

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

Munise Zapparoli

**ESTRESSE CELULAR PARA A PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS EM *Spirulina platensis***

Passo Fundo

2019

Munise Zaparoli

ESTRESSE CELULAR PARA A PRODUÇÃO DE
BIOCOMPOSTOS EM *Spirulina platensis*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre, sob a orientação da Profa. Dra. Luciane Maria Colla.

Passo Fundo

2019

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado “Estresse celular para a produção de biocompostos em *Spirulina platensis*”, elaborada por Munise Zapparoli, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data da defesa: 15 de Março de 2019.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Universidade Federal do Rio Grande-FURG

Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr
Universidade de Passo Fundo-UPF

Prof. Dr. Vandr e Barbosa Bri o
Universidade de Passo Fundo-UPF

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla
Orientadora

*Dedico este trabalho às pessoas que me deram apoio incondicional
para que eu alcançasse mais esta etapa em minha vida,
aos meus pais Elenir e Plínio!*

AGRADECIMENTOS

Um “Muito Obrigada” não traduz todo o sentimento que tenho pelas pessoas que estiveram comigo nesses dois anos, me apoiando em cada escolha e vibrando a cada conquista. A vocês minha eterna gratidão!

A minha família, em especial aos **meus pais e irmã**, por todos os conselhos, abraços, sorrisos, pelas malas cheias de comida e afeto, amos vocês. Ao meu amore, **Je**, obrigada por ampliar meu conhecimento em história, pelos cafés, chimarrões, abraços e conforto, e por também entender meus vários momentos de ausência, amo você, obrigada por tudo!

A pessoa que sempre me inspirou pela determinação e amor pela ciência, que me tornou mais crítica nas análises dos dados e na vida, **Prof. Lu**. Agradeço pela oportunidade de poder compartilhar todo o conhecimento e o amor pela pesquisa. A você dedico grande parte do meu crescimento pessoal e profissional, obrigada por todas as orientações e oportunidades, sou eternamente grata!

As minhas queridas ajudantes de laboratório, **Fran e Leti**. Agradeço a vocês por toda a determinação no laboratório, obrigada por aceitarem esse desafio e por colaborarem tão lindamente para com esta pesquisa. Parte dessa dissertação devo a vocês, muito obrigada!

As minhas irmãs do coração, **Rafa e Grazi**, por estarem sempre ao meu lado, desde a faculdade, incentivando e vibrando por cada conquista. Agradeço a vocês pela amizade e as conversas que fazem tão bem ao coração!

A todos os colegas do **LABIO** que de uma forma ou outra colaboraram com meu aprendizado em laboratório durante os anos de iniciação científica até o mestrado. Agradeço em especial a **Andréia e a Naiara** pelos ensinamentos durante a iniciação científica, a **Ana** que sempre esteve presente colaborando com a pesquisa e demonstrando a importância da ciência. A **Fran**, que vivenciou o mesmo sentimento do mestrado, das análises inacabáveis, da responsabilidade de assumir tão lindamente as turmas da Eng. Ambiental no estágio docente e da responsabilidade cuidar da coleção das nossas queridas microalgas. A todos que compartilharam conhecimento e as suas experiências no laboratório. Muito Obrigada!

A **Universidade de Passo Fundo**, por se tornar minha segunda casa e pela oportunidade de bolsa. Aos professores do **PPGEng** por todo o conhecimento compartilhado, a banca de projeto, qualificação e defesa final, por toda colaboração para com esta pesquisa. Muito obrigada!

*“O tempo muito me ensinou:
ensinou a amar a vida,
não desistir de lutar,
renascer na derrota,
renunciar às palavras
e pensamentos negativos,
acreditar nos valores humanos,
e a ser OTIMISTA.
Aprendi que mais vale
tentar do que recuar...
antes acreditar do que duvidar,
que o que vale na vida,
não é o ponto de partida
e sim a nossa caminhada.”*

Cora Carolina

RESUMO

As biorrefinarias à base de microalgas para a produção de biocombustíveis renováveis como o bioetanol e outros produtos químicos de alto valor receberam grande atenção como potenciais fontes de energia para o futuro, em função da necessidade de substituição da matriz energética e redução dos impactos das matérias-primas não renováveis sobre o aquecimento global e mudanças climáticas. Muitas pesquisas têm sido realizadas com microalgas devido ao seu curto tempo de geração, por serem matérias-primas abundantes e por utilizarem como fonte de energia para o crescimento a energia solar e CO₂, um dos gases do efeito estufa. Quando essas biomassas apresentam facilidade de acúmulo de carboidratos intracelulares, estes podem ser utilizados na produção de bioetanol, além de outros biocombustíveis, como o biogás e bioquerosene. A aplicação de estressores ambientais e nutricionais possibilitam mudanças nas rotas metabólicas das microalgas, fazendo com que carboidratos sejam acumulados na forma de energia, possibilitando uma melhor produtividade. Além disso, coprodutos de alto valor podem ser produzidos para melhorar a economia das biorrefinarias de microalgas. Exemplos desses produtos são os biossurfactantes. Objetivou-se aumentar a síntese de carboidratos e biossurfactantes extracelulares da microalga *Spirulina platensis* a partir de estresses nutricionais e físicos. A microalga foi cultivada em dois estágios. No primeiro estágio foi utilizado meio rico em nutrientes (Zarrouk 50%), possibilitando o crescimento da cianobactéria até o final da fase exponencial de crescimento (18° d). Para o segundo estágio, as células cultivadas foram centrifugadas e recicladas em novo meio de cultivo (Zarrouk 20%), realizando-se então a aplicação de estresses físicos (radiação UV, fotoperíodo/luminosidade, NaCl, peróxido de hidrogênio) e nutricionais (limitação e suplementação das concentrações de Ca, Fe e Mg no Zarrouk 20%). Todas as condições de estresse foram realizadas em três níveis de concentração e em duplicata, ao longo de 15 d (Estágio II). Ao final dos cultivos, foram realizadas determinações da produção intracelular de carboidratos, proteínas e biossurfactantes extracelulares. Os melhores resultados foram então selecionados para uma etapa posterior de combinação de estresses. Para isso, um delineamento fatorial 2² foi realizado. Os estresses com as maiores produtividades de carboidratos na primeira etapa do estudo com cultivos em dois estágios foram o NaCl 300 mM (10,27 mg.L⁻¹.d⁻¹), radiação UV 6 min (9,80 mg.L⁻¹.d⁻¹), limitação de Mg 0,01 g.L⁻¹ (9,75 mg.L⁻¹.d⁻¹) e fotoperíodo de 18h/06h claro/escuro com intensidade luminosa de 67,5 μmol fótons m⁻².s⁻¹ (27,84 mg.L⁻¹.d⁻¹). A quantificação de biossurfactantes a partir da redução das tensões superficiais foi identificada para todos os cultivos submetidos a suplementação de cálcio. A formação de emulsões estáveis foi verificada apenas nas condições de estresse por fotoperíodo/intensidade luminosa. A limitação de nutrientes por meio Zarrouk 20%, combinada com maiores intensidades de luz e fotoperíodo demonstrou ser uma estratégia eficiente para atingir maiores concentrações intracelulares (59,71%) e produtividades de carboidratos (55,85 mg.L⁻¹.d⁻¹) em um único estágio de cultivo.

Palavras-chave: bioetanol, biossurfactantes, *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

The production of renewable biofuel in microalgae based biorefinery have receive attention as potential energy sources for the future. The need to replace the energy matrix and reduce impacts of non-renewable raw materials on global warming and climate change increase the necessity of new renewable fuels. Studies have been conducted with microalgae due to their short growing time, plus they are abundant raw materials and use as growth energy CO₂ (greenhouse gas) and solar energy. The microalgae biomass can easily accumulate intracellular carbohydrates, which can be used in bioethanol production, biokerosene, biogas, and other biofuels. The stimulation of environmental and nutritional stress allows changes in the microalgae metabolic routes, causing carbohydrates to accumulate in energy form, increasing productivity. Also, high-value coproducts can be created to increase the economical level of microalgae biorefineries, such as biosurfactants. This study goal is to increase the synthesis of extracellular carbohydrates and biosurfactants from the *Spirulina platensis* by nutritional and physical stresses. *Spirulina platensis* was cultivated in two steps. In the first step, nutrient-rich medium (50% Zarrouk's medium) was used, allowing cyanobacteria growth until the end of the exponential growth phase (18° d). In the second step, the gowned cells were centrifuged and recycled in a new growth medium (20% Zarrouk's medium), and subjected to physical stresses (UV radiation, photoperiod/luminosity, NaCl, hydrogen peroxide), nutritional stresses (shortage or enrichment of Ca, Fe and Mg concentrations in 20% Zarrouk's medium). All stress conditions were performed in duplicate and with three concentration levels over 15 days (Stage II). At the end, intracellular production of carbohydrates, proteins and extracellular biosurfactants were analyzed. The best results were selected for a combining stress approach. Therefore, a 2² factorial design was made. The stresses with the highest carbohydrate productivities in the first stage of the two-stage culture study was 300 mM NaCl (10.27 mg.L⁻¹.d⁻¹), with UV radiation 6 min (9.80 mg.L⁻¹.d⁻¹), Mg 0.01 g.L⁻¹ (9.75 mg.L⁻¹.d⁻¹) and 18h/06h photoperiod of 67.5 μmol photons m⁻².s⁻¹ (27.84 mg.L⁻¹.d⁻¹). The biosurfactants quantification from the reduction of surface tensions was identified in all the calcium supplementation cultures. The development of stable emulsions was only verified under photoperiod/light intensity stress conditions. The nutrient restriction by 20% Zarrouk's medium, combined with higher light intensity and photoperiod shown to be an efficient strategy to achieve higher intracellular concentrations (59.71%) and carbohydrate productivities (55.85 mg.L⁻¹.d⁻¹) in a single cultivation stage.

Key-words: bioethanol, biosurfactants, *Spirulina platensis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do meio Zarrouk 50%	32
Tabela 2- Condições de estresses celulares	33
Tabela 3- Níveis reais e codificados do Delineamento Fatorial Completo 2 ²	35
Tabela 4- Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (tg) dos cultivos microalgais realizados com Zarrouk 50% no primeiro estágio e submetidos a condições de estresse nutricional ou físico no segundo estágio de produção.	41
Tabela 5- Efeitos dos estresses celulares sobre a tensão superficial no I e II estágio de cultivo	54
Tabela 6- Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e produtividades.....	56
Tabela 7- Tensões superficiais para os cultivos submetidos a diferentes fotoperíodos e intensidade luminosa no primeiro e segundo estágio de cultivo	59
Tabela 8- Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (tg) e produtividade final para os cultivos submetidos a combinação de estresses por NaCl e radiação UV.	62
Tabela 9- Composição bioquímica (carboidratos e proteínas) no tempo de 0d do segundo estágio de cultivo.	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema geral de biorrefinarias de microalgas.....	15
Figura 2- Fluxograma geral do estudo.....	31
Figura 3- Tubo de ensaio contendo emulsões A/O e O/A.....	37
Figura 4- Efeito das condições de estresse sobre o crescimento celular da <i>S. platensis</i>	39
Figura 5- Concentração de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> ao final do segundo estágio dos cultivos nos experimentos controle e com estresses nutricionais e ambientais.....	47
Figura 6-Produtividades de carboidratos e proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹) na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> ao final do segundo estágio dos cultivos nos experimentos controle e com estresses nutricionais e ambientais.....	50
Figura 7- Cultivos realizados em luminosidade de 67,5 μmol fótons m ⁻² .s ⁻¹ e variação do fotoperíodo.....	56
Figura 8- Concentrações de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> ao final do segundo estágio e respectivas produtividades em carboidratos e proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹).....	58
Figura 9- Atividade emulsificante dos extratos livres de células ao final do segundo estágio de cultivo para os ensaios submetidos a diferentes condições de luminosidade.....	59
Figura 10- Efeito das condições de cultivo sobre a curva de crescimento da <i>S. platensis</i> cultivada em meio Zarrouk 20%.....	61
Figura 11- Concentrações de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em função do tempo no segundo estágio dos cultivos nos experimentos submetidos ao planejamento fatorial completo 2 ² e o controle (níveis normais de Mg em Zarrouk 20%).....	63
Figura 12- Produtividade de carboidratos e proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹) intracelulares na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> em função do tempo no segundo estágio dos cultivos nos experimentos submetidos ao planejamento fatorial completo 2 ² e o controle (níveis normais de Mg em Zarrouk 20%).....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Biorrefinarias	14
2.1.1 Biocombustíveis	15
2.1.2 Biossurfactantes.....	16
2.2 Processos de cultivo a partir de dois estágios	18
2.3 Microalgas	19
2.3.1 <i>Spirulina platensis</i>	20
2.4 Fatores nutricionais e ambientais que influenciam na síntese de biocompostos	22
2.4.1 Estresses nutricionais	24
2.4.2 Presença de metais traços.....	25
2.4.3 Intensidade de luz e fotoperíodo.....	26
2.4.4 Estresse por salinidade.....	27
2.4.5 Radiação ultravioleta	28
2.4.6 Peróxido de Hidrogênio	29
3 METODOLOGIA	31
3.1 Microalga e condições de estresse.....	32
3.1.1 Definição das condições de estresses ambientais e nutricionais	33
3.1.2 Aplicação de estresse por mudanças de luminosidade.....	34
3.1.3 Combinação de estresses celulares	34
3.2 Determinações analíticas	35
3.2.1 Determinação do crescimento e produtividade de biomassa.....	35
3.2.2 Quantificação de proteínas e carboidratos	36
3.2.3 Determinação das atividades emulsificantes	36
3.2.4 Determinação da tensão Superficial	37
3.3 Análise dos dados.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1 Efeito das condições de cultivo no crescimento, produtividade e composição de carboidratos e proteínas	39
4.2 Efeito dos estresses nutricionais e ambientais sobre a liberação de biossurfactantes nos meios de cultivo.....	53
4.3 Efeito do aumento da intensidade luminosa e variação do fotoperíodo sobre a cinética microalgal, composição bioquímica e produção de biossurfactantes.....	55
4.4 Definição dos melhores parâmetros de cultivo para a etapa de combinação de estresses celulares	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A	84
ANEXO B	85

1 INTRODUÇÃO

As microalgas receberam grande interesse como matéria-prima para a obtenção de biocombustíveis, em resposta à crise de energia, às mudanças climáticas e à poluição atmosférica (HOSSAIN et al., 2008). Estima-se que a demanda de energia deverá aumentar 50% ou mais até 2030, logo a utilização de petróleo já não pode compensar essa demanda, visto que o consumo relatado é muito superior ao que a natureza pode fornecer (SHUBA; KIBLE, 2018).

Os processos biológicos que envolvem a produção de biocombustíveis de terceira geração tornam-se promissores pela sua capacidade em converter fotossinteticamente CO₂ em uma grande variedade de metabólitos e produtos químicos como proteínas, hidrogênio, lipídios e carboidratos (DRAGONE et al., 2011). A partir das biomassas produzidas pode-se produzir o bioetanol, obtido através da sacarificação dos carboidratos (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012), antioxidantes, lipídios para a obtenção de biodiesel (HO et al., 2013), pigmentos (LIRA et al., 2012), biossurfactantes (RADMANN et al., 2015), podendo ainda suprir a deficiência proteica na nutrição humana (LUPATINI et al., 2016).

Os biossurfactantes são conhecidos por apresentarem em sua estrutura química porções hidrofílicas e hidrofóbicas, permitindo-lhes a redução da tensão superficial e atividade emulsificante (COLLA; COSTA, 2003). Dessa forma possuem aplicações em diferentes áreas industriais como na indústria farmacêutica, de cosméticos, de limpeza, de higiene pessoal, na produção alimentícia, na área de proteção ao meio ambiente e na agricultura (BANAT et al., 2010).

Embora haja um grande número de estudos acerca do uso de microalgas no contexto de biorrefinarias, a produção concomitante de carboidratos e biossurfactantes em cultivos microalgais, como biocompostos de interesse, ainda não foram avaliadas. Sabe-se que a produção de bioetanol a partir de microalgas ainda não é um processo competitivo economicamente, necessitando de estudos para a resolução dos gargalos de produção, que envolvem o cultivo com meios que permitam a obtenção de elevadas concentrações celulares, mas também com altas concentrações de carboidratos intracelulares (HO et al., 2014).

Em relação aos biossurfactantes para uso no meio ambiente, os custos dos bioprocessos ainda não compensam a substituição dos surfactantes químicos, para as mais diversas aplicações (SILVA et al., 2017). Assim, a avaliação da produção concomitante de biossurfactantes e carboidratos nos cultivos microalgais pode ser uma forma de aproveitamento total do bioprocessos, contribuindo para a viabilização de ambos os processos.

A fim de aumentar as concentrações de carboidratos intracelulares nos cultivos microalgais, bem como para ocasionar a produção de biossurfactantes intra ou extracelulares nas células, pode-se utilizar como técnica a aplicação de estresses ambientais e nutricionais, os quais ocasionam a modificação da composição química celular e das rotas metabólicas das microalgas, podendo promover a síntese de biocompostos de interesse (CHEN et al., 2017).

Durante a aplicação de estresses, o fluxo de carbono fotossintético nas células das microalgas canaliza a energia metabólica para sintetizar vários compostos ricos em energia, sendo os carboidratos e os lipídios os principais produtos de armazenamento nestas condições. Estes compostos ricos em energia podem ser usados pelas células em condições adversas a sua sobrevivência (CHOKSHI et al., 2015). Além disso, muitos dos estresses ambientais desencadeiam na formação de espécies reativas de oxigênio, que induzem o estresse oxidativo, causando danos às moléculas celulares (SUZUKI et al., 2012). Em resposta a este estresse, as microalgas são capazes de mediar defesas anti-oxidativas através de várias enzimas, como o ascorbato peroxidase (APX) (TANAKA et al., 2011). Esses mecanismos por sua vez, estimulam a biossíntese de compostos, como armazenamentos ricos em energia (BEER et al., 2009).

Os estresses nutricionais e ambientais podem influenciar também a produção de biossurfactantes (MEHDI et al., 2011; BANAT et al., 2010), visto que estes estão presentes na forma de lipídios intracelulares (SCHMITZ et al., 2015), podendo facilitar os processos de extração pela mudança na composição dos compostos de parede celular que controlam a permeabilidade das células.

Este estudo colaborou com a temática de biorrefinarias de microalgas, vinculada à linha de pesquisa em Infraestrutura Sustentável do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (PPGEng), com o propósito de desenvolver projetos que tornem viáveis o uso de biocombustíveis de terceira geração.

Desta forma, objetivou-se estimular a síntese de carboidratos intracelulares e biossurfactantes extracelulares a partir da microalga *Spirulina platensis* cultivada a partir de condições de estresse celular, num contexto de biorrefinarias. Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar se estressores ambientais e nutricionais afetam o acúmulo de carboidratos, proteínas, crescimento microalgal e produção de biossurfactantes extracelulares;
- b) Potencializar a produção dos biocompostos através da utilização das cepas selecionadas através das condições de estresse celular;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinarias

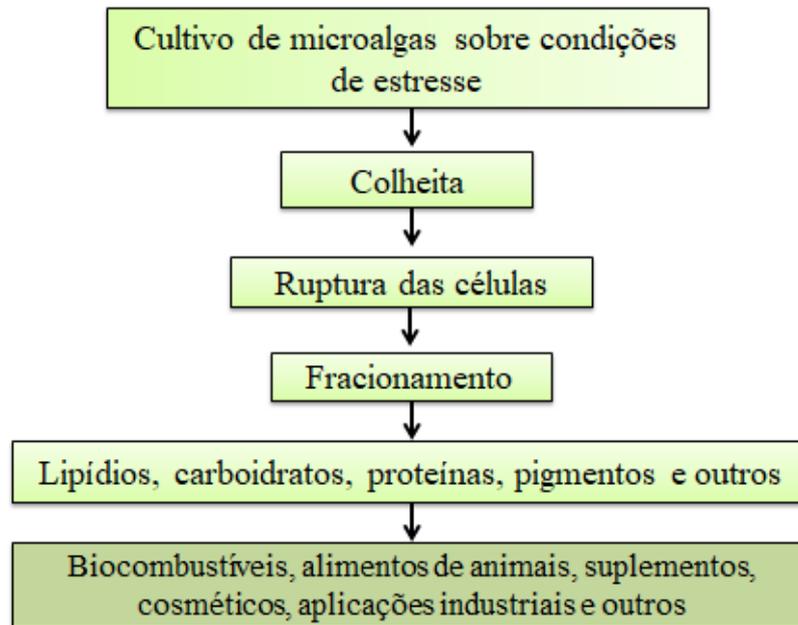
Biorrefinaria é um processo para a obtenção de biocombustíveis, energia e produtos de alto valor através da transformação da biomassa e equipamentos do processo. O conceito é uma maneira promissora de mitigar a emissão de gases do efeito estufa, já que as emissões geradas pelos combustíveis fósseis contribuem fortemente para o aquecimento global (JUAN et al., 2011).

As abordagens das biorrefinarias consistem na produção de uma ampla gama de biocombustíveis e produtos químicos através do uso de várias tecnologias de forma econômica e sustentável. O conceito não é novo, no entanto, contribui para tornar a produção de biocombustíveis economicamente viáveis (GOUVEIA, 2011). O objetivo é utilizar ao máximo o potencial das microalgas de forma semelhante às refinarias de petróleo, em que o mesmo é fracionado em combustíveis e uma ampla variedade de produtos de maior valor agregado (GUNERKEN et al., 2015), otimizando o uso de recursos e minimizando os resíduos, maximizando assim os benefícios e a lucratividade.

A produção de biomassa de microalgas com base em biorrefinarias inclui as seguintes etapas: cultivo de microalgas, colheita da biomassa, ruptura de células, extração de compostos, seguido do fracionamento e purificação (MARKOU; NERANTZIS, 2013), conforme indicado na Figura 1. Destes processos, o fracionamento é apontado como um dos principais gargalos, devido à dificuldade em separar diferentes frações sem danificar o produto (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

O potencial das biorrefinarias de microalgas para a produção de produtos de alto valor vem sendo avaliada (CHEW et al., 2017). Um exemplo é o estudo realizado por Nobre et al. (2013) em que a microalga *Nannochloropsis* sp. foi utilizada em um contexto de biorrefinaria, sendo matéria-prima de biomassa para a produção de ácidos graxos para biodiesel, bio-hidrogênio e compostos de alto valor agregado.

Figura 1- Esquema geral de biorrefinarias de microalgas



Fonte: adaptado de Markou e Nerantzis, 2013.

2.1.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis fornecem benefícios ambientais devido à diminuição das emissões nocivas de CO₂, hidrocarbonetos, partículas e a eliminação das emissões de SO_x, com consequente redução do efeito estufa. Além disso, em relação aos combustíveis fósseis, a queima de biocombustíveis acrescenta menos carbono ao meio, já que o carbono liberado por esta ação já existe como parte do ciclo de carbono (POPP et al., 2014).

A produção de biocombustíveis ocorre através de várias matérias-primas renováveis, tais como o óleo comestível (por exemplo, óleo de palma), o óleo não comestível (por exemplo, jatropha) e biomassa lignocelulósica (por exemplo, madeira). As diferentes matérias-primas são utilizadas por diversos países e regiões. A classificação se dá com base nos tipos de matéria-prima utilizada e na disponibilidade atual/futura, sendo categorizados em biocombustíveis de 1º geração, 2º geração e 3º geração. As culturas de primeira geração são produzidas a partir de açúcares, grãos e sementes. Essas formas de produção são as mais avançadas e estão comercialmente disponíveis, devido a grande utilização da cana de açúcar em países tropicais (ACHEAMPONG, 2017).

As tecnologias de segunda geração que utilizam matérias-primas lignocelulósicas são mais flexíveis e eficientes em termos energéticos, como a biomassa de resíduos agrícolas e

florestais, bem como outras matérias-primas como árvores, palha, bagaço. Ao contrário dos biocombustíveis de primeira geração, os de segunda geração não utilizam apenas grãos ou açúcares, mas a planta inteira, o que significa maiores rendimentos por hectare de terra (SENAUER, 2008).

Os biocombustíveis de terceira geração baseiam-se na produção de biomassa, visto que algas e outras matérias-primas são utilizadas. As microalgas são cultivadas para atuar como matéria-prima de alta energia, sendo totalmente renovável. Espera-se que estas tenham potencial para produzir mais energia por hectare de terra do que culturas convencionais como o milho e a cana-de-açúcar (CHISTI, 2007). Além disso, as culturas de microalgas tem potencial para serem usadas como produtores primários de biomassa nos próximos anos, podendo atuar como matéria-prima para vários combustíveis renováveis, como bioetanol, metanol, biodiesel, metano e hidrogênio. Das três gerações de biocombustíveis, culturas alimentares, não alimentares e biocombustíveis de microalgas, as microalgas representam ser a melhor fonte de estoque em termos de segurança alimentar e para reduzir o impacto sobre o meio ambiente (TANDON; JIN, 2017).

Os biocombustíveis de microalgas são considerados promissores para a produção fermentativa de álcoois, principalmente o etanol, devido à composição da parede celular e de sua capacidade de acumular reservas de amido. A partir de alguns processos, o amido pode ser convertido em açúcares simples sendo utilizado como fonte primária de carboidratos (LI et al., 2015).

Os processos de conversão da biomassa em biocombustíveis podem ocorrer de duas formas: conversão bioquímica e termoquímica (PROBANDONO; AMIN, 2015). Segundo Medipally et al. (2015), a conversão bioquímica pode ser usada para a produção de metanol a partir da digestão anaeróbica e de etanol a partir da fermentação. Enquanto os processos de conversão termoquímica podem ser usados em processos de pirólise para a obtenção de bio-óleo e carvão vegetal, ou na gaseificação para a produção de gás combustível, ou ainda na liquefação para a obtenção de bio-óleo. Além disso, processos termoquímicos utilizam calor para decompor componentes orgânicos na biomassa, já na conversão bioquímica utilizam-se microrganismos para produzir os biocombustíveis da microalga (TAN et al., 2015).

2.1.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de microrganismos, apresentando diferentes estruturas químicas e propriedades surfactantes (CALVO et al.,

2009). Dentre os produtores de biossurfactantes encontram-se as bactérias, leveduras, fungos filamentosos (OLIVEIRA, 2010) e microalgas (COSTA; MORAIS; ANDRADE, 2013). Os biossurfactantes produzidos podem ser excretados extracelularmente no meio de cultivo ou podem permanecer na membrana celular durante a fase de crescimento celular (DESAI; BANAT, 1997).

A produção dos biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida, seja pela adição de compostos lipídicos como indutores, variações de pH, temperatura, aeração e agitação, ou ainda condições que gerem estresses, como baixas concentrações de nitrogênio (ÚBEDA, 2004) e outros. Dentre as vantagens do uso destes compostos destacam-se as baixas toxicidades, e alta biodegradabilidade (PANIAGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; MORALES-GUERREIRO, 2014).

Os biossurfactantes de origem algal possuem natureza lipídica, sendo classificados como glicolipídios, fosfolipídios, lipopéptidos, lipídios naturais, ácidos graxos, e lipopolissacarídeos. Estes produtos bioativos metabólicos são aplicáveis em uma série de indústrias e processos, como no processamento de alimentos, farmacologia e biorremediação de ambientes poluídos por petróleo e metais (PANIAGUA-MICHEL; OLMOS-SOTO; MORALES-GUERREIRO, 2014).

A composição lipídica das microalgas é composta por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos, podendo conter entre 12 e 22 carbonos, dividindo-se em saturados, mono ou poliinsaturados. Nas microalgas, os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poliinsaturados representam entre 25% e 60% dos lipídios totais. Os lipídios microalgais podem ser classificados em lipídios neutros e polares, sendo polares os glicolipídios e fosfolipídios, muito semelhantes as estruturas dos biossurfactantes (SCHMITZ et al., 2015).

Uma grande vantagem de cultivar microalgas para a produção de biossurfactantes é que muitos dos microrganismos produtores se enquadram na categoria geral reconhecida como segura (GRAS). Logo, estes microrganismos não apresentam riscos de toxicidade ou patogenicidade, podendo ser utilizados para diversas aplicações (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

A produção de biossurfactantes por microalgas foi relatada por Carvalho (2014). Neste trabalho testou-se a potencialidade surfactante de duas cepas da *Spirulina* sobre a influência das concentrações de fósforo e nitrogênio. As concentrações de nitrogênio e fósforo não tiveram influência significativa na resposta. Os resultados foram favoráveis à pesquisa tanto

dos extratos microalgais como das nanoemulsões obtidas, apresentando potencialidade de uso em diversos processos industriais.

Radmann et al. (2015) demonstraram o cultivo de microalgas para a produção de biossurfactantes. As cepas de cianobactérias *Spirulina platensis* LEB 18 e *Synechococcus nidulans* LEB 25 e as cepas de *Chlorella minutissima* LEB 108, *Chlorella vulgaris* LEB 106 e *Chlorella homosphaera* foram investigadas em cultivos autotróficos e mixotróficos. Verificou-se ao final do estudo reduções das tensões superficiais iniciais, sendo a *Spirulina platensis* LEB 18 a apresentar a menor redução, 38% atingindo tensão de 43 mN.m^{-1} .

2.2 Processos de cultivo a partir de dois estágios

Um dos maiores problemas encontrados em relação à produção de bioetanol são as condições ideais necessárias para se atingir um alto teor de carboidratos, o que aliado a condições de estresse como técnica para o aumento dos teores de carboidratos resulta em baixas taxas de crescimento e baixas produções de biomassa.

Abordando esse problema, os processos de cultivo por dois estágios fornecem diferentes condições de crescimento e acumulação de compostos, a partir de um meio rico em nutrientes sendo usado para obter a produtividade máxima no primeiro estágio. No segundo estágio as condições de cultivo são alteradas para submeter às células a estresses como exemplo a depleção de nitrogênio, adição de sais ou outros, estimulando assim a acumulação de compostos de interesse (HO et al., 2014; ZHU, 2015), como os carboidratos.

O processo de cultivo em dois estágios foi avaliado por Jiang (2011) que investigou a viabilidade de integração usando água do mar e águas residuárias e 15% de aeração de CO_2 . Em seguida o acúmulo de lipídios foi testado por meio de processos em duas fases sob exposição a altas temperaturas e privação de nitrogênio. Os resultados demonstram aumento no crescimento celular e do teor de lipídios.

Wang et al. (2016) testaram o aumento da produtividade lipídica com uma cultura heterotrófica em dois estágios alimentados por *Chlorella protothecoides* e um ensaio de reciclagem de CO_2 acoplado como processo autotrófico. Segundo os autores o estudo foi bem sucedido tendo o conteúdo lipídico aumentado pela estratégia de abastecimento de oxigênio em dois estágios combinando com a inibição de nitrogênio no processo heterotrófico.

Os cultivos contínuos em duas fases têm sido bem relatados também no desenvolvimento de produtos, como por exemplo, na dieta ou alimentos saudáveis como proteínas e vitaminas, no desenvolvimento de cosméticos para o cuidado da pele e também

para produtos farmacêuticos para aumentar a imunidade e na prevenção de câncer (ZHU, 2015).

Comparando um único estágio de cultivo e dois estágios de cultivo, Pancha et al. (2015) relataram que o segundo estágio não demonstra muito retardamento na produção de biomassa celular, sugerindo que a técnica de cultivo em dois estágios é uma ferramenta apropriada para produzir altos teores de carboidratos e lipídios, sem comprometer a produção de biomassa.

2.3 Microalgas

As microalgas são organismos fotossintetizantes unicelulares e multicelulares, podem ser procariontes (cianobactérias) ou eucariontes, e possuem poucos requerimentos para seu crescimento, quando comparadas a outras fontes de biomassa (ANDRADE et al., 2008). Em condições naturais de crescimento, as algas fotoautotróficas absorvem a luz solar, assimilam o dióxido de carbono do ar e os nutrientes de ambientes aquáticos (BRENNAN; OWENDE, 2010). Possuem capacidade de se adaptar a diversos ambientes, podendo ajustar ou alterar sua estrutura interna para excretar diversos compostos, podendo ainda assumir vários tipos de metabolismos, sendo capazes de mudanças metabólicas como respostas a mudanças nas condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As microalgas são capazes de crescer em terras não cultiváveis, como praias, terras salinas e até mesmo desertas, além de apresentarem potencial na remoção de nutrientes, metais tóxicos e toxinas químicas e orgânicas de águas residuais (CHEN; ZHAO; QI, 2015), além de se destacarem por serem efetivas na fixação de carbono.

Para a indústria, as microalgas são de grande interesse por apresentarem importantes ácidos graxos os quais apresentam aplicações na indústria de aquicultura, ração animal e também como antioxidantes (BOROWITZKA et al., 2013), além de apresentarem grande interesse como fonte alternativa aos biocombustíveis.

Durante a fotossíntese, utilizando apenas luz e nutrientes, as algas produzem lipídios, proteínas, carboidratos e outros produtos de valores agregados. As quantidades desses produtos metabólicos estão diretamente ligadas as condições ambientais como intensidade de luz solar, níveis de CO₂, pH, temperatura e de nutrientes disponíveis, como os macronutrientes que incluem nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio e magnésio e os micronutrientes, como ferro, manganês, cobalto, zinco, boro e molibdênio (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013).

Nos sistemas naturais e de engenharia, as algas podem ser expostas a uma variedade de condições ambientais que afetam a taxa de crescimento e a composição celular (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013). Compreender como esses processos influenciam o crescimento das algas e suas funções metabólicas são importantes para o aumento da produção em sistemas comerciais.

A produção de biocombustíveis pode ser alcançada por uma ampla variedade de espécies de microalgas com alto potencial em produzir fontes de energia diversificadas, como etanol, álcoois, biodiesel, triglicerídios, ácidos graxos, carboidratos, celulose e biomassa. Destas por exemplo, em peso seco de *Spirulina* tem 60%-71% m/m de proteínas, espécies de *Porphyrium cruentum* possuem 40%-57% p/p de carboidratos e espécies de *Schizochytrium* possuem 50%-77% m/m de lipídios (RAZEGHIFARD, 2013).

As vantagens encontradas nas culturas de microalgas são as fáceis condições de cultivo, rápido crescimento, tolerância a altos teores de CO₂, redução da liberação de óxido nitroso do ar, produção de altos teores de lipídios e carboidratos em comparação com as plantas de cultivo, redução da escassez no uso de alimentos e produção de muitos derivados biológicos de valor agregado. Dentre as desvantagens encontram-se as baixas concentrações de biomassas, penetração da luz em culturas densas devido ao sombreamento das células, e falta de estudos sobre a reciclagem da água, dos meios e da energia usando cálculos de pegada ambiental (TANDON; JIN, 2017).

2.3.1 *Spirulina platensis*

A *S. platensis* é uma cianobactéria filamentosa (alga azul-verde), com alto teor proteico e nutritivo. Em virtude dessas características, ela pode ser utilizada no tratamento de certas doenças, sendo uma alternativa para a produção de alimentos funcionais e nutracêuticos (COLLA; BERTOLIN, COSTA, 2004) e também para a produção de energia, a partir dos biocombustíveis. As condições ótimas de crescimento incluem meios alcalinos (pH 8,5-11,0), ambiente salino (>30 kg.m⁻³), alta luminosidade e temperaturas entre 35°C e 40°C (HABBIB et al., 2008).

Enquanto que outras microalgas são conhecidas por possuírem altos teores de carboidratos iniciais como a *Porphyridium cruentum* (40-57%) e *Scenedesmus dimorphus* (21-52%) a *S. platensis* é conhecida por suas altas produtividades de biomassa (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010) e rápido crescimento (HASUNUMA et al., 2013), em relação a outras microalgas.

A composição da *S. platensis* em base seca foi definida por Azevedo (2012) como sendo 60-71% de proteínas, 13-16% de carboidratos, 6-7% de lipídios e 3-4% de ácidos nucleicos. Embora esta composição tenha sido definida, alguns estudos demonstram o potencial da *S. platensis* em acumular carboidratos, como o desenvolvido por Margarites (2014) que realizou a produção de etanol a partir de biomassa de *Spirulina* sp., apresentando produtividade de 1,18 g.L⁻¹.h⁻¹ de etanol, utilizando 50% dos carboidratos provindos da sacarificação da biomassa e 50% a partir da glicose.

Muliterno et al. (2005) estudaram um cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada a partir da adição de uma fonte orgânica de carbono (glicose), utilizando diferentes luminosidades, diluição do meio e concentração de glicose. As maiores concentrações celulares (5,38 g.L⁻¹) foram obtidas com a adição de 0,5 g.L⁻¹ de glicose ao meio de cultivo, intensidade luminosa de 3000 lux e diluição de 75% do meio Zarrouk.

Como alternativa para aumentar o teor de carboidratos em *S.platensis*, Salla et al. (2016) cultivaram a microalga em meio Zarrouk diluído com a adição de resíduos da indústria láctea em processos descontínuo simples e descontínuo alimentado. Este estudo demonstrou elevados teores de carboidratos quando operado no modo descontínuo alimentando, propiciando um aumento na produtividade de carboidratos, a qual chegou a 60 mg.L⁻¹.d⁻¹.

Magro (2016) desenvolveu o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em *raceways* para a obtenção de matéria-prima para produção de bioetanol, tendo como foco o acúmulo de carboidratos através de limitação de nutrientes. O cultivo realizado em *raceways* com volume de 250L atingiu a concentração de biomassa na fase estacionária de 1,10±0,004 g.L⁻¹, atingindo produtividade de carboidratos de 0,100±0,003 g.L⁻¹.d⁻¹.

Schmitz et al (2015) utilizaram lipídios microalgais como fonte de biossurfactantes em processos de biorremediação de solos contaminados com diesel e biodiesel. Neste trabalho, os lipídios da microalga *Spirulina platensis* foram extraídos e adicionados em solos contaminados com 4% de contaminante. Os resultados da pesquisa demonstraram o potencial dos biossurfactantes microalgais nos processos de biorremediação, obtendo-se 81,9% de biodegradação do biodiesel e 81,7% do diesel com a adição do biossurfactante, resultado superior quando comparado aos ensaios de atenuação natural (54,36% e 30,09%).

2.4 Fatores nutricionais e ambientais que influenciam na síntese de biocompostos

Embora as taxas de crescimento e composição celular variem de acordo com as espécies, a maioria dos relatos concorda que as microalgas podem crescer rapidamente, porém gerando uma pequena quantidade de carboidratos, em condições favoráveis ao crescimento. Por esse motivo, esses compostos só começam a ser sintetizados em maiores quantidades em condições de estresse físico ou químico como luminosidade, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, salinidade e concentrações metais traços (HU et al., 2008), entre outras.

Os fatores de cultivo ou ambientais são uma abordagem acessível para a manipulação da composição dos carboidratos de microalgas (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Uma hipótese é a de que ao inibir a divisão celular a partir da presença de estressores, a síntese de carboidratos torne-se maior por não ser utilizada como demanda de energia (BRÁNYIKOVÁ et al., 2010).

Sabe-se que as microalgas necessitam além da energia solar e CO₂, nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e outros para seu crescimento. Se um nutriente é limitado ou omitido do meio de cultivo, as microalgas mudam suas estratégias metabólicas, resultando em uma alteração na composição da biomassa, a qual geralmente esta relacionada ao acúmulo de carboidratos ou lipídios (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012) e a uma redução do conteúdo proteico. Se o fornecimento de nitrogênio, por exemplo, for limitado, os processos de fotossíntese podem continuar, mas os compostos ricos em nitrogênio como os pigmentos, carotenoides tenderão a diminuir, sendo aumentada a porção mais rica em energia, como os carboidratos (BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016).

A acumulação de carboidratos ocorre a partir da fixação de CO₂ durante a fotossíntese, este processo utiliza ATP/NADPH para fixar e converter o CO₂ capturado do ar para produzir glicose e outros açúcares através de uma via metabólica conhecida como Ciclo de Calvin (SUKENIK, 1991). Existem dois tipos principais de reações fotossintéticas, as reações na presença e ausência de luz. Nas reações com a presença de luz, a energia solar é absorvida pelos pigmentos gerando energia (NADHP e ATP). Nas reações escuras, o CO₂ é reduzido a carboidratos pelo ciclo de Calvin, usando a energia derivada de NADPH e ATP. No ciclo de Calvin, o primeiro passo é a assimilação do CO₂, catalisado pela Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase. O CO₂ é usado para a carboxilação de um composto de cinco carbonos (ribulose 1,5-bifosfato) em dois compostos de três carbonos (3-fosfoglicerato), um dos quais é usado como substrato para a formação de carboidratos, e outro para a realização do próximo ciclo (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

Os carboidratos algais consistem principalmente de glicose, amido, celulose e vários tipos de polissacarídeos. Dentre estes, a glicose e o amido são utilizados para a produção de biocombustíveis como o bioetanol e o biohidrogênio, enquanto que os polissacarídeos possuem funções biológicas como armazenamento e proteção das moléculas (AIKAWA et al., 2012).

Como mencionado, muitos estudos abordam o uso de estressores ambientais e nutricionais para a acumulação de produtos alvos. A maioria dos estudos aborda a produção de lipídios e em segundo de carboidratos. Já a aplicação de biossurfactantes de microalgas a partir de estresses celulares não foi muito evidenciada na literatura. Alguns destes estudos são demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1- Condições de estresse que viabilizam a produção de biocompostos em microalgas e cianobactérias

Microalga	Condição de estresse	Produto alvo	Referência
<i>S. obliquus CNW-N</i>	Luminosidade	Carboidratos	Ho et al. (2012)
<i>Spirulina platensis</i>	-	Biossurfactantes	Carvalho (2014); Radman et al. (2015)
	Limitação de fósforo	Carboidratos	Markou, Chatzipavlidis e Georgakakis (2012a)
	Intensidade de luz e concentrações de nitrato	Glicogênio	Aikawa et al., (2012)
	Limitação de nitrogênio	Glicogênio e biofloculação	Depraetere et al. (2015)
<i>Scenedesmus sp. CCNM 1077</i>	Salinidade	Carboidratos e lipídios	Pancha et al. (2015a)
	Limitação de nitrato		Pancha et al. (2015b)
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Salinidade	Carboidratos e lipídios	Chokshi et al. (2017)
	Temperatura		Chokshi et al. (2015)
<i>Chorella vulgaris</i>	Limitação de N, P, S e presença de cicloheximida (antibiótico)	Carboidratos	Brányiková et al. (2010)
<i>Aphanothece microscopica Nägeli</i>	Fotoperíodo	Produção de biomassa e fixação de Carbono	Jacob-Lopez et al. (2009)

Para aumentar a viabilidade econômica das microalgas na produção de biocombustíveis e biosurfactantes é preciso uma melhor compreensão sobre o comportamento das microalgas sobre condições de estresse vinculado aos acúmulos de carboidratos. Desta forma, os efeitos dos diferentes estresses ambientais em microalgas são abordados a seguir.

2.4.1 Estresses nutricionais

As estratégias de limitação de nutrientes têm sido consideradas apropriadas para a produção de microalgas ricas em carboidratos. Tais técnicas tornam-se viáveis pelo fácil controle de nutrientes no meio de cultivo (DRAGONE et al., 2011). A otimização da concentração de nutrientes pode ocorrer de duas formas, por um lado ela suporta uma produção adequada, e por outro atua como fator limitante para controlar a composição da biomassa (MARKOU et al., 2012).

O nitrogênio, por exemplo, é considerado um nutriente chave, possuindo efeito significativo no crescimento e metabolismo das algas (AL-RASHED et al., 2016), porém a limitação deste nutriente é um mecanismo natural no qual as microalgas podem alterar o metabolismo em resposta ao estresse desta limitação (CHEN et al., 2017).

Em geral, a taxa de crescimento de algas é proporcional à taxa de absorção do nutriente mais limitante em condições ideais de temperatura e pH, sendo geralmente descrita pela equação de Michaelis-Menten (TITMAN, 1976). O nitrogênio é um elemento fundamental para a formação de proteínas e ácidos nucleicos, sendo uma importante via de energia. Já o fósforo faz parte do DNA e do RNA sendo componente chave dos fosfolipídios.

A limitação destes nutrientes essenciais muda as rotas metabólicas do organismo. O princípio geral destas mudanças é o de que quando não houver nitrogênio suficiente para a síntese proteica necessária para o crescimento, o excesso de carbono da fotossíntese seja canalizado para moléculas de armazenamento, como triglicerídeos ou amido (SCOTT et al., 2010).

A limitação de nitrogênio pode causar um aumento no teor de lipídios e carboidratos de microalgas, provocando uma queda no teor de proteínas e clorofila, sugerindo que as microalgas podem degradar clorofila e proteínas como sendo uma fonte de nitrogênio, enquanto transformam seus esqueletos de carbono em lipídios e carboidratos, em resposta ao estresse externo (SUN et al., 2014).

O efeito da limitação de fósforo sobre a composição da biomassa microalgal também é simultânea ao acúmulo de carboidratos. Sabe-se que os carboidratos começam a serem acumulados quando a concentração de fósforo intracelular mínima é atingida, conforme evidenciado por Markou, Chatzipavlidis e Georgakakis (2012) que descobriram que uma concentração de 1,82 mg de fósforo por g de biomassa seca é a quantidade ideal para a máxima produção carboidratos.

O efeito da limitação de nitrogênio (20 mg.L^{-1}) utilizando a *S. platensis* foi estudado por Depraetere et al. (2015) para verificar a viabilidade de colheita da biomassa a partir da sedimentação espontânea. Os resultados demonstram elevados teores de carboidratos ($74 \pm 3\%$) e nenhuma diferença significativa nas taxas de crescimento da microalga, sendo também verificada uma relação espontânea entre o aumento dos teores de carboidratos e as eficiências de sedimentação.

Alterações no perfil metabólico da *S. platensis* foram avaliadas por HASUNUMA et al. (2013), indicando a possibilidade de que na falta de nitrato, os aminoácidos liberados pelas proteínas são assimilados noutros metabólitos, como o glicogênio. Este estudo foi realizado sobre a privação de nitrogênio, o qual apresentou conteúdo de glicogênio aumentado para 63% do peso seco de células. O conteúdo proteico reduziu 15,4%, não apresentando redução significativa na densidade celular ao longo das 72h de cultivo, em relação aos ensaios na presença de nitrogênio.

2.4.2 Presença de metais traços

Metais traços como magnésio, ferro, cobre, cálcio e manganês são muito importantes para o mecanismo celular das microalgas, fotossíntese, divisão celular, respiração transporte intracelular, biossíntese de proteínas e lipídios (WAN et al., 2014).

Dependendo do estado de oxidação, os metais podem ser tóxicos para a maioria dos organismos. Os efeitos dos metais tóxicos estão relacionados, em partes, ao estresse oxidativo induzido em sistemas vivos, podendo promover danos oxidativos e por consequência aumentando diretamente a concentração celular de espécies reativas de oxigênio (PINTO et al., 2003).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo levar a mutagênese celular. Isso acontece porque a produção das ERO constituem uma ameaça grave para os organismos fotossintéticos, uma vez que uma fonte comum de oxigênio é a redução de um único elétron de oxigênio molecular por cadeia de

transporte de elétrons. Logo, maiores danos são causados as células fotossintéticas devido às mitocôndrias, cloroplastos serem compartimentos altamente suscetíveis a lesões oxidativas.

A fim de verificar o efeito causado por metais tóxicos no crescimento de microalgas, Belokobylsky et al. (2004) submeteram a microalga *Spirulina platensis* ao crescimento com a presença de Se (VI) e Cr (III) concluindo que ambos os metais afetaram o crescimento da biomassa, porém sem alterar sua morfologia e o conteúdo proteico.

O efeito das concentrações de metais, individualmente e em combinação sobre as microalgas ainda é pouco explorada, em vista disso Singh et al (2016) investigaram os efeitos combinados da limitação de nitrogênio e concentrações selecionadas de metais (Ferro, Magnésio e Cálcio) na produtividade da *Acutodesmus obliquus*, sob condições limitadas de nitrogênio. Os resultados demonstram que o estresse por metais combinados pode aliviar a restrição da baixa produção de biomassa.

Wan et al. (2014) avaliaram o efeito do ferro sobre o crescimento, acumulação de lipídios e perfil da expressão genética da microalga *Chlorella sorokiniana*. Os resultados apresentam aumento das densidades celulares finais em quase duas vezes, e a concentração de lipídios aumentou de 12% para 33% na adição do ferro, o rendimento de lipídios chegou a 179 mg/L.

O acúmulo de lipídios também foi testado por Ren et al. (2014) porém com *Scenedesmus* sp. a partir da adição de íons metálicos e EDTA. Da mesma forma que demonstrado em outras pesquisas, a adição de íons metálicos demonstrou ser benéfica para a acumulação de lipídios, sendo verificado aumento de 29,7% na produtividade lipídica, em relação ao controle.

2.4.3 Intensidade de luz e fotoperíodo

A intensidade de luz e o fotoperíodo desempenham papel importante no crescimento e distribuição das algas. Sob alta intensidade luminosa, alguns complexos são frequentemente confrontados, em razão do excesso de energia de excitação. Esses complexos resultam em uma adaptação evolutiva das microalgas para maximizar a absorção de luz para que elas sobrevivam em ambientes de pouca luz. Isso ocorre em função da danificação no aparelho fotossintético, levando a uma densidade celular reduzida de culturas microalgais por ação da penetração insuficiente de luz nas partes internas do meio de cultivo (CHUNG; LEE; CHUNG, 2017).

As espécies reativas de oxigênio possuem efeito em organismos fotossintéticos a partir de iluminação excessiva, isso ocorre devido à entrada excessiva de energia aumentar os níveis de moléculas excitadas, oxidando as moléculas. É importante ressaltar que a iluminação excessiva pode resultar em uma diminuição da produção de biomassa e posteriormente, uma redução de pigmentos de alto valor (HE et al., 2015).

Os regimes de luz são considerados fatores importantes na produtividade e rendimento das reações fotossintéticas. Um estudo visando a comparação de diferentes fotoperíodos foi realizada por Jacob-Lopez et al. (2009) para avaliar a produção de biomassa e a fixação de carbono da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em fotobiorreatores de colunas de bolhas. A pesquisa foi conduzida por meio de alterações no fotoperíodo a cada 2h. Valores máximos de 5,100 g de biomassa.L⁻¹ e 1440 gCO₂.L⁻¹.d⁻¹ foram obtidos para a concentração máxima de células e taxa de fixação de dióxido de carbono, respectivamente, sob regime de luz contínua. A redução do desempenho foi evidenciada em função da duração do regime de luz, com exceção do período de 12h/12h (claro/escuro).

Cabe ressaltar ainda, que além das mudanças nas taxas de crescimento de biomassa e fixação de CO₂, a biomassa formada em cada condição de fotoperíodos pode ter uma composição bioquímica diferente. Em condições de períodos de luz limitadas, microalgas cultivadas fotoautotróficamente, assimilam preferencialmente o carbono para a síntese de aminoácidos e outros constituintes celulares essenciais. Enquanto que sobre condições de luz saturada, açúcares e amidos são formados através da via de redução de fosfato de pentose (ZAK et al., 2001).

2.4.4 Estresse por salinidade

A salinidade é amplamente usada para induzir o estresse em microalgas. Se o estresse por salinidade for utilizado para estimular o acúmulo de biocompostos e a taxa de crescimento for satisfatória, a estratégia será uma boa alternativa para aumentar o acúmulo e a produtividade destes compostos (HO et al., 2014). Da mesma forma, sabe-se que este estresse influencia diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados ao crescimento e desenvolvimento das microalgas, devido aos altos teores de sal dificultar a absorção de água e nutrientes (CHOKSHI et al., 2017).

O acúmulo de moléculas protetoras como o glicerol e de espécies reativas de oxigênio podem ajudar as células microalgais a enfrentar estresses por salinidades. Esses mecanismos, por sua vez, estimulam a biossíntese de produtos como armazenamentos ricos em energia

(WHANG et al., 2016). Logo, expor algas a níveis de salinidade inferiores ou superiores aos níveis naturais podem alterar a taxa de crescimento e a composição celular.

Estudos demonstram que a salinidade aumenta o teor de lipídios e carboidratos (JUNEJA, et al., 2013), devido ao fato de altas condições de salinidade levarem ao estresse oxidativo, apresentando resposta ambientalmente desfavorável para o crescimento e a necessidade de armazenamento de compostos ricos em energia para poder sobreviver em um ambiente mais severo (PANCHHA, et al., 2015a). Segundo Zhila et al., (2011) e Chokshi et al. (2017) a concentração de biocompostos em microalgas é melhorado significativamente aumentando-se a concentração de NaCl.

Pancha et al (2015a) estudaram o efeito da indução de estresse oxidativo a partir da salinidade para aumentar a produção de biocombustíveis da microalga *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. Os experimentos foram realizados em dois estágios. Os resultados demonstram que em elevadas concentrações de NaCl (400 mM), as concentrações de carboidratos e lipídios aumentam, porém diminui-se a produtividade de biomassa.

O estresse oxidativo induzido por salinidade alterou as respostas fisiológicas e melhorou o potencial de biocombustíveis da microalga *Acutodesmus dimorphus*. A adição de 200 mM de NaCl resultou em acumulação de carboidratos e lipídios em mais de 50% (CHOKSHI et al., 2017).

2.4.5 Radiação ultravioleta

A luz é um fator crucial no crescimento microalgal. O excesso da intensidade luminosa pode levar a efeitos como a foto oxidação e fotolimitação, enquanto que baixas intensidades luminosas podem limitar o crescimento das microalgas (LOERA-QUEZADA; ANGELES; OLGUÍN, 2011).

A radiação UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm) induzem efeitos deletérios geneticamente e fisiologicamente sobre muitas formas de vida de ecossistemas terrestres e aquáticos. Estudos têm demonstrado que o UVB reduz a taxa de crescimento e a atividade fotossintética do fitoplâncton, podendo prejudicar ainda a estrutura do DNA causando mutações ou morte celular (GUIHÉNEUF et al., 2010). Já o UVC é conhecido por sua função germicida e bactericida, por possuir elevada energia associada ao seu menor comprimento de onda, sendo altamente lesiva e podendo causar efeitos mutagênicos. As radiações em UVA são menos energéticas, em virtude do maior comprimento de onda, originando radicais livres oxidativos (ARAÚJO; SOUZA, 2008).

Em estudo realizado por Kumar et al. (2018), o efeito da radiação UV-B foi investigado sobre o crescimento, concentrações de carboidratos e lipídios da microalga *Chlorella sorokiniana* UUIND6. A partir dos resultados obtidos foi concluído que as luzes UV levam a sérios efeitos na microalga, reduzindo o crescimento, clorofila, carotenoides e teores de carboidratos, enquanto que os teores de proteínas foram aumentados. Já em estudo reportado por Liu et al. (2015), a exposição de *Chlorella* sp. em radiação ultravioleta (254 nm) levou a uma diminuição significativa da clorofila enquanto que o mutante levou um aumento do conteúdo lipídico (28,1%).

Cosazza et al. (2015) estudaram a influência de duas condições de estresse oxidativo, sendo eles a concentração de TiO₂ e radiação UV. Os resultados demonstram que as variáveis não influenciaram na produção final de biomassa. Porém, neste mesmo estudo verificou-se aumento no teor de lipídios com a aplicação de radiação UV. Outros testudos têm sido focados nos efeitos da radiação UV-C visando uma investigação sobre o crescimento e integridade celular de como um método para prevenir a proliferação de cianobactérias (TAO et al., 2010).

2.4.6 Peróxido de Hidrogênio

Ao contrário da limitação de nutrientes, a oxidação química aumenta a peroxidação lipídica em microalgas, logo quando se tem um aumento das espécies reativas de oxigênio se tem por consequência um aumento do teor de lipídios (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017). O H₂O₂ é um oxidante forte que pode iniciar um dano oxidativo localizado, levando à interrupção das funções metabólicas e perda de integridade celular em locais onde se acumula (MALLICK; MOHN, 2000).

A fim de estudar o efeito do peróxido de hidrogênio e da radiação UV e Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017) realizaram uma pesquisa com a microalga *Scenedesmus* sp. para testar o aumento das concentrações de lipídios. A radiação UV levou a um aumento de 1,9 g.L⁻¹ para 2,4 g.L⁻¹ e de 40% para 55% de peso seco de células, após 12 dias de tratamento. A combinação entre radiação UV e estresse por peróxido de hidrogênio foi positiva levando a um aumento de biomassa e de lipídios, em três vezes.

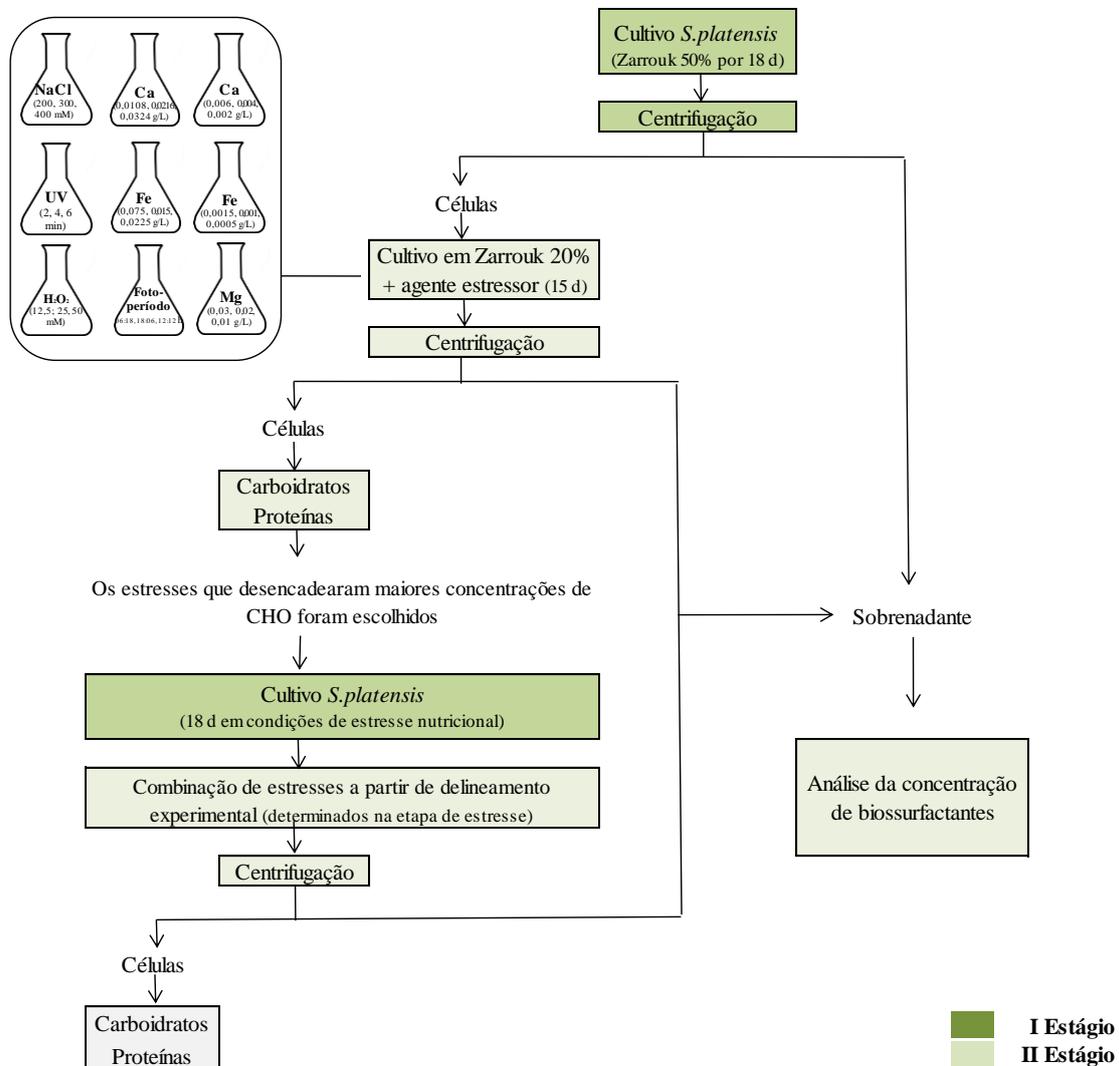
O efeito de H₂O₂, Mn²⁺ e Co²⁺ em biomassa e lipídios da microalga verde *Chlorella vulgaris* foi testado por Battah et al. (2015). A produtividade de lipídios aumentou em 29% em relação ao controle quando o peróxido de hidrogênio 4 mM foi adicionado ao meio de cultura. Da mesma forma, o cloreto de manganês propiciou um aumento de 16% com a adição

de 10 μM ao meio de cultivo e todas as concentrações de nitrato de cobalto aumentaram o conteúdo lipídico em até 25%.

3 METODOLOGIA

Os cultivos foram realizados em dois estágios, conforme indicado pelo fluxograma da Figura 2. No primeiro estágio, os cultivos foram realizados em condições padronizadas (meio Zarrouk 50%) a fim de obterem-se concentrações celulares altas, enquanto que no segundo estágio foi realizada a aplicação de estresses físicos e nutricionais a fim de induzir o acúmulo de carboidratos intracelulares e a produção de biossurfactantes extracelulares na microalga *S. platensis*.

Figura 2- Fluxograma geral do estudo



3.1 Microalga e condições de estresse

Foi utilizada a cepa da microalga *Spirulina platensis* disponível no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, localizado no prédio L1 da Universidade de Passo Fundo- RS/ Brasil. A *S. platensis* foi cultivada em meio Zarrouk a 50%, cuja composição está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Composição do meio Zarrouk 50%

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	8,4
K ₂ HPO ₄	0,25
NaNO ₃	1,25
K ₂ SO ₄	0,5
NaCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
EDTA	0,04

Fonte: ZARROUK, 1966

Os cultivos foram realizados em dois estágios:

- no primeiro estágio a microalga foi cultivada a 30°C, fotoperíodo 12h claro/escuro, luminosidade 44,55 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ através de lâmpadas fluorescentes, agitação a partir de injeção de ar constante e concentração inicial de in\u00f3culo de 0,20 g.L⁻¹. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 1000 mL com volume \u00fatil de 800 mL;
- no segundo est\u00e1gio, as c\u00e9lulas foram submetidas a centrifuga\u00e7\u00e3o e novamente inseridas em meios de cultivo adicionados de estresses f\u00edsicos ou nutricionais. Para tanto, um volume de 800 mL de meio contendo a *Spirulina* no in\u00edcio da fase estacion\u00e1ria de crescimento (18\u00b0 d) foi centrifugado a 3500 rpm, durante 10 min, exceto para a condi\u00e7\u00e3o de estresse por radia\u00e7\u00e3o ultravioleta, na qual a aplica\u00e7\u00e3o do estresse ocorre antes do processo de separa\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas. Ap\u00f3s centrifuga\u00e7\u00e3o, a biomassa foi reinoculada em meio contendo 800 mL de meio Zarrouk 20%, o qual, devido a menor concentra\u00e7\u00e3o de nutrientes, pode induzir a s\u00edntese intracelular de carboidratos (SALLA et al., 2016).

Controles com meio Zarrouk 50% e 20% foram realizados para fins de comparação. Os ensaios foram realizados em duplicata durante um período de 15 d. Amostras foram coletadas após este período para a determinação dos teores de carboidratos e proteínas na biomassa.

Nos meios residuais isentos de células, avaliou-se a capacidade de produção de biossurfactantes a partir de atividades emulsificantes e redução de tensão superficial, no tempo inicial e final do primeiro e do segundo estágio de cultivo.

3.1.1 Definição das condições de estresses ambientais e nutricionais

As condições de estresse utilizadas são demonstradas da Tabela 2. Cada estresse foi aplicado isoladamente, em diferentes concentrações. Dois ensaios controles foram realizados a fim de verificar o comportamento das condições normais de cultivo. O primeiro estágio de ambos os cultivos foi em Zarrouk 50%, sendo cultivado por 18 d. Após as células foram colhidas e reinoculadas em meio contendo Zarrouk 50% (Controle 1) e outro em meio Zarrouk 20% (Controle 2).

Tabela 2- Condições de estresses celulares

Estressor	Nível de estresse		
	1	2	3
NaCl (mM)	200	300	400
Metais (g.L ⁻¹)			
Suplementação de Ca ⁺²	0,0108	0,0216	0,0324
Suplementação de Fe ⁺²	0,0075	0,015	0,0225
Limitação de Ca ⁺²	0,006	0,004	0,002
Limitação de Fe ⁺²	0,0015	0,001	0,0005
Limitação de Mg ⁺²	0,03	0,02	0,01
Peróxido de Hidrogênio (mM)	50	25	12,5
Radiação Ultravioleta (min)	2	4	6

Para o estresse com a radiação ultravioleta, as células foram cultivadas no meio Zarrouk 50% até fase estacionária de crescimento sendo posteriormente adicionadas em placas de Petri (5 mL em placas com 10 cm de diâmetro) e expostas à radiação ultravioleta

através de uma câmara de fluxo laminar com uma lâmpada de 30 W a uma distância de 53 cm da superfície, por tempos determinados na Tabela 2. O meio exposto na radiação UV foi mantido durante 24h no escuro para evitar fotorreativação (LIU et al., 2015). Após este período as células foram centrifugadas e cultivadas em Zarrouk 20% durante 15 d. Os estresses realizados a partir dos metais Fe, Mg e Ca foram realizados pelas modificações de concentrações dos reagentes do meio de cultivo Zarrouk sendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 , respectivamente.

3.1.2 Aplicação de estresse por mudanças de luminosidade

Para verificar a influência do fotoperíodo e da luminosidade sobre *S. platensis*, três cultivos foram realizados. Para isso, a *S. platensis* foi inoculada em Zarrouk 50%, até início da fase estacionária de crescimento, sendo cultivada sob condições de temperatura 30°C, fotoperíodo 12h claro/escuro, luminosidade $44,55 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ através de lâmpadas fluorescentes, agitação a partir de injeção de ar constante e concentração inicial de in\u00f3culo de $0,20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Ap\u00f3s 18 d de cultivo em Zarrouk 50%, as c\u00e9lulas foram colhidas e reinoculadas em Zarrouk 20% alterando o per\u00edodo claro/escuro em tr\u00eas n\u00edveis, sendo 18h/06h, 06h/18h e 12h/12h. Para a realiza\u00e7\u00e3o dos estresses por fotoper\u00edodo os ensaios foram realizados em estufa incubadora com lâmpadas de luz fria (LED), luminosidade de $67,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura 30°C. Ao final de 15 d, as c\u00e9lulas foram colhidas, sendo realizada a quantifica\u00e7\u00e3o de carboidratos e prote\u00ednas e biossurfactantes extracelulares.

3.1.3 Combina\u00e7\u00e3o de estresses celulares

A partir dos resultados obtidos dos estresses nutricionais e ambientais, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 , com cultivo em dois est\u00e1gios, por\u00e9m, sem o processo de centrifuga\u00e7\u00e3o ao final do primeiro est\u00e1gio. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 1000 mL com volume \u00fatil de 800 mL em estufa incubadora de luz fria (BOD), luminosidade de $67,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, temperatura 30°C, fotoper\u00edodo 18h/06h (claro/escuro), com limita\u00e7\u00e3o de Mg ($0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e em Zarrouk 20%. O primeiro est\u00e1gio de cultivo teve dura\u00e7\u00e3o de 18d. Ao final do primeiro est\u00e1gio, os cultivos foram estressados conforme estabelecido na Tabela 3, utilizando 300 mM de NaCl e exposi\u00e7\u00e3o a radia\u00e7\u00e3o ultravioleta com dura\u00e7\u00e3o de 6 min. Um ensaio controle foi realizado em Zarrouk 20%, sem redu\u00e7\u00e3o de Mg, em fotoper\u00edodo

de 18h/06h claro/escuro para verificação da influência da limitação do metal. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 3- Níveis reais e codificados do Delineamento Fatorial Completo 2²

Experimento	X1- Salinidade (NaCl mM)	X2- Radiação Ultravioleta (min)
E1	(-1) 0	(-1) 0
E2	(+1) 300	(-1) 0
E3	(-1) 0	(+1) 6
E4	(+1) 300	(+1) 6

As quantificações de carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (LOWRY et al., 1951) foram realizadas a cada 2 d, ao longo do segundo estágio de cultivo, a fim de avaliar a composição bioquímica ao longo da aplicação dos estresses determinados pelo delineamento fatorial (Tabela 3).

3.2 Determinações analíticas

3.2.1 Determinação do crescimento e produtividade de biomassa

A concentração de biomassa das microalgas foi determinada a cada 48h através de medida de densidade ótica em espectrofotômetro a 670 nm, conforme estabelecido por Costa et al. (2002). Curvas de crescimento foram obtidas ao longo do processo de crescimento para todos os ensaios, das quais foram obtidas as concentrações finais de biomassa.

Os parâmetros avaliados foram a produtividade no primeiro e segundo estágio de cultivo e a final ($P \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) sendo obtida através da Equação 1. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) (Equação 2), e o tempo de geração (t_g) (Equação 3).

$$\text{Produtividade em biomassa } (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = \frac{X-X_0}{t-t_0} \quad (1)$$

Sendo X a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d) e X0 é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t0 (d).

$$\text{Velocidade específica máxima de crescimento } (\text{d}^{-1}) = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (2)$$

Sendo Xi a concentração de biomassa (g.L^{-1}), e t é tempo (d)

$$\text{Tempo de geração (d)} = \frac{\text{Ln}2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (3)$$

Em que $\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

3.2.2 Quantificação de proteínas e carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) (ANEXO 1). A produtividade de carboidratos nos cultivos ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida através da Equação 4 (MARGARITES, 2014).

$$\text{Produtividade em carboidratos (g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = \frac{X_f \times \text{CHO}}{100 \times t_c} \quad (4)$$

Sendo X_f é a concentração final de biomassa (g.L^{-1}), CHO é a concentração de carboidratos (%) e t_c é o tempo de cultivo (d).

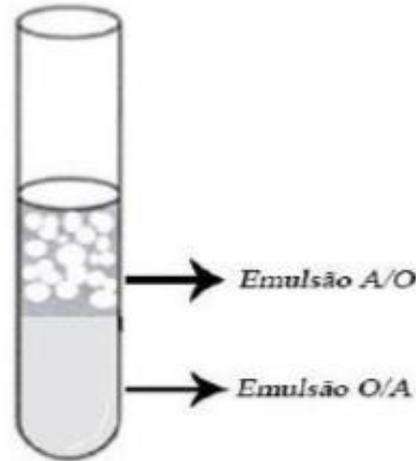
O teor de proteínas foi sendo determinado conforme Anexo 2 (LOWRY et al., 1951).

Os teores de carboidratos e lipídios foram expressos em base seca. A umidade foi determinada por metodologia da AOAC (2000).

3.2.3 Determinação das atividades emulsificantes

As atividades emulsificantes foram realizadas por metodologia adaptada de Martins et al. (2006), no qual 3,5 mL do meio livre de células e 2 mL de óleo diesel foram adicionados em um tubo de amostra, sendo posteriormente agitados em agitador de tubos a 700 rpm por 1 min. Após 24h de repouso, a leitura em paquímetro foi realizada a partir da altura da emulsão formada e da altura total do tubo, obtendo-se a atividade emulsificante água em óleo (A/O). A Figura 3 demonstra a fração de interesse A/O da atividade emulsificante. O cálculo da atividade emulsificante A/O foi calculado conforme Equações 5 e 6.

Figura 3- Tubo de ensaio contendo emulsões A/O e O/A



Fonte: Martins et al. (2006)

$$AE \text{ A/O} = (E \text{ amostra} - E \text{ branco}) \cdot D \quad (5)$$

$$E = \left(\frac{h \text{ emulsão}}{h \text{ total}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Sendo: AE: atividade emulsificante (UE); A/O: água em óleo; E: relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total e o D: diluição da amostra em água.

3.2.4 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada ao início e final dos cultivos, em tensiômetro digital (Biolin Scientific, modelo Sigma 702), com a adição de 10 mL de meio livre de células em temperatura ambiente, realizado em triplicata. Os dados obtidos da tensão superficial foram também avaliados de acordo com redução da tensão superficial, obtida de acordo com a Equação 7.

$$R = \left(\frac{T_i - T_f}{T_i} \right) * 100 \quad (7)$$

Sendo, T_i a tensão superficial no tempo de 0h; T_f a tensão superficial no final do cultivo de cada estágio.

3.3 Análise dos dados

As diferenças entre as médias dos cultivos da etapa um foram avaliadas pela Análise de Variância em um nível de 95% de confiança, com posterior comparação pelo teste de Tukey. Os experimentos realizados com variação do fotoperíodo foram analisados individualmente, devido às diferenças na luminosidade e estufa de cultivo.

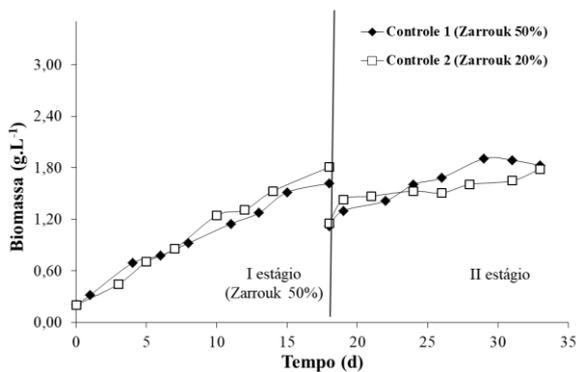
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeito das condições de cultivo no crescimento, produtividade e composição de carboidratos e proteínas

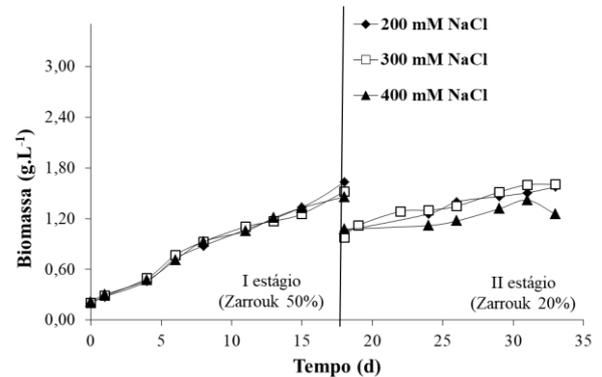
A Figura 4 mostra as curvas de crescimento dos cultivos microalgais durante o primeiro e segundo estágio, correspondentes aos ensaios com estresses nutricionais e com radiação UV e peróxido de hidrogênio. As velocidades específicas de crescimento celular, o tempo de geração e produtividades finais de biomassa de cada estágio são apresentados na Tabela 4.

Figura 4- Efeito das condições de estresse sobre o crescimento celular da *S. platensis*

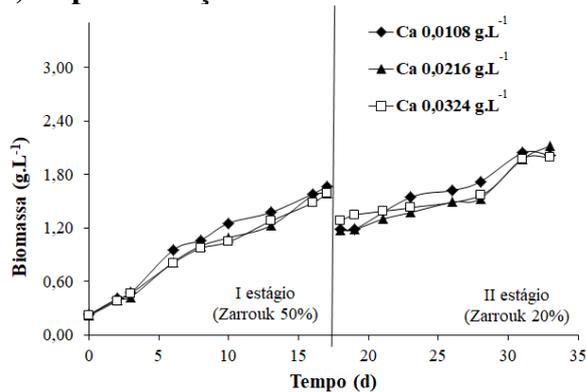
a) Controles



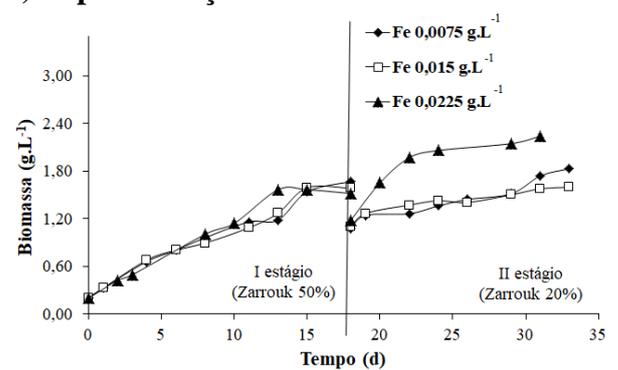
b) NaCl



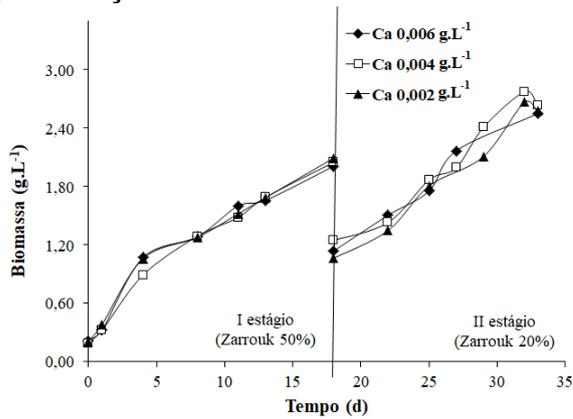
c) Suplementação de Ca



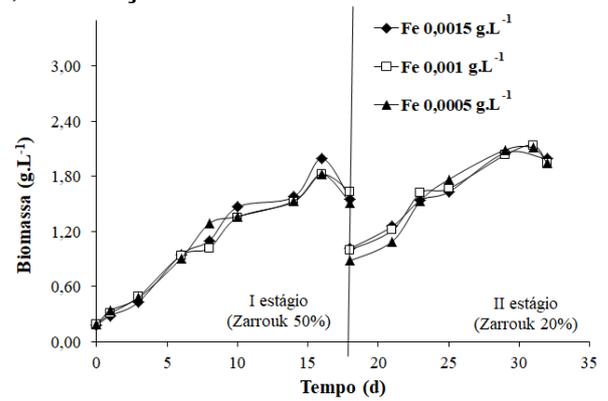
d) Suplementação de Fe



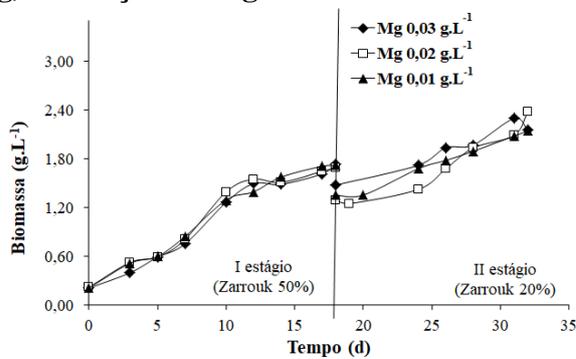
e) Limitação de Ca



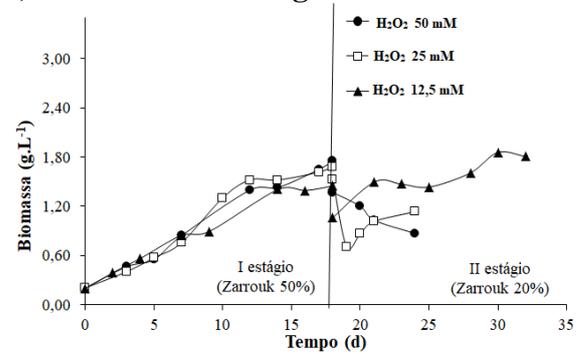
f) Limitação de Fe



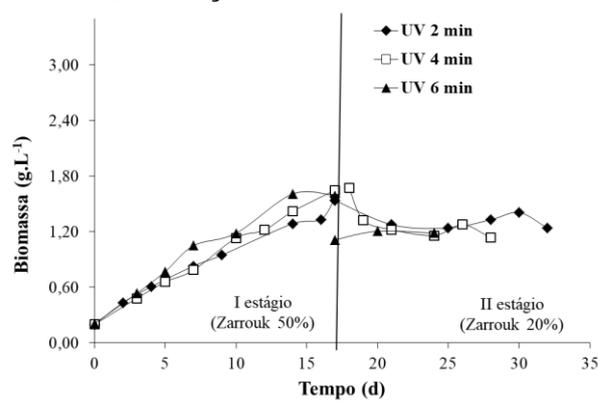
g) Limitação de Mg



h) Peróxido de Hidrogênio



i) Radiação Ultravioleta



O valor médio de concentração de biomassa no primeiro estágio de cultivo foi de $1,64 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$. O processo de centrifugação realizado entre a transição do primeiro estágio para o segundo acarretou em uma perda de biomassa de aproximadamente $0,5 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 4- Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (tg) dos cultivos microalgais realizados com Zarrouk 50% no primeiro estágio e submetidos a condições de estresse nutricional ou físico no segundo estágio de produção

Experimento	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)		tg (d)		Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)		
	I estágio	II estágio	I estágio	II estágio	I estágio	II estágio	(I ao II estágio)
Controle Zarrouk 50%	0,126±0,001 ^a	0,038±0,011 ^{abcd}	5±0,049 ^a	19±5,217 ^{cdefg}	0,08±0,011 ^a	0,05±0,004 ^{abcdef}	0,05±0,002 ^{abcdef}
Controle Zarrouk 20%	0,125±0,003 ^a	0,040±0,011 ^{abcd}	6±0,135 ^a	18±4,903 ^{abcdefg}	0,09±0,002 ^a	0,04±0,007 ^{abcde}	0,05±0,002 ^{abcdef}
NaCl 200mM	0,145±0,005 ^a	0,023±0,003 ^a	5±0,202 ^a	25±3,760 ^g	0,08±0,003 ^a	0,05±0,012 ^{abcdef}	0,05±0,007 ^{abcdef}
NaCl 300mM	0,132±0,004 ^a	0,035±0,000 ^{abc}	5±0,189 ^a	20±0,058 ^{cdefg}	0,07±0,006 ^a	0,05±0,015 ^{bcdef}	0,05±0,008 ^{abcdef}
NaCl 400mM	0,129±0,004 ^a	0,029±0,004 ^a	5±0,261 ^a	24±2,145 ^{fg}	0,07±0,003 ^a	0,01±0,000 ^{ab}	0,03±0,000 ^{ab}
Ca 0,0108 g.L ⁻¹	0,129±0,011 ^a	0,037±0,003 ^{abcd}	5±0,472 ^a	19±1,016 ^{bcdefg}	0,09±0,011 ^a	0,06±0,004 ^{abcdef}	0,05±0,004 ^{abcdef}
Ca 0,0216 g.L ⁻¹	0,132±0,008 ^a	0,041±0,004 ^{abcd}	5±0,209 ^a	16±1,254 ^{abcdefg}	0,08±0,002 ^a	0,06±0,005 ^{bcdef}	0,06±0,004 ^{abcdef}
Ca 0,0324 g.L ⁻¹	0,131±0,004 ^a	0,030±0,001 ^a	5±0,171 ^a	23±0,552 ^{fg}	0,08±0,007 ^a	0,05±0,011 ^{abcdef}	0,05±0,006 ^{abcdef}
Fe 0,0075 g.L ⁻¹	0,126±0,002 ^a	0,040±0,003 ^{abcd}	5±0,101 ^a	18±1,379 ^{abcdefg}	0,08±0,002 ^a	0,05±0,008 ^{abcdef}	0,05±0,005 ^{abcdef}
Fe 0,015 g.L ⁻¹	0,125±0,001 ^a	0,032±0,001 ^a	6±0,064 ^a	22±0,617 ^{efg}	0,08±0,002 ^a	0,03±0,003 ^{abcd}	0,04±0,001 ^{abcde}
Fe 0,0225 g.L ⁻¹	0,145±0,010 ^a	0,071±0,003 ^e	5±0,326 ^a	10±0,412 ^{ab}	0,07±0,000 ^a	0,07±0,003 ^{bcdef}	0,06±0,000 ^{cdef}
Mg 0,03 g.L ⁻¹	0,144±0,001 ^a	0,045±0,000 ^{abcd}	5±0,043 ^a	16±0,000 ^{abcdef}	0,08±0,012 ^a	0,05±0,007 ^{cdef}	0,06±0,006 ^{cdef}
Mg 0,02 g.L ⁻¹	0,124±0,014 ^a	0,045±0,000 ^{abcd}	6±0,619 ^a	15±0,097 ^{abcdef}	0,08±0,001 ^a	0,08±0,015 ^{abcdef}	0,07±0,004 ^{def}
Mg 0,01 g.L ⁻¹	0,134±0,007 ^a	0,035±0,003 ^{abc}	5±0,269 ^a	20±1,819 ^{cdefg}	0,08±0,006 ^a	0,06±0,005 ^{abcdef}	0,06±0,001 ^{bcdef}
Ca 0,006 g.L ⁻¹	0,149±0,007 ^a	0,056±0,004 ^{cde}	5±0,207 ^a	12±0,975 ^{abcd}	0,10±0,003 ^a	0,09±0,010 ^{ef}	0,07±0,004 ^{ef}
Ca 0,004 g.L ⁻¹	0,147±0,000 ^a	0,056±0,004 ^{cde}	5±0,007 ^a	12±0,930 ^{abcd}	0,10±0,002 ^a	0,09±0,008 ^{def}	0,07±0,008 ^f
Ca 0,002 g.L ⁻¹	0,150±0,004 ^a	0,058±0,018 ^{de}	5±0,124 ^a	13±4,072 ^{abcde}	0,10±0,001 ^a	0,10±0,022 ^f	0,07±0,004 ^f
Fe 0,0015 g.L ⁻¹	0,147±0,000 ^a	0,055±0,007 ^{bcde}	5±0,007 ^a	13±1,518 ^{abcde}	0,08±0,021 ^a	0,07±0,021 ^{bcdef}	0,06±0,004 ^{abcdef}
Fe 0,001 g.L ⁻¹	0,147±0,008 ^a	0,058±0,000 ^{de}	5±0,260 ^a	12±0,059 ^{abc}	0,08±0,008 ^a	0,07±0,000 ^{bcdef}	0,05±0,000 ^{abcdef}
Fe 0,0005 g.L ⁻¹	0,148±0,004 ^a	0,074±0,003 ^e	5±0,115 ^a	9±0,410 ^a	0,07±0,010 ^a	0,08±0,016 ^{cdef}	0,05±0,003 ^{abcdef}
UV 6 min	0,143±0,003 ^a	ND	5±0,097 ^a	ND	0,08±0,001 ^a	0,03±0,052 ^{abc}	0,04±0,007 ^{abcd}
UV 4 min	0,125±0,003 ^a	ND	6±0,131 ^a	ND	0,07±0,011 ^a	ND	0,04±0,006 ^{abcd}
UV 2 min	0,128±0,002 ^a	0,033±0,003 ^{ab}	5±0,078 ^a	21±2,133 ^{defg}	0,08±0,026 ^a	0,03±0,011 ^{abc}	0,04±0,004 ^{abc}
H ₂ O ₂ 50 mM	0,151±0,022 ^a	ND	5±0,667 ^a	ND	0,09±0,002 ^a	ND	0,03±0,007 ^a
H ₂ O ₂ 25 mM	0,138±0,012 ^a	ND	5±0,421 ^a	ND	0,08±0,019 ^a	ND	0,03±0,028 ^a
H ₂ O ₂ 12,5 mM	0,129±0,010 ^a	0,045±0,005 ^{abcd}	5±0,402 ^a	15±1,759 ^{abcdef}	0,07±0,005 ^a	0,05±0,016 ^{abcdef}	0,05±0,004 ^{abcdef}

Valores médios ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança (p>0,05). ND= não detectado.

Observando-se a Figura 4, verifica-se que os cultivos não apresentaram fases de adaptação no primeiro estágio. Isso ocorre devido os cultivos com a *S. platensis* encontrarem-se adaptados ao meio Zarrouk, que comumente é utilizado na manutenção dos inóculos, iniciando imediatamente a fase de crescimento logarítmico. Essa situação ocorre quando não existem grandes diferenças entre os inóculos e os meios de cultivo (LOURENÇO, 2006). Mudanças no pH também não foram verificadas, permanecendo na faixa de pH ótimo para a *S. platensis*, entre 9 e 10, para os dois estágios de cultivo.

O tempo médio de crescimento logarítmico das biomassas cultivadas no primeiro estágio foi de $14 \pm 1,17$ d com tempo de geração de $5 \pm 0,4$ d. Observou-se que após o processo de centrifugação e inserção das células em Zarrouk 20% o tempo de geração foi em geral superior ao do primeiro estágio.

Três fatores podem explicar o aumento nos tempos de geração na transição entre os estágios I e II. O primeiro fator é a inserção das condições de estresse no segundo estágio. O segundo fator é que no início do segundo estágio, as concentrações iniciais de células eram superiores às do primeiro estágio, provocando o efeito de sombreamento, já reportado na literatura por resultar em reduções nas velocidades específicas de crescimento. O fenômeno é conhecido como fotolimitação e ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas células que se encontram no interior de meio de cultivo (RICHMOND; VONSHAK, 1978). O terceiro fator é o processo de centrifugação utilizado para a colheita das células que consiste na colisão, agregação e sedimentação da biomassa por uma força centrípeta, que expõem as células a elevadas forças gravitacionais e de cisalhamento, podendo danificar sua estrutura (PIRES et al., 2012).

No ensaio controle 2 (Zarrouk 50% no primeiro estágio e Zarrouk 20% no segundo estágio, Figura 4a) verifica-se que a redução na concentração do meio de cultivo não ocasionou redução da produção de biomassa final e dos parâmetros cinéticos da *S. platensis*. A $\mu_{\text{máx}}$ do cultivo controle 1, em Zarrouk 50% no segundo estágio foi de $0,038 \pm 0,011$ d⁻¹ com tg de 19 d em comparação com uma $\mu_{\text{máx}}$ de $0,040 \pm 0,011$ d⁻¹ com tg de 18 d no controle 2, em Zarrouk 20% ($p > 0,05$).

Os parâmetros cinéticos de crescimento da microalga *S. platensis* são dependentes das condições de cultivo utilizadas. Em estudo desenvolvido por Andrade e Costa (2008), verificou-se que o cultivo utilizando a *S. platensis* LEB-52 em meio autotrófico apresentou concentração máxima de biomassa de $1,44 \pm 0,04$ g.L⁻¹, produtividade máxima igual a $0,045 \pm 0,002$ g.L⁻¹.d⁻¹, atingindo uma velocidade específica máxima de $0,117 \pm 0,013$ d⁻¹ e fase log de aproximadamente 30 d.

Os ensaios realizados com a adição de estresses por NaCl em meio com limitação de nutrientes (Zarrouk 20%), (Figura 4b), apresentaram $\mu_{\text{máx}}$, tg e estatisticamente iguais aos ensaios controles no segundo estágio de cultivo. Os estresses por salinidade não afetaram a produtividade de biomassa em relação ao controle, indicando que maiores concentrações de NaCl podem ser adicionadas ao meio para induzir maiores estresses na microalga.

Em estudo similar a este, Álvarez-Díaz et al. (2015) realizaram cultivos com modo de operação em dois estágios, demonstrando crescimento máximo de $1,03 \text{ g.L}^{-1}$ para a microalga *S. obliquus* no primeiro estágio, não havendo posterior crescimento no segundo estágio com a aplicação de estresse por salinidade ($0\text{-}15 \text{ g.L}^{-1}/256 \text{ mM}$) e aeração ($0\text{-}4\%$), apenas variações na concentração de biomassa de $0,811 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,15 \text{ g.L}^{-1}$.

No estudo proposto por Álvarez-Díaz et al. (2015) não foram realizados processos de centrifugação, não ocorrendo perdas de biomassa antes da adição do estresse. No entanto, mesmo que ocorra uma pequena redução na produção celular em função do estresse por NaCl e centrifugação, é demonstrado na literatura que maiores concentrações de carboidratos ocorrem devido ao estresse celular, que desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio como O_2 , H_2O_2 , O_2^- , OH^- . Estas moléculas reativas de oxigênio são altamente tóxicas, sendo responsáveis por causar danos às proteínas, lipídios, DNA e outras macromoléculas, inibindo também o crescimento celular (CHOKSHI et al., 2015) e desencadeando a síntese de carboidratos e lipídios em microalgas.

Para os ensaios realizados com o cálcio como agente estressor (Figura 4c e 4e, suplementação e limitação de Ca, respectivamente), observa-se o mesmo comportamento dos ensaios realizados por NaCl e controle, entre a transição do I para o II estágio, porém com um aumento de biomassa ao final do processo. Isso ocorre porque sobre baixas concentrações de estresse, o Ca é solubilizado, tornando-se disponível para o crescimento celular.

Em estudo realizado por Pérez-Pazos e Fernández-Izquierdo (2011) demonstrou-se que sob altas concentrações de carbonato de cálcio ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) a solubilidade do nutriente é excedida e tende a precipitar, promovendo uma redução no crescimento microalgal e por consequência um aumento no teor de lipídios das células de *Chlorella sp.* Este estado é caracterizado por modificações nas funções fisiológicas básicas que causam a ativação de mecanismos defensivos, levando ao ajuste do metabolismo celular a novas condições.

As maiores $\mu_{\text{máx}}$ foram obtidas pelos ensaios com limitação de cálcio ($0,056 \text{ d}^{-1}$; $0,056 \text{ d}^{-1}$ e $0,058 \text{ d}^{-1}$) e também os menores tempos de geração (12d, 12d e 13d). Em relação aos controles, nenhuma diferença entre as P_{finais} foram verificadas, tanto para a limitação quanto para a suplementação de Ca. Em estudo como o desenvolvido por Esakkimuthu et

al.(2016) demonstrou-se que concentrações otimizadas de limitação de micronutrientes como o Ca e Mg, desencadeiam na síntese de compostos de interesse, sem prejudicar o crescimento celular das microalgas. Também foi verificado em estudo proposto por Hanifzadeh, Garcia e Viamajala (2018), que a limitação de cálcio provocou um aumento de 30% nas produtividades de biomassa, em relação ao controle com excesso de nutrientes. A limitação do micronutriente também foi responsável por um aumento dos teores de carboidratos (10 vezes) e lipídios (3 vezes) na microalga *Chlorella sorokiniana* str SLA-04.

Os ensaios a partir da suplementação de Ferro (Figura 4d) apresentaram maiores $\mu_{\text{máx}}$ no segundo estágio para a maior concentração de estresse ($0,0225 \text{ g.L}^{-1}$) correspondendo a um tg de 10 d. Em decorrência do maior crescimento na presença de Fe a produtividade no primeiro e segundo estágio foi a mesma $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A suplementação de ferro nos meios de cultivo estimulou a concentração de biomassa em microalgas. Foi verificado em outro estudo que a adição de Fe^{3+} demonstrou densidade celular significativamente maior ao controle quando adicionada por duas vezes, o aumento na densidade chegou a ser 2,35 vezes maior (LIU; WANG; ZHOU, 2008).

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência de todos os organismos vivos, incluindo os fotossintetizantes que possuem exigência especial por o ferro, como cofator em múltiplos elementos do seu sistema de transporte de elétrons. As limitações de ferro podem fazer com que as células fotoautotróficas percam a sua capacidade fotossintética, afetando o crescimento das microalgas (WAN et al., 2014; SUN et al., 2014). Neste estudo, a limitação de Ferro (Figura 4f) em $0,0005 \text{ g.L}^{-1}$ foi responsável pelas maiores $\mu_{\text{máx}}$, sendo diferente dos cultivos controles em Zarrouk 50% e 20% ($p < 0,05$). No entanto, nenhuma diferença foi verificada quanto as P_{finais} , em relação aos ensaios controle.

O Mg (Figura 4g), assim como o Fe e o Ca, quando adicionado em concentrações reduzidas, provocou um aumento na concentração de biomassa ao final do cultivo ($2,15 \text{ g.L}^{-1}$, $2,37 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,14 \text{ g.L}^{-1}$) apresentando $\mu_{\text{máx}}$ de $0,045 \text{ d}^{-1}$; $0,045 \text{ d}^{-1}$ e $0,035 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, nas concentrações de Mg adicionadas de $0,03 \text{ g.L}^{-1}$, $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,01 \text{ g.L}^{-1}$, sendo que nestes ensaios obtiveram-se elevadas produtividades em biomassa.

Foram observados na literatura muitos estudos sobre a limitação de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, tanto sobre o crescimento de microalgas quando ao acúmulo de carboidratos e lipídios. Exemplos são demonstrados por Markou, Chatzipavlidis e Georgakakis (2012b) e Margarites e Costa (2014). No entanto, são escassos os relatos sobre a limitação dos micronutrientes como o Ca e Mg. Ainda assim, os estudos encontrados abordam a influência dos micronutrientes sobre a composição em lipídios da biomassa para posterior

produção de biodiesel, como foi demonstrado por Gorain, Bagchi e Mallick (2013). Neste estudo, o efeito das concentrações de cálcio, magnésio e salinidade foram investigados no crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*. As maiores concentrações celulares ocorreram para as maiores concentrações de magnésio. Em ambas as depleções, Ca e Mg, o crescimento das microalgas foi afetado (GORAIN; BAGCHI; MALLICK, 2013).

Por ser um forte agente oxidante, o peróxido de hidrogênio causou um efeito deletério nos cultivos com concentração de 25mM e 50 mM, logo no primeiro dia após a exposição. Observa-se na Figura 4h que nas concentrações mais elevadas de H₂O₂ o cultivo precisou ser encerrado antes do período proposto de 15 d. A concentração de 12,5 mM foi a única na qual a microalga suportou a concentração, apresentando crescimento com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,045 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ no segundo estágio.

Reações redox de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio resultam em toxicidade devido a condições de estresse oxidativo. Estas espécies reativas de oxigênio (ERO) são consideradas importantes na resposta celular. O acúmulo de ERO induzido pelo estresse é neutralizado por um mecanismo de defesa integral das células, que elimina o excesso de oxidantes e evita os efeitos nocivos das ERO (CIRULIS; SCOTT, ROSS, 2013).

O peróxido de hidrogênio é um oxidante forte que pode iniciar danos oxidativos localizados, levando ao rompimento das funções metabólicas e perda da integridade celular nos locais onde se acumula. Há estudos em que diferentes concentrações de peróxido foram utilizadas para verificar a tolerância da *S. plantensis* ao estresse, como o desenvolvido por El-Baky, Baz e El-Baroty (2009), em que concentração de 2 mM, 4 mM, 6 mM e 8 mM de H₂O₂ foram utilizadas no meio de cultivo, monitorando-se a taxa de crescimento. O estudo demonstra redução gradual sob o estresse por H₂O₂, em dependência do tempo de exposição e da concentração. Mesmo assim, a *S. platensis* apresentou certa tolerância aos estresses aplicados. Além da aplicação para a indução da síntese de lipídios, como verificado nos estudos já citados, há pesquisas que demonstram a aplicação de peróxido de hidrogênio para induzir morte celular em cianobactérias (BARRINGTON; GHADOUANI, 2008).

Os ensaios expostos a diferentes tempos de radiação ultravioleta (Figura 4i) apresentaram crescimento apenas em 2 min de exposição à luz UV, com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,033 \text{ d}^{-1}$ e tg de 21 d. A ausência de crescimento da *S. platensis* devido a exposição à radiação UV pode ser explicada em virtude dos danos ao DNA, prejudicando a fotossíntese e crescimento das

microalgas (ZHANG et al., 2017) e a fotoinibição (inibição da atividade fotossistema II). (MURATA et al., 2017).

Em estudo desenvolvido por Zhang et al. (2017) demonstrou-se que a radiação UV-B impede a divisão celular da microalga marinha *Dunaliella salina*, porém não o crescimento celular. Isso porque na medida em que se aumentava a radiação UV-B se reduzia a densidade celular, mas os conteúdos de proteínas e glicerol, essenciais para o crescimento celular aumentavam, logo sugeriu-se que o UV-B exercia efeito negativo sobre a divisão celular, e não sobre o crescimento. Também foi demonstrado que a absorção de nutrientes foi afetada pela exposição da UV-B, promovendo espécies reativas de oxigênio. Neste mesmo estudo, verificou-se uma correlação significativa entre Ca^{2+} e ATPase e mais componentes antioxidantes quando a microalga foi exposta ao UV-B. No entanto, a adição de Ca suplementado, não aumentou a capacidade antioxidante das células. Este resultado diverge de outros estudos, onde a adição de Ca^{2+} alivia os danos abióticos, inibindo a geração de espécies reativas de oxigênio (BRESSAN; HASEGAWA; PARDO, 1998).

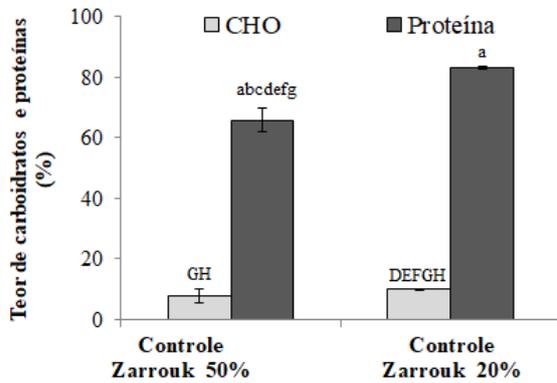
Quando as microalgas são cultivadas em condições de estresse, elas reagem e modificam seu padrão e estratégias metabólicas, a fim de lidar com as dificuldades sob as condições a elas impostas. Essa mudança dinâmica na estratégia metabólica afeta a composição da biomassa (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

As quantificações de carboidratos e proteínas foram realizadas ao final do segundo estágio de cultivo, momento em que ocorreu a colheita das células por processo de centrifugação. Os teores de carboidratos e proteínas (Figura 5) e suas respectivas produtividades (Figura 6) foram determinados.

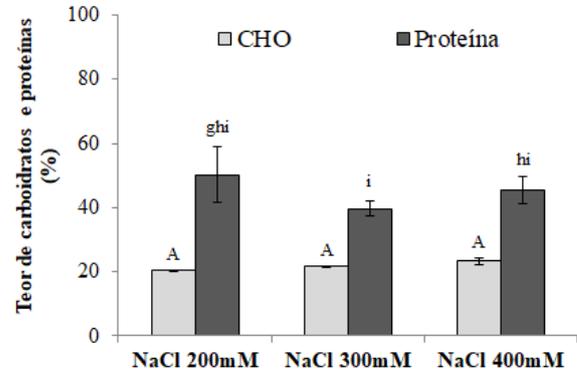
O cultivo controle 1 e 2 (Figura 5a) realizados em meio Zarrouk 50% no primeiro estágio e em Zarrouk 50% (controle 1) e 20% (controle 2) no segundo estágio, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os teores de carboidratos, passando de $7,97 \pm 0,39\%$ para $9,93 \pm 0,03\%$, respectivamente. Muitos estudos relatam que a intensidade de luz interfere na composição bioquímica das microalgas, logo pode se esperar que em baixas condições de luminosidade como a utilizada nos cultivos ($44,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a limitação de nutrientes não tenha grande influência sobre os cultivos, como teria em intensidades de luz superiores.

Figura 5- Concentração de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de *Spirulina platensis* ao final do segundo estágio dos cultivos nos experimentos controle e com estresses nutricionais e ambientais

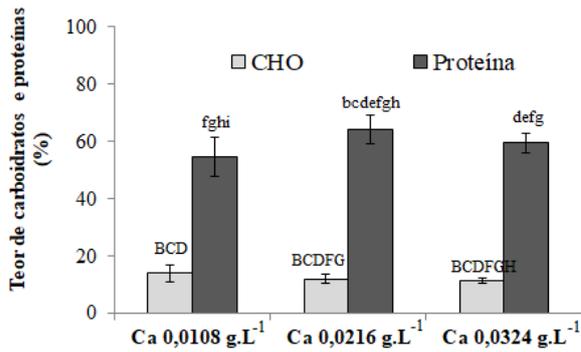
a) Controle



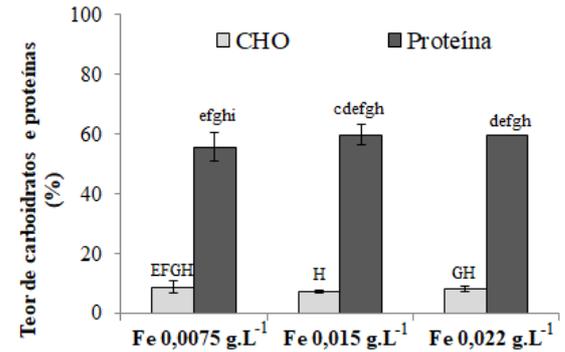
b) Salinidade



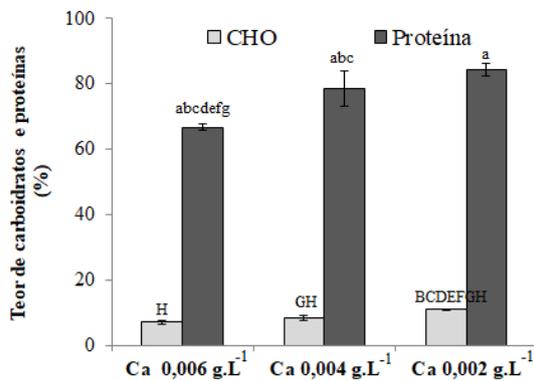
c) Suplementação de Cálcio



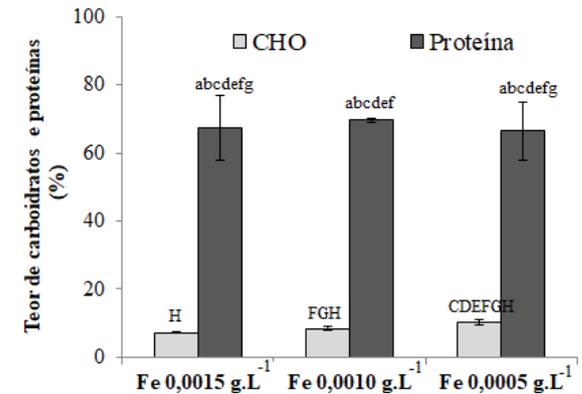
d) Suplementação de Ferro



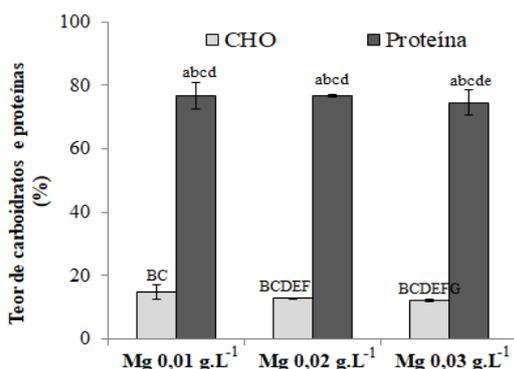
e) Limitação de Cálcio



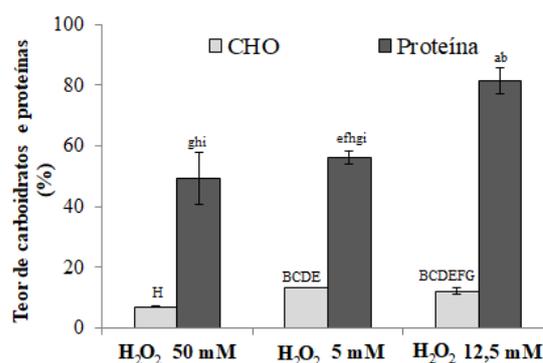
f) Limitação de Ferro



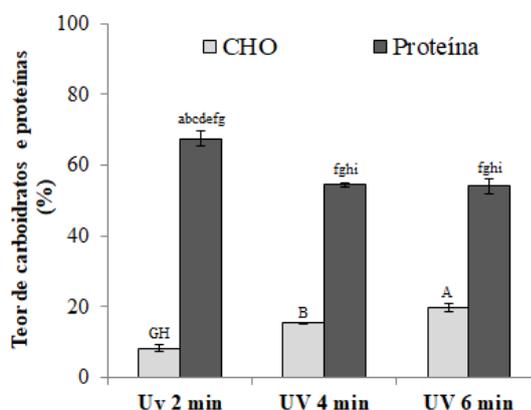
g) Limitação de Magnésio



h) Peróxido de Hidrogênio



i) Radiação Ultravioleta



Valores médios \pm desvio padrão. Letras iguais em barras de cores iguais indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Letras maiúsculas referem-se aos carboidratos e letras minúsculas aos teores de proteínas.

No estudo realizado por Magro et al (2017), elevadas concentrações de carboidratos (72%) para a mesma cepa de *S. platensis* cultivada em estufa com luminosidade em condições ambientais de $670,88 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foram encontradas. Utilizando a mesma cepa, Rempel et al. (2018) também encontraram elevadas concentrações de carboidratos de 56,56%, quando realizou cultivos de *S. platensis* em mini *raceways* por 12 dias, em condições ambientais de luz. Em ambos os estudos foi utilizado Zarrouk 20%. As hipóteses para as maiores concentrações de carboidratos intracelulares obtidas nos estudos desses autores são as maiores intensidades de luz, que é positivamente correlacionada com maiores produções de biomassa e carboidratos (AIKAWA et al., 2012) e também a agitação da cultura (HUANG et al., 2015).

As maiores concentrações de carboidratos neste estudo foram encontradas para os cultivos com estresse por NaCl (Figura 5b) em 200 mM ($20,39 \pm 0,21\%$), 300 mM ($21,62 \pm 0,16\%$) e 400 mM ($23,36 \pm 1,10\%$). Não houve diferença significativa nos estresses salinos entre si ($p > 0,05$) em relação aos teores de carboidratos. Analisando as Figuras 5a e 5b,

correspondentes aos ensaios controle e com estresse por NaCl, verifica-se uma relação entre o aumento dos teores de carboidratos e redução dos teores de proteínas. As maiores concentrações de proteínas correspondem aos ensaios controles, e as maiores concentrações de carboidratos aos ensaios na presença de altas concentrações de NaCl, evidenciando os efeitos do NaCl na mudança dos padrões metabólicos da microalga.

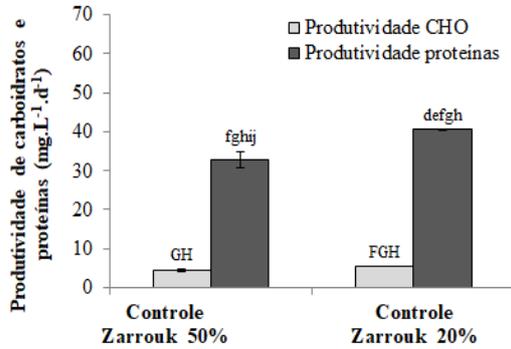
A associação da restrição de nutrientes e da salinidade, como o que foi realizado neste trabalho, ocasiona a alteração metabólica em microalgas, resultando na conversão do conteúdo proteico em compostos de armazenamento de energia, como os carboidratos (DISMUKES et al., 2008). Utilizando a *Spirulina platensis* LEB 52, Margarites et al. (2016) identificaram aumento no teor de carboidratos utilizando 50% a menos de nutrientes e 20% a mais de NaCl ($0,60\text{g.L}^{-1}$; 10 mM) no meio Zarrouk. Uma concentração de NaCl de 400 mM no meio de cultivo permitiu aumentar os teores de lipídios e carboidratos na microalga *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 segundo PANCHA et al. (2015) e na *A. dimorphus* que acumulou 60% a mais de carboidratos ($53,30\pm 2,76\%$) que o cultivo controle, utilizando 200 mM de NaCl ao meio de cultivo (CHOKSHI et al., 2017).

A salinidade é conhecida por alterar a composição fisiológica e bioquímica das microalgas, sendo também responsável por aumentar os teores de lipídios e de carboidratos em algumas espécies de microalgas (PANCHA et al., 2015a). Paralelo a isso, a limitação das fontes de nitrogênio são também responsáveis por aumentar os conteúdos de carboidratos e lipídios na *S. platensis*, como foi demonstrado por Salla et al. (2016).

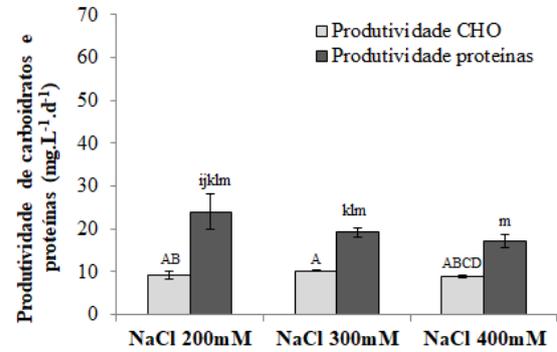
A adição de cálcio (Figura 5c) como agente estressor resultou em valores máximos de carboidratos de $13,88\pm 2,82\%$ com $0,0108\text{ g.L}^{-1}$ de cálcio adicionada ao cultivo, sendo igual as demais variações de suplementação, porém maior e diferente da concentração do controle em Zarrouk 50% ($7,97\pm 0,39\%$). A produtividade em carboidratos utilizando $0,0108\text{ g.L}^{-1}$ de cálcio foi maior que ambos os controles (Figura 6c). Entre os principais nutrientes metálicos, o cálcio foi estudado principalmente devido à boa solubilidade, baixa toxicidade em altas concentrações e efeito benéfico em muitos aspectos à fisiologia de plantas. Respostas metabólicas detalhadas à nutrição de Ca e estresse metálico, bem como o impacto direto da nutrição do Ca e sua toxicidade não foram muito estudadas. Estudos têm indicado uma relação entre a suplementação de cálcio, propondo que este elemento pode afetar o acúmulo de metais e os parâmetros metabólicos de algas (KOVÁČIK; DRESLER, 2018). Respostas quanto a sua utilização para o estímulo de carboidratos não foram bem relatadas, demonstrando a necessidade em se estudar os efeitos do cálcio no metabolismo e biossíntese das microalgas.

Figura 6- Produtividades de carboidratos e proteínas ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) na biomassa de *Spirulina platensis* ao final do segundo estágio dos cultivos nos experimentos controle e com estresses nutricionais e ambientais

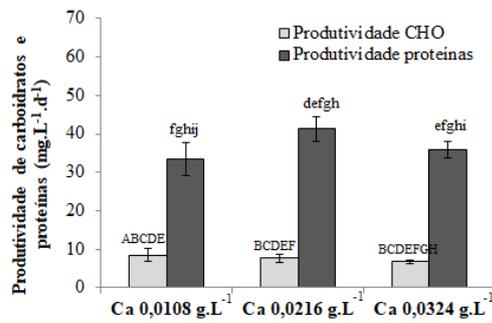
a) Controle



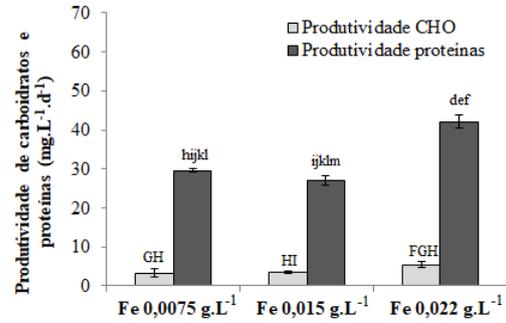
b) Salinidade



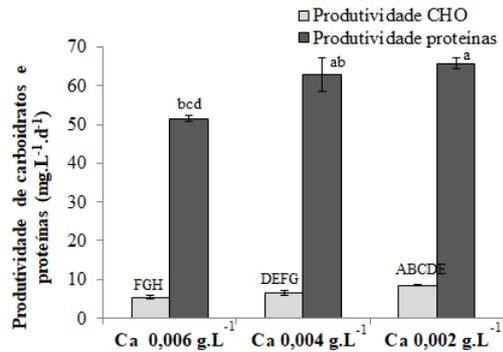
c) Suplementação de Cálcio



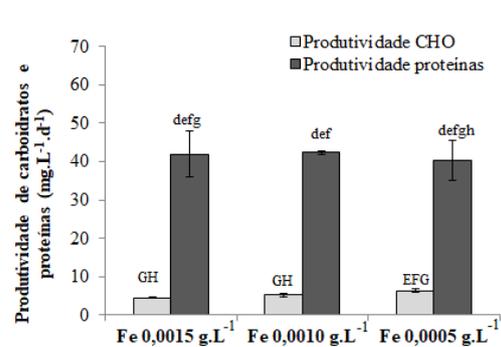
d) Suplementação de Ferro



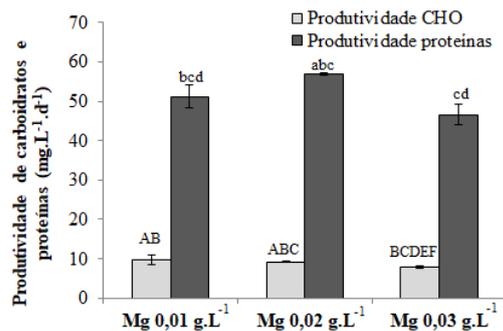
e) Limitação de Cálcio



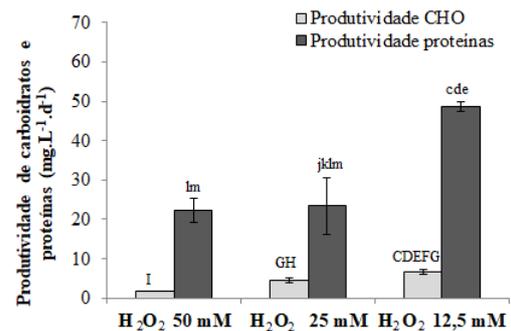
f) Limitação de Ferro



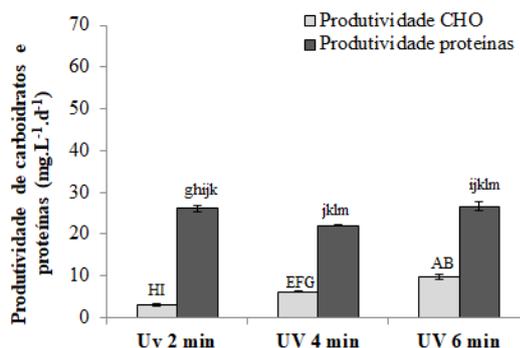
g) Limitação de Magnésio



h) Peróxido de Hidrogênio



i) Radiação Ultravioleta



Valores médios \pm desvio padrão. Letras iguais em barras de cores iguais indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). Letras maiúsculas referem-se às produtividades de carboidratos e letras minúsculas às produtividades de proteínas.

O acúmulo de carboidratos quando a limitação de cálcio foi utilizada (Figura 5e) foi inferior aos dos ensaios com suplementação de Ca, apresentando teores máximos de carboidratos de $10,90 \pm 0,29\%$ para a concentração de cálcio em $0,002 \text{ g.L}^{-1}$. A produtividade de carboidratos do melhor ensaio da suplementação de cálcio ($0,0108 \text{ g.L}^{-1}$, Figura 6c) foi de $8,48 \pm 1,72 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, semelhante aos encontrados na limitação de Ca (Figura 6e) em concentração de $0,002 \text{ g.L}^{-1}$ ($8,50 \pm 0,22 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Neste estudo as diferentes concentrações de ferro adicionadas tanto na limitação (Figura 5f), quanto na suplementação (Figura 5d), do metal não resultaram em diferenças significativas entre os teores de carboidratos e proteínas, e nem sobre as produtividades (Figura 6f e 6d), não apresentando também diferenças em relação aos controles.

Em estudo similar a este desenvolvido por Sun et al. (2014), realizado com diferentes concentrações de ferro ($0-0,37 \text{ mM}$), também não houve diferenças significativas na produção de carboidratos entre as concentrações de suplementação e limitação de Fe^{3+} , quando cultivada sob condições de limitação de nitrogênio, e em dois estágios, utilizando a microalga *Neochloris oleoabundans* HK-129. Neste mesmo estudo, um aumento significativo nos teores de carboidratos somente ocorreu com um aumento na intensidade de luz de 50 para $100 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, mas diminuiu na medida em que a intensidade de luz aumentou de 100 para $300 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. A maior concentração de carboidratos foi de $44,16\%$ com uma produtividade de $91,85 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtida com intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.

Os três níveis de limitação de magnésio propostos neste estudo apresentaram efeitos semelhantes entre si, sobre os teores de carboidratos (Figura 5g) e as produtividades (Figura 6g). A produtividade de carboidratos obtida na condição de cultivo com a menor concentração de Mg foi uma das maiores neste estudo, sendo inferior apenas às obtidas nos cultivos com

NaCl e radiação UV durante 6 min. O magnésio desempenha um papel fundamental nas microalgas, uma vez que é parte constituinte das moléculas de clorofila, além de possuir outras funções essenciais para a célula, tais como agregação de ribossomos em unidades funcionais e formação de catalase (BECKER, 2004).

Em relação aos demais micronutrientes utilizados como fontes limitantes neste estudo, o Mg é o que possui maior concentração no meio Zarrouk, seguido pelo Ca e Fe (Mg>Ca>Fe). Logo, pode-se sugerir que os nutrientes e micronutrientes que possuem maiores concentrações no meio de cultivo, quando limitados, resultam em maiores estresses as microalgas, como já foi verificado em outros estudos, principalmente em relação ao nitrogênio e fósforo.

Em relação ao peróxido de hidrogênio (Figura 6h), quanto maiores as concentrações de H₂O₂, menores foram as produtividades de carboidratos. Para a concentração de 12,5 mM obteve-se produtividade de carboidratos de 6,63±0,56 mg.L⁻¹.d⁻¹, sendo reduzida para 4,55±0,58 mg.L⁻¹.d⁻¹ em 25 mM e 1,82±0,04 mg.L⁻¹.d⁻¹ em 50 mM de H₂O₂. Outros estudos demonstram a utilização do peróxido como agente estressor para a obtenção de produtos alvos, como por exemplo, os lipídios. Concentrações de 2 mM, 4 mM e 6 mM de H₂O₂ foram utilizadas na microalga *C. vulgaris* em estudo proposto por Battah et al (2015). O uso de peróxido de hidrogênio 2 mM e 4 mM mostrou inibição do crescimento com estimulação do conteúdo lipídico, enquanto que o peróxido 6 mM teve um efeito letal sobre as células. O estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio também foi utilizado em *Scenedesmus* sp para estimular a biossíntese de triglicerídios (SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017).

Estudos têm demonstrado uma relação entre a radiação UV-B e a síntese proteica, incluindo reduções significativas nos padrões da biossíntese de determinadas proteínas e indução de proteínas específicas e alterações nas intensidades das bandas de algumas proteínas (ABO-SHADY et al., 2008). Embora muitas pesquisas foquem na radiação UV-B, acredita-se que a radiação UV-C como a utilizada neste estudo, tenha efeitos mais eficientes nas microalgas, por ser mais energética (SHARMA et al., 2014). Assim a mutagênese por UV-C juntamente com outros estresses, seja nutricional ou ambiental, podem estimular a síntese de carboidratos ou produtos alvo, como foi evidenciado neste estudo e por Sharma et al (2014), que obteve produção de lipídios em *Tetraselmis* sp. ao utilizar radiação UV-C e estresse nutricional.

O tempo de exposição à radiação ultravioleta foi fundamental para o acúmulo de carboidratos em *S.platensis* (Figura 5i). Foi verificado que no maior tempo de exposição (6

min), obtiveram-se os maiores teores de carboidratos, sendo de $19,83 \pm 1,18\%$ e uma das maiores produtividades de carboidratos (Figura 6i), sendo de $9,80 \pm 0,58 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A gravidade do dano do DNA da célula depende do tempo de exposição dos raios UV, já o mecanismo de auto reparo do DNA é interrompido quando mantido no escuro por 24h (LIU et al., 2015).

4.2 Efeito dos estresses nutricionais e ambientais sobre a liberação de biossurfactantes nos meios de cultivo

Em relação às análises de determinação de tensão superficial (Tabela 5) que indica a produção de biossurfactantes extracelulares, não foram observadas reduções no primeiro estágio de cultivo. Da mesma forma os extratos livres de células não produziram emulsões estáveis em ambos os estágios de cultivo, indicando que a produção de biossurfactantes extracelulares não foi produzida.

Foram observadas reduções de tensão superficial no II estágio de cultivo para todos os cultivos realizados com a suplementação de Ca, atingindo reduções máximas de tensão superficial de 24,65% para o ensaio com maior nível de estresse (Ca $0,0324 \text{ g.L}^{-1}$), seguido de 22,12% para o cultivo com menor nível de estresse (Ca $0,0108 \text{ g.L}^{-1}$). Estes cultivos apresentaram as maiores reduções de tensão superficial deste estudo, sendo estatisticamente iguais entre si ($p > 0,05$).

Segundo Cavaleiro e Cooper (2003), substratos solúveis em água são inicialmente utilizados no metabolismo celular principalmente para a síntese de porções hidrofílicas da molécula dos biossurfactantes, enquanto que os substratos lipofílicos são usados para a porção lipofílica. O cálcio é conhecido por ser um micronutriente que possui boa solubilidade, podendo viabilizar a formação das porções hidrofílicas, que associadas às concentrações lipídicas da *S. platensis* pode ter conduzido a redução das tensões superficiais, pela ação dos biossurfactantes.

Em estudo utilizando a microalga *Spirulina platensis* LEB-18, Carvalho (2014) obteve reduções de tensão superficial (70 mN.m^{-1} para $31,2 \text{ mN.m}^{-1}$) quando adicionado 412 mg.L^{-1} de nitrogênio ao meio de cultivo, indicando a potencialidade da microalga para a produção de biossurfactantes. Radmann (2011) também verificou a produção de biossurfactantes a partir da redução da tensão superficial (70 mN.m^{-1} para 43 mN.m^{-1}) quando utilizou-se 5 g.L^{-1} de glicose como fonte de carbono em cultivos com a *Spirulina sp.* LEB-18. Em ambos os

estudos, a quantificação da produção de biossurfactantes foi intracelular, diferente deste trabalho, onde se analisam os biossurfactantes extracelulares, liberados ao meio de cultivo.

Tabela 5- Efeitos dos estresses celulares sobre a tensão superficial no I e II estágio de cultivo

Experimento	I estágio (inicial) (mN/m)	I estágio (final) (mN/m)	Redução I estágio (%)	II estágio (inicial) (mN/m)	II estágio (final) (mN/m)	Redução II estágio (%)
Controle 1 (Zarrouk 50%)	47,45±0,74	56,47±3,68	ND	49,41±3,79	62,53±0,95	ND
Controle 2 (Zarrouk 20%)	47,04±0,08	62,33±1,65	ND	66,74±0,06	64,19±0,49	3,82±0,82 ^b
NaCl 200mM	48,09±0,97	49,26±0,62	ND	54,43±3,71	54,15±0,34	0,30±6,16 ^b
NaCl 300mM	45,59±0,69	49,84±0,54	ND	57,30±1,34	64,09±0,54	ND
NaCl 400mM	44,30±0,84	56,72±2,78	ND	51,10±0,85	54,98±1,49	ND
Ca 0,0108 g.L ⁻¹	55,44±1,03	54,48±2,71	ND	52,78±0,51	42,73±3,76	22,12±10,6 ^a
Ca 0,0216 g.L ⁻¹	47,39±2,22	55,78±1,04	ND	55,07±1,46	48,99±1,41	8,93±2,77 ^b
Ca 0,0324 g.L ⁻¹	50,43±1,88	57,11±2,04	ND	60,09±2,14	45,29±3,13	24,65±3,79 ^a
Fe 0,0075 g.L ⁻¹	46,52±0,24	51,40±0,74	ND	47,94±0,47	66,51±1,69	ND
Fe 0,015 g.L ⁻¹	45,97±1,96	51,42±0,16	ND	50,83±3,07	58,56±1,05	ND
Fe 0,0225 g.L ⁻¹	50,67±0,71	53,39±3,28	ND	48±0,27	64,97±2,74	ND
Mg 0,03 g.L ⁻¹	58,07±0,04	59,25±1,51	ND	53,86±2,57	70,45±,63	ND
Mg 0,02 g.L ⁻¹	54,57±5,42	57,02±0,36	ND	54,67±0,69	69,25±0,61	ND
Mg 0,01 g.L ⁻¹	54,64±3,59	53,02±4,27	3,01±1,44	60,52±0,53	61,77±10,54	ND
Ca 0,006 g.L ⁻¹	59,36±0,93	63,07±9,40	ND	59,04±1,03	57,82±4,14	2,11±5,3 ^b
Ca 0,004 g.L ⁻¹	64,01±0,77	61,77±0,83	3,49±0,14	60,82±0,80	63,23±6,65	ND
Ca 0,002 g.L ⁻¹	61,74±2,43	69,79±1,56	ND	67,63±1,10	69,06±1,37	ND
Fe 0,0015 g.L ⁻¹	53,99±1,36	69,67±0,15	ND	60,02±0,45	57,89±7,60	3,51±13,39 ^b
Fe 0,001 g.L ⁻¹	57,47±1,32	69,92±0,00	ND	58,52±0,49	54,44±0,19	7,45±0,45 ^b
Fe 0,0005 g.L ⁻¹	58,18±0,31	69,71±2,06	ND	59,48±1,24	60,26±6,68	ND
UV 6 min	61,87±3,25	64,28±1,51	ND	66,26±0,60	60,74±1,55	8,34±1,51 ^a
UV 4 min	54,61±4,53	67,15±0,95	ND	48,20±3,59	59,43±3,97	ND
UV 2 min	48,77±1,73	62,01±0,96	ND	59,96±0,62	58,06±3,82	ND
H ₂ O ₂ 50 mM	56,17±3,08	55,61±0,47	0,82±6,26	54,73±1,20	52,07±1,13	4,85±0,01 ^b
H ₂ O ₂ 25mM	51,54±0,27	54,97±0,49	ND	50,66±3,69	53,97±0,46	ND
H ₂ O ₂ 12,5mM	52,19±0,84	64,45±0,01	ND	67,11±2,23	61,47±0,24	8,36±2,69 ^b

ND: não detectado. Valores médios±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança (p>0,05).

Philipps et al. (1991) demonstraram que a partir do aumento do crescimento celular se tem um aumento da viscosidade dos cultivos da *Cyanospira capsulata*. Este estudo concorda com esta pesquisa, visto que na maioria dos cultivos foi verificado um aumento das tensões superficiais conforme se aumentou a concentração de biomassa.

As determinações das atividades emulsificantes não apresentaram emulsões água/óleo. Observa-se que os resultados entre as tensões superficiais e as atividades emulsificantes não apresentaram resultado similar, isso pode ocorrer devido ao tipo de biossurfactante presente, o

qual apresentou afinidade em reduzir tensão superficial ao invés de gerar emulsões estáveis. Outra hipótese pode ser justificada pelas características dinâmicas e estruturais da membrana, que podem ser modificadas pelas alterações das condições ambientais, ou seja, mudança na composição molecular na membrana ou adição de células estranhas que interagem com a mesma (BENEY; GERVAIS, 2001), podendo influenciar na redução das tensões superficiais.

4.3 Efeito do aumento da intensidade luminosa e variação do fotoperíodo sobre a cinética microalgal, composição bioquímica e produção de biossurfactantes

Nesta etapa do estudo, foram realizados ensaios a fim de verificar a influência do fotoperíodo e intensidade luminosa sobre o crescimento da *S. platensis* e sua composição bioquímica (carboidratos e proteínas). Para isso, os cultivos foram inicialmente realizados nos mesmos parâmetros dos utilizados nos demais estresses (luminosidade de 44,55 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Zarrouk 50%, temperatura de 30°C). Após 18 d de cultivo, os ensaios foram colhidos por centrifugação, reinoculados em Zarrouk 20% e incubados em BOD, em condições superiores de luminosidade, sendo esta de 67,5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de luzes de LED, e variação do fotoperíodo de 06h/18h, 18h/06h e 12h/12h claro/escuro.

As maiores taxas de crescimento foram verificadas quando utilizado fotoperíodo de 18h/06h claro/escuro, conforme demonstrado na Figura 7 e Tabela 6 (cinética de crescimento). Isso ocorre devido a maior atividade de fotossíntese da microalga, que leva a um maior crescimento celular. A $\mu_{\text{m\u00e1x}}$ do segundo estágio foi superior ao do primeiro, sendo de $0,159 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ e tempo de geração de 4 d, tendo produtividade no segundo estágio de $0,13 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, sendo este o melhor desempenho demonstrado até esta etapa da pesquisa. Quanto maior o fotoperíodo claro mais rápidas as taxas de crescimento e maiores as densidades celulares. O efeito de uma maior intensidade de luz na composição bioquímica da fotossíntese das algas é controlado por processos chamados de foto-aclimação ou foto-adaptação, onde ocorrem mudanças dinâmicas nas vias metabólicas, para aumentar o crescimento celular (HU, 2004).

Figura 7- Cultivos realizados em luminosidade de $67,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e varia\u00e7\u00e3o do fotoper\u00edodo

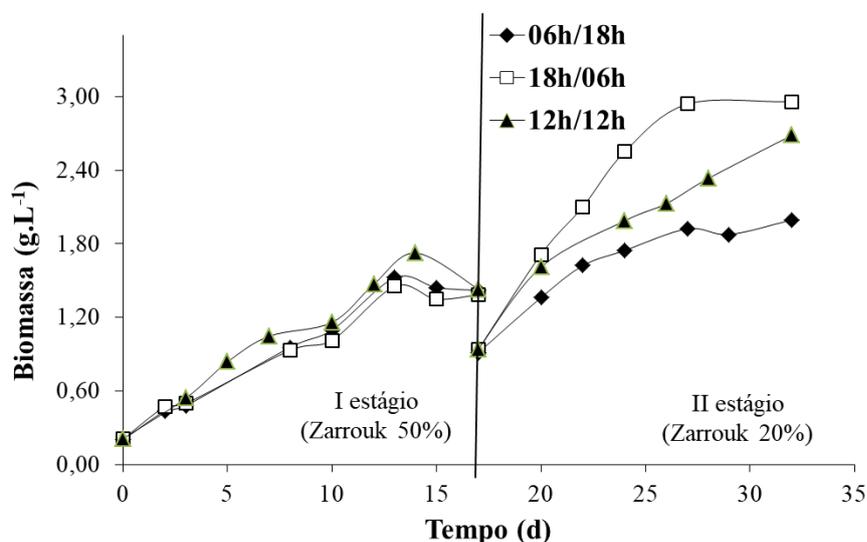


Tabela 6- Velocidade espec\u00edfica m\u00e1xima ($\mu_{\text{m\u00e1x}}$), tempo de gera\u00e7\u00e3o (tg) e produtividades.

Experimento		06h/18h	18h/06h	12h/12 h
$\mu_{\text{m\u00e1x}}$ (d ⁻¹)	I est\u00e1gio	0,141 \pm 0,00 ^a	0,138 \pm 0,02 ^a	0,132 \pm 0,02 ^a
	II est\u00e1gio	0,073 \pm 0,00 ^b	0,159 \pm 0,01 ^a	0,072 \pm 0,01 ^b
tg (d)	I est\u00e1gio	5 \pm 0,07 ^a	5 \pm 0,00 ^a	5 \pm 0,66 ^a
	II est\u00e1gio	9 \pm 0,44 ^b	4 \pm 0,16 ^a	10 \pm 1,29 ^b
Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	I est\u00e1gio	0,07 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,00 ^a	0,07 \pm 0,02 ^a
	II est\u00e1gio	0,07 \pm 0,00 ^b	0,13 \pm 0,02 ^a	0,12 \pm 0,00 ^a
	P. final	0,06 \pm 0,00 ^b	0,09 \pm 0,01 ^a	0,08 \pm 0,00 ^{ab}

(I ao II est\u00e1gio)

Valores m\u00e9dios \pm desvio padr\u00e3o. Letras iguais na mesma linha indicam igualdade estat\u00edstica em um n\u00edvel de 95% de confian\u00e7a ($p>0,05$).

A intensidade de luz e o fotoper\u00edodo desempenham um papel importante no crescimento e composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica das microalgas. Sob altas intensidades de luz ($100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoper\u00edodo de 18h/06h claro/escuro, a microalga *Nannochloropsis* sp. foi cultivada, demonstrando resultados satisfat\u00f3rios ao maximizar a concentra\u00e7\u00e3o celular ($6,5 \times 10^7$ células.mL⁻¹) e os teores lip\u00eddicos (31,3%) (WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013). Em estudo desenvolvido por George et al. (2014), diferentes intensidades de luz e fotoper\u00edodos foram utilizados na microalga *Ankistrodesmus* sp. a fim de avaliar a composi\u00e7\u00e3o bioqu\u00edmica e o crescimento da microalga. Os resultados reportam altas taxas de crescimento e

produtividades de biomassa, além de maiores teores de carboidratos sob alta intensidade luminosa ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Em função do fotoperíodo foi observado que o aumento do fotoperíodo a partir dos regimes de 12h/12h resultou em diminuição na taxa de crescimento.

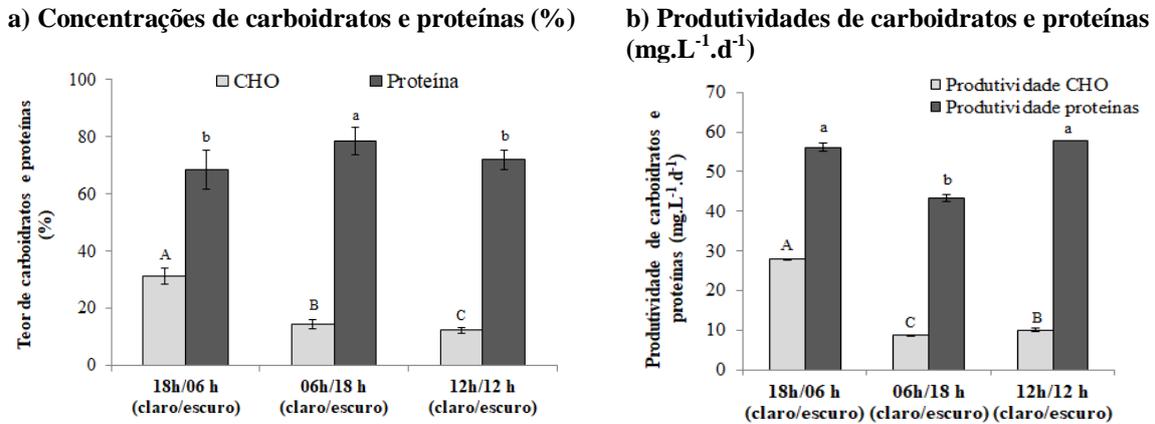
Mesmo nos experimentos com menor período de exposição à luz, 06h/18 h, obteve-se alta $\mu_{\text{máx}}$ ($0,073 \pm 0,00 \text{ d}^{-1}$), quando comparado com os ensaios realizados na primeira fase experimental ($\mu_{\text{máx}}$ $0,040 \text{ d}^{-1}$ para o Controle 2 em Zarrouk 20%). Esse fato evidencia a influência de uma maior intensidade de luz sobre os cultivos com a *S. platensis*.

Muitos estudos investigaram o efeito da intensidade de luz sobre a síntese de compostos de interesse, mostrando diferentes tendências. Ao investigar o efeito da intensidade de luz (21, 42, e $63 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (8h/16h, 12h/12h, e 16h/8h claro/escuro), sobre a produção de biomassa e a composição bioquímica da microalga *N. calcícola*, Khajepour et al. (2015) verificaram que a microalga prefere luz fraca. No entanto, a maioria dos níveis de intensidade de luz e fotoperíodo não demonstraram impacto significativo na produção de biomassa. Um aumento na intensidade de luz representou uma redução nos conteúdos proteicos e um aumento nos teores de carboidratos. O mesmo foi observado quando a duração de luz (fotoperíodo) aumentou.

As concentrações de carboidratos e proteínas intracelulares (Figura 8a), bem como as produtividades destes compostos (Figura 8b) durante os cultivos, são apresentados. Os resultados demonstram maiores concentrações de carboidratos ($31 \pm 0,20\%$) e produtividade de carboidratos ($27,84 \pm 0,18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) para a condição de fotoperíodo com 18h/06h claro/escuro, sendo o melhor resultado de todos os experimentos realizados deste estudo. Estas concentrações demonstraram diferença estatística quando comparado aos ensaios submetidos as demais variações de fotoperíodo.

Em relação a outros trabalhos utilizando a *S. platensis* altas produtividades de carboidratos foram encontradas utilizando-se fontes orgânicas no meio de cultivo, como no estudo proposto por Salla et al. (2016) a qual relatou produtividade de carboidratos de $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ utilizando resíduos da ultrafiltração e nanofiltração de soro de leite. Ou ainda utilização da limitação das fontes de nitrogênio (8,4 g de NaHCO_3) ou 0,3 vvm de CO_2 (5 min) no estudo proposto por Braga et al., (2018), que resultou em concentrações de carboidratos de 59,1% p.p⁻¹ e 49,3% p.p⁻¹, respectivamente.

Figura 8- Concentrações de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de *Spirulina platensis* ao final do segundo estágio e respectivas produtividades em carboidratos e proteínas ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)



Valores médios \pm desvio padrão. Letras iguais em barras de cores iguais indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança ($p>0,05$). Letras maiúsculas referem-se aos teores e produtividades de carboidratos e letras minúsculas aos teores e produtividades de proteínas.

O aumento de carboidratos em maiores intensidades de luz pode ser uma maneira da *S.platensis* controlar os reservatórios de carbono e o armazenamento de energia para ajustar seu crescimento sob condições ambientais variáveis, como a limitação de nutrientes utilizada no segundo estágio do cultivo. Markou, Chatzipavlidis e Georgakakis (2012b) estudaram a intensidade de luz ($24, 42$ e $60 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e demonstraram não haver efeito no teor de carboidratos da *S. platensis*, exceto quando outros fatores de estresse foram combinados a este, como a limitação de fósforo. Esses resultados nos levam a acreditar que devem existir fatores combinados de estresse para se acumular maiores teores de carboidratos nas células.

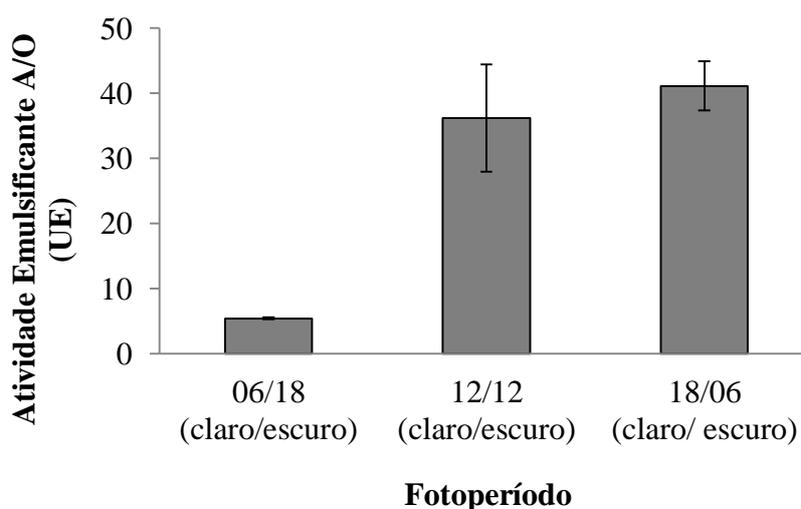
Em oposição às condições que propiciaram acúmulo de carboidratos, a maior concentração de proteínas foi obtida nas condições de 06h/18h claro/escuro. Entretanto, as melhores produtividades foram obtidas nos ensaios com maiores períodos de exposição a luz (18h/06h e 12h/12h), em função do efeito da variável sobre a concentração celular. Em geral, o conteúdo de proteínas diminui conforme se aumenta a intensidade de luz, ocorrendo um aumento nas concentrações intracelulares de carboidratos.

A exposição dos cultivos no segundo estágio a níveis superiores de intensidade de luz e duração de luminosidade desencadearam a produções de emulsões, como pode ser observado na Figura 9. Verifica-se que nos dois maiores períodos de exposição de luz, 12h/12h ou 18h/06h claro/escuro, houve um aumento nas unidades formadoras de emulsão.

O aumento da concentração de células apresentou relação proporcional à produção de biossurfactantes, determinados a partir das atividades emulsificantes. Em geral, a melhora de produção de um composto alvo ocorre pelas condições de estresse nos cultivos, que desencadeia em um desvio do metabolismo, levando a produção de compostos específicos, como os carboidratos, lipídios que compõe os biossurfactantes (RADMANN et al., 2015).

A *S.platensis* apresenta em sua composição compostos como glicolipídios, fosfolipídios e lipídios neutros, que por sua vez possuem efeito biossurfactante (CARVALHO, 2014). Em estudo desenvolvido por Costa et al. (2019) verificou-se a presença de produção de biossurfactantes por *Spirulina* sp. LEB 18. As nanoemulsões foram obtidas a base de lipídios extraídos da microalga, com incorporação de biopeptídios obtidos desta mesma microalga.

Figura 9- Atividade emulsificante dos extratos livres de células ao final do segundo estágio de cultivo para os ensaios submetidos a diferentes condições de luminosidade



A Tabela 7 traz a relação das tensões em ambos os estágios de cultivo. Diferente das atividades emulsificantes, a presença de biossurfactantes não foi verificada a partir das leituras das tensões superficiais.

Tabela 7- Tensões superficiais para os cultivos submetidos a diferentes fotoperíodos e intensidade luminosa no primeiro e segundo estágio de cultivo

Experimento	1° estágio (inicial) (mN/m)	1° estágio (final) (mN/m)	Redução 1° estágio (%)	2° estágio (inicial) (mN/m)	2° estágio (final) (mN/m)	Redução 2° estágio (%)
06h/18h	52,05±0,52	61,88±7,38	ND	46,11±0,83	61,10±2,02	ND
18h/06h	51,20±0,63	60,05±0,27	ND	48,00±1,05	60,86±0,35	ND
12h/12h	55,16±0,71	68,67±0,21	ND	66,96±1,73	63,50±0,42	5,14±1,82

4.4 Definição dos melhores parâmetros de cultivo para a etapa de combinação de estresses celulares

Na fase de aplicação de estresses celulares foram verificadas perdas de biomassa entre a transição do primeiro para o segundo estágio. Relacionado a isso, o cultivo em mais de uma fase pode consumir mais energia em comparação a sistemas em um único estágio, especialmente quando a colheita é um fator essencial para a realização do próximo estágio (DEL RÍO et al., 2008). Levando em consideração que o consumo de energia no processo de centrifugação é um parâmetro significativo nos custos totais da produção, podendo ainda causar um declínio das produtividades celulares e de carboidratos, optou-se por realizar um cultivo em dois estágios sem o processo de colheita da biomassa no fim do primeiro estágio.

Em relação aos ensaios controles em meio Zarrouk diluído de 50% e 20%, verificou-se que a limitação de nutrientes em 20% não afetou a produtividade em células, podendo ser inserida desde o primeiro estágio de cultivo. É verificado que as cianobactérias como a *S. platensis* ajustam a absorção de nutrientes de acordo com a disponibilidade. Logo, elas podem armazenar grandes quantidades de um nutriente, como também podem crescer em condições limitadas destes (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Outro ponto avaliado foram as concentrações de carboidratos obtidas na primeira fase deste estudo. Os maiores percentuais de carboidratos ocorreram para os ensaios expostos aos três níveis de NaCl (200mM, 300mM e 400 mM), menor concentração de magnésio (0,01 g.L⁻¹) e para a exposição de radiação UV em 6 min. Ainda sobre os estresses, verificou-se influência positiva da intensidade de luz/fotoperíodo nos parâmetros cinéticos e nas produtividades de carboidratos. Nos maiores tempos de exposição à luz (18h/06h claro/escuro) ocorreram os maiores crescimentos celulares, devido ao maior período de fotossíntese pela microalga, conduzindo também as maiores concentrações (31%) e produtividades de carboidratos (27,84 mg.L⁻¹.d⁻¹).

A partir dos parâmetros avaliados, foram selecionados para a última etapa do estudo: modo de cultivo em dois estágios, realizando-se o crescimento da *S. platensis* em meio Zarrouk 20% com limitação de magnésio (0,01 g.L⁻¹), intensidade de luz de 67,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 18h/06h claro/escuro, sendo realizada em BOD, com luz de LED. Ao final do estágio em 18 d, inseriu-se os estresses por NaCl 300 mM ou radiação UV por 6 min (segundo um delineamento fatorial completo 2²). O segundo estágio foi encerrado ao ser verificado a fase estacionária de crescimento.

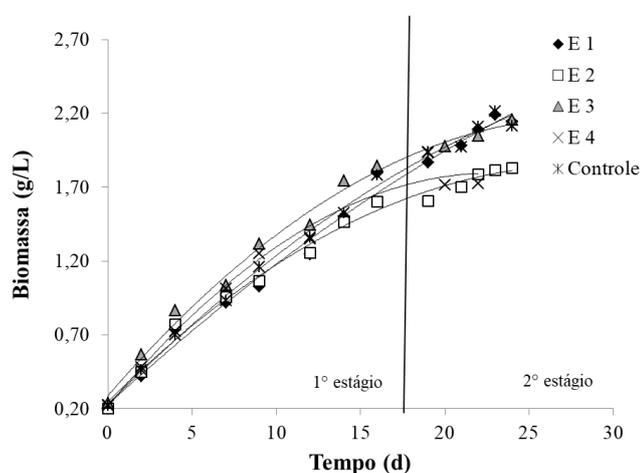
As curvas de crescimento da *S. platensis* cultivadas sob limitação de nutrientes (Zarrouk 20% na qual a concentração de Mg foi de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$) e diferentes combinações de estresse (NaCl e UV), selecionadas na etapa I, são mostrados na Figura 10. As velocidades específicas de crescimento celular, o tempo de geração e produtividades finais de biomassa de cada estágio são apresentadas na Tabela 8.

Para a realização da análise de variância (ANOVA) foram utilizados os resultados dos tratamentos obtidos no delineamento (E1, E2, E3 e E4), submetidos a diferentes condições de estresse por NaCl e radiação UV. Para a comparação destes resultados com o controle (sem limitação de Mg) foi realizado o teste de Tukey.

No primeiro estágio, os cultivos permaneceram em crescimento por 18 d e apresentaram concentração média de biomassa de $1,70 \pm 0,15 \text{ g.L}^{-1}$, semelhante as concentrações médias encontradas nos cultivos submetidos a primeira etapa do estudo ($1,64 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$). Os diferentes tratamentos aplicados no segundo estágio resultaram em comportamento semelhante no crescimento celular, com exceção do experimento E4, que apresentou efeito negativo na concentração de biomassa.

As menores produtividades finais em células foram encontradas nos tratamentos E2 (NaCl) e E4 (NaCl e UV), ambos com estresse por NaCl ($p < 0,05$). Isso demonstra o efeito negativo da salinidade sobre o crescimento da *S. platensis*. É conhecido que tanto a aplicação de radiação UV quanto a presença de altas taxas de NaCl retardam o crescimento celular, devido a formação de espécies reativas de oxigênio, que inibem o processo de fotossíntese e a divisão celular (SINGH et al., 2018).

Figura 10- Efeito das condições de cultivo sobre a curva de crescimento da *S. platensis* cultivada em meio Zarrouk 20%



Exp.1: 0 mM NaCl e 0 min UV, **Exp.2:** 300mM NaCl e 0 min UV, **Exp. 3:** 0 mM NaCl e 6 min UV **Exp.4:** 300 mM NaCl e 6 min UV.

Estudos demonstram que os tratamentos com a radiação UV predisõem independente da salinidade, redução na taxa de crescimento e na viabilidade celular, além de afetar os parâmetros morfológicos (PEREIRA et al., 2018). Quando as células são expostas a altas intensidades luminosas, como a radiação UV, o excesso de elétrons na cadeia de transporte induz a geração de espécies reativas de oxigênio, causando a inibição da fotossíntese, co-oxidação de pigmentos, peroxidação lipídica, destruição da membrana e desnaturação de proteínas (HE et al., 2015). Neste estudo, foram verificadas maiores influências devido ao efeito da alta salinidade aos quais os cultivos foram expostos.

Tabela 8- Velocidade específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), tempo de geração (tg) e produtividade final para os cultivos submetidos a combinação de estresses por NaCl e radiação UV.

Experimento	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d^{-1})	tg (d)	Produtividade final ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
E1	0,117±0,004 ^a	5,94±0,20 ^a	0,081±0,002 ^a
E2	0,110±0,007 ^a	6,31±0,42 ^a	0,068±0,002 ^b
E3	0,105±0,021 ^a	6,77±1,39 ^a	0,080±0,002 ^a
E4	0,120±0,007 ^a	5,78±0,32 ^a	0,068±0,004 ^b
Controle	0,114±0,009 ^a	6,10±0,50 ^a	0,079±0,002 ^a

Valores médios \pm desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança ($p>0,05$). **Exp.1:** 0 mM NaCl e 0 min UV, **Exp.2:** 300mM NaCl e 0 min UV, **Exp. 3:** 0 mM NaCl e 6 min UV **Exp.4:** 300 mM NaCl e 6 min UV.

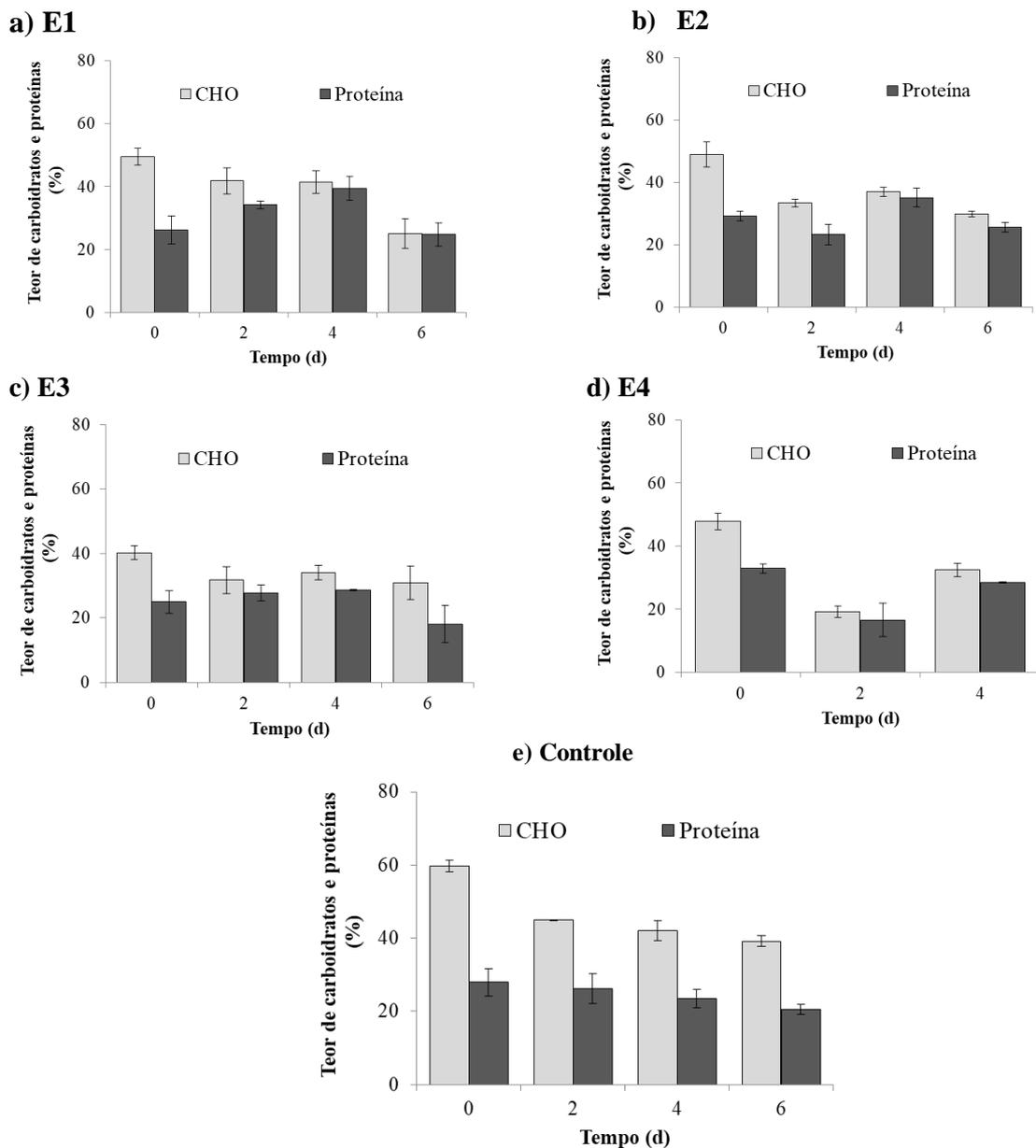
Embora o magnésio seja um elemento essencial para a produção de biomassa em microalgas, por participar de processos vitais, como reações de ATP para a fixação de carbono, e por ser parte constituinte do aparelho fotossintético e em partículas das clorofilas (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014), não foi verificada influência da limitação do micronutriente sob a taxa de crescimento celular e cinética da *S. platensis*. Assim como não foram verificadas diferenças significativas para um nível de 95% de confiança para as $\mu_{m\acute{a}x}$ e tg para os tratamentos. Isso ocorreu porque os cultivos possuíam as mesmas condições de cultivo no primeiro estágio, com fase logarítmica de 16 d apresentada no primeiro estágio.

As determinações de carboidratos e proteínas foram realizadas a contar do 18^o d, período em que se aplicaram os estresses por NaCl em 300 mM e radiação UV 6 min. As quantificações de carboidratos foram realizadas em quadro tempos (0 d, 2 d, 4 d e 6 d) a fim de demonstrar a evolução dos teores de carboidratos e proteínas em relação ao período de exposição da *S. platensis* aos estresses por NaCl, radiação UV e limitação de magnésio.

As concentrações de carboidratos e proteínas e suas respectivas produtividades são demonstradas pelas Figuras 11 e 12. Para a comparação entre as melhores médias da

composição de carboidratos e proteínas obtidas no 18º d (Tempo 0d, II estágio) de cultivo, foi realizado o teste de Tukey. Os resultados entre as médias são demonstrados na Tabela 9.

Figura 11- Concentrações de carboidratos e proteínas (%m/m) intracelulares na biomassa de *Spirulina platensis* em função do tempo no segundo estágio dos cultivos nos experimentos submetidos ao planejamento fatorial completo 2² e o controle (níveis normais de Mg em Zarrouk 20%)

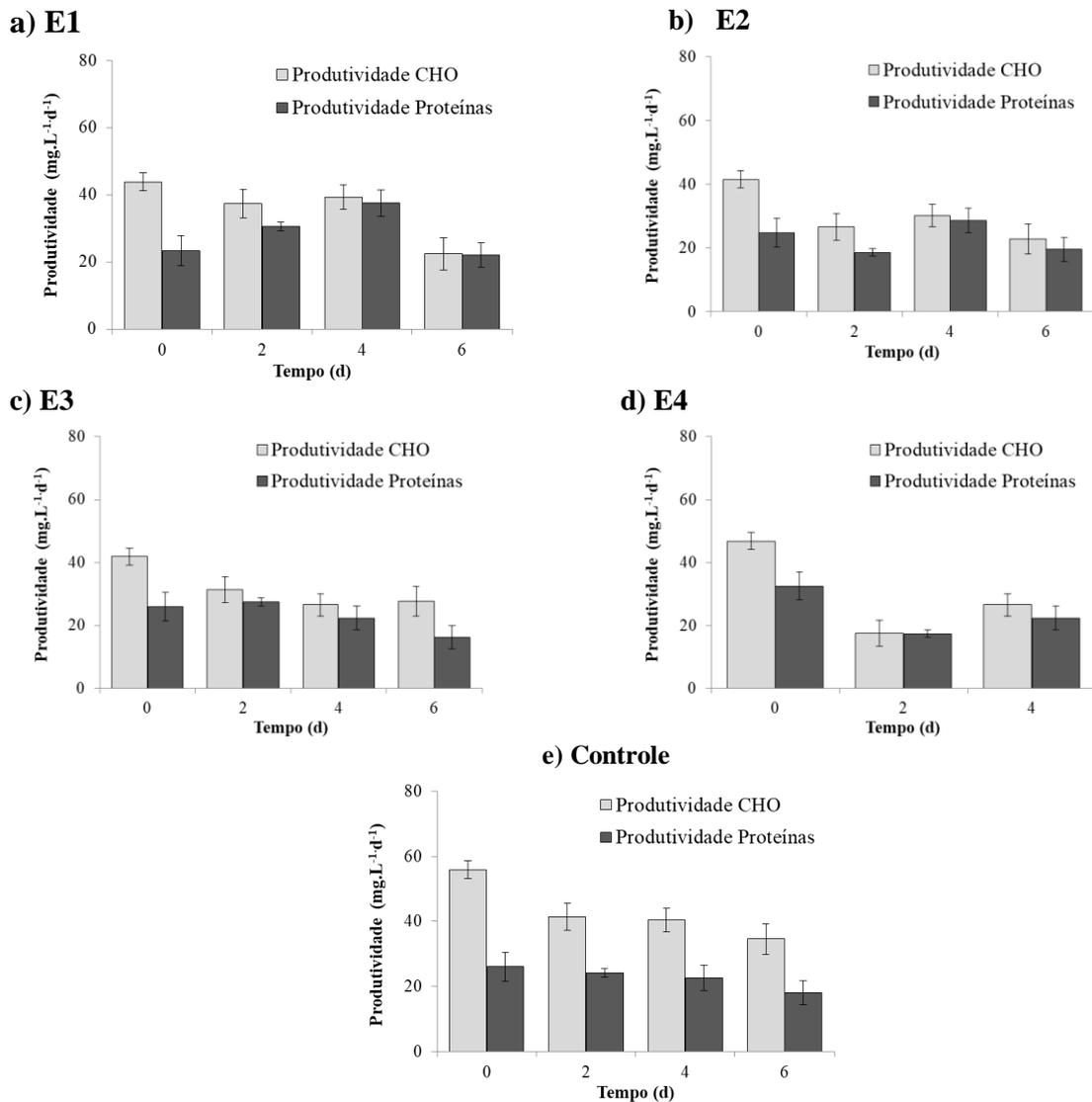


E1: 0 mM NaCl e 0 min UV, **E2:** 300mM NaCl e 0 min UV, **E3:** 300 mM NaCl e 6 min UV **E4:** 0 mM NaCl e 6 min UV.

As maiores concentrações de carboidratos foram verificadas no tempo inicial de exposição ao estresse celular no segundo estágio (18º d), sendo superior para o cultivo

controle cultivado em Zarrouk 20% com fotoperíodo de 18h/06h claro/escuro e luminosidade de $67,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, onde obteve-se $59,71 \pm 1,64\%$ de carboidratos, seguido pelo cultivo E1 (níveis inferiores de Mg)- $49,46\%$, E2 (níveis inferiores de Mg + NaCl)- $48,96\%$ e E4 (níveis inferiores de Mg + NaCl e UV)- $45,91\%$. Destes tratamentos, o E1, E2 e o cultivo controle apresentaram igualdade estatística. Para as proteínas, as maiores concentrações foram encontrados no tempo de 4 d após o estresse, para os ensaios E1 ($39,43\%$), E2 ($35,16\%$) e E3 ($32,88\%$).

Figura 12- Produtividade de carboidratos e proteínas ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) intracelulares na biomassa de *Spirulina platensis* em função do tempo no segundo estágio dos cultivos nos experimentos submetidos ao planejamento fatorial completo 2^2 e o controle (níveis normais de Mg em Zarrouk 20%)



E1: 0 mM NaCl e 0 min UV, **E2:** 300mM NaCl e 0 min UV, **E3:** 300 mM NaCl e 6 min UV **E4:** 0 mM NaCl e 6 min UV.

Tabela 9- Composição bioquímica (carboidratos e proteínas) no tempo de 0d do segundo estágio de cultivo.

Experimento (Tempo 0d II estágio)	Carboidratos (%)	Produtividade Carboidratos (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Proteínas (%)	Produtividade Proteínas (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
E1	49,46±2,73 ^{ab}	43,88±4,15 ^{ab}	26,28±4,51 ^a	23,37±4,91 ^a
E2	48,96±3,95 ^{ab}	41,47±4,32 ^a	29,22±1,65 ^a	24,74±1,97 ^a
E3	40,23±2,07 ^a	41,93±2,29 ^a	24,29±3,53 ^a	25,96±3,76 ^a
E4	45,91±2,62 ^a	46,84±2,34 ^{ab}	31,89±1,46 ^a	32,54±1,25 ^a
Controle	59,71±1,64 ^b	55,85±0,62 ^b	27,93±3,80 ^a	26,07±2,55 ^a

Valores médios ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam igualdade estatística em um nível de 95% de confiança (p>0,05). **E1:** 0 mM NaCl e 0 min UV, **E2:** 300mM NaCl e 0 min UV, **E3:** 0 mM NaCl e 6 min UV **E4:** 300 mM NaCl e 6 min UV.

As maiores concentrações de carboidratos no tempo inicial do segundo estágio podem ter ocorrido devido às condições de estresses ao qual a *S. platensis* foi submetida no primeiro estágio. Condições como limitação de nutrientes, aumento da intensidade luminosa e fotoperíodo são bem documentadas na literatura como fatores que melhoram a síntese de compostos como os carboidratos.

As maiores produtividades de carboidratos foram obtidas para os cultivos controle (55,85 mg.L⁻¹.d⁻¹), E4 (46,84 mg.L⁻¹.d⁻¹) e E1 (43,88 mg.L⁻¹.d⁻¹). Em relação à etapa de seleção de estresses, foi verificado um aumento de aproximadamente 6 vezes nos teores de carboidratos para o cultivo controle (final do primeiro estágio), e de 10,4 vezes nas produtividades de carboidratos para este mesmo cultivo, quando comparados com o cultivo controle em Zarrouk 20%, da etapa anterior do estudo.

As aplicações de múltiplos fatores de estresse vêm sendo relatada na literatura. Chentir et al. (2017), que estudaram uma cepa isolada de *S. platensis*, demonstraram a flexibilidade metabólica da microalga quando exposta a diferentes faixas de intensidade de luz, concentrações de NaCl, nitrogênio e fósforo. As condições de culturas combinadas modificaram significativamente a composição da *S. platensis*. Sob alta intensidade de luz (120 μmol de fótons m⁻².s⁻¹) e baixas concentrações de NaCl (1 g.L⁻¹), NaNO₃ e K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), o teor de carboidratos foi maximizado (3,55 vezes) para 26,61%. O estudo demonstrou que múltiplos fatores de estresse podem ser uma estratégia promissora para produzir biomassa enriquecida de vários compostos de alto valor agregado.

A presença de biossurfactantes a partir das medidas de redução da tensão superficial e formações de emulsões não foram verificadas nesta etapa da pesquisa. Uma hipótese pode ter sido o processo de centrifugação realizado na primeira etapa, o que pode ocasionar na ruptura das células e liberação do material intracelular que contém emulsificantes.

A redução dos custos de produção ainda são uns dos parâmetros a serem alcançados nos cultivos microalgais, assim como uma melhoria nas produtividades. No entanto, foi verificado que é possível se otimizar as produtividades de carboidratos a partir de mecanismos simples. Cultivar microalgas sob condições otimizadas de estresse pode reduzir o custo do cultivo e maximizar o acúmulo de biocompostos de interesse, além de oferecer uma estratégia sustentável para melhorar a produção de biocombustíveis (CHENG; HE, 2014). A limitação de nutrientes combinada com maiores intensidade de luz e fotoperíodo pode ser uma estratégia de menor custo para atingir maiores produtividades de carboidratos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos ensaios com a aplicação de estresses ambientais e nutricionais foi possível observar diferentes resultados no crescimento microalgal e na composição bioquímica da *S. platensis*, bem como na produção de biossurfactantes extracelulares. As melhores condições de estresse para os cultivos em dois estágios, visando o acúmulo de carboidratos foram NaCl em 300 mM, radiação ultravioleta com período de exposição de 6 min, limitação de magnésio 0,01 g.L⁻¹ e fotoperíodo de 18h/06h claro/escuro juntamente com intensidade luminosa de 67,5 μmol fótons m⁻² s⁻¹.

A maior produção de biossurfactantes extracelulares observada nos extratos livres de células a partir da redução das tensões superficiais foi verificada na presença de maiores concentrações de cálcio (0,0324 g.L⁻¹ e 0,0108 g.L⁻¹). Já a presença de emulsões estáveis foi verificada nos ensaios com alterações do fotoperíodo/luminosidade.

A combinação de estresses do cultivo controle resultou em um aumento de 6 vezes nos teores de carboidratos e 10,4 vezes nas produtividades de carboidratos, quando comparado ao cultivo controle em meio Zarrouk 20%, da primeira etapa do estudo. A partir da combinação de estresses foi verificado maiores produtividades de carboidratos no tempo final do primeiro estágio, não sendo necessário prolongar o cultivo até o final da fase estacionária de crescimento.

A limitação de nutrientes combinada com maiores intensidade de luz e fotoperíodo apresentou ser uma estratégia eficaz para atingir maiores teores e produtividades de carboidratos em um único estágio de cultivo.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Realizar cultivos na presença de compostos oleosos e fontes orgânicas a fim de verificar a influência sobre a produção de biossurfactantes e composição bioquímica;
- b) Acompanhar o acúmulo e a produtividade de carboidratos durante toda a fase de crescimento;
- c) Realizar o aumento de escala dos cultivos com maiores potenciais de produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ABO-SHADY, A.M.; EL-NAGGAR, A. H.; EI-SHEEKH, M. M.; ABOMOHRRA, A.E. Impact of UV-B radiation on antioxidant enzymes and protein electrophoretic pattern of the green alga *Chlorococcum* sp. **Annals Of Microbiology**, v. 58, n. 2, p.195-201, 2008.
- ACHEAMPONG, M.; ERTEM, F. C.; KAPPLER, B.; NEUBAUER, P. In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: Will biofuels be reliable?. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p.927-937, 2017.
- AIKAWA, S.; IZUMI, Y.; MATSUDA, F.; HASUNUMA, T.; CHANG, J.-S.; KONDO, A. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospiraplantensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. **Bioresource Technology**, v.108, p. 211-215, 2012.
- AL-RASHED, S. A.; IBRAHIM, M. M.; EI-GAALY, G.A.; AL-SHEHRI, S.; MOSTAFA, A. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 706-712, 2016.
- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; RUIZ, J. ARBIB, J, BARRAGÁN, J.; GARRIDO-PERÉZ, M. C.; PERALES, J. A. Wastewater treatment and biodiesel production by *Scenedesmus obliquus* in a two-stage cultivation process. **Bioresource Technology**, v. 181, p.90-96, 2015.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- ARAÚJO, T. S de; SOUZA, S. O de. Protetores solares e o efeito da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, v. 4, n.11, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th. v. II., 2000.
- AZADI, P.; MALINA, R.; BARRETT, S. R. H.; KRAFT, M. The evolution of the biofuel science. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p.1479-1484, set. 2017.
- AZEREDO, V.B.S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. Dissertação (Mestrado em Planejamento energético) UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.87, p. 427-444, 2010.
- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARRINGTON, D. J.; GHADOUANI, A. Application of Hydrogen Peroxide for the Removal of Toxic Cyanobacteria and Other Phytoplankton from Wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 23, p.8916-8921, 2008.

BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J. ; CORCORAN, A. A. ; HOLGUIN, F. O. ; SCHAUB, T. Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Biomass Bioenergy**, v. 54, p. 83–88, 2013.

BATTAH, M.; EL-AYOTY, Y.; ABOMOHRA, A. E.; EL-GHANY, S. A.; ESMAEL, A. Effect of Mn²⁺, Co²⁺ and H₂O₂ on biomass and lipids of the green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential candidate for biodiesel production. **Annals of Microbiology**, v.65, p. 155-162, 2015.

BEER, L.L.; BOYD, E. S.; PETERS, J.W.; POSEWITZ, M. C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 264-271, 2009.

BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition, in A. Richmond (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. (London: Blackwell Science, 2004) 312-351.

BELOKOBYSKY, A.I.; GINTURI, E.I.; KUCHAVA, N.E.; KIRKESALI, E.I.; MOSULISHVILI, L.M.; FRONTASYEVA, M.V.; PAVLOV, S.S.; AKSENOVA, N.G. Accumulation of selenium and chromium in the growth dynamics of *Spirulina platensis*. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 259, n. 1, p. 65-68, 2004.

BENAVENTE-VALDÉS, J.R.; AGUILAR, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL. J. C; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑEZ, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p.117-125, 2016.

BENEY, L. E.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p.34-42, 2001.

BOFF, S. O. Direito, Democracia e Sustentabilidade: Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Direito da Faculdade Meridional. Erechim: Deviant, 2017. 295 p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=KJwqDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA253&dq=energias+renováveis&ots=e0Shkh_vJ&sig=JZEU1SNWBUXeUqVenSPpYkypm1w#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 11 set. 2017.

BONIN, C.; LAN, R. Agronomic and ecological implications of biofuels. **Advances in Agronomy**, v.117, p. 1-50, 2012.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p743–75, 2013.

BRAGA, V.; MANSTRANTONIO, D. J, da S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 269, p.221-226, 2018.

BRÁNYIKOVÁ, I.; MARŠÁLKOVÁ, B.; DOUCHA, J.; BRÁNYIK, T.; BIŠOVÁ, K.; ZACHLEDER, V.; VÍTOVÁ, M. Microalgae-novel highly efficient starch producers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 4, p.766-776, 2010.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae- A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRESSAN, R; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 11, p.411-412, 1998.

CADE-MENUN, B.; PAYTAN, A. Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae. **Marine Chemistry**, v. 121, p. 27-36, 2010.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTROL, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future Prospects. **Science of The Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CARVALHO, Lisiane Fernandes de. **Produção de biossurfactantes e nanoemulsões a partir da microalga *Spirulina***. 2014. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

CAVALERO, D.A; COOPER, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of biotechnology**, v. 103, n.1, p. 31-41.

CHEN, B.; WAN, C., MEHMOOD, M.A., CHANG, J-S., BAI, F., ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products-A review, **Bioresource Technology**, v. 244 , p. 1198-2006, 2017.

CHEN, G. Y.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: a critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282–91, 2015.

CHENG, D.; HE, Q. Assessment of Environmental Stresses for Enhanced Microalgal Biofuel Production- An Overview. **Frontiers In Energy Research**, v. 2, p.1-8, 2014.

CHENTIR, I.; AMMAR, J.; ZILI, F.; MARKOU, G.; OUADA, H. B. Induced change in *Arthrospira* sp. (*Spirulina*) intracellular and extracellular metabolites using multifactor stress combination approach. **Journal Of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p.1563-1574, 2017.

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

CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n.3, p. 294–306, 2007.

CHOKSHI, K.; PANCHA, 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.

CHOKSHI, K.; PANCHA, I.; TRIVEDI, K.; GEORGE, B.; MAURYA, R. ; GHOSH, A.; MISHRA, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**, v. 180, p.162-171, 2015.

CHUNG, I.; LEE, J.; CHUNG, C. Molecular challenges in microalgae towards cost-effective production of quality biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 139-144, 2017.

CIRULIS, J. T. SCOTT, J. A.; ROSS, G. M. Management of oxidative stress by microalgae. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 15-21, 2013.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Z Naturforsch**, v. 59, p. 55-59, 2004.

COLLA, L. M; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, n. 1, p. 85-103, 2003.

COSAZZA, A. A.; FERRARI, P. F.; ALIAKBARIAN, B.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Effect of UV radiation or titanium dioxide on polyphenol and lipid contents of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Algae Research**, v. 12, p. 308-315, 2015.

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

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

COSTA, J.A.V.; DE MORAIS, M.G.; ANDRADE, M. D. R. Microalgal engineering: The metabolic products and the bioprocess. **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**, p. 141-170, 2013.

DEL RÍO, E.; ACIÉN, F. G.; GARCÍA-MALEA, M. C.; RIVAS, J.; MOLINA-GRIMA, E.; GUERRERO, M. G. Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 397-402, 2008.

DELRUE, F.; LI BEISSON, Y.; SETIER, P.A.; SAHUT, C.; ROUBAUD, A.; FROMENT, A.K. Comparison of various microalgae liquid biofuel production pathways based on energetic, economic and environmental criteria. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 205-212, 2013.

DEPRAETERE, O.; PIERRE, G.; DESCHOENMAEKER, F.C.; BADRI, H.; FOUBERT, I.; LEYS, N.; MARKOU, G.; WATTIEZ, R.; MICHAUD, P.; MUYLAERT, K. Harvesting carbohydrate-rich *Arthrospira platensis* by spontaneous settling. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 16-21, 2015.

DESAI, J. D.; BANAT, M. I. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n 1, p. 47-64, 1997.

DISMUKES, G. C.; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.; POSEWITZ, M. C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p.235-240, 2008.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, p. 3331–3335, 2011.

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

EL-BAKY, Hanaa H. Abd; BAZ, F. K. El; EL-BAROTY, Gamal S.. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 3, p.623-631, 2009.

ESAKKIMUTHU, S.; KRISHNAMURTHY, V.; GOVINDARAJAN, R.; SWAMINATHAN, K. Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 88, p.126-134, 2016.

FLETCHER, R.J.; ROBERTSON, B.A.; EVANS, J.; DORAN, P.J. ; ALAVALAPATI, J.R.R. ; SCHEMSKE, D.W. Biodiversity conservation in the era of biofuels: risks and opportunities. **Frontiers in Ecology and Environment**, v.9, p. 161-168, 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GEORGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p.367-374, 2014.

GORAIN, P. C.; BAGCHI, S. K.; MALLICK, N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13-14, p.1887-1894, 2013.

GOUVEIA, L. Microalgae as a feedstock for biofuels. **Springer Briefs in Microbiology**, p. 1-69, 2011.

GRIFFITHS, M. J.; HILLE, R. V.; HARRISON, S. T. L. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 2345-2354, 2014.

GUIHÉNEUF, F.; FOUQUERAY, M.; MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; JACQUETE, B.; TREMBLIN, G. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 5, p. 629-638, 2010.

GÜNERKEN, E.; D'HONDT, E.; EPPINK, M.H.M.; GARCIA-GONZALEZ, L.; ELST, L.; R.H. WIJFFELS, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 2, p.243-260, 2015.

HABIB, M.A.B.; PARVIN, M. HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **Fisheries and Aquaculture Circular**, n. 1034, p. 2–18, 2008.

HANIFZADEH, M.; GARCIA, E. C.; VIAMAJALA, S. Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. **Renewable Energy**, v. 127, p.989-997, 2018.

HASUNUMA, T.; KIKUYAMA, F.; MATSUDA, M.; AIKAWA, S.; IZUMI, Y.; KONDO, A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p.2943-2954, 2013.

HE, Q.; YANG, H.; WU, L.; HU, C. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 219-228, 2015.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgae CO₂ emission mitigation systems- a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 189-198, 2011.

HO, S. H.; NAKANISHI, A.; YE, X, CHANG, J. S.; HARA, K.; HASUNUMA, T. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas sp.* JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 24, p. 87-97, 2014.

HO, S.; CHEN, C; CHANG, J. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p.244-252, 2012.

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

HO, S.-H.; YE, X.; HASUNUMA, T. .; CHANG, J.-S.; KONDO, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae – a critical review. **Biotechnology Advance**, v. 32 , p. 1448-1459, 2014.

HOSSAIN, S. A. B. M.; SALLEH, A.; BOYCE, A. N.; CHOWDHURY, P.; NAQUIDDIN, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 250-254, 2008.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: **Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 54, n.4, p. 621-639, 2008.

HUANG J.; QU, X.; WAN, M.; YING, J.; LI, Y.; ZHU, F.; WANG, J.; SHEN, G.; CHEN, J.; LI, W.. Investigation on the performance of raceway ponds with internal structures by the means of CFD simulations and experiments. **Algal Research**, v. 10, p. 64–71, 2015.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H.G.; LACERDA, L.M.C.F.; FRANCO, T.T. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 48, p.306-310, 2009.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336- 3341, 2011.

JUAN, J.C.; KARTIKA, D.A.; WU, T.Y.; HIN, T. –YY. Biodiesel production from jatropha oil by catalytic and non-catalytic approaches: an overview. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 452- 460, 2011.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Murthy effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. **Energies**, v. 6, p. 4607- 4638, 2013.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S. A.; NASRABADI, R. G.; MARKOU, G. Effect of Light Intensity and Photoperiod on Growth and Biochemical Composition of a Local Isolate of *Nostoc calcicola*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 176, n. 8, p.2279-2289, 2015.

KOKOSSIS, A.C.; TSAKALOVA, M.; PYRGAKIS, K. Design of integrated biorefineries. **Computers & Chemical Engineering**, v. 81, p.40-56, 2015.

KOVÁČIK, J.; DRESLER, S. Calcium availability but not its content modulates metal toxicity in *Scenedesmus quadricauda*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 147, p.664-669, 2018.

KUMAR, V.; NANDA, M.; KUMAR, S.; CHAUHAN, P. K. The effects of ultraviolet radiation on growth, biomass, lipid accumulation and biodiesel properties of microalgae. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 40, n.7, p. 787–793, 2018.

- LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629- 636, 2008.
- LI, J.; LIU, Y.; CHENG, J.J.; MOS, M.; DAROCH, M. Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p.588-596, 2015.
- LI-BEISSON, Y.; BEISSON, F.; RIEKHOF, W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 504-522, 2015.
- LIRA, R. de A.; MARTINS, A.; MACHADO, M. F.; CORRÊDO, L. de P.; MATTOS, A. T. Microalgas como alternativa à produção de biocombustíveis. **Engenharia na agricultura**, v.20, n.5, p. 389-403, 2012.
- LIU, J.; YUAN, C.; HU, G.; LI, F. Effects of light Intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus sp.* 11-1 under nitrogen limitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 2127-2137, 2012.
- LIU, S.; ZHAO, Y.; LIU, L.; AO, X.; MA, L.; WU, M.; MA, F. Improving cell growth and lipid accumulation in green microalgae *Chlorella sp.* via UV irradiation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3507-3518, 2015.
- LIU, Z; WANG, G; ZHOU, B. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p.4717-4722, 2008.
- LOERA-QUEZADA, M. M., ANGELES, G.; OLGUÍN, E. J. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Y Algal**, v. 2, n. 2, p. 81–92, 2011.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima. 606 p, 2006.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.
- LU, C; ZHANG, J. Effects of Salt Stress on PSI! Function and Photoinhibition in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Plant Physiology**, v.155, n. 6, p. 740-745, 1999.
- MAGRO, F. G. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em raceways para a obtenção de matéria-prima para produção de bioetanol**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.
- MALLICK, L; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: responses of algae cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 183-193, 2000.

MARGARITES, A. C.; COSTA, J. A.V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 11, p.80-86, 2014.

MARGARITES, A.C.F. 2014. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2014.

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

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: improvements through phosphorus limitation process. **Bioenergy Research**, v. 5, p.915-925, 2012a.

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, 2012b.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Using natural zeolite for ammonia sorption from wastewater and as nitrogen releaser for the cultivation of *Arthrospira platensis*. **Bioresource technology**, v. 155, p. 373-378, 2014.

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.

MARTINS, G.V.; KALIL, S.J.; BERTOLIN, T.; COSTA, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, n. 9-10, p. 721-726, 2006.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-320, 2010.

MEDIPALLY, S. R.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M. Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MEHDI, S.; DONDAPATI, J. S.; RAHMAN, P. Q. S. M. Influence of nitrogen and phosphorus on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 using glycerol as carbon source. **Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 183-189, 2011.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 196, p. 555-564, 2012.

- MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, v. 63, p.114–22, 2013.
- MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p.1132-1138, 2005.
- MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767, n. 6, p.414-421, 2007.
- NOBRE, B.P.; VILLALOBOS, V.; BARRAGEN, B.E.; OLIVEIRA, A.C.; BATISTA, A.P.; MARQUES, P.A.S.S.; MENDES, R.L.; SOVOVÁ, H.; PALAVRA, A.F.; GOUVEIA, L. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p.128-136, 2013.
- OLIVEIRA, A. C. dos S. M. **Recuperação e purificação de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-GVIIA utilizando melão de cana como substrato**. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- 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, 2015a.
- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GHOSH. A.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. *CCNM 1077*. **Bioresource Technology**, v. 193, p.315-323, 2015b.
- PANIAGUA-MICHEL, J. de J.; OLMOS-SOTO, J.; MORALES-GUERRERO, E.R. Algal and Microbial Exopolysaccharides. **Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications, Part B**, p.221-257, 2014.
- PEREIRA, D.T.; SIMIONIL, C.; OURIQUES, L.C.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; STEINERF, N.; CHOW, F.; BOUZONÉ, Z. L.; SCHMIDT, É.C. Comparative study of the effects of salinity and UV radiation on metabolism and morphology of the red macroalga *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta, Ceramiales). **Photosynthetica**, v. 56, n.3, p. 799-810, 2018.
- PÉREZ-PAZOS, J. V.; FERNÁNDEZ-IZQUIERDO, P. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 4, n.4, 47-58, 2011.
- PERIMENIS, A.; WALIMWIPI, H.; ZINOVIEV, S.; MÜLLER-LANGER, F.; MIERTUS, S. Development of a decision support tool for the assessment of biofuels. **Energy Policy**, p.1782-1793, 2011.

- PHILIPPIS, R. de.; SILI, C.; TASSINATO, G.; VINCENZINI, M.; MATERASSI, R. Effects of Growth Conditions on Exopolysaccharide Production by *Cyanospira capsulate*. **Bioresource Technology**, v. 38, p. 101-104, 1991.
- PIENKOS, P.T; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuel Bioproducts Biorefining**, v, 3, p. 431- 40, 2009.
- PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, M. A. S, OKAMOTO, O. K. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Algae. **Journal Phycol**, v. 39, p. 1008-1018, 2003.
- PIRES, J.C.M.; ALVIM-FERRAZ, M.C.M; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3043 – 3053, 2012
- POPP, J.; LAKNER, Z.; HARANGI-RÁKOS, M.; FÁRI, M. The effect of bioenergy expansion: food, energy and environment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 559-78, 2014.
- PRABANDONO, K.; AMIN, S. Biofuel Production from Microalgae. **Handbook Of Marine Microalgae**, p.145-158, 2015.
- RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.
- RADMANN, E. M.; MORAIS, E. G.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; COSTA, J.A. V. Microalgae cultivation for biosurfactant production. **African Journal Of Microbiology Research**, v. 9, n. 47, p.2283-2289, 2015.
- RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1-3, p.207-219, 2013.
- REN, H.; LIU, B.; KONG, F.; ZHAO, L.; XIE, G.; REN, N. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. **Bioresource Technology**, v. 169, p.763-767, 2014.
- REMPEL, A.; MACHADO, T.; TREICHEL, H., COLLA, E.; MARGARITES, A. C, COLLA, L. M. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource Technology**, v. 263, p.163-171, 2018.
- RICHMOND, A.; VONSHAK, A. (1978) *Spirulina* culture in Israel. **Archive Hydrobiology**, v. 11, p. 274-280, 1978.
- RISMANI, S.; SHARIATI, M. Changes of the Total Lipid and Omega-3 Fatty Acid Contents in two Microalgae *Dunaliella Salina* and *Chlorella Vulgaris* under Salt Stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.60, 2017.
- RITTMANN, B. E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p.203-212, 2008.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; LEE, K. Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 1, p. 68-75, 2017.

SALLA, A. C. V. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído e adicionado de resíduo da indústria láctea**. 2016. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 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.

SANTOS, A.M.; JANSSEN, M.; LAMERS, P.P.; EVERS, W.A.; WIJFFELS, R.H. Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 593-599, 2012.

SCHMITZ, R.; DECESARO, A.; SANTETI, G.; REINEHR, C. O.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Lipídios microalgais utilizados como biossurfactantes em processo de biorremediação de diesel e biodiesel em solo. **Ciência e Engenharia**, v. 24, n. 1, p. 63-70, 2015.

SCHÜLER, L. M.; SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; LEON, R.; VARELA, J. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. **Algae Research**, v. 25, p. 263-273, 2017.

SCOTT, S. A, DAVEY, M. P, DENNIS, J. S, HORST, I, HOWE, C. JBiodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 277-286, 2010.

SENAUER, B. Food Market Effects of a Global Resource Shift Toward Bioenergy. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 90, n. 5, p.1226-1232, 2008.

SHARMA, K.; LI, Y.; SCHENK, P. M. UV-C-mediated lipid induction and settling, a step change towards economical microalgal biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 7, p.3539-3548, 2014.

SHUBA, E-s; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p.743-755, 2018.

SILVA, M. A.; SILVA, A. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Production of Biosurfactants by Pseudomonas Species for Application in the Petroleum Industry. **Water Environmet research**, v. 89, n. 2, p. 117-126, 2017.

SINGH, P.; GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAWAT I, BUX, F. Combined metals and EDTA control: an integrated and scalable lipid enhancement strategy to alleviate biomass constraints in microalgae under nitrogen limited conditions. **Energ Convers Manag**, v. 114, p.100- 109, 2016.

SINGH, R. UPADHYAY, A. K.; CHANDRA, P.; SINGH, D. P. Sodium chloride incites reactive oxygen species in green algae *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*:

Implication on lipid synthesis, mineral nutrients and antioxidant system. **Bioresource Technology**, v. 270, p.489-497, 2018.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment. **Bioresource Technology**, v. 235, p.366-370, 2017.

SU, Y.; SONG, K.; ZHANG, P.; SU, Y.; CHENG, J.; CHEN, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p.402-411, 2017.

SUKENIK, A. Ecophysiological Considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis*-Sp (Eustigmatophyceae). **Bioresource Technology**, v. 35, p. 263-269, 1991.

SUN X, CAO Y, XU H, LIU Y, SUN J, QIAO D. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 204-12, 2014.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTER, R.; MILLHER, G. Miller. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant & Cell Environment**, v. 35, n. 2, p. 259-270, 2012.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends In Plant Science**, v. 13, n. 4, p.178-182, 2008.

TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHANG, J.; LING, T. C.; LAN, J. C. Novel Approaches of Producing Bioenergies from Microalgae: A Recent Review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p.1219-1227, 2015.

TANAKA, S.; IKEDA, K.; MIYASAKA, H.; SHIOI, Y.; SUZUKI, Y.; TAMOI, M.; TAKEDA, T.; SHIGEOKA, S.; HARADA, K.; HIRATA, K. Comparison of three *Chlamydomonas* strains which show distinctive oxidative stress tolerance. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 112, n. 5, p.462-468, 2011.

TANDON, P.; JIN, Q. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p.1089-1099, 2017.

TAO, Y.; ZHANG, X.; AU, D. W. T.; MAO, X.; YUAN, K. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. **Chemosphere**, v. 78, n.5, p.541-547, 2010.

TITMAN, D. Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory. **Science**, v. 192, p. 463-465, 1976.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da Produção de Biossurfactante pela Bactéria *Kocuria rhizophila***. 2004, 99f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP.

VALVERDE, F.; ROMERO-CAMPERO, F. J.; LEON, R.; GUERRERO, M. G.; SERRANO, A. New challenges in microalgae biotechnology. **European Journal of Protistology**, v. 55, p. 95-101, 2016.

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

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis, London, 2002.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p.7-11, 2013.

WAN, M.; JIN, X. .; XIA, J. .; ROSENBERG, J.N.; YU, G. .; NIE, Z.; OYLER, G. A.; BETENBAUGH, M. J. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology and Biotechnology** , v. 98, n. 22, p. 9473- 9481, 2014.

WANG, T.; TIAN, X.; LIU, T.; WANG, Z.; GUAN, W.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y. Enhancement of lipid productivity with a novel two-stage heterotrophic fed-batch culture of *Chlorella protothecoides* and a trial of CO₂ recycling by coupling with autotrophic process. **Biomass Bioenergy**, v. 95, p. 235-243, 2016.

WU, L. F.; CHEN, P. C.; LEE, C. M. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 506-510, 2013.

XU, Y.; IBRAHIM, I. M.; HARVEY, P. J. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 106, p.305-315, 2016.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LI, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v.77, 9-13, 2002.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAINTRA, R.; HUANG, F.; ANDERSSON, B.; PAKRASI, H. B. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 98, n. 23, p.13443-13448, 2001.

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**. 1966. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.

ZHANG, X.; TANG, X.; WANG, M.; ZHANG, W.; ZHOU, B.; WANG, Y. ROS and calcium signaling mediated pathways involved in stress responses of the marine microalgae *Dunaliella salina* to enhanced UV-B radiation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 173, p.360-367, 2017.

ZHILA, N. O.; KALACHEVA, G. S; VOLOVA, T. G. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. **Journal Applied Phycology**, v. 23, p. 47-52, 2011.

ZHU, L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 9, n. 6, p.801-814, 2015.

ANEXO A

Determinação de carboidratos

Para a determinação de carboidratos, uma curva padrão com concentrações entre 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de glicose foi inicialmente preparada, assim como uma solução de fenol 5%. Para a análise, 1 mL do extrato devidamente diluído foi adicionado em tubo de ensaio, sendo adicionado igual volume da solução de fenol. A mistura foi posteriormente homogeneizada em agitador de tubos e após foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação ocorreu durante 10 min, ao final do qual foi adicionada em banho de água fria por 20 min. A densidade óptica foi lida em um espectrofotômetro a 490 nm. Uma análise contendo água destilada foi realizada para fins de comparação (DUBOIS et. al., 1956).

ANEXO B

Determinação de proteínas

Para a determinação de proteínas, uma curva de calibração com solução padrão de albumina de soro bovino foi preparada. No extrato devidamente diluído, foi acrescentado 0,5 mL juntamente com 0,5 mL de NaOH, sendo posteriormente levados no banho termostatizado em temperatura de 100°C por 5 min. Após esse tempo, os tubos foram resfriados em banho de água fria por 10 min. Após adicionou-se 2,5 mL de solução de tartarato de sódio e potássio em conjunto com sulfato de cobre, agitando-se a amostra com o auxílio de um vórtex. Após homogeneização, a amostra manteve-se em repouso por 10 minutos. Em seguida, 0,5 mL do reagente folin-ciocalteau diluído em água (1:1) foi adicionada, sendo posteriormente mantido no escuro por 30 minutos. Após este período a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro a 750 nm (LOWRY et al., 1951).