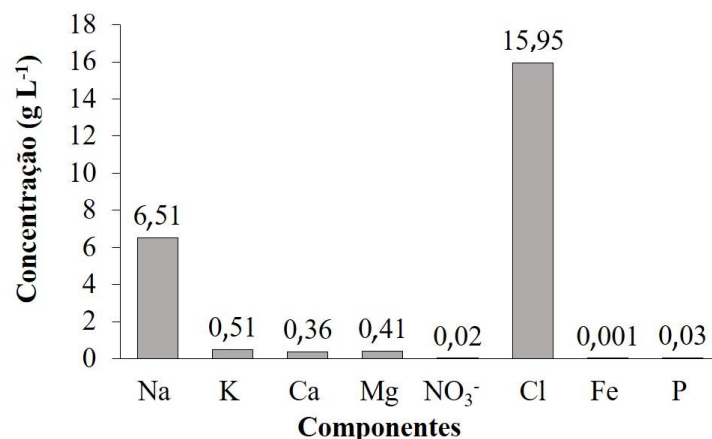
As respostas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARAMETROS CINÉTICOS E pH

A água do mar apresentou maiores concentrações de sódio, cloretos, potássio, magnésio e cálcio. Além disso, outros elementos importantes para o metabolismo das microalgas foram detectados, como nitrato, ferro e fósforo (Figura 1). O crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 com os nutrientes presentes apenas na água do mar (AM0) foi possível até o 11º d. A partir do 11º d, o crescimento da cepa diminuiu até o fim do ensaio (Figura 2a). A redução do crescimento neste ensaio não pode ser atribuída apenas à limitação de nutrientes essenciais para o metabolismo das microalgas (nitrogênio e fósforo), mas também à alta salinidade do meio. Os demais ensaios apresentaram crescimento exponencial em média de 5 dias (Tabela 1) e crescimento linear até o 15º dia de cultivo (Figura 2a).

**Figura 1-** Composição e características físico-químicas da água do mar (AM0)



Salinidade Total (g L<sup>-1</sup>) 37,82

Condutividade (mS cm<sup>-1</sup>) 56,9

Alcalinidade HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) 114

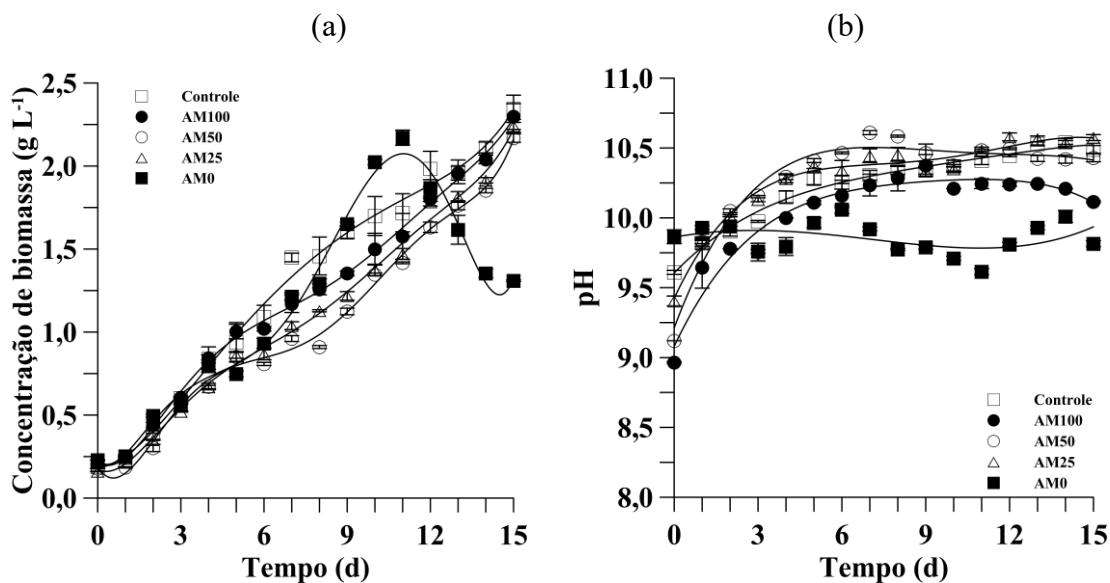
Alcalinidade CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) 41,4

Alcalinidade Total (mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) 155

Dureza Total (mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) 27470

Sólidos Totais Dissolvidos (g L<sup>-1</sup>) 28,37

**Figura 2-** Perfil de concentração de biomassa (a) e pH (b) de *Spirulina* sp. LEB 18 nos ensaios controle, AM100, AM50, AM25 e AM0



As máximas concentrações de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ) foram verificadas nos ensaios controle e AM100, apresentando diferença significativa dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). No ensaio AM0, o  $X_{\text{máx}}$  foi semelhante a concentração de biomassa no 11º d, enquanto no ensaio AM100, AM50, AM25 e controle, o  $X_{\text{final}} = X_{\text{máx}}$  (Figura 2a; Tabela 1). O ensaio AM0 apresentou valores mais baixos de  $X_{\text{máx}}$  (7,26%) e  $P_{\text{final}}$  (50%) em comparação com o ensaio de controle. No entanto, o ensaio AM0 apresentou valor  $P_{\text{máx}}$  (0,18 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) igual ( $p > 0,05$ ) ao ensaio controle (Tabela 1). Os resultados da  $P_{\text{máx}}$  em todas as condições avaliadas foram

superiores aos obtidos por Moraes et al. (2018) ( $P_{\text{máx}}$  0,097 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) em cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 sob estresse salino (30,0 g L<sup>-1</sup> de NaCl), redução da fonte de nitrogênio (1,25 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>), injeção de CO<sub>2</sub> (12,0% v v<sup>-1</sup>, vazão 0,3 vvm) e utilizando a mesma configuração de fotobiorreator e condições temperatura e intensidade luminosa.

No presente estudo, verificou-se que os ensaios com menores concentrações de nutrientes (AM0 e AM25) apresentaram valores de  $P_{\text{máx}}$  e  $P_{\text{final}}$  superiores e semelhantes aos observados nos ensaios AM100 e AM50, respectivamente (Tabela 1). Nos ensaios AM100 e AM50, uma parte das concentrações de nutrientes pode ter se tornado quimicamente indisponível para serem metabolizados por microalgas, resultando na redução da produtividade da biomassa. Além disso, de acordo com Chokshi et al. (2017), o aumento da salinidade pode causar estresse osmótico e iônico nas microalgas e promover alterações na permeabilidade seletiva da membrana. Nesse sentido, Duarte et al. (2020) verificaram diminuição contínua na concentração de biomassa, mesmo com aporte elevado de nutrientes para *Spirulina* sp. LEB 18, em cultivo com água subterrânea salobra e 100% dos nutrientes do meio Zarrouk. Esses autores concluíram que a água subterrânea salobra e 25% da concentração de nutrientes que compõe o meio Zarrouk foi suficiente para aumentar o crescimento da microalga.

O menor tempo de geração ( $t_g$ ) ( $p < 0,05$ ) foi observado no ensaio de controle. Por outro lado, o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 no ensaio AM0 aumentou apenas 18% do resultado  $t_g$ , em relação ao ensaio de controle (Tabela 1). Em um estudo de Leema et al. (2010) os resultados de  $t_g$  (3,01 d) de *Spirulina platensis* cultivada em água do mar pré-tratada e suplementada com 100% de nitrogênio, fósforo e ferro foram 43,3–69,1% maiores do que os resultados obtidos no presente estudo.

Os valores de pH dos cultivos variaram de 9,0–10,6 (ensaios AM100, AM50 e AM25), 9,6–10,5 (ensaio de controle) e 9,6–10,1 (ensaio AM0) (Figura 2b). Segundo Vonshak (1997), a microalga *Spirulina* apresenta crescimento favorável na faixa de pH de 9,0–10,0.

### 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA

O conteúdo de proteínas em *Spirulina* sp. LEB 18 foi maior no ensaio de controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, *Spirulina* sp. LEB 18 cultivado em água do mar (AM50, AM25 e AM0) apresentou aumento no teor de carboidratos na biomassa, sendo o valor máximo

**Tabela 1-** Resultados médios da concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ), produtividade máxima de biomassa ( $P_{\text{máx}}$ ), produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ), velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), tempo de geração ( $t_g$ ), concentração de proteínas, carboidratos e lipídios (em base seca) e produtividade de carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada nos ensaios controle, AM100, AM50, AM25 e AM0

| Parâmetros                                                      | Controle                  | AM100 <sup>1</sup>          | AM50 <sup>2</sup>         | AM25 <sup>3</sup>           | AM0 <sup>4</sup>          |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                           | 2,34 <sup>a</sup> ± 0,08  | 2,30 <sup>a, b</sup> ± 0,08 | 2,17 <sup>c</sup> ± 0,03  | 2,24 <sup>b, c</sup> ± 0,04 | 2,17 <sup>c</sup> ± 0,05  |
| $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )           | 0,18 <sup>a</sup> ± <0,01 | 0,16 <sup>b</sup> ± 0,01    | 0,14 <sup>c</sup> ± <0,01 | 0,14 <sup>c</sup> ± <0,01   | 0,18 <sup>a</sup> ± <0,01 |
| $P_{\text{final}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )         | 0,14 <sup>a</sup> ± 0,01  | 0,14 <sup>a</sup> ± 0,01    | 0,13 <sup>b</sup> ± <0,01 | 0,14 <sup>a</sup> ± <0,01   | 0,07 <sup>c</sup> ± <0,01 |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                           | 0,39 <sup>a</sup> ± <0,01 | 0,36 <sup>b</sup> ± 0,01    | 0,35 <sup>b</sup> ± 0,01  | 0,36 <sup>b</sup> ± <0,01   | 0,33 <sup>c</sup> ± 0,01  |
| $R^{2*}$                                                        | 0,991 ± 0,004             | 0,972 ± 0,009               | 0,945 ± 0,002             | 0,993 ± 0,002               | 0,944 ± 0,003             |
| $\Delta t$ (d)**                                                | 0-4                       | 0-4                         | 0-5                       | 0-4                         | 0-4                       |
| $t_g$ (d)                                                       | 1,78 <sup>a</sup> ± 0,01  | 1,90 <sup>b</sup> ± 0,10    | 1,97 <sup>b</sup> ± 0,03  | 1,91 <sup>b</sup> ± 0,03    | 2,10 <sup>c</sup> ± 0,07  |
| Proteínas (% m m <sup>-1</sup> )                                | 52,5 <sup>a</sup> ± 3,1   | 48,4 <sup>b</sup> ± 2,5     | 29,8 <sup>c</sup> ± 2,2   | 30,9 <sup>c</sup> ± 0,5     | 8,0 <sup>d</sup> ± 0,1    |
| Carboidratos (% m m <sup>-1</sup> )                             | 22,6 <sup>c</sup> ± 0,6   | 20,9 <sup>c</sup> ± 1,2     | 43,1 <sup>b</sup> ± 0,5   | 42,4 <sup>b</sup> ± 1,0     | 68,6 <sup>a</sup> ± 2,5   |
| Lipídios (% m m <sup>-1</sup> )                                 | 12,1 <sup>a</sup> ± 1,1   | 6,4 <sup>c</sup> ± 0,6      | 5,0 <sup>c</sup> ± 0,3    | 10,0 <sup>b</sup> ± 1,0     | 6,7 <sup>c</sup> ± 1,0    |
| $P_{\text{carboidratos}}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 32,5 <sup>c</sup> ± 0,5   | 28,5 <sup>d</sup> ± 0,5     | 57,2 <sup>a</sup> ± 1,3   | 58,8 <sup>a</sup> ± 1,9     | 49,4 <sup>b</sup> ± 1,9   |

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ ); \*Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento no perfil  $\ln X$  versus  $t$ ; \*\* $\Delta t$ : início-fim da fase exponencial de crescimento.<sup>1-3</sup> Água do mar suplementada com 100% (AM100), 50% (AM50) e 25% (AM25) das concentrações de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e EDTA dissódico que compõem o meio de cultivo Zarrouk; <sup>4</sup>- Água do mar sem adição de nutrientes (AM0)

verificado no ensaio AM0 (68,6% m m<sup>-1</sup>) em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). Esse resultado foi 203,5% superior quando comparado ao ensaio controle, cultivado com o meio de cultivo Zarrouk.

O aumento da salinidade do meio (LEEMA et al., 2010) e a redução/limitação de nitrogênio (BRAGA et al., 2019) e fósforo (MARKOU et al., 2012b) nas culturas foram relatados como fatores que promovem aumento no conteúdo de carboidratos e redução nas proteínas na biomassa de *Spirulina*. Pancha et al. (2015) e Leema et al. (2010) descreveram que as microalgas, na tentativa de manter o equilíbrio osmótico do meio, direcionam seu metabolismo para a produção e acúmulo de carboidratos osmorreguladores de baixo peso molecular, como sacarose e trealose. Condições osmorregulatórias semelhantes às do presente estudo foram observadas por Leema et al. (2010) quando a *Spirulina platensis* foi cultivada em água do mar pré-tratada e suplementada com 100% de nitrogênio, fósforo e ferro, com aumento de 79% no teor de carboidratos da biomassa. Markou et al. (2012b) observaram redução de 30% no conteúdo de proteína e aumento de 159% em carboidratos na biomassa de *Spirulina platensis* quando cultivada em meio Zarrouk modificado com fonte de fósforo reduzida (0,01 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em oposição à cultura de controle. Braga et al. (2019) limitaram a concentração de nitrogênio (0,25 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>) no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, redirecionando assim o metabolismo das microalgas para aumentar os carboidratos (63% m m<sup>-1</sup>) e diminuir o teor de proteínas em 30%.

Os maiores valores de produtividade de carboidratos ( $p < 0,05$ ) foram observados nos ensaios AM50 e AM25 (Tabela 1). Por outro lado, o ensaio AM0 apresentou resultado promissor de produtividade de carboidratos (49,4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), valor 52% superior ao verificado no ensaio controle (Tabela 1). De acordo com Salla et al. (2016), a avaliação da produtividade de carboidratos permite a verificação do potencial da aplicação de biomassa microalgal como matéria-prima para a produção de bioetanol.

O maior teor de lipídios ( $p < 0,05$ ) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi observada no ensaio de controle (Tabela 1). A redução do teor de lipídios totais nos cultivos conduzidos em água do mar, com e sem adição de nutrientes, pode ser atribuída ao desvio da energia metabólica em direção à produção de carboidratos para promover o equilíbrio osmorregulador, alterado pelas altas concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nos ambientes intra e extracelulares. Além disso, Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) também são produzidos neste ambiente estressante, desencadeando danos celulares e peroxidação lipídica (PANCHÁ et al., 2015). Assim, é possível que, no presente estudo, a alta salinidade e o reduzido aporte de nitrogênio e fósforo possam ter agido de forma sinérgica, ocasionando o aumento dos

carboidratos e comprometendo o conteúdo proteico e lipídico na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

#### 4. CONCLUSÃO

O cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em água do mar sem adição de nutrientes apresentou crescimento ( $X_{\text{máx}} = 2,17 \text{ g L}^{-1}$ ) e aumento no teor e produtividade de carboidratos em 203% e 52%, respectivamente, quando comparado ao cultivo controle. Portanto, o estudo apresentou uma estratégia inovadora da água do mar como meio de crescimento para o cultivo da *Spirulina* como alternativa a sistemas que demandam grandes quantidades de água doce e nutrientes, com vantagens adicionais para a produção de biomassa e carboidratos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFAN, M. A.; LEE, D-W.; JEON, S-M.; NOH, J-H.; HEO, S-J.; OH, C.; PARK, H-S.; KHOMAYIS, H. S. A.; KANG, D-H. Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* growth with decreased production costs. **Aquaculture**, v. 436, p. 121-126, 2015.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. , 17<sup>th</sup> edition, AOAC International, 2000.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>th</sup> edition. Washington: APHA, 2005. Am. Water Work. Assoc. Public Work. Assoc. Environ. Fed. 552.

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

CHOKSHI, K.; PANCHI, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1376-1383, 2017.

COSTA, S. 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 Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552-562, 2018.

DUARTE, J. H.; CARDOSO, L. G.; SOUZA, C. O.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Brackish Groundwater from Brazilian Backlands in *Spirulina* Cultures: Potential of Carbohydrate and Polyunsaturated Fatty Acid Production.

**Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, p. 907-917, 2020.

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.

FAUCHER, O.; COUPAL, B.; LEDUY, A. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 752-759, 1979.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

HOFFMAN, J.; PATE, R. C.; DRENNEN, T.; QUINN, J. C. Techno-economic assessment of open microalgae production systems. **Algal Research**, v. 23, p. 51-57, 2017.

LÉCUYER, C. Seawater residence times of some elements of geochemical interest and the salinity of the oceans. **Bulletin de la Société Géologique de France**, v. 187, p. 245-260, 2016.

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

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

MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, T. Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 111-120, 2018.

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2661-2670, 2012.

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 NaNO<sub>3</sub> and NaCl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-10, 2018.

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

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K.; PATIDAR, S. K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341-348, 2015.



ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. D. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO<sub>2</sub> absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, n. 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.

SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARÍÑAS, B. J.; MAYES, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nature**, v. 452, p. 301-310, 2008.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997. p. 233.

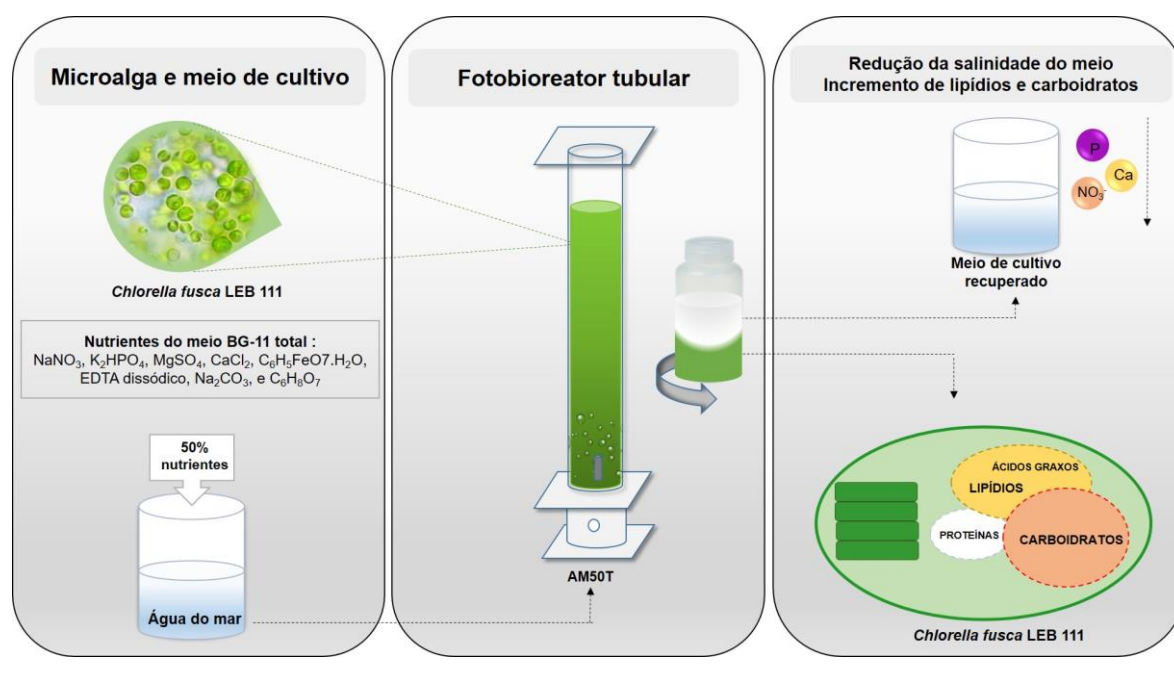
WWAP (UNESCO World Water Assessment Programme). 2019. **The United Nations World Water Development Report 2019: Leaving No One Behind**. Paris, UNESCO.

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

## ARTIGO II

### ÁGUA DO MAR COMO ALTERNATIVA INOVADORA E SUSTENTÁVEL PARA O CULTIVO DE *Chlorella fusca*

#### Resumo gráfico





## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o emprego de água do mar (AM), com e sem suplementação de nutrientes para a produção de biomassa e biomoléculas por *Chlorella fusca* LEB 111. A AM foi utilizada como meio de cultivo (AM0), e suplementada com 50% (AM50P) e 100% (AM25P) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), EDTA dissódico e ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) do meio de cultivo BG11. Além disso, foram elaborados meios de cultivo com AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11. *C. fusca* LEB 111 cultivada em AM50T apresentou os maiores resultados de concentração máxima de biomassa ( $1,72 \text{ g L}^{-1}$ ) e produtividade máxima de biomassa ( $149,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Além disso, nesta condição de cultivo foram verificados maiores resultados de teor e produtividade de carboidratos, sendo estes valores superiores a condição controle em 98,2% e 118,6%, respectivamente. Os principais ácidos graxos verificados na biomassa de *C. fusca* LEB 111 em AM50T foram ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico, demonstrando perfil com potencial para a produção de biodiesel. Esta condição também foi capaz de remover as concentrações das fontes de N, Ca, e P do meio (40-97,3%). A utilização de AM com adição de 50% de todos os nutrientes do meio BG11 foi capaz de promover o crescimento de *C. fusca* LEB 111, como também incrementar a concentração e produtividade de carboidratos e lipídios na biomassa, com potencial aplicação para produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Água marinha. Biocombustível. Lipídios. Produtividade. Remoção de nutrientes.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas pode resultar na produção de biomassa com relevantes teores de proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos graxos e pigmentos de elevado interesse para aplicação comercial. Nessa perspectiva, estudos tem estimulado o cultivo destes micro-organismos sob utilização de fontes alternativas de água e nutrientes a fim de minimizar a problemática da escassez de água doce no mundo, redução de custos com o processo e maior aproveitamento da biomassa e dos biocompostos produzidos (DUARTE et al., 2020; OTAKI et al., 2019; ZHAI et al., 2020).

Entre as principais alternativas hídricas favoráveis para o cultivo destes micro-organismos fotossintéticos, a água do mar vem apresentando destaque por conter em sua composição íons dissolvidos como: cloreto, sódio, magnésio, cálcio e sulfato (JUNG et al., 2015), interessantes para o metabolismo das microalgas (OTAKI et al., 2019; ZHAI et al., 2020). Entretanto, estudos vem relatando que a elevada concentração de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  na água do mar promovem precipitação de nutrientes nos meios de cultivo, exigindo assim

etapas de pré-tratamento (FAUCHER; COUPAL; LEDUY, 1979; LEEMA et al., 2010), bem como podem demandar práticas de diluições com água doce (AFFAN et al., 2015; OTAKI et al., 2019). Zhai et al. (2020) demonstraram a viabilidade de cultivar *Chlorella* sp. em água do mar sem demanda prévia de pré-tratamento, porém sob práticas de diluições. Os pesquisadores concluíram que a utilização desta alternativa hídrica suplementada com nutrientes do meio F/2 e diferentes concentrações de bicarbonato de sódio ( $0-7 \text{ g L}^{-1}$ ) foi capaz de elevar a produtividade de biomassa ( $0,470 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e favorecer o acúmulo de carboidratos ( $42\% \text{ m m}^{-1}$ ) e lipídios ( $21\% \text{ m m}^{-1}$ ) na biomassa da microalga.

Espécies de *Chlorella kessleri* (OTAKI et al., 2019), *Chlorella sorokiniana* (CHEN et al., 2013) e *Chlorella vulgaris* (LUANGPIPAT; CHISTI, 2017; MATHIMANI et al., 2018) apresentaram potencial de crescimento e obtenção de coprodutos de alto valor comercial quando cultivadas em água do mar. Estes estudos utilizam essa fonte de água diluída em água doce. No entanto, o emprego da água do mar como alternativa hídrica e fonte nutricional, associada a suplementação de nutrientes (total/parcial) continua sendo pouco investigada na produção de microalgas do gênero *Chlorella*. Além disso, pesquisas ressaltam que o estresse osmótico conferido pela elevada salinidade do meio pode promover o acúmulo de biomoléculas de interesse para produção de biocombustíveis, no entanto pode comprometer a produtividade de biomassa (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013; LUANGPIPAT; CHISTI, 2017; PAL et al., 2011; PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017; ZHAI et al., 2020). Sendo assim, torna-se necessário a realização de novas estratégias de cultivo para minimizar esta problemática.

Entre as espécies de *Chlorella*, *C. fusca* se destaca por apresentar elevada produtividade de biomassa e macromoléculas e potencial na biorremediação de nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P) de águas residuais (PERALTA; JEREZ; FIGUEROA, 2019). Além disso, Duarte et al. (2017) reforçam a elevada adaptação desta microalga em ambientes alcalinos ( $\text{pH} > 9,0$ ), uma vez que seu isolamento ocorreu em lagoas de sedimentação de cinzas de uma usina termoeletrica, o que a torna diferente de outras espécies de *Chlorella*, favoráveis ao crescimento em ambientes próximo da neutralidade ( $\text{pH} \sim 7,0$  a  $8,0$ ). Isto estimula verificar a tolerância dessa microalga em cultivos com água do mar frente a ausência ou limitação de nutrientes e possível contribuição na produção de biocombustíveis (BRAGA et al., 2019), ração animal, fertilizantes (DUARTE et al., 2017) ou na biofixação de  $\text{CO}_2$  (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019).

Diante deste cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego de água do mar, com e sem suplementação de nutrientes para o crescimento de *Chlorella fusca*

LEB 111. Além disso, foi avaliado o incremento do conteúdo de carboidratos, lipídios e perfil de ácidos graxos na biomassa microalgal a fim de verificar o potencial de aplicação dessa matéria-prima para a produção de biocombustíveis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO E COLETA DA ÁGUA DO MAR

A microalga utilizada neste estudo foi *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE et al., 2016), pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O inóculo foi mantido em meio de cultivo BG11 (RIPPKA et al., 1979) a 30 °C, fotoperíodo 12h: 12 h claro/escuro e intensidade luminosa de 44,8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por até 90 d, sem suplementação de nutrientes e adicionado de água destilada para compensar a evaporação. A água do mar (AM) foi coletada na praia do Cassino (32°12'23" S – 52°10'30" W) em Rio Grande-RS, Brasil. Após a coleta, a AM foi filtrada em membrana de acetado (0,45  $\mu\text{m}$ ), esterilizada (121 °C/ 1,1 atm, 30 min) (salinidade 37,8 g L<sup>-1</sup>; pH 8,64) e armazenada a -20 °C para posterior caracterização e utilização nos ensaios.

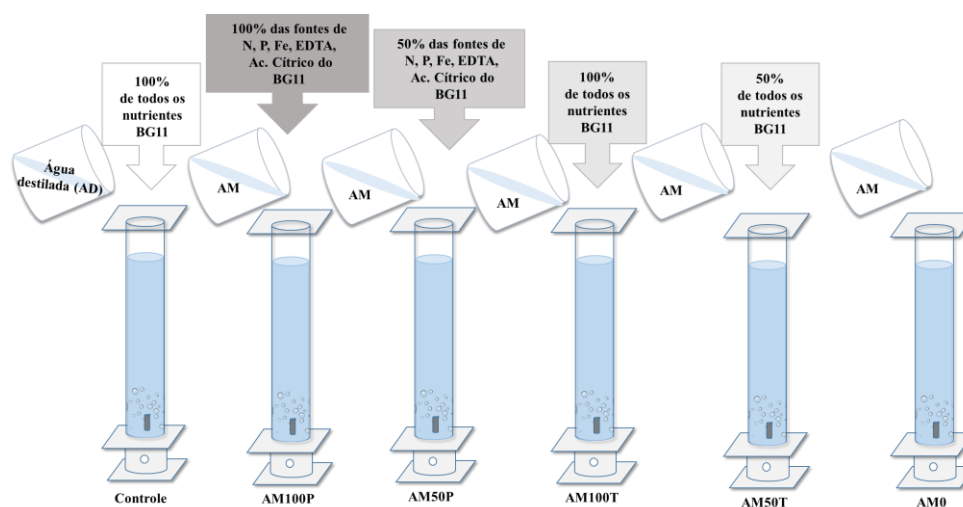
### 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os ensaios com *Chlorella fusca* LEB 111 foram realizados com meio de cultivo preparado com AM suplementada com 50% (AM50P) e 100% (AM100P) das concentrações das fontes de nitrogênio (NaNO<sub>3</sub>), fósforo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), ferro (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O), EDTA dissódico e ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) presentes no meio de cultivo BG11. Além disso, foram elaborados meios de cultivo com AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11. AM também foi avaliada como meio de cultivo (AM0) e um ensaio controle em meio de cultivo BG11 padrão foi elaborado (Figura 1). Cabe ressaltar que, todos os meios de cultivo elaborados com AM não foram suplementados com os micronutrientes que compõem o meio de cultivo controle.

Os ensaios foram conduzidos em duplicata (modo descontínuo) em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L (com volume útil de 1,5 L), com agitação promovida pela injeção de ar comprimido por meio de aspersor do tipo pedra porosa, com vazão específica de 0,3 mL<sub>ar</sub> mL<sub>meio</sub><sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. A concentração inicial de biomassa utilizada foi

0,2 g L<sup>-1</sup>. Ao longo dos 15 d de ensaio os cultivos foram mantidos a 30 °C, fotoperíodo 12: 12h claro/ escuro e intensidade luminosa de 44,8 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (MORAES et al. 2020).

**Figura 1-** Esquema experimental da elaboração dos meios de cultivo com água do mar (AM) para os ensaios com *Chlorella fusca* LEB 111. BG11 total (g L<sup>-1</sup>): Nitrogênio (1,5; NaNO<sub>3</sub>), fósforo (0,04; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sulfato de magnésio (0,075; MgSO<sub>4</sub>), cloreto de cálcio (0,036; CaCl<sub>2</sub>) ferro (0,006; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O), EDTA dissódico (0,001), carbonato de sódio (0,02; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e ácido cítrico (0,006; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) + micronutrientes: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 2,86 g L<sup>-1</sup>; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O: 1,81 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,222 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,39 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,079 g L<sup>-1</sup>; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,0494 g L<sup>-1</sup>



## 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.3.1 Caracterização dos meios de cultivo e eficiência de remoção de nutrientes

A água do mar (AM) e as frações de entrada (meios de cultivo) e saída (após o cultivo) dos ensaios foram avaliados de acordo com os métodos padrão (MP) para o exame de água e efluentes (APHA, 2005) quanto a concentração (mg L<sup>-1</sup>) de sódio (Na; SM 3120B), potássio (K; SM 3120B), cálcio (Ca; SM 3120B), magnésio (Mg; SM 3120B) e fósforo (P; SM 4500 P). A concentração de nitrogênio em forma de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) foi determinada por cromatografia de troca iônica, enquanto os cloretos (Cl<sup>-</sup>) foram quantificados pelo método de Mohr (APHA, 2005). A eficiência de remoção (ER, %) dos nutrientes pelos cultivos foi calculada de acordo com a Equação  $ER = ((C_i - C_o)/C_i) * 100$ , em que C<sub>i</sub> e C<sub>o</sub> são as concentrações dos nutrientes nas frações de entrada e saída do meio de cultivo, respectivamente, representando assim a redução da concentração de nutrientes na saída (ROMERO VILLEGAS et al. 2017).

### 2.3.2 Concentração de biomassa e pH

Diariamente os cultivos foram avaliados quanto a concentração de biomassa e pH. A concentração de biomassa ( $X_b$ ) foi determinada por medida da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (Shimadzu UV/VIS UVMMini-1240, Japão), utilizando curva padrão de *Chlorella fusca* LEB 111 ( $X_b = 0,3273 \text{ abs} - 0,0055$ ,  $R^2 = 0,9996$ ), relacionando a densidade óptica e o peso seco de biomassa (COSTA et al., 2002). O pH dos cultivos foi determinado por medida direta em pHmetro digital (Metter Toledo FiveGoTM, Suíça).

### 2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A partir dos valores de concentração de biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, em cada condição experimental, foram obtidos os resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ , g L<sup>-1</sup>), produtividade volumétrica de biomassa ( $P_x$ , mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) e tempo de geração ( $t_g$ , d). A produtividade volumétrica de biomassa foi determinada de acordo com a Equação  $P_x = (X_t - X_0) / (t - t_0)$ , onde  $X_t$  é a concentração de biomassa (mg L<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  é a concentração de biomassa (mg L<sup>-1</sup>) no tempo  $t_0$  (d). A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) foi determinada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento em um perfil ( $\ln X$  vs  $t$ ), onde a inclinação da reta foi considerada o valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . O tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos foi calculado de acordo com Equação  $t_g = \ln(2) / \mu_{\text{máx}}$ .

### 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos cultivos a biomassa de *C. fusca* LEB 111 foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio, Japão) a 15,200 x g, 20°C por 10 min, ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada sob as mesmas condições. Esta etapa foi realizada por duas vezes para a retirada de sais remanescentes do meio de cultivo que pudessem estar aderidos as células. A biomassa microalgal concentrada foi congelada (-80 °C), liofilizada (48 h) e armazenada (-20 °C) para posterior caracterização (ROSA et al., 2018).



### 2.5.1 Determinação de proteínas, carboidratos, lipídios e umidade

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método proposto por Lowry et al. (1951), a partir do pré-tratamento térmico e alcalino da biomassa microalgal. Os teores de carboidratos e lipídios na biomassa foram determinados de acordo com os métodos propostos por Dubois et al. (1956) e Folch, Lees e Stanley (1957), respectivamente. O teor de umidade na biomassa foi determinado de acordo com a AOAC (2000).

A produtividade de carboidratos e lipídios ( $P_{\text{Carboidratos}}$  ou  $P_{\text{Lipídios}}$ ,  $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) nos cultivos foi calculada de acordo com a Equação  $PM = (P_f * f_m)$ , onde  $P_{\text{final}}$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) é a produtividade final de biomassa,  $f_{\text{macromolécula}}$  ( $\text{mg}_{\text{Carboidratos/Lipídios}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ) é a concentração de carboidratos ou lipídios na biomassa final.

### 2.5.2 Identificação e quantificação de ácidos graxos

Os lipídios totais extraídos da biomassa microalgal (item 2.5.1) foram esterificados à metil ésteres de ácidos graxos por saponificação (2%  $\text{m v}^{-1}$  de NaOH em metanol P.A (99,8%)) e metilados (catalisador trifluoreto de boro-dietil-eterato ( $\text{BF}_3 - 12\% \text{ v v}^{-1}$  em metanol)). A separação e quantificação dos ésteres metílicos foi realizada em cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP ( $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm}$ ), com temperaturas do injetor e detector de  $250^\circ\text{C}$  e  $280^\circ\text{C}$ , respectivamente. O hélio foi usado como o gás de arraste uma taxa de fluxo de  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ . Para identificação dos ácidos graxos, os tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras foram comparados com os de padrões autênticos (C4-C24, 18, 919-AMP; Sigma-Aldrich®, EUA). As áreas dos picos foram determinadas usando software de estação de trabalho de cromatografia Clarus® para normalizar a concentração (%  $\text{m m}^{-1}$ ) total de ácidos graxos (NASCIMENTO et al., 2013).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

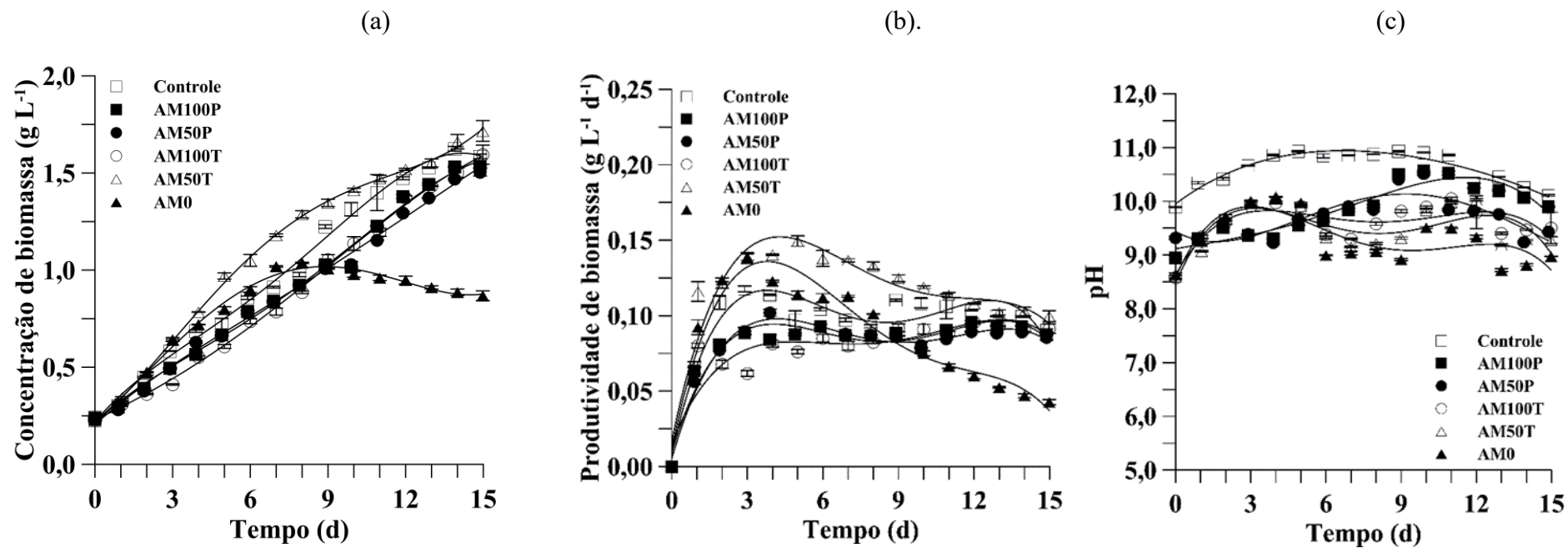
#### 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS, pH E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES NOS MEIOS CULTIVOS DE *Chlorella Fusca* LEB 111

A composição nutricional dos meios elaborados com água do mar suplementada com 100% e 50% das concentrações parciais (AM100P e AM50P) e totais (AM100T e AM50T) dos componentes do meio de cultivo BG11, permitiu o crescimento de *C. fusca* LEB 111 até o 15º d de cultivo reforçando assim o potencial da utilização da água do mar como fonte de água e nutrientes para o cultivo desta cepa de água doce (Figura 2a; Tabela 1). *C. fusca* LEB 111 quando cultivada em AM100P, AM50P, AM50T, AM0 e em condição controle não apresentou fase de adaptação, enquanto os cultivos da cepa em AM100T apresentaram fase *lag* de apenas 1 d. Quanto a fase exponencial de crescimento, essa ocorreu entre 0 e 4º d nos ensaios controle, AM100P e AM50P e AM0, entre 1º e 6º d para o cultivo AM100T e entre 0 e 5º d para o ensaio AM50T (Figura 2a; Tabela 1).

O cultivo de *C. fusca* LEB 111 realizado somente com água do mar (AM0) apresentou crescimento até o 8º d (Figura 2a, Tabela 1), demonstrando assim o potencial desta água como fonte de nutrientes para este micro-organismo. Contudo, ficou evidente a necessidade do fornecimento adicional de nutrientes essenciais (N e P) para a manutenção do crescimento da microalga. Sob esta perspectiva, Jung et al. (2015) adicionaram diferentes volumes de água do mar (10, 20 e 30% v v<sup>-1</sup>) ao meio BG11 (elaborado com água doce) resultando em ensaios com diferentes concentrações das fontes de MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (S0: BG11 sem MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; S1: 10%, S2: 20% e S3: 30% desses nutrientes). Os autores reportaram que os meios de cultivos elaborados com água do mar, sob estas condições, foram suficientes para manter o crescimento de *Scenedesmus obliquus* UTEX 393, podendo substituir suficientemente as fontes desses nutrientes do meio BG11.

No cultivo de *C. fusca* LEB 111 realizado em água do mar com adição de 50% de todos os nutrientes do meio BG11 (AM50T) foram verificados os maiores resultados ( $p < 0,05$ ) de  $X_{\text{máx}}$  (1,72 g L<sup>-1</sup>),  $P_{\text{máx}}$  (149,4 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e  $P_{\text{final}}$  (100 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), sendo estes valores ~6,2, 26,9 e 10,8% superiores aos verificados no ensaio controle (Tabela 1). Resultados similares foram observados por Luangpipat e Chisti (2017) em cultivo de *Chlorella vulgaris* ( $P_{\text{final}}$  = 111 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) em água do mar artificial (40 g L<sup>-1</sup>) com adição de 100% dos nutrientes do meio BG11. Isso sugere que a cepa de *Chlorella* utilizada, mesmo sendo isolada

**Figura 2-** Perfil de crescimento (X) (a), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) (b) e pH (c) dos cultivos de *C. fusca* LEB 111 em função do tempo.



**Tabela 1-** Resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ), produtividade máxima ( $P_{\text{máx}}$ ) e final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0

| Parâmetros                                               | Controle                                  | AM 100P <sup>1</sup>                      | AM 50P <sup>2</sup>                       | AM 100T <sup>3</sup>                      | AM 50T <sup>4</sup>                       | AM 0 <sup>5</sup>                         |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                    | 1,62 <sup>b</sup> ± 0,01 <sup>(14d)</sup> | 1,54 <sup>c</sup> ± 0,01 <sup>(14d)</sup> | 1,50 <sup>c</sup> ± 0,02 <sup>(15d)</sup> | 1,59 <sup>b</sup> ± 0,05 <sup>(15d)</sup> | 1,72 <sup>a</sup> ± 0,05 <sup>(15d)</sup> | 1,04 <sup>d</sup> ± <0,01 <sup>(8d)</sup> |
| $P_{\text{máx}}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )   | 117,7 <sup>c</sup> ± 1,94                 | 95,8 <sup>c</sup> ± 0,94                  | 102,0 <sup>d</sup> ± 2,37                 | 95,5 <sup>e</sup> ± 0,35                  | 149,4 <sup>a</sup> ± 3,56                 | 138,1 <sup>b</sup> ± 3,73                 |
| $P_{\text{final}}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 90,2 <sup>bc</sup> ± <0,01                | 87,1 <sup>cd</sup> ± <0,01                | 85,6 <sup>d</sup> ± <0,01                 | 91,3 <sup>b</sup> ± 0,03                  | 100,0 <sup>a</sup> ± <0,01                | 42,7 <sup>e</sup> ± <0,01                 |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                    | 0,28 <sup>c</sup> ± <0,01                 | 0,23 <sup>c</sup> ± <0,01                 | 0,26 <sup>d</sup> ± 0,01                  | 0,18 <sup>f</sup> ± <0,01                 | 0,29 <sup>b</sup> ± <0,01                 | 0,30 <sup>a</sup> ± <0,01                 |
| $R^2$ *                                                  | 0,981 ± 0,005                             | 0,986 ± 0,004                             | 0,999 ± <0,001                            | 0,986 ± 0,002                             | 0,981 ± 0,001                             | 0,970 ± 0,003                             |
| $\Delta t$ (d)**                                         | 0-4                                       | 0-4                                       | 0-4                                       | 1-6                                       | 0-5                                       | 0-4                                       |
| $t_g$ (d)                                                | 2,48 <sup>d</sup> ± 0,03                  | 3,03 <sup>b</sup> ± 0,06                  | 2,66 <sup>c</sup> ± 0,07                  | 3,91 <sup>a</sup> ± 0,05                  | 2,38 <sup>e</sup> ± 0,02                  | 2,32 <sup>e</sup> ± 0,02                  |

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ );

\*Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento no perfil  $\ln X$  versus  $t$ ; \*\* $\Delta t$ : início-fim da fase exponencial de crescimento. <sup>1-4</sup>

AM100P, AM50P: AM com 50% (AM50P) e 100% (AM100P) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), EDTA dissódico e ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) presentes no meio de cultivo BG11; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11; <sup>5</sup>- AM0: Água do mar sem adição de nutrientes. (d) tempo em que foi obtida a máxima concentração celular.

de água doce foi capaz de crescer em água do mar, assim como a cepa de *Chlorella fusca* LEB 111 utilizada no presente estudo. Dessa forma, fica evidente a vantagem da estratégia proposta no presente estudo em reduzir a demanda de nutrientes do meio BG11 em 50% e produzir biomassa em concentrações similares a de sistemas de cultivo que demandam maiores aportes nutricionais.

Os demais ensaios AM100P e AM50P apresentaram resultados de crescimento abaixo da condição AM50T ( $p < 0,05$ ) porém, próximos ao ensaio controle (Tabela 1). Isso pode ser verificado pelos valores de  $X_{\text{máx}}$  do ensaio AM50P,  $\sim 7,4\%$  inferior ao controle e  $P_{\text{máx}}$  dos ensaios AM100P e AM100T,  $\sim 18,9\%$  inferiores ao controle. Contudo, cabe ressaltar que o ensaio AM100T apresentou menor ( $p < 0,05$ ) velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ :  $0,18 \text{ d}^{-1}$ ),  $\sim 35,7\%$  inferior ao controle (Figura 2a-b; Tabela 1). Este resultado pode estar associado a elevada salinidade do meio atribuída a combinação de todos os componentes do meio BG-11 e sais (principalmente NaCl), naturalmente presentes na água do mar. Luangpipat e Chisti (2017) observaram esta problemática quando cultivaram *Scenedesmus* sp. em água do mar artificial ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) com adição de 100% dos nutrientes do meio BG11. Esta condição limitou o crescimento da microalga e causou redução da produtividade da biomassa em até 39% ( $0,086 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), quando comparado ao cultivo realizado em água doce. Os autores atribuem o comprometimento do crescimento ao estresse osmótico salino.

Os ensaios realizados em água do mar (AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0) apresentaram valores de pH na faixa de 8,6-10,5, sendo estes próximos ao ensaio controle (9,9-10,9) (Figura 2c). Segundo Duarte et al. (2017), *C. fusca* LEB 111 apresentou crescimento favorável em pH acima de 9,0, pois esta cepa foi isolada em lagoa de sedimentação de cinzas de uma usina termoeletrica (pH acima de 9,0). Os autores afirmam que as condições do local onde a cepa foi isolada podem contribuir para a adaptação desta microalga a ambientes alcalinos, diferente de outras espécies de *Chlorella* que apresentam pH ideal próximo da neutralidade (pH  $\sim 7,0$  a  $8,0$ ). Assim, os resultados de pH do presente estudo mostram-se ideais para o metabolismo da microalga.

O ensaio controle, por apresentar menor concentração de sais, apresentou maior eficiência de remoção para todos os nutrientes avaliados (Figura 3). Por outro lado, quando cultivada em água do mar, *C. fusca* LEB 111 mostrou maior eficiência na remoção de Ca ( $>60\%$ ) e  $\text{NO}_3^-$  ( $>40\%$ ) nos ensaios AM100P, AM50P, AM50T e AM0. Além disso, independente da concentração de fósforo (P) adicionada aos ensaios AM100P, AM50P, AM100T e AM50T, a eficiência de remoção de P por *C. fusca* LEB 111 foi superior a 96% (Figura 3). Chu et al. (2013) reportaram que espécies de *Chlorella*, como *C. vulgaris*, podem

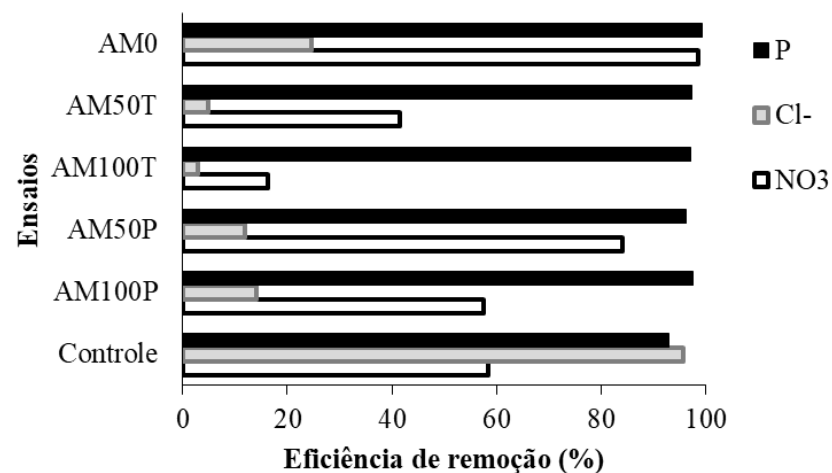
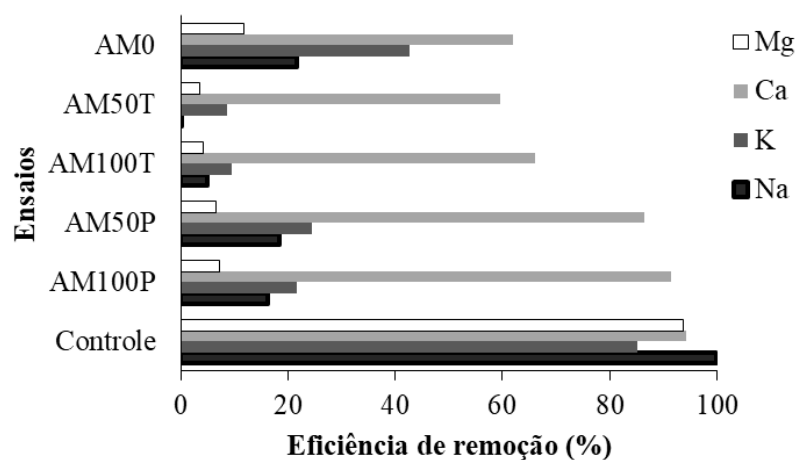
acumular fósforo (na forma de polifosfato) e garantir seu metabolismo energético por longo prazo.

Luangpipat e Chisti (2017) avaliaram a remoção de fosfato e nitrato por *C. vulgaris* cultivada em água do mar com adição de 100% de todos os componentes do meio BG11. Os autores atribuíram o elevado consumo da fonte de fósforo a capacidade desta microalga acumular fosfato no meio intracelular e sugerem que o uso de água do mar pode reduzir substancialmente a demanda para fosfato na produção de biomassa de *C. vulgaris*. Além disso, reportaram que a concentração de nitrato do meio excedeu a necessidade metabólica da microalga para este nutriente, ao passo que a quantidade de nitrato inicial foi semelhante a observada no final do cultivo, não evidenciando assim consumo deste componente. Assim, os autores supõem que a concentração deste nutriente pode ser reduzida em formulações de BG11 com água do mar sem comprometer a produção de biomassa. Embora estudos suponham que o uso da água do mar no cultivo de microalgas pode alterar sua capacidade de remoção de nutrientes, são identificadas lacunas quanto a estudos que reportem as reações metabólicas específicas associadas a eficiência de remoção de nutrientes por microalgas em ambiente marinho (BOROWITZKA; LUANGPIPAT; CHISTI, 2017; MOHEIMANI, 2013; PAL et al., 2011; PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017; ZHAI et al., 2020).

Church et al. (2017) avaliaram o efeito da concentração de NaCl (0-45 g L<sup>-1</sup>) na capacidade de remoção de fósforo e nitrogênio pela microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio Basal Bold (BBM). Os autores verificaram que o NaCl (15-45 g L<sup>-1</sup>) podem atuar no cotransporte de P, aumentando a eficiência de remoção (>50%) deste nutriente pelas células da microalga. Além disso, a partir desta mesma faixa de concentração de NaCl, esta microalga foi capaz de reduzir em até 22% a concentração de NH<sub>4</sub>Cl do meio de cultivo. Porém, os autores ressaltaram que o aumento gradual da concentração de NaCl do meio foi capaz de promover redução da velocidade de remoção das fontes de P e N. Assim, é possível que a alteração das concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> seja um fator importante para remoção de nutrientes por microalgas.

É importante ressaltar a vantagem adicional da remoção de nutrientes por *C. fusca* LEB 111 do ensaio realizados em água do mar, pois, no momento em que os nutrientes são consumidos pelo micro-organismo, a salinidade do meio é reduzida e simultaneamente biomassa de alto valor agregado pode ser produzida. Isso é vantajoso em termos de redução dos custos dos nutrientes e utilização de água como alternativa hídrica durante o cultivo em comparação aos sistemas convencionais que utilizam água doce e adição total dos

**Figura 3-** Eficiência de remoção de nutrientes por *C. fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0. AM100P, AM50P: com 50% (AM50P) e 100% (AM100P) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), EDTA dissódico e ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) presentes no meio de cultivo BG11; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11; AM0: Água do mar sem adição de nutrientes



componentes químicos do meio BG11.

### 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA

O conteúdo de proteínas na biomassa de *C. fusca* LEB 111 foi estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) em todos os ensaios cultivados em água do mar (AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0), sendo mais acentuada a redução no ensaio AM0, que foi aproximadamente 3,2 vezes menor quando comparado com condição controle ( $48,6\% \text{ m m}^{-1}$ ) (Figura 4a). Essa alteração do conteúdo de proteínas pode estar associada a elevada concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos cultivos realizados com água do mar, quando comparado a condição controle. Alyabyev et al. (2007) reportaram que o estresse osmótico afeta o metabolismo de *Chlorella vulgaris*, devido a toxicidade dos íons  $\text{Na}^+$  que podem degradar enzimas e ácidos nucleicos. A célula gasta ATP constantemente para transportar os íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular através da bomba de prótons. Provavelmente essa utilização constante de ATP leva a célula da microalga a acumular carboidratos e lipídios em detrimento do conteúdo proteico como forma de adaptação ao meio com elevada salinidade. Kim et al. (2016) avaliaram o efeito da salinidade ( $\text{NaCl}$ : 0-60  $\text{g L}^{-1}$ ) em *Chlorella sorokiniana* HS1 e verificaram redução do teor de proteínas ( $\sim 60\%$ ; 30  $\text{g L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ ) na biomassa. Os autores atribuíram as alterações na composição da biomassa devido ao estresse osmótico e iônico causados pelo excesso de  $\text{NaCl}$  no meio extracelular.

Outro fator que pode ter contribuído para o comprometimento da síntese proteica nos ensaios AM0 e AM50P conduzidos no presente estudo foi a limitação e/ou redução das concentrações de nutrientes como N disponíveis do meio de cultivo. Miller et al. (2010) observaram que a privação de N em cultivos de clorófitas promoveu redução na transcrição de proteínas (50-30%) que codificavam ribossomos nos cloroplastos das microalgas.

Os maiores conteúdos lipídicos na biomassa de *C. fusca* LEB 111 foram verificados nos ensaios AM100P ( $20,8\% \text{ m m}^{-1}$ ), AM50P ( $17,6\% \text{ m m}^{-1}$ ) e AM50T ( $16,3\% \text{ m m}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), sendo observado incremento de 48%, 25% e 16%, respectivamente, em comparação a condição controle ( $14,1\% \text{ m m}^{-1}$ ) (Figura 4a). As alterações do conteúdo de macromoléculas na biomassa podem estar associadas à elevada concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  do meio, quando comparado a condição controle. De acordo com Church et al. (2017), quando esses íons estão em excesso no meio extracelular, podem promover estresse nas



células microalgais, que na tentativa de manter o equilíbrio osmótico, sintetizam osmorreguladores, como lipídios e/ou carboidratos.

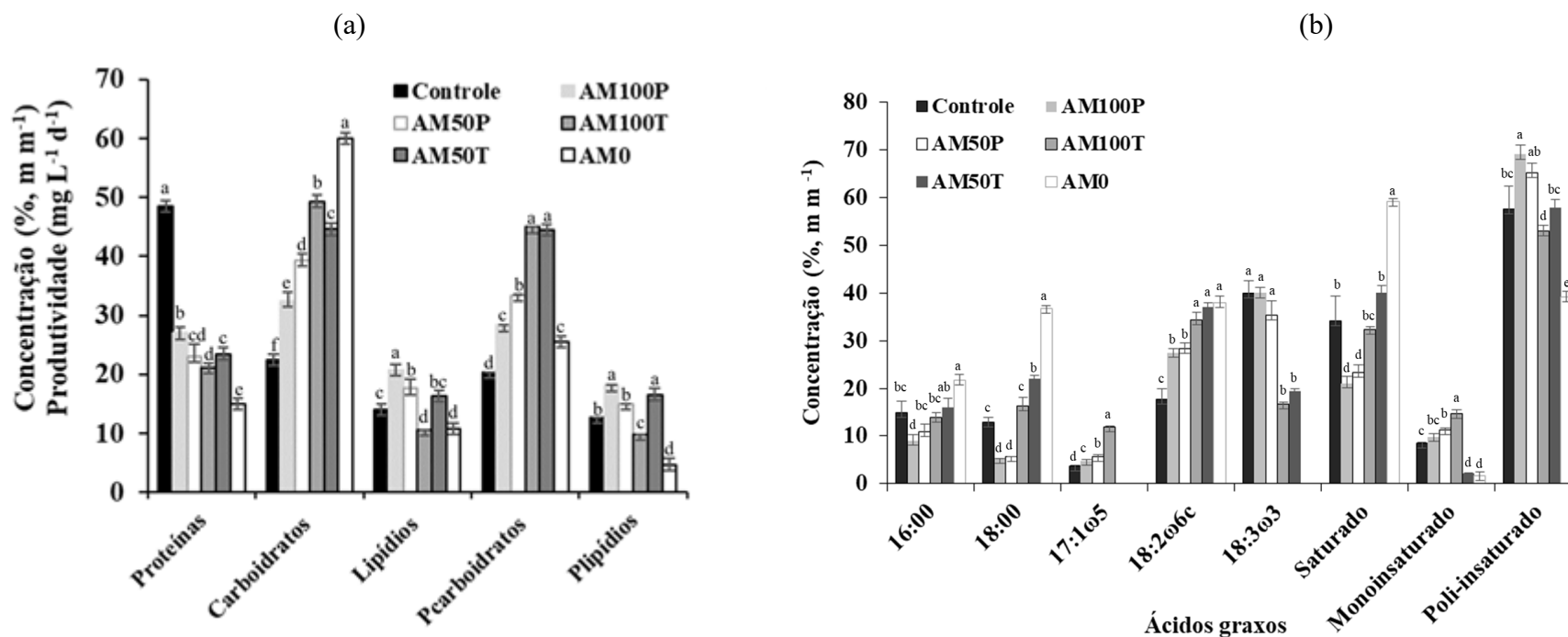
Otaki et al. (2019) verificaram redução do teor proteínas em 42% e incremento de lipídios em até 273% na biomassa de *Chlorella kessleri* quando cultivada sob estresse salino (NaCl: 0,15 M) associado a redução de 99,75% das fontes de N ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>), Ca (CaCl<sub>2</sub>), Mg (MgSO<sub>4</sub>), K (KNO<sub>3</sub>) e P (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) do meio Gamborg B5 (GB5). Os autores relatam que o comprometimento da síntese proteica pode ser justificado pela degradação dos complexos PSI e/ou PSII, principais proteínas da membrana tilacóide da microalga. Além disso, neste estudo também foi verificada alteração dos genes *accA* e *KASII*, os quais codificam a subunidade de acetil-CoA carboxilase (ACCase) (enzima essencial na síntese de ácidos graxos) e  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase (subunidade de um complexo de proteína de síntese de ácidos graxos), respectivamente. Assim, o efeito sinérgico destes dois fatores pode ter induzido o acúmulo lipídico na biomassa de *Chlorella kessleri*.

Os maiores valores de produtividade de lipídios ( $p < 0,05$ ) foram verificados nos ensaios AM100P (18,2 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), AM50P (15,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e AM50T (16,6 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), sendo estes 43,6; 19,0 e 31,1% superiores a condição controle (12,7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Figura 4a). De acordo com Chu et al. (2013), esse é um importante parâmetro a ser avaliado, pois demonstra a viabilidade da utilização de biomassa microalgal como matriz biológica na produção de biodiesel. Luangpipat e Chisti (2017) obtiveram melhor resultado de produtividade lipídica no cultivo de *C. vulgaris* em água do mar artificial (40 g L<sup>-1</sup>) de 37,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, aproximadamente o dobro da obtida do ensaio controle em água doce. Nesse contexto, o presente estudo destaca o diferencial da condição AM50T por conferir simultânea produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$  100 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e de lipídios (16,60 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Tabela 1; Figura 4a).

Com relação ao perfil de ácidos graxos na biomassa de *C. fusca* LEB 111 foi possível observar maior incremento (73,7 e 17,6%) do conteúdo de ácidos graxos saturados nos ensaios AM0 (59,2% m m<sup>-1</sup>) e AM50T (40,1% m m<sup>-1</sup>), principalmente do ácido esteárico (C18:0) e ácido palmítico (C16:0), quando comparados aos demais tratamentos (Figura 4b). As concentrações totais de ácidos graxos insaturados foram superiores nos ensaios AM100P (69,0% m m<sup>-1</sup>), AM50P (65,3% m m<sup>-1</sup>) e AM50T (57,1% m m<sup>-1</sup>), decorrente principalmente do conteúdo dos ácidos linoleico (18:2 $\omega$ 6c) e  $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ 3), sendo estes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) superiores aos verificados nos demais ensaios (Figura 4b).

Kim et al. (2016) observaram que o conteúdo de ácidos graxos na biomassa de *Chlorella sorokiniana* HS1 pode ser alterado pela variação da concentração de NaCl

**Figura 4-** Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios (em base seca) (%  $m^{-1}$ ), produtividade de carboidratos e lipídios ( $mg L^{-1} d^{-1}$ ) (a) Perfil de ácidos graxos (%  $m^{-1}$ ) (b) da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0. AM100P, AM50P: com 50% (AM50P) e 100% (AM100P) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $NaNO_3$ ), fósforo ( $K_2HPO_4$ ), ferro ( $C_6H_5FeO_7 \cdot H_2O$ ), EDTA dissódico e ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) presentes no meio de cultivo BG11; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11; AM0: Água do mar sem adição de nutrientes. 16:0 (Ácido palmítico); 18:0 (Ácido esteárico); 17:1  $\omega$ 5 (Ácido heptadecanóico); 18:2 $\omega$ 6c (ácidos linoleico); 18:3 $\omega$ 3( $\alpha$ -linolênico)



(0-60 g L<sup>-1</sup>) presentes na água do mar artificial. Os autores observaram diminuição dos níveis de linoleatos e atribuíram esse resultado à condição de estresse salino. No presente estudo, a limitação de N dos ensaios AM0 e AM50P também pode ter contribuído para modificações do conteúdo dos ácidos graxos na biomassa da microalga. Guarnieri et al. (2011) relataram alteração do perfil lipídico quando limitaram N no cultivo de *Chlorella vulgaris* UTEX 395. Os autores observaram incremento no teor de ácido oleico (C18:1 $\omega$ 9) em até 9 vezes e redução de 4 vezes de  $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ 3). Assim, é possível atribuir às alterações no perfil de ácidos graxos na biomassa de *C. fusca* LEB 111 ao efeito sinérgico entre a elevada concentração de sais do meio, principalmente Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e ou redução da concentração das fontes de N.

De acordo com Ramos et al. (2009), para produção de biodiesel de boa qualidade é preciso que haja balanço entre as concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados (até 50:50). Os autores ressaltam que este equilíbrio é interessante pois, a estabilidade oxidativa deste combustível diminui com o aumento da concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Do mesmo modo, a propriedade de fluxo a frio é comprometida com o aumento da concentração de ácidos graxos saturados. Nesse sentido, o perfil de ácidos graxos da biomassa do ensaio AM50T mostrou-se promissor para produção de biodiesel. Essa estratégia de cultivo pode favorecer a produção deste biocombustível uma vez que apresentou incremento da produtividade lipídica em até 31,1%, quando comparado ao cultivo em água doce e adição de todos os nutrientes do meio BG11. Além disso, utiliza água do mar como alternativa hídrica, importante incentivo devido a problemática de escassez global de água doce.

Os maiores teores de carboidratos em *C. fusca* LEB 111 foram verificados nos ensaios realizados em água do mar com e sem adição de nutrientes, com destaque para o AM0 (60% m m<sup>-1</sup>) ( $p < 0,05$ ), o qual apresentou incremento de 167% quando comparado com a condição controle (Figura 4a). O ensaio AM0, por apresentar redução da produtividade de biomassa (8º d de cultivo), não resultou na melhor estratégia de cultivo de *C. fusca* LEB 111 para obtenção de carboidratos. Contudo, a condição AM50T mostrou-se como importante estratégia de cultivo para este fim, pois não só apresentou elevado conteúdo de carboidratos (44,6 % m m<sup>-1</sup>), como também elevado valor de produtividade dessa macromolécula (44,47 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), resultado este superior ( $p < 0,05$ ) aos verificados no ensaio controle, AM50P, AM100P e AM0 (Figura 4b). Neste sentido, a condição AM50T pode ser empregada visando à obtenção de biomassa com elevado teor e produtividade de carboidratos, com redução da

concentração de nutrientes em cultivos de espécies de *C. fusca*, essa favorável para a produção de bioetanol.

Cabe ressaltar que há poucos relatos na literatura que reportem o cultivo de espécies *Chlorella* em água do mar com potencial para o acúmulo de carboidratos na sua biomassa. Estudos similares com cepas de *Chlorella kessleri* (OTAKI et al., 2019), *Chlorella sorokiniana* (CHEN et al., 2013), *Chlorella pyrenoidosa* (HE et al., 2015), *Chlorella vulgaris* (LUANGPIPAT; CHISTI, 2017; MATHIMANI et al., 2018) se destacaram por apresentar potencial no acúmulo de lipídios em resposta ao estresse salino.

No presente estudo, o acúmulo de carboidratos pode estar associado à elevada concentração de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e/ou redução/privação das fontes de N e P no meio extracelular. Otaki et al. (2019) avaliaram o efeito sinérgico da concentração de NaCl (0,15 M) combinado a redução de 99,75% das fontes de N ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), Ca ( $\text{CaCl}_2$ ), Mg ( $\text{MgSO}_4$ ), K ( $\text{KNO}_3$ ) e P ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) do meio Gamborg B5 (GB5) em cultivos de *Chlorella kessleri*. Os autores observaram o efeito de interação destas variáveis no incremento de carboidratos na forma de amido em até 175%, acúmulo de triacilgliceróis e alteração genética nas células. Os genes alterados foram *APL*, responsável por codificar a subunidade de ADP-glucose pirofosforilase (enzima essencial na síntese de amido), e gene *AMY* que codifica  $\alpha$ -amilase (enzima envolvida na degradação de amido).

Assim, é possível que no presente estudo, a elevada concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , associado as limitações de nutrientes como nitrogênio e fósforo, comparado o meio convencional, tenham influenciado sinergicamente na redução do conteúdo proteico e desvio metabólico para a síntese e incremento conjunto de carboidratos e lipídios (Figura 4a). Em análise conjunta de todos parâmetros, a condição AM50T apresenta-se como alternativa de sistema de cultivo de *C. fusca* LEB 111, uma vez que nesta condição a microalga foi capaz de crescer em água do mar com adição de apenas 50% de todos nutrientes do meio BG11 e induzir incremento simultâneo de biomassa, lipídios e carboidratos interessantes para produção de biocombustíveis.

## 4 CONCLUSÃO

A utilização água do mar com adição de 50% das concentrações de todos os nutrientes do meio de cultivo BG11 (AM50T) resultou em elevadas produtividades de biomassa ( $P_{\text{max}}$ : 149,4 mg  $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), de lipídios (16,60 mg  $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e de carboidratos (44,47 mg

L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) por *Chlorella fusca* LEB 111. Além disso, foram verificadas reduções nas concentrações de Ca (~60%), P (97,3%) e NO<sub>3</sub> (41,5%) do meio de cultivo pela microalga e produção de biomassa com teores de ácidos graxos saturados (40,1%, m m<sup>-1</sup>) e poli-insaturados (57,9%, m m<sup>-1</sup>) favoráveis à produção de biodiesel. Portanto, foi possível estabelecer uma estratégia de cultivo com potencial de produção de biomassa, lipídios e carboidratos como alternativa às matrizes energéticas convencionais na obtenção de biocombustíveis e aos sistemas de cultivo que demandam água doce e elevada demanda nutricional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFAN, M. A.; LEE, D-W.; JEON, S-M.; NOH, J-H.; HEO, S-J.; OH, C.; PARK, H-S.; KHOMAYIS, H. S. A.; KANG, D-H. Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina (Arthrospira) maxima* growth with decreased production costs. **Aquaculture**, v. 436, p. 121-126, 2015.
- ALYABYEV, A. J.; LOSEVA, N. L.; GORDON, L. K.; ANDREYEVA, I. N.; RACHIMOVA, G. G.; TRIBUNSKIY, V. I.; PONOMAREVA, A. A.; KEMP, R. B. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, v. 258, p. 65-70, 2007.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> edition, AOAC International, 2000.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>th</sup> edition. Washington: APHA, 2005. Am. Water Work. Assoc. Public Work. Assoc. Environ. Fed. 552.
- BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 13-25, 2013.
- BRAGA, V. DA S. et al. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 277, p. 55-61, 2019.
- CHEN, C-Y.; CHANG, J-S.; CHANG, H-Y.; CHEN, T-Y.; WU, J-H.; LEE, W-L. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 74-81, 2013.
- CHU, F-F.; CHU, P-N.; CAI, P-J.; LI, W-W.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.
- CHURCH, HWANG, J-H.; KIM, K-T.; MCLEAN, R.; OH, Y-K.; NAM, B.; JOO, J. C.; LEE, W. H. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella*

*vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 147-153, 2017.

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

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Use of static magnetic fields to increase CO<sub>2</sub> biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 103-109, 2019.

DUARTE, J. H.; CARDOSO, L. G.; SOUZA, C. O.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Brackish Groundwater from Brazilian Backlands in *Spirulina* Cultures: Potential of Carbohydrate and Polyunsaturated Fatty Acid Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, p. 907-917, 2020.

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

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

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

FAUCHER, O.; COUPAL, B.; LEDUY, A. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 752-759, 1979.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GUARNIERI, M. T.; NAG, A.; SMOLINSKI, S. L.; DARZINS, A.; SEIBERT, M.; PIENKOS, P. T. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an sequenced microalga. **Plos One**, v. 6, n. 25851, 2011.

HE, M.; LI, L.; LIU, J.; ZHANG, L. Improvement of H<sub>2</sub> photoproduction in *Chlorella pyrenoidosa* in artificial and natural seawater by addition of acetic acid and control of nutrients. **Algal Research**, v. 10, p. 104-109, 2015.

JUNG, J-Y.; LEE, H.; SHIN, W-S.; SUNG, M-G.; KWON, J-H.; YANG, J-W. Utilization of seawater for cost-effective cultivation and harvesting of *Scenedesmus obliquus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 449-455, 2015.

KIM, B-H.; RAMANAN, R.; KANG, Z.; CHO, D-H.; OH, H-M.; KIM, H-S. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid

droplets in seawater salinity. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 300-305, 2016.

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

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

LUANGPIPAT, T.; CHISTI, Y. Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae – effects of salinity and other factors. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 47-57, 2017.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 575-586, 2018.

MILLER, R.; WU, G.; DESHPANDE, R. R.; VIELER, A.; GARTNER, K.; LI, X.; MOELLERING, E. R.; ZAUNER, S.; CORNISH, A. J.; LIU, B.; BULLARD, B.; SEARS, B. B.; KUO, M-H.; HEGG, E. L.; SHACHAR-HILL, Y.; SHIU, S-H.; BENNING, C. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1737-1752, 2010.

MORAES, L.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Bioprocess strategies for enhancing biomolecules productivity in *Chlorella fusca* LEB 111 using CO<sub>2</sub> a carbon source. **Biotechnology Progress**, v. 36, p. 1-9, 2020.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 1-13, 2013.

OTAKI, R.; OISHI, Y.; ABE, S.; FUJIWARA, S.; SATO, N. Regulatory carbon metabolism underlying seawater-based promotion of triacylglycerol accumulation in *Chlorella kessleri*. **Bioresource Technology**, v. 289, n. 121686, 2019.

PAL, D.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1429-1441, 2011.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 13437-13451, 2017.

PERALTA, E.; JEREZ, C. G.; FIGUEROA, F. L. Centrate grown *Chlorella fusca* (Chlorophyta): Potential for biomass production and centrate bioremediation. **Algal**

**Research**, v. 39, n. 101458, 2019.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B. The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 2, p. 83-86, 1979.

ROMERO VILLEGAS, G. I.; FIAMENGO, M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Outdoor production of microalgae biomass at pilot-scale in seawater using centrate as the nutrient source. **Algal Research**, v. 25, p. 538-548, 2017.

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

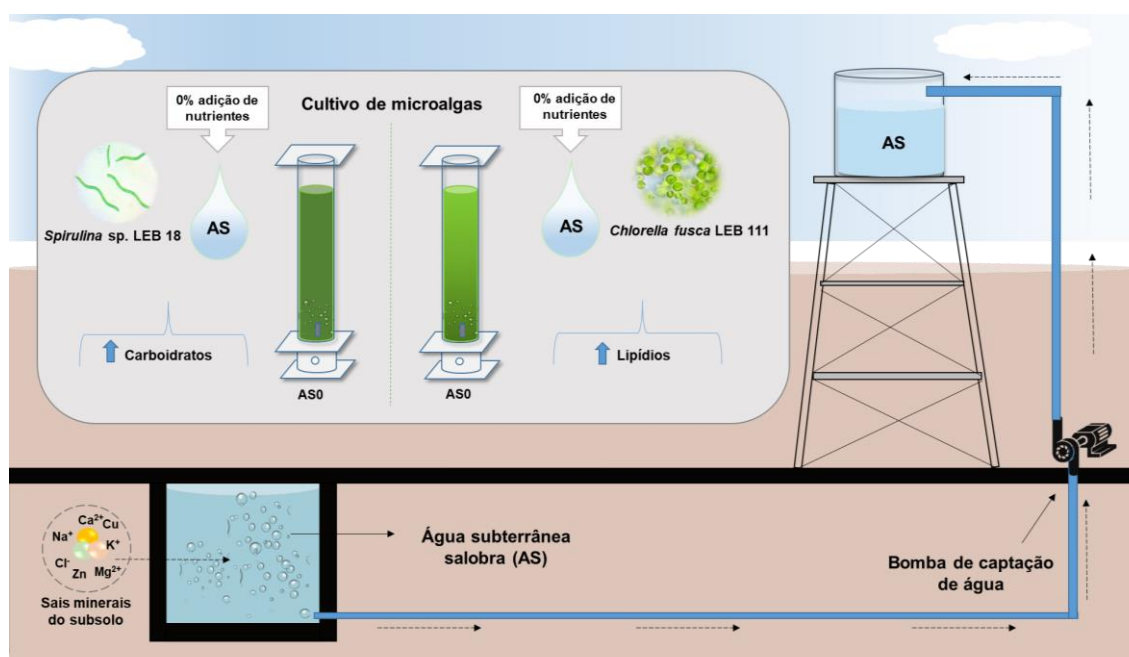
ZHAI X.; ZHU, C.; ZHANG, Y.; PANG, H.; KONG, F.; WANG, J.; CHI, Z. Seawater supplemented with bicarbonate for efficient marine microalgae production in floating photobioreactor on ocean: A case study of *Chlorella* sp. **Science of the Total Environment**, v. 738, n. 139439, 2020.



### ARTIGO III

## APLICAÇÃO INOVADORA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA SALOBRA, SEM ADIÇÃO DE NUTRIENTES, EM CULTURAS DE *Spirulina* E *Chlorella*: ALTERNATIVA DE BIOECONOMIA PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS

### Resumo gráfico





## RESUMO

A água subterrânea salobra (AS) possui limitação para o consumo humano e aplicação agrícola, contudo, apresenta composição química interessante para o cultivo de microalgas. O objetivo do estudo foi avaliar a utilização de AS, com e sem suplementação de nutrientes, no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e seu efeito no perfil de crescimento e produção de macromoléculas. A AS foi utilizada como meio de cultivo (AS0) e, a partir de ensaio de seleção, foi suplementada com 25% das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA dissódico/ácido cítrico dos meios Zarrouk/BG11. O cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e *C. fusca* LEB 111 em AS0 promoveu o crescimento ( $X_{\text{máx}} = 1,22^{(11^{\text{ºd}})} \text{ g L}^{-1}$  e  $0,92^{(9^{\text{ºd}})} \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e maiores resultados de teor ( $68,1\% \text{ m m}^{-1}$ ) e produtividade de carboidratos ( $35,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e elevado teor ( $56,45\% \text{ m m}^{-1}$ ) e produtividade de lipídios ( $13,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) em *C. fusca* LEB 111, quando comparados às condições controle. Portanto, a utilização de AS como meio de cultivo para *Spirulina* sp. e *Chlorella fusca* mostrou-se com uma alternativa inovadora na obtenção de biomassa rica em carboidratos/lipídios, interessantes para produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Água subterrânea. Biocombustível. Escassez de água. Macromoléculas. Microalgas.

## 1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de água doce vem configurando uma problemática de caráter mundial resultante das mudanças climáticas, elevado crescimento populacional e ação antrópica (UNESCO, 2020). O sertão brasileiro, conhecido como polígono da seca, é um dos locais mais afetado com a crise da escassez água. Esta região apresenta condições climáticas (secas recorrentes) e geográficas (domínio hidrogeodinâmico cristalino e meio aquífero fissural) favoráveis ao depósito subterrâneo de água salobra (IBGE, 2016).

A água subterrânea salobra (AS) possui elevada salinidade quando comparada a água doce ( $> 0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) (CONAMA, 2005; MATOS; MOECKE; SANT'ANNA, 2017). A origem de AS ocorre pelo contato prolongado entre água de precipitação atmosférica e rochas cristalinas, o qual a confere composição química em minerais inorgânicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ), nitrogênio, fósforo, e elementos traços ( $\text{Zn}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Cu}$ ) (DUARTE et al., 2020). Essa composição química pode variar em função da geologia, hidrologia e processos geoquímicos locais (MCMAHON et al., 2015).

A salinidade da água subterrânea salobra a torna imprópria para o consumo humano e para a utilização em sistemas agrícolas (CIRILO; MONTENEGRO; CAMPOS,

2010). Assim, para que possa ser utilizada, esta necessita ser dessalinizada, resultando em altos custos operacionais com a implantação e manutenção das plantas dessalinizadoras e elevado volume de resíduo gerado durante o processo (JONES et al., 2019). Nesse sentido, torna-se interessante encontrar alternativas mais viáveis e de menor custo para mitigar os efeitos do uso de água salobra subterrânea.

*Spirulina* e *Chlorella* estão entre as microalgas mais estudadas na produção de biocombustíveis (COSTA et al., 2019; THIRUGNANASAMBANTHAM et al., 2020) e tratamento de efluentes (COSTA et al., 2019; LIM et al., 2021). Este destaque é atribuído à elevada capacidade destes micro-organismos em biorremediar componentes tóxicos (SERRÀ et al., 2020), CO<sub>2</sub> atmosférico (>80%) (SERRÀ et al., 2020; YADAV et al. 2019) e gases de combustão (YADAV et al. 2019). Além disso, por apresentarem elevada produtividade de biomassa e capacidade de crescer em ambientes de elevada salinidade (6-20 g L<sup>-1</sup>) (DUARTE et al., 2020; SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019) e pH (9-10) (DUARTE et al., 2017; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016; VONSHAK, 1997). O acúmulo de carboidratos e lipídios na biomassa dessas microalgas caracteriza potencial de utilização como matriz energética na produção de etanol e biodiesel, como alternativa aos combustíveis fósseis (MORAIS JUNIOR et al., 2020).

Um grande desafio no cultivo de microalgas está na limitada produção de biomassa em escala comercial, uma vez que os custo do processo excedem os dos combustíveis e biocompostos produzidos de fontes vegetais (KHAN; SHIN; KIM, 2018; SERRÀ et al., 2020). Isso está relacionado principalmente a elevada demanda de nutrientes para o cultivo destes micro-organismos, o qual pode representar até 35% dos custos operacionais de produção (COSTA et al., 2019; HOFFMAN et al., 2017; LIM et al., 2021). Neste contexto, o emprego da AS, como alternativa hídrica e nutricional, pode contribuir para a redução dos custos da produção de biomassa de alto valor agregado (AUDU et al. 2018; DUARTE et al. 2020). Sob este propósito, Duarte et al. (2020) cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 em AS com diferentes quantidades de nutrientes do meio de cultivo Zarrouk. Os autores destacaram que o cultivo da cianobactéria em AS suplementada com 25% de todos os nutrientes do meio de cultivo resultou na produção de biomassa com concentração de carboidratos 4 vezes superior ao cultivo em meio padrão. Isso encoraja a realização de cultivos de microalgas utilizando a AS como único meio de nutrientes, tendo em vista sua composição em sais e outros compostos. Contudo, a maioria dos estudos cultivam microalgas utilizando água salobra artificial ou oriundas da diluição de águas salinas/hipersalinas em água doce (SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019; TOYOSHIMA et al. 2014),

que consequentemente destoam das particularidades físico-químicas das águas subterrâneas salobras.

Não há relatos sobre o uso de águas subterrâneas salobras do sertão brasileiro para o crescimento das culturas do gênero *Chlorella*, bem como há poucos estudos que reportem o cultivo de *Spirulina* nesta água. Os trabalhos nessa linha de pesquisa relatam cultivos de microalgas com o concentrado de dessalinização (CD), originado do processo de dessalinização de AS (MATA et al., 2020; MATOS et al., 2015; MATOS et al., 2015b). A partir desses estudos cepas de *Dunaliella*, *Nannochloropsis* (MATOS et al., 2015), *Spirulina* (MATA et al., 2020; VOLKMANN et al., 2008) e *Chlorella* (MATOS et al., 2014; MATOS et al., 2015b) se destacaram por apresentarem potencial no acúmulo de compostos de reserva como lipídios e carboidratos, em resposta ao estresse salino.

Mata et al. (2020) relataram que o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em CD de AS, com adição de 25% de todos os nutrientes do meio Zarrouk foi capaz de promover aumento do teor de carboidratos (52,29%) e lipídios (12,79%) em comparação com o ensaio controle (47,91 e 7,59, respectivamente). Os pesquisadores atribuem essa alteração da composição química na biomassa algal ao meio de cultivo salobro (salinidade total: 10,53 g L<sup>-1</sup>) rico em SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (452 mg L<sup>-1</sup>).

Diante deste panorama, é possível observar a carência de estudos que analisem a AS como substrato único e associada à suplementação reduzida de nutrientes, a fim de determinar a demanda nutricional ideal ao metabolismo de microalgas. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização de AS, com e sem suplementação de nutrientes, no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e seu efeito no perfil de crescimento e produção de macromoléculas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMOS E COLETA DA ÁGUA SUBTERRÂNEA SALOBRA (AS)

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) e *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE et al., 2016) pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os inóculos foram mantidos em meios de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966) e BG-11 (RIPPKA et al., 1979) a 30 °C, fotoperíodo 12 h: 12 h claro/escuro e intensidade luminosa de 44,8 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, sem suplementação de nutrientes e adionado de água destilada para compensar a evaporação. A água subterrânea salobra (AS) foi coletada na

comunidade de Mandassaia II, município de Riachão do Jacuípe, (11°54'25.8"S – 39°23'38.8"W) Bahia, Brasil. Após a coleta, a AS foi filtrada em membrana de acetado de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ ) (salinidade 5,5 g L<sup>-1</sup>; pH 8,40) e armazenada a -20 °C para posterior caracterização e utilização nos ensaios.

## 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

### 2.2.1 Ensaios de seleção

Para a realização dos ensaios com *Spirulina* sp. LEB 18, os meios de cultivo foram preparados com AS suplementada com 50% (AS50) e 25% (AS25) das concentrações das fontes de carbono (NaHCO<sub>3</sub>), nitrogênio (NaNO<sub>3</sub>), fósforo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e EDTA dissódico presentes no meio de cultivo Zarrouk. Ademais, foi realizado um ensaio somente com água subterrânea salobra sem adição de nutrientes (AS0) e um ensaio controle em meio de cultivo Zarrouk completo (Figura 1).

Os ensaios com *Chlorella fusca* LEB 111 foram realizados com meios de cultivo preparados com AS suplementadas com 50% (AS50) e 25% (AS25) das concentrações das fontes de carbono (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), nitrogênio (NaNO<sub>3</sub>), fósforo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), ferro (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O), EDTA dissódico e ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) presentes no meio de cultivo BG-11. Além disso, foi realizado um ensaio somente com AS, sem adição de nutrientes (AS0) e um ensaio controle em meio de cultivo BG11 completo (Figura 1). Cabe ressaltar que, todos os meios de cultivo elaborados com AS, para ambas as microalgas, não foram suplementados com os micronutrientes que compõem o meio de cultivo controle.

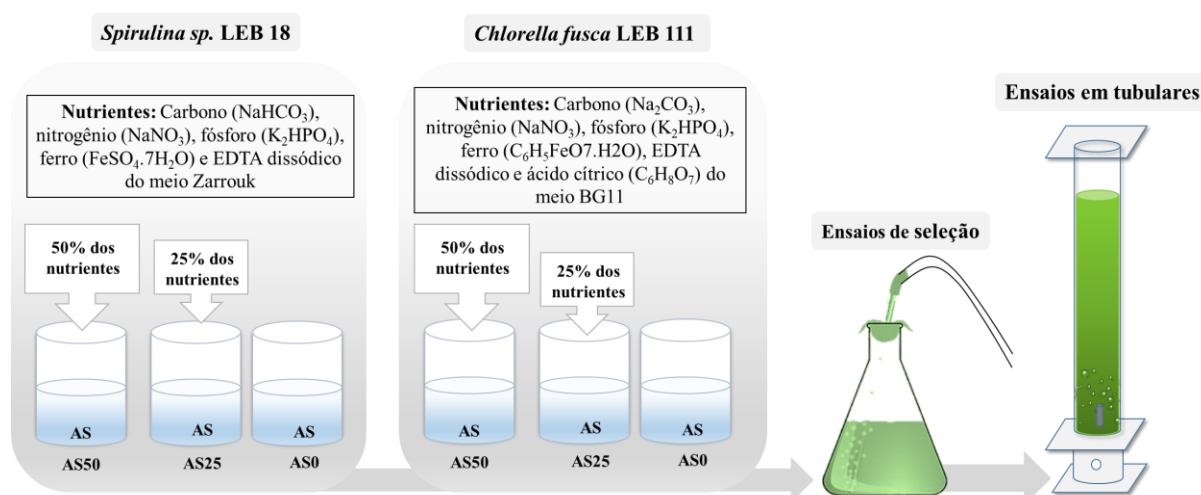
Os cultivos foram conduzidos em duplicata, modo descontínuo, em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* de 200 mL de volume útil, a 30 °C, iluminância de 44,8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12 h claro: 12 h escuro, por 7 d, com agitação promovida pela injeção de ar comprimido esterilizado por filtros contendo lã de vidro.

### 2.2.2 Ensaios em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv)

Para ambas as microalgas, os cultivos que apresentaram os melhores resultados de produtividade volumétrica de biomassa ( $P_x$ , g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foram conduzidos e FBRTv de 1,8 L (com volume útil de 1,5 L). Os cultivos foram realizados em duplicata (modo descontínuo), com agitação promovida pela injeção de ar comprimido por meio de aspensor do tipo pedra

porosa, com vazão específica de  $0,3 \text{ mL}_{\text{ar}} \text{ mL}_{\text{meio}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . A concentração inicial de biomassa utilizada foi  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  e ao longo dos 15 d os cultivos foram mantidos a  $30^\circ \text{C}$ , fotoperíodo 12 h: 12 h claro/ escuro e intensidade luminosa de  $44,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (MORAES et al. 2020).

**Figura 1**– Meios de cultivo elaborados com água subterrânea salobra (AS) para as culturas de *Spirulina sp.* LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111



## 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.3.1 Caracterização da água subterrânea salobra (AS)

A água subterrânea salobra (AS) caracterizada no laboratório LEPETRO, localizado no Instituto de Geociências (IGEO) na Universidade Federal da Bahia (UFBA, Brasil), onde foi avaliada de acordo com os métodos padrão (SM) para o exame de água e efluentes (APHA, 2005) quanto a concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sódio (Na; SM 3120B), potássio (K; SM 3120B), cálcio (Ca; SM 3120B) e magnésio (Mg; SM 3120B), ferro (Fe; SM 3120B) e fósforo (P; SM 4500 P). Além disso, foi avaliado a salinidade total ( $\text{g L}^{-1}$ ), condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ), alcalinidade total ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), alcalinidade de carbonatos ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), alcalinidade de bicarbonatos ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), dureza total ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) e sólidos totais dissolvidos ( $\text{g L}^{-1}$ ). A concentração de nitrogênio em forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foi determinada por cromatografia de troca iônica (APHA, 2005) e cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) pelo método de Mohr (APHA, 2005).

### 2.3.2 Concentração de biomassa, alcalinidade, pH e Carbono Inorgânico Dissolvido (CID)

A concentração de biomassa ( $X_b$ ) foi determinada diariamente por medida da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (Shimadzu UV/VIS UVMMini-1240, Japão), utilizando curva padrão de *Spirulina* sp. LEB 18 ( $X_b = 0,6207 \text{ abs} - 0,0198$ , com  $R^2 = 0,9938$ ) e *Chlorella fusca* LEB 111 ( $X_b = 0,3273 \text{ abs} - 0,0055$ , com  $R^2 = 0,9996$ ), relacionando a densidade óptica e o peso seco de biomassa (COSTA et al., 2002). A alcalinidade dos cultivos foi determinada a cada 72 h por titulação potenciométrica e o pH, a cada 24 h, em pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça). A concentração de CID foi calculada a partir dos valores de alcalinidade e pH seguindo as equações de equilíbrio (BRUNE; NOVAK, 1981; RUBIO et al., 1999) como demonstrado por Rosa et al. (2015).

### 2.4 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A partir dos valores de concentração de biomassa das microalgas em estudo, em cada condição experimental, foram obtidos os resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ , g L<sup>-1</sup>), produtividade volumétrica de biomassa ( $P_x$ , g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) e tempo de geração ( $t_g$ , d). A produtividade volumétrica de biomassa foi determinada de acordo com a Equação  $P_x = (X_t - X_0) / (t - t_0)$ , onde  $X_t$  é a concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>) no tempo  $t$  (d) e  $X_0$  é a concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>) no tempo  $t_0$  (d). A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) foi determinada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento em um perfil ( $\ln X$  vs  $t$ ), onde a inclinação da reta foi considerada o valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . O tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos foi calculado de acordo com Equação  $t_g = \ln(2) / \mu_{\text{máx}}$ .

### 2.5 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos cultivos a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *C. fusca* LEB 111 foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio, Japão) a 15,200 x g, 20°C por 10 min, ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada sob as mesmas condições. Esta etapa foi realizada por duas vezes para a retirada de sais remanescentes do meio de cultivo que pudessem estar aderidos as células. A biomassa microalgal concentrada foi



congelada (-80 °C), liofilizada (48 h) e armazenada (-20 °C) para posterior caracterização (ROSA et al., 2018).

### 2.5.1 Determinação de proteínas, carboidratos e lipídios

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método proposto por Lowry et al. (1951), a partir do pré-tratamento térmico e alcalino da biomassa microalgal. Os teores de carboidratos do extrato da biomassa e lipídios na biomassa foram determinados de acordo com os métodos propostos por Dubois et al. (1956) e Folch, Lees e Stanley (1957), respectivamente. O teor de umidade na biomassa foi determinado de acordo com a AOAC (2000).

A produtividade de carboidratos e lipídios ( $P_{\text{Carboidratos}}$  ou  $P_{\text{Lipídios}}$ ,  $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) nos cultivos foi calculada de acordo com a Equação  $PM = (P_f * f_m)$ , onde  $P_{\text{final}}$  ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) é a produtividade final de biomassa,  $f_{\text{macromolécula}}$  ( $\text{mg}_{\text{Carboidratos/Lipídios}} \text{mg}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ) é a concentração de carboidratos ou lipídios na biomassa final.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PERFIS DE CRESCIMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS, pH E CID NOS MEIOS CULTIVOS DE *Spirulina* sp. LEB 18 E *Chlorella fusca* LEB 111

A água subterrânea salobra (AS) possui em sua composição sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e nitrogênio (N), sendo estes importantes para o metabolismo de microalgas (Tabela 1). Composição diferente de AS foram observadas por Duarte et al. (2020) quando verificaram concentrações inferiores de Na ( $0,83 \text{ g L}^{-1}$ ), Mg ( $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) e N ( $0,04 \text{ g L}^{-1}$ ), contudo, foi identificado similar teor de salinidade total ( $5,49 \text{ g L}^{-1}$ ) e sólidos totais dissolvidos ( $4,67 \text{ g L}^{-1}$ ). No presente estudo, os resultados dos experimentos de seleção demonstraram o potencial da utilização desta água como meio de cultivo (AS0) para produção de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 em até 7 d (Figura 2). Além disso, a suplementação em 25% das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA

dissódico/ácido cítrico dos meios Zarrouk/BG11 tornou-se a estratégia de cultivo mais promissora, quando comparada a suplementação com 50% destes componentes nutricionais. Isso pode ser observado pelos resultados de  $P_{\text{final}}$ , tanto nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, quanto nos de *Chlorella fusca* LEB 111 (Figura 2).

**Tabela 1-** Composição e características físico-químicas da água subterrânea salobra (AS)

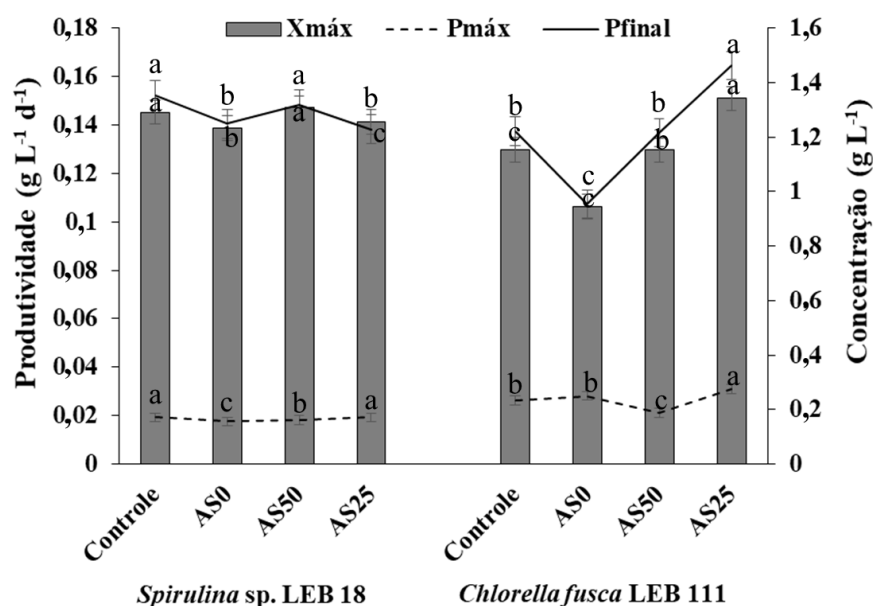
| Parâmetro                                                                         | AS     | LQ     | Método               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|----------------------|
| Sódio (Na) (g L <sup>-1</sup> )                                                   | 1,5    | < 0,25 | SM-3120B             |
| Potássio (K) (g L <sup>-1</sup> )                                                 | 0,01   | < 0,25 | SM-3120B             |
| Cálcio (Ca) (g L <sup>-1</sup> )                                                  | 0,004  | < 0,25 | SM-3120B             |
| Magnésio (Mg) (g L <sup>-1</sup> )                                                | 0,41   | < 0,25 | SM-3120B             |
| Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (g L <sup>-1</sup> )                      | 0,15   | < 0,25 | Cromatografia iônica |
| Cloretos (Cl <sup>-</sup> ) (g L <sup>-1</sup> )                                  | N.D    | < 1,00 |                      |
| Ferro (Fe) (g L <sup>-1</sup> )                                                   | < 0,01 | < 0,10 | SM-3120B             |
| Fósforo total (P) (g L <sup>-1</sup> )                                            | N.D    | < 0,10 | SM 4500 P            |
| Salinidade total (g L <sup>-1</sup> )                                             | 5,5    | < 0,10 | SM 2520 C            |
| Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )                                              | 9,83   | < 1    | SM 2510 A/B          |
| Alcalinidade HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | 630    | < 2    | SM 2320 A/B          |
| Alcalinidade CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | <LQ    | < 2    | SM 2320 A/B          |
| Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )                         | 630    | < 2    | SM 2320 A/B          |
| Dureza total (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )                               | 1962,7 | < 1    | SM 2340 A/B/C        |
| Sólidos totais dissolvidos (g L <sup>-1</sup> )                                   | 4,91   | < 1    | SM 2540 C            |
| pH                                                                                | 8,4    |        |                      |

LQ= Limite de Quantificação do método; SM= Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. Edition, 2005; ND= Não detectado

A água subterrânea salobra (AS0) foi capaz de promover o crescimento de *Spirulina* sp. LB 18 em até 11º d ( $X_{\text{máx}} = 1,22 \text{ g L}^{-1}$ ) e de *C. fusca* LEB 111 ( $X_{\text{máx}} = 0,92 \text{ g L}^{-1}$ ) em até 9º d de cultivo (Figura 3a e 4a; Tabela 2) em cultivos conduzidos em FBRTv. Isso sugere que, nesses intervalos de tempos, ambas as microalgas podem prosperar em AS sem a suplementação das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, ferro e EDTA dissódico/ácido cítrico dos meios Zarrouk/BG11. A redução do crescimento de ambas as microalgas pode estar associada a baixas concentrações de nutrientes como nitrogênio e/ou limitação de fósforo combinado a elevada concentração de íons Na<sup>+</sup>, quando comparado aos meios de cultivo padrão (Tabela 1). Ao cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 em concentrado de dessalinização com adição de 25% de todos os nutrientes do meio Zarrouk (salinidade total: 10,5 g L<sup>-1</sup>), Mata et al. (2020) observaram redução nos resultados de crescimento da microalga em apenas 9%, em comparação ao ensaio controle. Os autores destacaram que isso pode estar relacionada

com a alta concentração de sais encontrado no concentrado salino associado a 25% dos constituintes do meio de cultivo Zarrouk, resultando no estresse salino da microalga.

**Figura 2-** Concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ) e produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ) de *Spirulina* sp. LEB 18 (a) e *Chlorella fusca* LEB 111 (b) nos ensaios (teste) controle, AS50, AS25 e AS0. (a) - AS50 e AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 50% e 25% das concentrações das fontes de C, N, P, Fe e EDTA do meio Zarrouk. (b) - AS50 e AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 50% e 25% das concentrações das fontes de C, N, P, Fe, EDTA e ácido cítrico do meio BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes



O meio de cultivo Zarrouk comumente utilizado para o crescimento do gênero *Spirulina* (YUAN et al., 2018), quando comparado com AS apresenta concentração das fontes de N ( $\text{NaNO}_3$ ) ~12 vezes maior e de  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) e Mg ( $\text{MgSO}_4$ ) ~3,8, 7 e 20, vezes menor, respectivamente. Por outro lado, o meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979), usualmente utilizado no cultivo do gênero *Chlorella*, possui concentração das fontes de N ( $\text{NaNO}_3$ ) ~7,3 vezes maior e de  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaNO}_3$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) e Mg ( $\text{MgSO}_4$ ) ~3,7, 10 e 55, vezes menor, respectivamente. Além disso, o meio Zarrouk possui concentração total de sais de ~22,13  $\text{g L}^{-1}$  (ZARROUK, 1966), enquanto o meio BG11 possui salinidade total de ~1,7  $\text{g L}^{-1}$  (RIPPKA et al., 1979). Assim, a salinidade total da água subterrânea salobra (5,55  $\text{g L}^{-1}$ ) utilizada para o cultivo das cepas pode não ter resultado em um impacto negativo nas células microalgais adaptadas, o que explica a ausência de uma fase de adaptação das culturas quando cultivadas em água salobra sem e com suplementação de nutrientes (Figura 3a e 4a; Tabela 1 e 2).

A adição de 25% dos nutrientes na água subterrânea salobra (AS25) promoveu crescimento exponencial de *Spirulina* sp. LEB 18 em média de 3 d e crescimento linear até o 15º d (Figura 4a; Tabela 1). Comportamento semelhante foi observado nos cultivos de *C. fusca* LEB 111, apresentando 4 d de fase *log* e posterior crescimento linear até o 15º d (Figura 4a; Tabela 2). Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 na condição AS25 e controle apresentaram os maiores resultados ( $p < 0,05$ ) de  $X_{\text{máx}}$ ,  $P_{\text{máx}}$ , e  $P_{\text{final}}$ , além de maiores valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e menores  $t_g$  (Figura 3b; Tabela 2). O ensaio AS25 com *C. fusca* LEB 111 também resultou nas melhores respostas de crescimento da microalga, quando comparado a condição controle e AS0, apresentando  $X_{\text{máx}}$ , e  $P_{\text{final}}$  8,12 e 7,7% maiores que a condição controle (Figura 4b; Tabela 2). Resultados similares foram observados por Duarte et al (2020) quando cultivaram *Spirulina* sp. LEB 18 em água subterrânea salobra com adição de 25% de todos os componentes presentes no meio Zarrouk. Os autores verificaram resultados de  $X_{\text{máx}}$  ( $0,94 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $P_{\text{máx}}$  ( $0,12 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) similares a condição controle ( $1,07 \text{ g L}^{-1}$ ;  $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e reforçaram a significativa redução em 75% dos nutrientes.

Ressaltamos o diferencial do presente estudo com a suplementação parcial da AS, a fim de estimular a utilização nutrientes existentes naturalmente nesta água. Nessa perspectiva, ausentamos a adição das fontes de potássio, sódio, cloreto, magnésio e cálcio dos meios preparados com AS, contribuindo assim para menor requerimento de nutrientes na realização dos cultivos de ambas as microalgas.

Os perfis de pH para os ensaios realizados em água subterrânea salobra (AS25 e AS0) apresentaram valores na faixa de 9,1-10,7 para *Spirulina* sp. LEB 18 e 8,8-10,1 para *Chlorella fusca* LEB 111, sendo estes próximos aos ensaios controles (9-11 e 9,9-10,5, respectivamente) (Figura 3d e 4d). Isso evidencia pHs ideais aos processos metabólicos de cada microalga estudada. Cabe destacar que *C. fusca* LEB 111 apresenta crescimento favorável em pH alcalino (acima de 9,0). De acordo Duarte et al. (2017) isso pode ser justificado pela origem do seu isolamento partir de uma lagoa de sedimentação de cinzas de uma usina termoeletrica (pH acima de 9,0), o que a diferencia de outras cepas de *Chlorella* (crescimento favorável em pH próximo da neutralidade  $\sim 7,0$  a  $8,0$ ).

Com relação ao CID nas culturas de *Chlorella fusca* LEB 111, a água subterrânea salobra sem adição de nutrientes (AS0) apresentou maiores médias das concentrações de CID quando comparado a condição controle menores médias que AS25 (Figura 4c). Esta observação confirma esta água como fonte natural de carbono, o que a torna interessante ao metabolismo desta espécie de microalga. De acordo com Grobbelaar (2013), o bicarbonato é uma das formas preferidas de carbono absorvido por células microalgas. Nos cultivos

realizados com *Spirulina* sp. LEB 18, os ensaios AS0 e AS25 apresentaram as menores médias de CID, quando comparadas ao ensaio controle (Figura 3c). Isso já era esperado, uma vez que o meio de cultivo Zarrouk apresenta elevada concentração de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) em sua composição.

### 3.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA

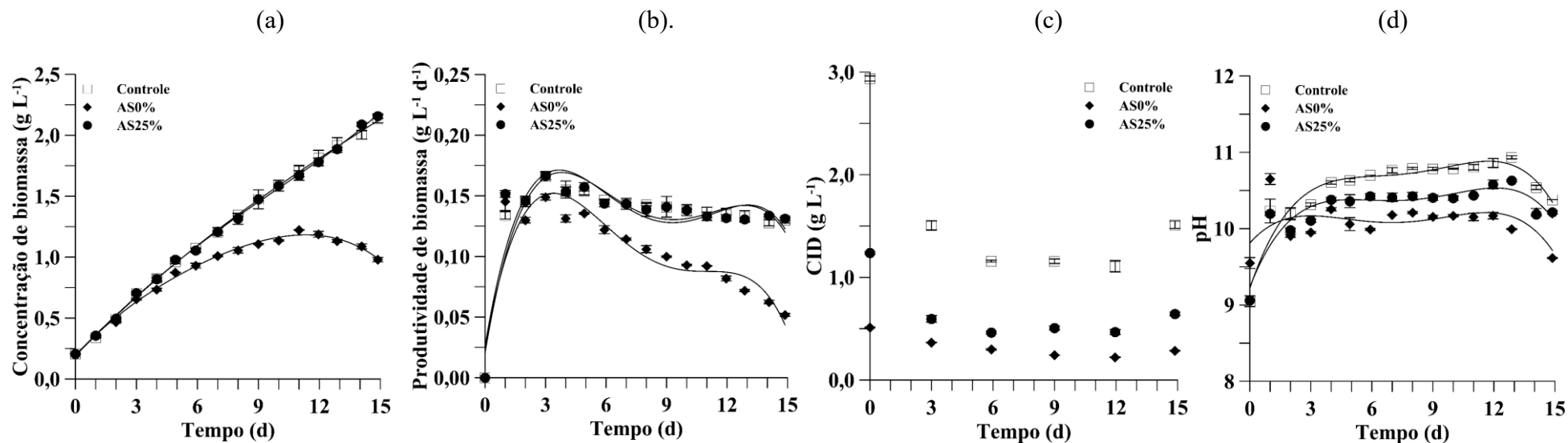
Um dos interesses biotecnológicos atribuídos as espécies do gênero *Spirulina* e *Chlorella* justifica-se devido aos elevados teores de proteínas presentes na biomassa destas microalgas até 60% e 50% ( $\text{m m}^{-1}$ ), respectivamente (DUARTE al., 2016; ROSA et al., 2015). Entretanto, a composição bioquímica da biomassa destas microalgas pode variar de acordo com as condições de cultivo aplicadas que podem envolver alterações na luminosidade, temperatura, concentração de sais, pH e disponibilidade de nutrientes (GROBBELAAR, 2013; LIM et al., 2021).

No presente estudo foi possível observar redução do conteúdo proteico na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *C. fusca* LEB 111 nos ensaios cultivados em água subterrânea salobra (AS25 e AS0) (Figura 5a).

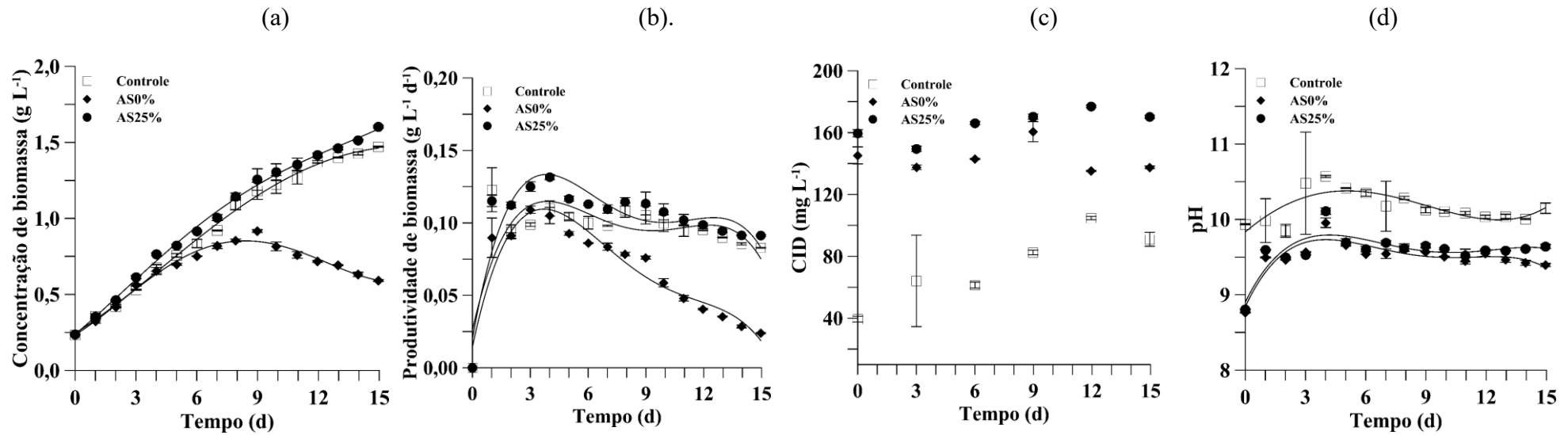
O mecanismo evidenciado por Mata et al. (2020) pode ter ocorrido no presente estudo, onde o conteúdo reduzido de proteínas na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em concentrado dessalinização de AS foi induzido pelo redirecionamento da energia disponível para um processo adaptativo de osmorregulação, frente a estresse osmótico e iônico, na produção de carboidratos.

No presente estudo também foi verificado que os cultivos de *C. fusca* LEB 111 na condição experimental AS0 apresentou maior conteúdo lipídico, sendo observado incremento de 265,1%, em comparação ao ensaio controle (Figura 5a). Sob estratégia semelhante, o tratamento AS0 realizados com *Spirulina* sp. LEB 18 promoveu incremento de carboidratos em 224,3% e redução do conteúdo de lipídios de 64,0%, em comparação ao ensaio controle. Os carboidratos produzidos por microalgas apresentam função estrutural como constituintes da parede celular e juntamente com os lipídios atuam como componente de armazenamento dentro da célula. Quando expostas ao estresse osmótico, as células microalgais são induzidas a armazenar essas macromoléculas a fim de fornecer a energia (ATP) necessária para manter o seu metabolismo frente a condições adversas (CHURCH et al. 2017). De acordo com Shetty et al. (2019) a energia necessária à manutenção do equilíbrio osmótico é impulsionada pela

**Figura 3-** Perfil de concentração de biomassa (a), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) (b), Carbono Inorgânico Dissolvido (CID) (c) e perfil de pH (d) de *Spirulina* sp. LEB 18 nos ensaios controle, AS0 e AS25. AS25: água subterrânea (AS) suplementada com 25% das concentrações de Zarrouk; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes



**Figura 4-** Perfil de concentração de biomassa (a), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) (b), Carbono Inorgânico Dissolvido (CID) (c) e perfil de pH (d) de *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AS0 e AS25. AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 25% das concentrações dos nutrientes dos meios de cultivo BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes



**Tabela 2**– Resultados de concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ), produtividade final de biomassa ( $P_{\text{final}}$ ) e produtividade máxima de biomassa ( $P_{\text{máx}}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AS25 e AS0

| <i>Spirulina</i> sp. LEB 18                             |                                  |                                |                                 |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Parâmetros                                              | Controle                         | AS25                           | AS0                             |
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                   | 2,14 <sup>a(15°d)</sup> ± 0,03   | 2,16 <sup>a(15°d)</sup> ± 0,02 | 1,22 <sup>b(11°d)</sup> ± <0,01 |
| $P_{\text{final}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 0,13 <sup>a</sup> ± <0,01        | 0,13 <sup>a</sup> ± <0,01      | 0,05 <sup>b</sup> ± <0,01       |
| $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )   | 0,17 <sup>a</sup> ± <0,01        | 0,17 <sup>a</sup> ± <0,01      | 0,15 <sup>b</sup> ± <0,01       |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                   | 0,41 <sup>a</sup> ± <0,01        | 0,40 <sup>a</sup> ± 0,01       | 0,37 <sup>b</sup> ± <0,01       |
| $R^{2*}$                                                | 0,992 ± 0,002                    | 0,984 ± 0,003                  | 0,980 ± 0,004                   |
| $\Delta t$ <sup>**</sup> (d)                            | 0-3                              | 0-3                            | 0-3                             |
| $t_g$ (d)                                               | 1,70 <sup>b</sup> ± 0,01         | 1,72 <sup>b</sup> ± 0,02       | 1,86 <sup>a</sup> ± <0,01       |
| <i>Chlorella fusca</i> LEB 111                          |                                  |                                |                                 |
| Parâmetros                                              | Controle                         | AS25 <sup>2</sup>              | AS0                             |
| $X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )                   | 1,47 <sup>b(15°d)</sup> ± < 0,01 | 1,60 <sup>a(15°d)</sup> ± 0,01 | 0,92 <sup>c(9°d)</sup> ± 0,01   |
| $P_{\text{final}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | 0,08 <sup>b</sup> ± <0,01        | 0,09 <sup>a</sup> ± <0,01      | 0,02 <sup>c</sup> ± <0,01       |
| $P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )   | 0,12 <sup>a</sup> ± 0,02         | 0,13 <sup>a</sup> ± <0,01      | 0,11 <sup>b</sup> ± <0,01       |
| $\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )                   | 0,25 <sup>c</sup> ± <0,01        | 0,29 <sup>a</sup> ± <0,00      | 0,26 <sup>b</sup> ± <0,01       |
| $R^{2*}$                                                | 0,974 ± 0,011                    | 0,989 ± 0,002                  | 0,985 ± 0,005                   |
| $\Delta t$ <sup>**</sup> (d)                            | 0-4                              | 0-4                            | 0-4                             |
| $t_g$ (d)                                               | 2,76 <sup>a</sup> ± 0,01         | 2,40 <sup>c</sup> ± 0,02       | 2,66 <sup>b</sup> ± 0,01        |

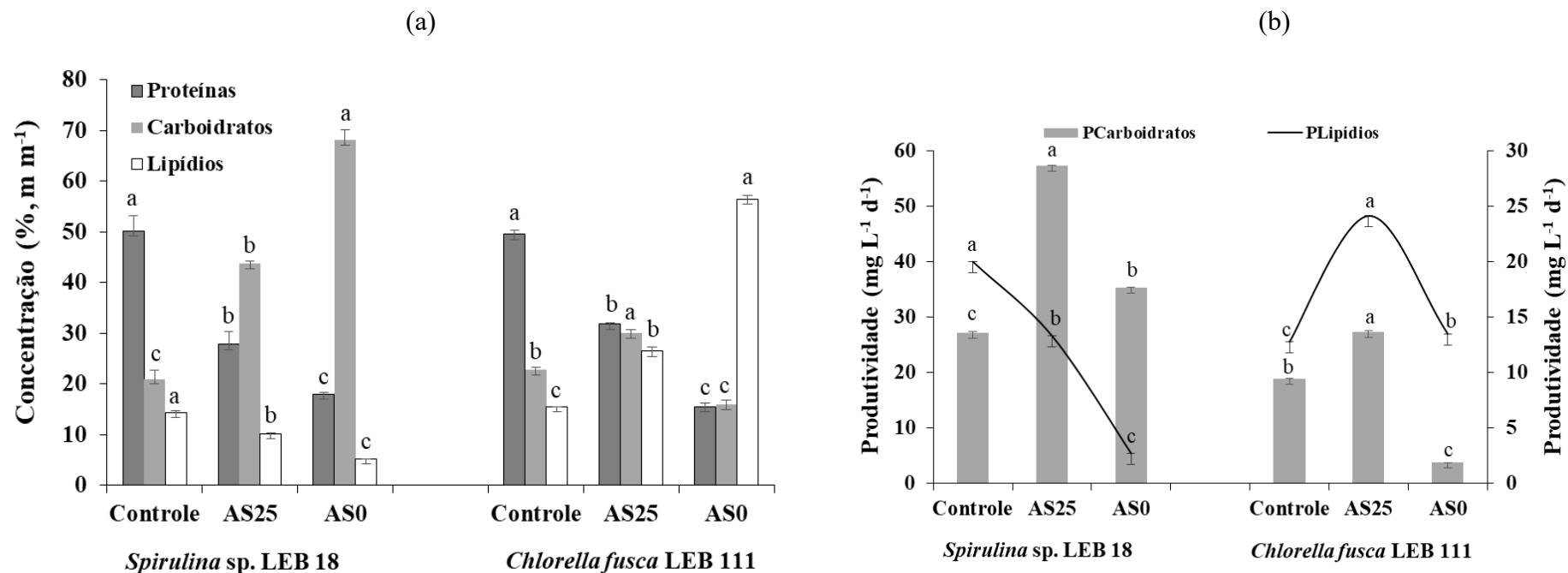
Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ( $p > 0,05$ );

\*Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento no perfil  $\ln X$  versus  $t$ ; \*\* $\Delta t$ : início-fim da fase exponencial de crescimento.

AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 25% das concentrações dos nutrientes dos meios de cultivo Zarrouk e BG11, respectivamente, AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes. (d) tempo em que foi obtida a máxima concentração celular.



**Figura 5-** Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios (em base seca) (%  $\text{m m}^{-1}$ ) (a) e produtividade de carboidratos e lipídios ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 nos ensaios controle, AS25 e AS0 (b). AS25: água subterrânea salobra (AS) suplementada com 25% das concentrações dos nutrientes dos meios de cultivos Zarrouk e BG11; AS0: Água subterrânea salobra sem adição de nutrientes



elevada concentração de  $\text{Na}^+$  extracelular, assim as células microalgais facilitam processos de extrusão de  $\text{Na}^+$  sob energia intensa para manter os processos metabólicos celulares.

Segundo Church et al. (2017) a partir dessa tensão osmótica, as células microalgais são estimuladas a acumular osmorreguladores como lipídios e carboidratos no interior das células. Toyoshima et al. (2014) observam aumento na reserva de carboidratos em até 52% na biomassa de *Spirulina platensis* cultivada em água salobra resultante da diluição de água do mar em água doce (salinidade de 7,9‰) em comparação ao controle realizado em água doce. Os autores atribuem esse acúmulo a produção de osmorreguladores como carboidratos de baixo peso molecular como descrito também por Pancha et al. (2015) e Leema et al. (2010). Taher et al. (2014) cultivando *Chlorella* sp. em uma salinidade de 460 mM obtiveram concentração e produtividade de lipídios 50 e 65% maiores, respectivamente, do que quando cultivada em salinidade de 0,49 mM. Os pesquisadores atribuíram esse incremento lipídico ao aumento da salinidade do meio.

Em particular, cepas de *Spirulina* e *Chlorella* foram capazes de suportar altas concentrações das fontes de Na entre 5-20 g L<sup>-1</sup> (DUARTE et al., 2020; SAHLE-DEMESSIE; HASSAN; BADAWEY, 2019). Isto sugere que, no presente estudo, a concentração das fontes de Na (1,5 g L<sup>-1</sup>) em ambos os cultivos, quando comparado a condição controle ( $\leq 1$  g L<sup>-1</sup>) não deve ser considerada como uma condição isolada indutora de estresse osmótico e capaz de ter desencadeado o acúmulo de carboidratos/lipídios nas células das microalgas. Assim, o efeito sinérgico promovido pela maior concentração das fontes Na, Mg e Ca e limitação de N e P em AS, comparado aos meios padrão, parece melhor justificar a indução ao estresse na produção desses osmorreguladores intracelulares em ambas as cepas (Tabela 1).

O N é essencial na síntese de proteínas, enquanto o P é o principal responsável pela transferência de energia e síntese de ácido nucléico (GROBBELAAR, 2013). A limitação destes componentes em conjunto a elevada concentração de NaCl tem estimulado a produção de lipídios por espécies de *Chlorella* (OTAKI et al., 2019) e carboidratos em *Spirulina* (MARGARITES et al., 2017; MARKOU et al., 2012b). No presente estudo a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  dos meios elaborados em água salobra foi aproximadamente 10 vezes maior que a do meio BG11 padrão, o que possivelmente contribuiu para o aumento da concentração de lipídios na biomassa de *C. fusca* LEB 111. Srivastava et al. (2017) observaram aumento no teor de lipídios de 12,6 para 40,02% na microalga *Chlorella sorokiniana* CG12(KR905186) ao aumentar a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio em 5 vezes. Os autores sugerem que o  $\text{Ca}^{2+}$  tem um papel importante em sinalizar caminhos metabólicos para acúmulo de lipídios neutros como uma resposta ao estresse osmótico causado.

Cabe ressaltar que no presente estudo, ainda que cultivada sob as mesmas condições experimentais, a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 acumulou carboidratos na sua biomassa e *Chlorella fusca* LEB 111 lipídios (Figura 5a). Pesquisas anteriores reforçam a preferência de espécies dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella* em acumular carboidratos e lipídios, respectivamente, quando expostas a condições de estresse similares ao presente do estudo (DUARTE et al., 2020; MATA et al., 2020; MATOS et al., 2014; MATOS et al., 2015b; TOYOSHIMA et al. 2014; VOLKMANN et al., 2008). Isso pode ser justificado pela diferença nas características fisiológicas específicas às espécies dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella*. Estudos reportam a capacidade da microalga *Chlorella* em acumular lipídios na forma de triacilglicerol como principal agente osmorregulador intracelular, uma vez que sua síntese demanda menor custo energético comparado aos demais osmorreguladores (ERDMANN; HAGEMANN, 2001; KIM et al., 2016; METHA et al., 2018; PANDIT et al., 2017). Esse acúmulo de glicerol é viável pela ocorrência de esteróis na membrana celular dos eucariotos, os quais tornam a membrana menos permeável e facilitam o aprisionamento do glicerol no meio intracelular (ERDMANN; HAGEMANN, 2001; SENKIV et al., 2020). Segundo Kim et al. (2016) e Salama et al. (2013), o aumento na concentração de glicerol está associado ao acúmulo de lipídios na biomassa como os triacilglicerol. Por outro lado, por ser procarionte, a cianobactéria *Spirulina* não possui a capacidade de acumular glicerol como osmorregulador, uma vez que não possui esteróis na membrana celular nem cloroplastos (SINGH et al., 2020), organela atuante na síntese deste metabólito nas microalgas eucariontes (SENKIV et al., 2020). Para esse micro-organismo é mais vantajoso acumular carboidratos de baixo peso molecular frente estresse osmótico, principalmente: glicosilglicerol e trealose (VONSHAK et al., 1988).

Os ensaios AS0 realizados tanto com *Spirulina* sp. LEB 18 quanto *Chlorella fusca* LEB 11, mesmo apresentando redução da produtividade de biomassa (11º d e 9º d de cultivo, respectivamente), resultaram em estratégias interessantes na obtenção de carboidratos/lipídios (Tabela 2; Figura 3a - 4a). De acordo com Chu et al. (2013) a elevada produtividade dos metabólitos produzidos por microalgas viabiliza sua competência comercial. Nesse contexto, o presente estudo destaca a condição AS0 que, ainda sem adição de nutrientes, promoveu elevada produtividade final de lipídios (13,50 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) por *C. fusca* LEB 111, bem como elevada produtividade de carboidratos (35,33 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) por *Spirulina* sp. LEB 18, maior que a condição controle (12,79 e 27,50 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabela 2; Figura 5a). Portanto, nossos resultados indicam a condição AS0 para obtenção de biomassa com elevado teor e produtividade de carboidratos/lipídios em cultivos de *C. fusca* LEB 111 e *Spirulina* sp.

LEB 18, favorável para a produção de biocombustíveis. Assim, foi possível evidenciar a possibilidade de cultivar dois gêneros de microalgas em água subterrânea salobra sem a necessidade de adição de nutrientes e produção de carboidratos e lipídios em concentrações superiores aos sistemas convencionais que utilizam água doce e maiores quantidade de nutrientes.

#### 4 CONCLUSÃO

O emprego de água subterrânea salobra sem adição de nutrientes resultou em maiores valores de produtividade de carboidratos (35,33 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 e elevada produtividade de lipídios (13,50 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) em culturas de *Chlorella fusca* LEB 111, em relação aos ensaios controle. Estes resultados apresentam uma alternativa inovadora na utilização da água subterrânea salobra como meio de cultivo, viável não só para a produção de biomassa de *Spirulina* e *Chlorella*, como também de biomoléculas (carboidratos e lipídios) promissores para a indústria de biocombustíveis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> edition, AOAC International, 2000.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>th</sup> edition. Washington: APHA, 2005. Am. Water Work. Assoc. Public Work. Assoc. Environ. Fed. 552.
- AUDU, M.; MYINT, M. T.; CHENG, F.; MALLICK, K.; JENA, U.; NIRMALAKHANDAN, N.; BREWER, C. E. Hydrothermal liquefaction of algae grown on brackish dairy wastewater. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2018, Detroit. **ASABE Paper No. 1801158**. St. Joseph: ASABE, 2018. p. 2-8.
- BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 71-76, 1981.
- CHURCH, J.; HWANG, J-H.; KIM, K-T.; MCLEAN, R.; OH, Y-K.; NAM, B.; JOO, J. C.; LEE, W. H. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 147-153, 2017.
- CIRILO, J. A.; MONTENEGRO, S. M. G. L.; CAMPOS, J. N. B. A questão da água no semiárido brasileiro. In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEVENSTUHL, M. C. B. **Águas no Brasil: Análises Estratégicas**. Academia Brasileira de Ciências, 2010. p. 79-91.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005 **Publicada no DOU nº 053**, de 18/03/2005, p. 58-63.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, n. 121946, 2019.

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

DUARTE, J. H.; CARDOSO, L. G.; SOUZA, C. O.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Brackish groundwater from brazilian backlands in *spirulina* cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, p. 907-917, 2020.

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

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

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

ERDMANN, N.; HAGEMANN, M. 11 Salt Acclimation of Algae and Cyanobacteria: A Comparison. In: RAI, L. C. GAUR, J. P. **Algal Adaptation to Environmental Stresses**. 1<sup>st</sup> edition. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 324-361.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2<sup>nd</sup> edition. Arizona: Wiley, 2013. p. 123-133.

HOFFMAN, J.; PATE, R. C.; DRENNEN, T.; QUINN, J. C. Techno-economic assessment of open microalgae production systems. **Algal Research**, v. 23, p. 51-57, 2017.

JONES, E.; QADIR, M.; VLIET, M. T. H.; SMAKHTIN, V.; KANG, S. The state of desalination and brine production: A global outlook. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 1343-1356, 2019.

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, 2018.

KIM, B-H.; RAMANAN, R.; KANG, Z.; CHO, D-H.; OH, H-M.; KIM, H-S. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 300-305, 2016.

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

LIMA, E. A.; CANO, H.; NASCIMENTO, J. A. S. Uma contribuição à geografia dos recursos hídricos. In: **Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. p. 322-357.

LIM, H. R.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; CHANG, C-K.; MUNAWAROH, H. S. H.; KUMAR, P. S.; HUY, N. D.; SHOW, P. L. Perspective of *Spirulina* culture with wastewater into a sustainable circular bioeconomy. **Environmental Pollution**, v. 284, n. 117492, 2021.

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

MATA, S. N.; SANTOS, T. S.; CARDOSO, L. G.; ANDRADE, B. B.; DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V.; SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. **Bioresource Technology**, v. 311, n. 123495, 2020.

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

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

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

MATOS, A. P.; TORRES, R. C. O.; MORIOKA, L. R. I.; MOECKE, E. H. S.; FRANÇA, K. B.; SANT'ANNA, E. S. Growing *Chlorella vulgaris* in photobioreactor by continuous process using concentrated desalination: effect of dilution rate on biochemical composition. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MCMAHON, P. B.; BOHLKE, J. K.; DAHM, K. G.; PARKHURST, D. L.; ANNING, D. W.; STANTON, J. S. Chemical considerations for an updated national assessment of brackish groundwater resources. **Groundwater**, v. 54, p. 464-475, 2015.

MEHTA, P.; RANI, R.; GUPTA, R.; MATHUR, A. S.; PURI, S. K. Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 in seawater salinity recycled medium. **Algal Research**, v. 36, p. 88-95, 2018.

MORAES, L.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Bioprocess strategies for enhancing biomolecules productivity in *Chlorella fusca* LEB 111 using CO<sub>2</sub> a carbon source. **Biotechnology Progress**, v. 36, p. 1-9, 2020.

MORAIS JUNIOR, W. G.; GORGICH, M.; CORRÊA, P. S.; MARTINS, A. A.; MATA, T. M.; CAETANO, N. S. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, n. 735562, 2020.

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

OTAKI, R.; OISHI, Y.; ABE, S.; FUJIWARA, S.; SATO, N. Regulatory carbon metabolism underlying seawater-based promotion of triacylglycerol accumulation in *Chlorella kessleri*. **Bioresource Technology**, v. 289, n. 121686, 2019.

PANCHIA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K.; PATIDAR, S. K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341-348, 2015.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 13437-13451, 2017.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B. The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 2, p. 83-86, 1979.

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

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

RUBIO, F. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology & Bioengineering**, n. 62, p. 71-86, 1999.

SAHLE-DEMESSIE, E.; HASSAN, A. A.; BADAWEY, A. E. Bio-desalination of brackish and seawater using halophytic algae. **Desalination**, v. 465, p. 104-113, 2019.

SALAMA, E-S.; KIM, H-C.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; JI, M-K.; OH, Y-K.; KIM, S-H.;

JEON, B-H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 827-833, 2013.

SEMKIV, M. V.; RUCHALA, J.; DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. A. 100 years later, what is new in glycerol bioproduction? **Trends in Biotechnology**, v.38, p. 907-916, 2020.

SERRÀ, A.; PIP, P.; GÓMEZ, E.; PHILIPPE, L. Efficient magnetic hybrid ZnO-based photocatalysts for visible-light-driven removal of toxic cyanobacteria blooms and cyanotoxins. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 268, n. 118745, 2020.

SHETTY, P.; GITAU, M. M.; MARÓTI, G. Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. **Cells**, v. 8, n. 1657, 2019.

SINGH, S. K.; KAUR, R.; BANSAL, A.; KAPUR, S.; SUNDARAM, S. Chapter 8 - Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds. In: VERMA, M. L.; CHANDEL, A. K. **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**. Elsevier, 2020. p. 221-259.

SRIVASTAVA, G.; NISHCHAL; GOUD, V. V. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR\_047). **Bioresource Technology**, v. 242, p. 244-252, 2017.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M.; TARIQ, S.; Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: process optimization and laboratory scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 57-66, 2014.

THIRUGNANASAMBANTHAM, R.; ELANGO, T.; ELANGO VAN, K. *Chlorella vulgaris* sp. microalgae as a feedstock for biofuel. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 3182-3185, 2020.

TOYOSHIMA, M.; AIKAWA, S.; YAMAGISHI, T.; KONDO, A.; KAWAI, H. A pilot-scale floating closed culture system for the multicellular cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2191-2202, 2015.

UNESCO, UN-Water, 2020. **United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change**, Paris, UNESCO.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98-101, 2008.

VONSHAK, A.; GUY, R.; GUY, M. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 417-420, 1988.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997. p. 233.

YADAV, G.; DASH, S. K.; SEN, R. A biorefinery for valorization of industrial waste-water and flue gas by microalgae for waste mitigation, carbon-dioxide sequestration and algal



biomass production. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 129-135, 2019.

YUAN, D.; ZHAN, X.; WANG, M.; WANG, X.; FENG, W.; GONG, Y.; HU, Q.  
Biodiversity and distribution of microzooplankton in *Spirulina (Arthrospira) platensis* mass cultures throughout China. **Algal Research**, v. 30, p. 38-49, 2018.

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



## **CAPÍTULO IV**

### Conclusão geral



## CONCLUSÃO GERAL

O cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em água do mar sem adição de nutrientes apresentou crescimento ( $X_{\text{máx}} = 2,17 \text{ g L}^{-1}$ ) e aumento no teor e produtividade de carboidratos em 203% e 52%, respectivamente, quando comparado aos cultivos controle em água doce. O cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em água do mar com 50% das concentrações de todos os nutrientes (AM50T) resultou em elevadas produtividades de biomassa ( $P_{\text{max}}$ :  $149,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), lipídios ( $16,60 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e carboidratos ( $44,47 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Além disso, a microalga foi capaz de reduzir as concentrações de Ca ( $\sim 60\%$ ), P (97,3%) e  $\text{NO}_3$  (41,5%) do meio de cultivo e produzir biomassa com teores de ácidos graxos saturados (40%,  $\text{m m}^{-1}$ ) e poli-insaturados (58%,  $\text{m m}^{-1}$ ) favoráveis à produção de biodiesel.

Os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 em água subterrânea salobra sem adição de nutrientes (AS0) mostrou como a melhor estratégia para promover o crescimento ( $X_{\text{máx}} = 1,22^{(11^{\text{ºd})}} \text{ g L}^{-1}$  e  $0,92^{(9^{\text{ºd})}} \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) e elevar o teor (68,1%  $\text{m m}^{-1}$ ) e produtividade de carboidratos ( $35,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 e aumentar o teor (56,45%  $\text{m m}^{-1}$ ) e produtividade de lipídios ( $13,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) em *C. fusca* LEB 111, quando comparados às condições controle. Portanto, o presente trabalho demonstrou o desenvolvimento de cultivos dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella* com caráter mais ambientalmente sustentável por meio do emprego de água do mar e subterrânea salobra como fonte de água e de nutrientes. Além disso, evidenciou estratégias de cultivo sob menor demanda de nutrientes, podendo desta forma contribuir para minimizar os custos com a produção de biomassa e somado a isso obter biomassa com elevado teor de carboidratos e lipídios, promissores para a produção de biocombustíveis.

## **CAPÍTULO V**

### Considerações finais



## RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados no desenvolvimento da presente tese correspondem aos meios de cultivo após recuperação de biomassas das microalgas estudadas, sais de precipitação obtidos após etapa de pré-tratamento da água do mar utilizada, bem como solventes empregados nas análises de extração dos biocompostos presentes nas biomassas microalgais. Todos os resíduos químicos e biológicos foram devidamente envazados, identificados, armazenados e segregados para unidade receptora de resíduos da Universidade Federal do Rio Grande e posteriormente destinados à empresa especializada para adequado tratamento e descarte.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1 Avaliar o efeito sinérgico de diferentes concentrações de Na, Cl, P, N, C, Ca e Mg no crescimento, biorremediação e composição química da biomassa de gêneros de *Spirulina* sp. e *Chlorella fusca* sob estratégias semelhantes às do presente estudo;
- 2 Analisar o potencial da salinidade da água do mar e subterrânea salobra no processo de floculação das células das microalgas de modo a minimizar os custos na recuperação da biomassa microalgal.
- 3 Avaliar a redução nos custos totais de produção de biomassa obtidas de estratégias semelhantes às do presente estudo;
- 4 Analisar a toxicidade da biomassa final de *Spirulina* e *Chlorella* cultivadas sob estratégias semelhantes às do presente estudo, a fim de verificar suas possíveis aplicações no setor de alimentos, aquicultura e de nutraceuticos.
- 5 Realizar cultivos com espécies de *Spirulina* e *Chlorella* em água do mar/água subterrânea salobra, sem adição de nutrientes até obtenção da concentração máxima de biomassa, analisando seu potencial na produção de carboidratos e lipídios
- 6 Observar o potencial de filtro biológico de *Spirulina* e *Chlorella* no tratamento de água subterrânea salobra como alternativa aos métodos de dessalinização convencionais.
- 7 Estudar a viabilidade da ampliação de escala dos cultivos de *Spirulina* sp. e *Chlorella* em água do mar e subterrânea salobra, sem adição de nutrientes, realizando ciclos de renovação da água.



8 Verificar o potencial dos carboidratos e lipídios microalgais na produção de etanol e biodiesel

## **CAPÍTULO VI**

Referências bibliográficas



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIÉN, F. G. et al. Photobioreactors for the production of microalgae. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Eds.). **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts From Feedstock Cultivation to End-Products**. Woodhead Publishing, 2017. p. 1-44.
- AFFAN, M. A.; LEE, D-W.; JEON, S-M.; NOH, J-H.; HEO, S-J.; OH, C.; PARK, H-S.; KHOMAYIS, H. S. A.; KANG, D-H. Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina (Arthrospira) maxima* growth with decreased production cost. **Aquaculture**, v. 436, p. 121-126, 2015.
- AFFENZELLER, M. J. et al. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 939-954, 2009.
- AIKAWA, S.; NISHIDA, A.; HO, S-H.; CHANG, J-S.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 88, 2014.
- ALYABYEV, A. J.; LOSEVA, N. L.; GORDON, L. K.; ANDREYEVA, I. N.; RACHIMOVA, G. G.; TRIBUNSKIY, V. I.; PONOMAREVA, A. A.; KEMP, R. B. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. **Thermochimica Acta**, v. 258, p. 65-70, 2007.
- AMEZAGA, J. M.; AMTMANN, A.; BIGGS, C. A.; BOND, T.; GANDY, C. J.; HONSBEIN, A.; KARUNAKARAN, E.; LAWTON, L.; MADSEN, M. A.; MINAS, K.; TEMPLETON, M. R. Biondesalination: a case study for applications of photosynthetic bacteria in water treatment. **Plant Physiology**, v. 164, p. 1661-1676, 2014.
- ANDRADE, B. B. et al. Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 284, p. 340-348, 2019.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> edition, AOAC International, 2000.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>th</sup> edition. Washington: APHA, 2005. Am. Water Work. Assoc. Public Work. Assoc. Environ. Fed. 552.
- ARORA, N.; PATEL, A.; SHARMA, M.; MEHTANI, J.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V.; POLUTRI, K. M. Insights into the enhanced lipid production characteristics of a fresh water microalga under high salinity conditions. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 7413-7421, 2017.
- AUDU, M.; MYINT, M. T.; CHENG, F.; MALLICK, K.; JENA, U.; NIRMALAKHANDAN, N.; BREWER, C. E. Hydrothermal liquefaction of algae grown on brackish dairy wastewater. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2018, Detroit. **ASABE Paper No. 1801158**. St. Joseph: ASABE, 2018. p. 2-8.
- BATYROVA, K.; GAVRISHEVA, A.; IVANOVA, E.; LIU, J.; TSYGANKOV, A. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2705-2716, 2015.

BELAY, A. Biology and Industrial Production of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology**. Second ed. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 339-358.

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

BRAGA, V. DA S. et al. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 269, n. July, p. 221-226, 2018.

BRAGA, V. DA S. et al. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 277, p. 55-61, 2019.

BROWN, E. et al. **Seawater: Its composition properties and behavior**. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford, UK: Pergamon Press, 1995.

BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 71-76, 1981.

CARDOSO L. G.; DUARTE, J. H.; ANDRADE, B. B.; LEMOS, P. V. F.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I.; CHINALIA, F. A. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: High biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. **Aquaculture**, v. 525, n. 735272, 2020.

CASSURIAGA, A. P. A. et al. Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456-463, 2018.

CHEN, C-Y.; CHANG, J-S.; CHANG, H-Y.; CHEN, T-Y.; WU, J-H.; LEE, W-L. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 74-81, 2013.

CHEN, H-H.; XUE, L-L.; LIANG, M-H.; JIANG, J-G. Sodium azide intervention, salinity stress and two-step cultivation of *Dunaliella tertiolecta* for lipid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.127, p. 1-5, 2019.

CHEN, H.; JIANG, J-G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, p. 251-258, 2009.

CHOKSHI, K.; PANCH, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1376-1383, 2017.

CHU, F-F.; CHU, P-N.; CAI, P-J.; LI, W-W.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.

CHURCH, J. et al. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 147-153, 2017.

CIRILO, J. A.; MONTENEGRO, S. M. G. L.; CAMPOS, J. N. B. A questão da água no semiárido brasileiro. In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEVENSTUHL, M. C. B. **Águas no Brasil: Análises Estratégicas**. Academia Brasileira de Ciências, 2010. p. 79-91.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & 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, n. 1, p. 2-9, 2011.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, n. 121946, 2019.

COSTA, S. 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 Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552-562, 2018.

DAS, P.; THAHER, M. I.; HAKIM, M. A. Q. M. A.; AL-JABRI, H. M. S. J.; ALGHASAL, G. S. H. S. A comparative study of the growth of *Tetraselmis* sp. in large scale fixed depth and decreasing depth raceway ponds. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 114-120, 2016.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Use of static magnetic fields to increase CO<sub>2</sub> biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 103-109, 2019.

DE JESUS, C. S.; UEBEL, L. S.; COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; MORAIS, E. G.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

DERE, Ş.; GÜNES, T.; SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. **Turkish Journal of Botany**, v. 22, p. 13-17, 1998.

DUARTE, J. H.; CARDOSO, L. G.; SOUZA, C. O.; NUNES, I. L.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Brackish groundwater from brazilian backlands in *Spirulina* cultures: potential of carbohydrate and polyunsaturated fatty acid production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, p. 907-917, 2020.

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

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

**Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

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

EL-SAYED, A. B.; ABDEL-MAGUID, A. A. Immobilized-microalga *Scenedesmus* sp. For biological desalination of red seawater: ii. Effect on macronutrients removal. **Journal of American Science**, v. 6, p. 637-643, 2010.

ERDMANN, N.; HAGEMANN, M. 11 Salt Acclimation of Algae and Cyanobacteria: A Comparison. In: RAI, L. C.; GAUR, J. P. **Algal Adaptation to Environmental Stresses**. 1<sup>st</sup> edition. Springer, Berlin, Heidelberg, 2001. p. 324-361.

FAUCHER, O.; COUPAL, B.; LEDUY, A. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 752-759, 1979.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 375-392, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

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

GAN, X.; SHEN, G.; XIN, B.; LI, M. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. **Desalination**, v. 400, p. 1-6, 2016.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2<sup>nd</sup> edition. Arizona: Wiley, 2013. p. 123-133.

GUARNIERI, M. T.; NAG, A.; SMOLINSKI, S. L.; DARZINS, A.; SEIBERT, M.; PIENKOS, P. T. Examination of triacylglycerol biosynthetic pathways via de novo transcriptomic and proteomic analyses in an unsequenced microalga. **Plos One**, v. 6, n. 25851, 2011.

GUCCIONE, A.; BIONDI, N.; SAMPIETRO, G.; RODOLFI, L. BASSI, N.; TREDICI, M. R. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 84, 2014.

HABIB, M. A. B. et al. A review of culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**. N° 1034. Rome: FAO, 2008.

HARAUMA, A. et al. The essentiality of arachidonic acid in addition to docosahexaenoic acid for brain growth and function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 116, n. August 2016, p. 9-18, 2017.

HARRISON, P. J.; BERGES, J. A. Marine Culture Media. In: ANDERSEN, R. **Algal Culturing Techniques**. New York: Academic Press, 2005. p. 21-33.

HE, M.; LI, L.; LIU, J.; ZHANG, L. Improvement of H<sub>2</sub> photoproduction in *Chlorella pyrenoidosa* in artificial and natural seawater by addition of acetic acid and control of nutrients. **Algal Research**, v. 10, p. 104-109, 2015.

HO, S. H. et al. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 669-675, 2018.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, 2012.

HO, S-H.; NAKANISHI, A.; YE, X.; CHANG, J-S.; HARA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 97, 2014.

HOFFMAN, J.; PATE, R. C.; DRENNEN, T.; QUINN, J. C. Techno-economic assessment of open microalgae production systems. **Algal Research**, v. 23, p. 51-57, 2017.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture**. Second ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013. p. 114-122.

ISHIKA, T.; BAHRI, P. A.; LAIRD, D. W.; MOHEIMANI, N. R. The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1453-1464, 2018.

ISHIKA, T.; MOHEIMANI, N. R.; BAHRI, P. A. Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 78, p. 356-368, 2017.

JEONG, M. H.; YUN, J. H.; YANG, K.; JO, W. S. Application of electrochemically treated seawater as basic culture media for mass cultivation of *Tetraselmis suecica*. **Aquaculture International**, v. 23, p. 1457-1471, 2015.

JEPSEN, P. M.; THOISEN, C. V. Effects of salinity, commercial salts, and water type on cultivation of the cryptophyte microalgae *Rhodomonas salina* and the calanoid copepod *Acartia tonsa*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, p. 104-118, 2019.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.



- JONES, E.; QADIR, M.; VLIET, M. T. H.; SMAKHTIN, V.; KANG, S. The state of desalination and brine production: A global outlook. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 1343-1356, 2019.
- JUNG, J-Y.; LEE, H.; SHIN, W-S.; SUNG, M-G.; KWON, J-H.; YANG, J-W. Utilization of seawater for cost-effective cultivation and harvesting of *Scenedesmus obliquus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 449-455, 2015.
- 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, 2018.
- KIM, B-H.; RAMANAN, R.; KANG, Z.; CHO, D-H.; OH, H-M.; KIM, H-S. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 300-305, 2016.
- LAWTON, R. J. et al. The effect of salinity on the biomass productivity, protein and lipid composition of a freshwater macroalga. **Algal Research**, v. 12, p. 213-220, 2015.
- LÉCUYER, C. Seawater residence times of some elements of geochemical interest and the salinity of the oceans. **Bulletin de la Société Géologique de France**, v. 187, n. 6, p. 245-260, 2016.
- LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9221-9227, 2010.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350-382, 1987.
- LIN, C-Y.; WU, S-H. Comparison of lipid and biodiesel properties of *Chaetoceros muelleri* cultured in deep seawater and surface sea water. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 9, n. 013104, 2017.
- LIM, D. K. Y.; GARG, S.; TIMMINS, M.; ZHANG, E. S. B.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHUHMANN, H.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Isolation and evaluation of oil-producing microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **PLoS One**, v. 7, n. 40751, 2012.
- LIM, H. R.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; CHANG, C-K.; MUNAWAROH, H. S. H.; KUMAR, P. S.; HUY, N. D.; SHOW, P. L. Perspective of *Spirulina* culture with wastewater into a sustainable circular bioeconomy. **Environmental Pollution**, v. 284, n. 117492, 2021.
- LIU, J.; HU, Q. *Chlorella*: Industrial production of cell mass and chemicals. In: RICHMOND, A.; QIANG HU (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 329-338.
- LIU, J. Interspecific biodiversity enhances biomass and lipid productivity of microalgae as biofuel feedstock. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 25-33, 2016.
- LIU, W. et al. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 43-48, 2012.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUANGPIPAT, T.; CHISTI, Y. Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae - Effects of salinity and other factors. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 47-57, 2017.
- MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E. W.; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2012.
- MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, T. Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 111-120, 2018.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2005.
- MARGARITES, A. C. et al. *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 17, p. 2209-2216, 2017.
- 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.
- MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 2661-2670, 2012.
- MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532-1542, 2013.
- MÁRQUEZ-ROCHA, T. L. F. J. Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. **Ciências Marinas**, v. 26, p. 607-619, 2000.
- MARYJOSEPH, S.; KETHEESAN, B. Microalgae based wastewater treatment for the removal of emerging contaminants: A review of challenges and opportunities. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, n. 100046, 2020.
- MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. . In: RICHMOND, A.; QIANG HU (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 21-36.
- MATA, S. N.; SANTOS, T. S.; CARDOSO, L. G.; ANDRADE, B. B.; DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V.; SOUZA, C. O.; DRUZIAN, J. I. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a

raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. **Bioresource Technology**, v. 311, n. 123495, 2020.

MATERASSI, R.; TREDICI, M.; BALLONI, W. *Spirulina* culture in sea-water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 384-386, 1984.

MATHIMANI, T.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 575-586, 2018.

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

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

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

MATOS, A. P.; TORRES, R. C. O.; MORIOKA, L. R. I.; MOECKE, E. H. S.; FRANÇA, K. B.; SANT'ANNA, E. S. Growing *Chlorella vulgaris* in photobioreactor by continuous process using concentrated desalination: effect of dilution rate on biochemical composition. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MCMAHON, P. B.; BOHLKE, J. K.; DAHM, K. G.; PARKHURST, D. L.; ANNING, D. W.; STANTON, J. S. Chemical considerations for an updated national assessment of brackish groundwater resources. **Groundwater**, v. 54, p. 464-475, 2015.

MEHTA, P. et al. Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 in seawater salinity recycled medium. **Algal Research**, v. 36, p. 88-95, 2018.

MILLER, R.; WU, G.; DESHPANDE, R. R.; VIELER, A.; GARTNER, K.; LI, X.; MOELLERING, E. R.; ZAUNER, S.; CORNISH, A. J.; LIU, B.; BULLARD, B.; SEARS, B. B.; KUO, M.-H.; HEGG, E. L.; SHACHAR-HILL, Y.; SHIU, S.-H.; BENNING, C. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1737-1752, 2010.

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 NaNO<sub>3</sub> and NaCl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-10, 2018.

MORAES, L.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Bioprocess strategies for enhancing biomolecules productivity in *Chlorella fusca* LEB 111 using CO<sub>2</sub> a carbon source. **Biotechnology Progress**, v. 36, p. 1-9, 2020.

MORAES, L. et al. Engineering strategies for the enhancement of *Nannochloropsis gaditana* outdoor production: Influence of the CO<sub>2</sub> flow rate on the culture performance in tubular photobioreactors. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 171-177, 2019.

MORAIS JUNIOR, W. G.; GORGICH, M.; CORRÊA, P. S.; MARTINS, A. A.; MATA, T. M.; CAETANO, N. S. Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, v. 528, n. 735562, 2020.

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

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; VICH, D. V.; CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO, M. A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 1-13, 2013.

NGUYEN, T. D. P.; FRAPPART, M.; JAOUEN, P.; PRUVOST, J.; BOURSEAU, P. Harvesting *Chlorella vulgaris* by natural increase in pH: Effect of medium composition. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, p. 1378-1388, 2014.

OTAKI, R.; OISHI, Y.; ABE, S.; FUJIWARA, S.; SATO, N. Regulatory carbon metabolism underlying seawater-based promotion of triacylglycerol accumulation in *Chlorella kessleri*. **Bioresource Technology**, v. 289, n. 121686, 2019.

PAL, D.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1429-1441, 2011.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K.; PATIDAR, S. K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341-348, 2015.

PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 13437-13451, 2017.

PARKHILL, J. P.; MAILLET, G.; CULLEN, J. J. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology**, v. 37, p. 517-529, 2001.

PATEL, A. K.; TSENG, Y-S.; SINGHANIA, R. R.; CHEN, C-W.; CHANG, J-S.; DONG, C. D. Novel application of microalgae platform for biodesalination process: A review. **Bioresource Technology**, v. 337, n. 125343, 2021.

PERALTA, E.; JEREZ, C. G.; FIGUEROA, F. L. Centrate grown *Chlorella fusca* (Chlorophyta): Potential for biomass production and centrate bioremediation. **Algal Research**, v. 39, n. 101458, 2019.

PICKENS, C. A.; SORDILLO, L. M.; ZHANG, C.; FENTON, J. I. Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE). **Metabolism**, v. 70, p. 177-191, 2017.

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

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 261-268, 2009.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537-542, 2006.

RIPPKA, R. et al. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

ROMERO VILLEGAS, G. I.; FIAMENGO, M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Outdoor production of microalgae biomass at pilot-scale in seawater using centrate as the nutrient source. **Algal Research**, v. 25, p. 538-548, 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KIMURA, M. **HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis**. (Technical monograph series, 2). Washington, DC: International Food Policy Research Institute and International; Cali: International Center for Tropical Agriculture, 2004.

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

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. D. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO<sub>2</sub> absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, n. 200, p. 528-534, 2016.

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

RUBIO, F. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology & Bioengineering**, n. 62, p. 71-86, 1999.

SAHLE-DEMESSIE, E.; HASSAN, A. A.; BADAWY, A. E. Bio-desalination of brackish and seawater using halophytic algae. **Desalination**, v. 465, p. 104-113, 2019.

SALAMA, E-S.; KIM, H-C.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; JI, M-K.; OH, Y-K.; KIM, S-H.; JEON, B-H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater

*Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 827-833, 2013.

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.

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

SANTOS, T. D. et al. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216-220, 2016.

SAYADI, M. H.; RASHKI, O.; SHAHRI, E. Application of modified *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* powder on the adsorption of heavy metals from aqueous solutions. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 103169, 2019.

SCHWENK, D.; SEPPALA, J.; SPILLING, K.; VIRKKI, A.; TAMMINEN, T.; OKSMAN-CALDENTEY, K-M.; RISCHER, H. Lipid content in 19 brackish and marine microalgae: influence of growth phase, salinity and temperature. **Aquatic Ecology**, v. 47, p. 415-424, 2013.

SEMKIV, M. V.; RUCHALA, J.; DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. A. 100 Years Later, What Is New in Glycerol Bioproduction? **Trends in Biotechnology**, v.38, p. 907-916, 2020.

SERRÀ, A.; PIP, P.; GÓMEZ, E.; PHILIPPE, L. Efficient magnetic hybrid ZnO-based photocatalysts for visible-light-driven removal of toxic cyanobacteria blooms and cyanotoxins. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 268, n. 118745, 2020.

SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARÍÑAS, B. J.; MAYES, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nature**, v. 452, p. 301-310, 2008.

SHETTY, P.; GITAU, M. M.; MARÓTI, G. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. **Cells**, v. 8, n. 1657, 2019.

SINGH, S. K.; KAUR, R.; BANSAL, A.; KAPUR, S.; SUNDARAM, S. Chapter 8 - Biotechnological exploitation of cyanobacteria and microalgae for bioactive compounds. In: VERMA, M. L.; CHANDEL, A. K. **Biotechnological Production of Bioactive Compounds**. Elsevier, 2020. p. 221-259.

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

SRIVASTAVA, G.; NISHCHAL; GOUD, V. V. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR\_047). **Bioresource Technology**, v. 242, p. 244-252, 2017.

- TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M.; TARIQ, S.; Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: process optimization and laboratory scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 57-66, 2014.
- TAWALBEH, M.; AL-OTHMAN, A.; SINGH, K.; DOUBA, I.; KABAKEBJI, D.; ALKASRAWI, M. Microbial desalination cells for water purification and power generation: A critical review. **Energy**, v. 209, n. 118493, 2020.
- THIRUGNANASAMBANTHAM, R.; ELANGO, T.; ELANGO VAN, K. *Chlorella vulgaris* sp. microalgae as a feedstock for biofuel. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 3182-3185, 2020.
- TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Environmental stress physiology with reference to mass cultures. In: RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 90-113.
- TOYOSHIMA, M.; AIKAWA, S.; YAMAGISHI, T.; KONDO, A.; KAWAI, H. A pilot-scale floating closed culture system for the multicellular cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2191-2202, 2015.
- UMMALYMA, S. B.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Evaluation of freshwater microalgal isolates for growth and oil production in seawater medium. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 223-230, 2020.
- UNESCO, UN-Water, 2020. **United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change**, Paris, UNESCO.
- VASQUEZ-VILLALOBOS, V. et al. Proportional influence of sea water and bicarbonate on the production of *Spirulina* sp. biomass with light-emitting diode lighting. **Scientia Agropecuaria**, v. 5, p. 199–209, 2014.
- VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO<sub>2</sub> biofixation by the cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the green alga *Chlorella fusca* LEB 111 grown using gas effluents and solid residues of thermoelectric origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 9 jan. 2016.
- VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98-101, 2008.
- VONSHAK, A.; GUY, R.; GUY, M. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 417-420, 1988.
- VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 233.
- XIE, Y.; LU, K.; ZHAO, X.; MA, R.; CHEN, J.; HO, S-H. Manipulating nutritional conditions and salinity-gradient stress for enhanced lutein production in marine microalga *Chlamydomonas* sp. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1800380, 2019.

WANG, Z. P.; ZHAO, Y. Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): From linear to helical. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 3, p. 622-628, 2005.

WENTEN, I. G. et al. Integrated processes for desalination and salt production: A mini-review. **AIP Conference Proceedings**, v. 1818, 2017.

WWAP. The United Nations world water development report 2018: nature-based solutions for water; executive summary; 2018. **United Nations World Water Assessment Programme)/UN-Water. 2018**, 2018.

WWAP (UNESCO World Water Assessment Programme). 2019. **The United Nations World Water Development Report 2019: Leaving No One Behind**. Paris, UNESCO.

WWAP. UNESCO, UN-Water, 2020. United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change, Paris, UNESCO.

YADAV, G.; DASH, S. K.; SEN, R. A biorefinery for valorization of industrial waste-water and flue gas by microalgae for waste mitigation, carbon-dioxide sequestration and algal biomass production. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 129-135, 2019.

YADAV, G.; PANDA, S. P.; SEN, R. Strategies for the effective solid, liquid and gaseous waste valorization by microalgae: A circular bioeconomy perspective. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 104518, 2020.

YUAN, D.; ZHAN, X.; WANG, M.; WANG, X.; FENG, W.; GONG, Y.; HU, Q. Biodiversity and distribution of microzooplankton in *Spirulina (Arthrospira) platensis* mass cultures throughout China. **Algal Research**, v. 30, p. 38-49, 2018.

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

ZHAI X.; ZHU, C.; ZHANG, Y.; PANG, H.; KONG, F.; WANG, J.; CHI, Z. Seawater supplemented with bicarbonate for efficient marine microalgae production in floating photobioreactor on ocean: A case study of *Chlorella* sp. **Science of the Total Environment**, v. 738, n. 139439, 2020.

ZHAO, L.; QI, Y.; CHEN, G. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from seawater. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 42-46, 2015.



**CAPÍTULO VII**  
**APÊNDICES**



## APÊNDICES

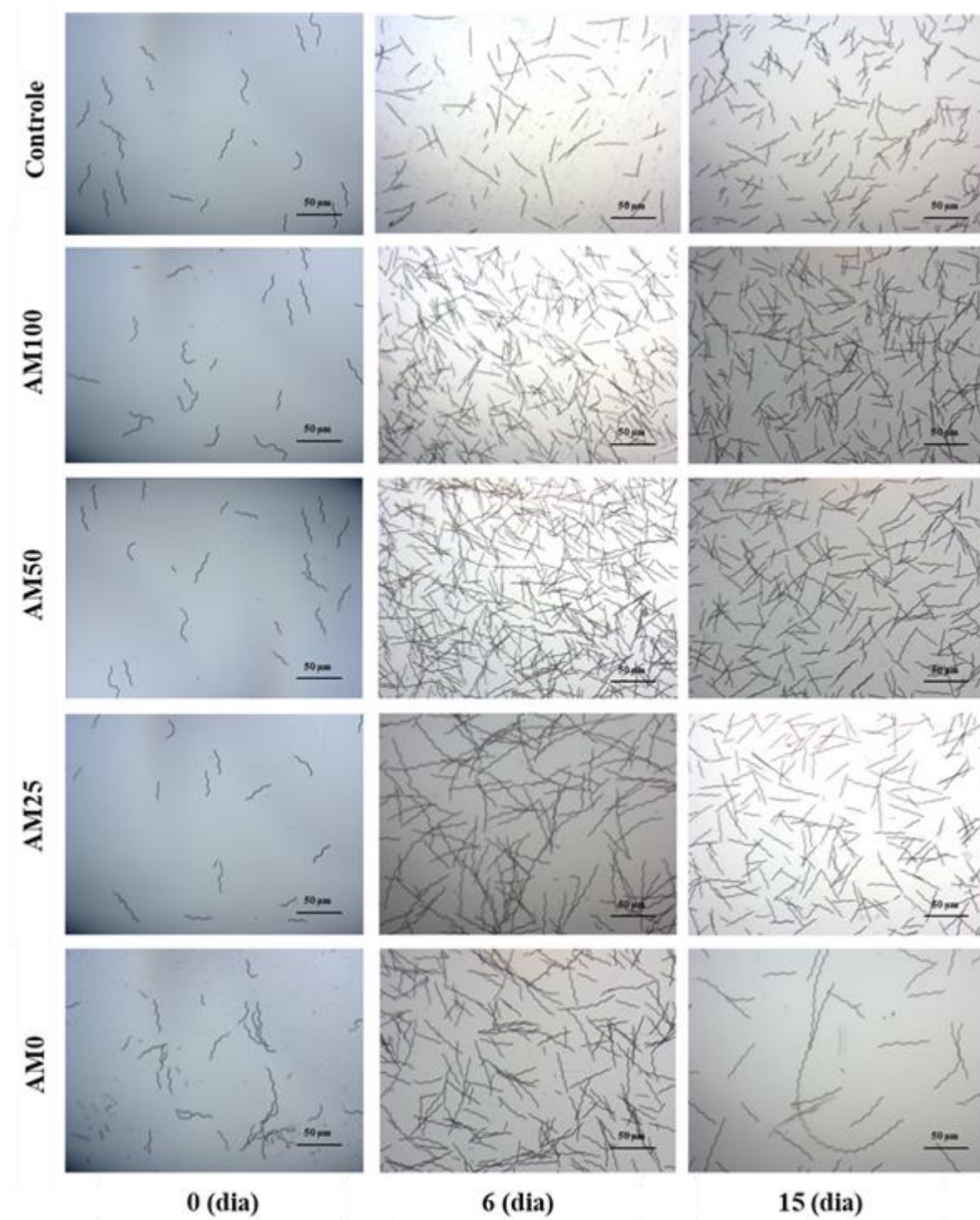
### Apêndice 1- Composição e características físico-químicas do meio de cultivo controle (Zarrouk) e ensaios AM100, AM50 e AM25

| Parâmetros                                                                        | LQ        | Controle | AM100 <sup>1</sup> | AM50 <sup>2</sup> | AM25 <sup>3</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Sódio (Na) (g L <sup>-1</sup> )                                                   | < 0,00025 | 4,54     | 9,40               | 8,80              | 8,35              |
| Potássio (K) (g L <sup>-1</sup> )                                                 | < 0,00025 | 0,89     | 0,80               | 0,64              | 0,44              |
| Cálcio (Ca) (g L <sup>-1</sup> )                                                  | < 0,00025 | 0,009    | 0,03               | 0,03              | 0,01              |
| Magnésio (Mg) (g L <sup>-1</sup> )                                                | < 0,00025 | 0,02     | 0,34               | 0,36              | 0,34              |
| Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (g L <sup>-1</sup> )                      | < 0,00025 | 1,79     | 1,80               | 1,10              | 0,56              |
| Cloretos (Cl <sup>-</sup> ) (g L <sup>-1</sup> )                                  | < 0,001   | 0,92     | 14,32              | 13,83             | 11,95             |
| Ferro (Fe) (g L <sup>-1</sup> )                                                   | < 0,0001  | 0,002    | 0,001              | 0,001             | 0,001             |
| Fósforo total (P) (g L <sup>-1</sup> )                                            | < 0,0001  | 0,14     | 0,04               | 0,04              | 0,02              |
| Salinidade total (g L <sup>-1</sup> )                                             | < 0,10    | 17,27    | 44,35              | 44,55             | 42,48             |
| Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )                                              | < 1,0     | 28,0     | 68,2               | 65,2              | 62,7              |
| Alcalinidade HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | < 0,002   | 5880     | 8140               | 9230              | 8720              |
| Alcalinidade CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) | < 0,002   | 4840     | 3660               | 2070              | 2610              |
| Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )                         | < 0,002   | 10700    | 11800              | 11300             | 11300             |
| Total hardness (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )                             | < 0,001   | 18820    | 38796              | 36237             | 34423             |
| Total dissolved solids (g L <sup>-1</sup> )                                       | < 1,0     | 14,00    | 46,69              | 32,74             | 28,87             |
| pH                                                                                |           | 9,6      | 9,0                | 9,1               | 9,4               |

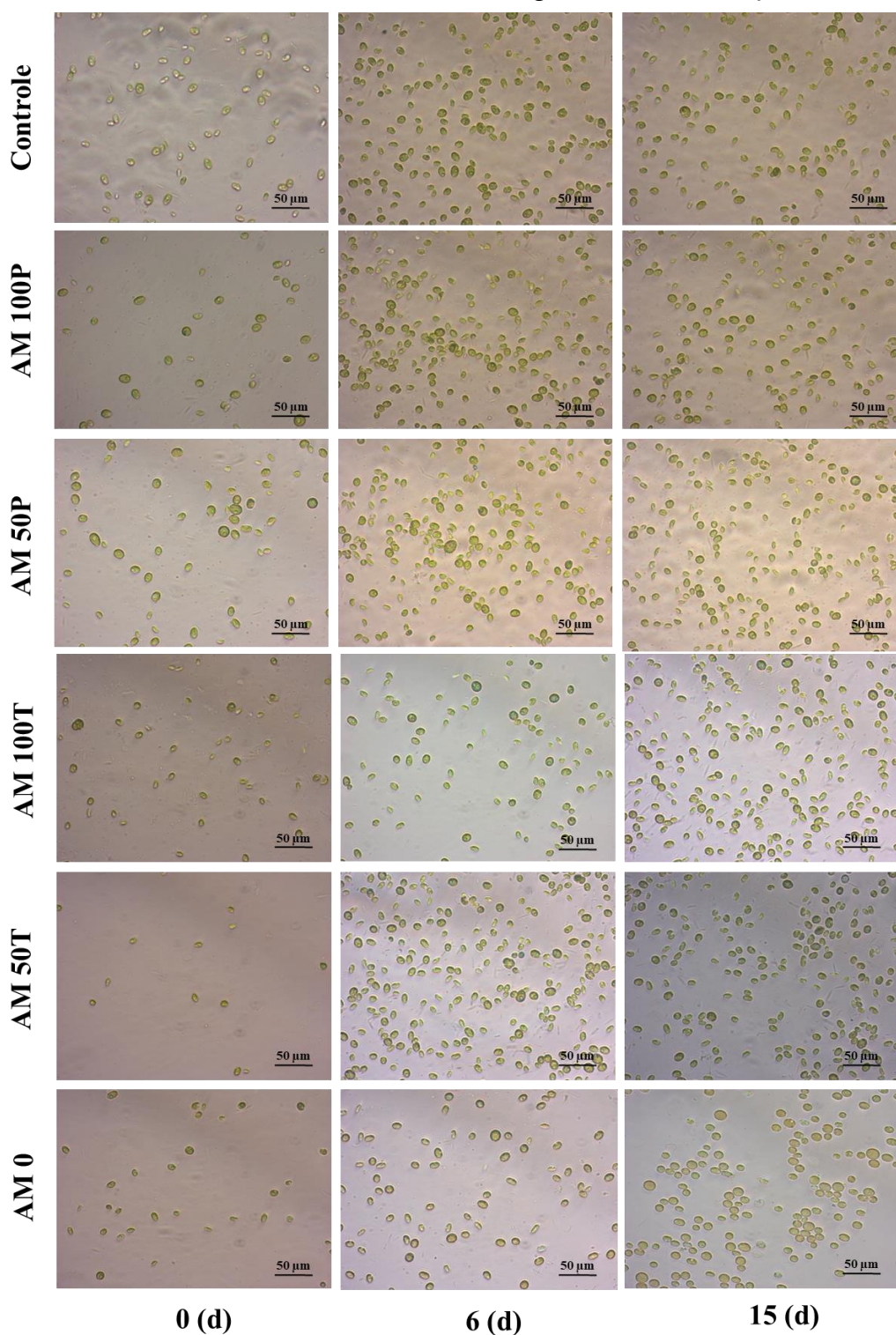
LQ: Limite de Quantificação do método. SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. Edition, 2005; <sup>1-3</sup> Água do mar suplementada com 100% (AM100), 50% (AM50) e 25% (AM25) das concentrações de nitrogênio (NaNO<sub>3</sub>), fósforo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), ferro (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e EDTA dissódico que compõem o meio de cultivo

Zarrouk

**Apêndice 2-**Morfologia das células de *Spirulina* sp. LEB 18 nos ensaios controle, AM100, AM50, AM25 e AM0 (ampliação 100 x)



**Apêndice 3** - Morfologia de *Chlorella fusca* LEB 111 dos ensaios controle, AM100P, AM50P, AM100T, AM50T e AM0. (ampliação 50x). AM100P, AM50P: com 50% (AM50P) e 100% (AM100P) das concentrações das fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), fósforo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ferro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), EDTA dissódico e ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) presentes no meio de cultivo BG11; AM100T e AM50T: AM suplementada com 100 (AM100T) e 50% (AM50T) de todos os nutrientes do meio BG11; AM0: Água do mar sem adição de nutrientes





**Apêndice 4** – Fotos dos cultivos de *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 em água do mar (AM)



*Spirulina* sp. LEB 18



*Chlorella fusca* sp. LEB 111

**Apêndice 5** - Fotos dos cultivos de *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 em água subterrânea salobra (AS)



*Spirulina* sp. LEB 18



*Chlorella fusca* LEB 111