

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

VANESSA DANELUZ GONÇALVES

**MAXIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE CAROTENOIDES MEDIANTE A
FOTOESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Tetradismus* sp.**

TOLEDO – PARANÁ

2019

VANESSA DANELUZ GONÇALVES

**MAXIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE CAROTENOIDES MEDIANTE A
FOTOESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Tetrademus sp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Fagundes Klen

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Daniela Estelita Goes Trigueros

Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov

TOLEDO – PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Gonçalves, Vanessa Daneluz

Maximização da síntese de carotenoides mediante a fotoestimulação do crescimento da microalga *Tetrademus* sp. / Vanessa Daneluz Gonçalves; orientador(a), Márcia Regina Fagundes Klen; coorientador(a), Daniela Estelita Goes Trigueros, coorientador(a)II, Alexander Dimitrov Kroumov, 2019.

152 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

1. Fotobiorreator. 2. LED. 3. Carotenoide. I. Klen, Márcia Regina Fagundes . II. Trigueros, Daniela Estelita Goes. III. Kroumov, Alexander Dimitrov. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Ronan Felipe de Souza.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ronan Felipe de Souza por ter me incentivado a cursar doutorado, por sua colaboração intelectual e braçal nesta pesquisa, por cobrar resultados da pesquisa e cuidar da minha saúde física e mental.

Aos meus gatos Mia, Lilo, Monalisa e Pitchuca pelas doses generosas de afeto e alegria indisponíveis em medicamentos sintéticos.

Aos meus pais Loreni Daneluz Gonçalves e Protasio Darcy Ferreira Gonçalves (*in memoriam*) pelos princípios e valores.

Aos meus irmãos Ariane Daneluz Gonçalves Turatto e Leandro Daneluz Gonçalves pela infância maravilhosa e admiração mútua no presente.

Ao meu amigo Vagner Roberto Batistela pelos momentos de descontração, risadas, conselhos, chopes, pizzas e piadas da vida real.

Aos professores Dr.^a Márcia Regina Fagundes Klen, Dr.^a Daniela Estelita Goes Trigueros, Dr. Aparecido Nivaldo Módenes, Dr. Alexander Dimitrov Kroumov, Dr. Fernando Espinosa Quinones pelas orientações e colaborações nesta pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Borba pela cordialidade em me receber na Unioeste para elucidar sobre o processo seletivo de doutorado.

Aos meus colegas de laboratório Camila Larissa Hinterholz e Adilson Schuelter pelo suporte técnico e intelectual.

Aos amigos Heloise G. Knapik, Carla C. Bem, Ana Paula Muhlenhoff, Camila de Bitencourt, Cristovão V. S. Fernandes e Marcelo Coelho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À UEM por me conceder afastamento em tempo integral por três anos para cursar o doutorado.

Ao Departamento de Física da UEM pelo suporte técnico.

Ao UTFPR campus Toledo pelo suporte técnico.

GONÇALVES, V. D. Maximização da Síntese de Carotenoides Mediante a Fotoestimulação do Crescimento da Microalga *Tetrademus* sp. 152 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Toledo, 2019.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo maximizar a produção de carotenoides da *Tetrademus* sp. via processo de fotoestimulação em diferentes faixas espectrais (visível, vermelho, amarelo, verde e azul) e intensidades luminosas (13 a 595 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por meio do planejamento experimental Plackett-Burman, foram avaliados os efeitos dos fatores: intensidade luminosa, fotoperíodo, pH e concentrações de NaCl e nitrogênio na resposta de carotenoides (astaxantina, β -caroteno e licopeno). Com o Delineamento Composto Central Rotacional, foram ajustados modelos de regressão com os fatores significativos, os quais foram posteriormente otimizados para prever a máxima resposta de carotenoides. Entre os resultados, a ANOVA ($\alpha = 0,05$) sugeriu maior síntese de carotenoides em cultivos da *Tetrademus* sp. sob a combinação espectral vermelho:verde (50%:50%) na intensidade de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde foi obtida elevada produção de carotenoides ($6,09 \pm 0,29 \text{ mg g}^{-1}$). No planejamento experimental Plackett-Burman foi observado efeito ($\alpha = 0,10$) dos fatores intensidade luminosa e fotoperíodo. Os modelos ajustados com estes fatores apresentaram coeficiente de determinação entre $0,90 \leq R^2 \leq 0,95$. A otimização resultou em valores máximos de carotenoides em mg g^{-1} com o cultivo da *Tetrademus* sp. sob 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 15,8:8,2 h (luz:escuro) de fotoperíodo; e máxima produção de carotenoides em mg L^{-1} sob 595 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 24 h. A validação experimental dos valores preditos pelos modelos, resultou na síntese de 7,6 mg g^{-1} de astaxantina, 9,1 mg g^{-1} de β -caroteno e 4,8 mg g^{-1} de licopeno; assim como a produção de 12,1 mg L^{-1} de astaxantina, 12,8 mg L^{-1} de β -caroteno e 5,5 mg L^{-1} de licopeno. Todos os resultados permaneceram dentro do intervalo de confiança de 95% calculado para os valores preditos pelos modelos. Este trabalho mostrou uma estratégia inovadora no segmento de pesquisa com microalgas, com resultados promissores em termos de aplicação industrial, dada a elevação da produção de carotenoides pela *Tetrademus* sp. de 1,67 mg g^{-1} determinada nos estudos preliminares, para os obtidos ao final do processo de otimização.

Palavras-chave: fotobiorreator, LED, carotenoide.

GONÇALVES, V. D. Maximization of Carotenoid Synthesis by Photostimulation of *Tetrademus* sp. Growth. 152 f. Thesis (Doctorate in Chemical Engineering) – West Paraná State University – Unioeste, Toledo, 2019.

ABSTRACT

This research aimed to maximize the carotenoids production of *Tetrademus* sp. by photostimulation in different spectral bands (visible, red, yellow, green and blue) and luminous intensities (13 to 595 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The effect of the factors: light intensity, photoperiod, pH, NaCl and nitrogen concentrations in the response of carotenoids (astaxanthin, β -carotene and lycopene) were evaluated using the Plackett-Burman experimental design. With Central Composite Rotatable Design, regression models were fitted with the factors, which were optimized to predict maximum carotenoid response. Among the results, ANOVA ($\alpha = 0.05$) suggested a higher synthesis of carotenoids in *Tetrademus* sp. under the spectral combination red: green (50%: 50%) in the intensity of 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, where high production of carotenoids ($6.09 \pm 0.29 \text{ mg g}^{-1}$). In the Plackett-Burman experimental design, effects of light intensity and photoperiod were observed ($\alpha = 0.10$). The adjusted models with these factors presented coefficient of determination between $0.90 \leq R^2 \leq 0.95$. The optimization resulted in maximum values of carotenoids in mg g^{-1} , with the cultivation of *Tetrademus* sp. under 85 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of light intensity and 15.8:8.2 h (light:dark) of photoperiod, and maximum carotenoid production in mg L^{-1} under 595 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 24 h. The experimental validation of the values predicted by the models resulted in the synthesis of 7.6 mg g^{-1} astaxanthin, 9.1 mg g^{-1} β -carotene and 4.8 mg g^{-1} lycopene; as well as the production of 12.1 mg L^{-1} astaxanthin, 12.8 mg L^{-1} β -carotene and 5.5 mg L^{-1} lycopene. All results remained within the 95% confidence interval calculated for the values predicted by the models. This work showed an innovative strategy in the research segment with microalgae, with promising results in terms of industrial application, due to the increase in the synthesis of carotenoids by *Tetrademus* sp. of 1.67 mg g^{-1} determined in the preliminary studies, to those obtained at the end of the optimization process.

Keywords: photobioreactor, LED, carotenoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-1- Síntese de fitoeno: precursor dos carotenoides	21
Figura 2.1-2 - Síntese de carotenoides nas Chlorophytes.....	22
Figura 2.1-3 - Estrutura química de clorofilas.....	24
Figura 2.1-4 - Estrutura química da ficoeritrobilina e ficocianobilina	25
Figura 2.2-1 - Estrutura química das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	29
Figura 2.2-2 - Ilustração da estrutura do ficobilissomo.....	30
Figura 2.2-3 - Comprimento de onda de absorção de clorofilas e pigmentos acessórios.....	31
Figura 2.2-4 - Representação gráfica da curva luz-resposta fotossintética	36
Figura 2.2-5 - Ilustração morfológica das espécies <i>Tetradismus cumbricus</i> , <i>Tetradismus lunatus</i> , <i>Tetradismus wisconsinensis</i> e <i>Tetradismus sibiricus</i> , publicada em 1953.....	38
Figura 2.2-6 - Ilustração morfológica de microalga publicada em 1913. (a) Arranjo em três dimensões da colônia de quatro células de <i>Tetradismus</i> sp.; (b) Seção longitudinal da colônia de <i>Tetradismus</i> sp.; (c) Colônia de <i>Scenedesmus acutus</i>	38
Figura 2.2-7- Ilustração morfológica da reprodução assexuada da <i>Tetradismus</i> sp. publicada de 1913. (a) Primeira divisão nuclear e clivagem celular; (b) Segunda divisão nuclear; (c) Segunda clivagem celular.....	40
Figura 2.2-8 - Imagem de microscopia da <i>Tetradismus acuminatus</i>	40
Figura 4.4-1 - Ilustração do fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.....	61
Figura 4.4-2 - Ilustração do fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	62
Figura 4.4-3 - Espectros de emissão das fitas de LED visível, vermelha, amarela, verde e azul.....	63
Figura 4.4-4 - Ilustração do fotobiorreator placa plana irradiado por LED	63
Figura 4.4-5 - Espectros de emissão das lâmpadas de LED vermelha e verde	64
Figura 5.1-1 - Espectro eletromagnético de absorção das microalgas <i>P. malhamensis</i> , <i>Micractinium</i> sp., <i>C. vulgaris</i> e <i>Tetradismus</i> sp.	74
Figura 5.1-2 - Gráficos de resíduos em função dos valores preditos para a variável biomassa (a) cultivos das microalgas em meio BG-11-CNP; (b) cultivos das microalgas em meio BG-11.	78
Figura 5.2-1 - Crescimento em biomassa da <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em BG-11 e BBM, em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.....	79
Figura 5.2-2 - Ciclos de congelamento – descongelamento para a extração das ficobilinas ficoeritrina (FE) e ficocianina (FC) da microalga <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em meios BG-11 e BBM	81

Figura 5.2-3 - Superfície de resposta de ficocianina (FC) em meio BG-11. (A) Gráfico de contorno com ponto ótimo. (B) Gráfico 3D com ponto ótimo	83
Figura 5.3-1 - Crescimento em biomassa da <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED, referentes ao Experimento 1: (a) 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (b) 190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Experimento 2: (c) 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (d) 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e Experimento 3 (e) 13 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (f) 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	84
Figura 5.3-2 - Média \pm IC (95%) referente à concentração final de biomassa de <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. (a) Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e testemunha Wh 100%; (b) Experimento 2, bicromático 50%:50% com testemunha Re 100%; e (c) Experimento 3, monocromático com testemunha Wh 100%.....	86
Figura 5.3-3 - Média \pm IC (95%) referente ao valor de carotenoide total da <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. (a) Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e testemunha Wh 100%; (b) Experimento 2, bicromático 50%:50% com testemunha Re 100%; e (c) Experimento 3, monocromático com testemunha Wh 100%	90
Figura 5.3-4 - Média \pm IC (95%) referente ao valor de clorofila da <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e Wh 100% como tratamento controle: (a) clorofila <i>a</i> ; (b) clorofila <i>b</i> . Experimento 2, bicromático 50%:50% com Re 100% como tratamento controle: (c) clorofila <i>a</i> (d) clorofila <i>b</i> ; e Experimento 3, monocromático com Wh 100% como tratamento controle: Experimento 3: (e) clorofila <i>a</i> (f) clorofila <i>b</i>	93
Figura 5.3-5 - Biomassa (ordenada direita) e carotenoides totais (CT), clorofila <i>a</i> (Chla) e clorofila <i>b</i> (Chlb) (ordenada esquerda) para o cultivo da <i>Tetradismus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	96
Figura 5.4-1 - Crescimento em biomassa da microalga <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo um planejamento experimental Plackett-Burman	98
Figura 5.4-2 - Superfícies de resposta de biomassa: (a) 3° dia, (b) 5° dia, (c) 7° dia; Superfícies de resposta de astaxantina: (d) 3° dia, (e) 5° dia, (f) 7° dia.....	103
Figura 5.4-3 - Comparativo entre a emissão de energia por biomassa e a concentração média de carotenoides na microalga <i>Tetradismus</i> sp. (a) Astaxantina; (b) β -caroteno e (c) Licopeno.....	104
Figura 5.5-1 - Crescimento em biomassa da microalga <i>Tetradismus</i> sp., cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED na faixa espectral vermelha e verde, na proporção 50%:50%, seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional.....	106
Figura 5.5-2 - Síntese de carotenoides da <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional: (a) e (b) astaxantina em mg g^{-1} e mg L^{-1} ; (c) e (d) β -caroteno em mg g^{-1} e mg L^{-1} ; (e) e (f) licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}	110

Figura 5.5-3 - DCCR: superfície de resposta referente à Astaxantina (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	114
Figura 5.5-4 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Astaxantina (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	116
Figura 5.5-5 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de β -caroteno (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	119
Figura 5.5-6 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de β -caroteno (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	121
Figura 5.5-7 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Licopeno (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	125
Figura 5.5-8 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Licopeno (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.	126
Figura 5.5-9 - Determinação experimental diária de astaxantina, β -caroteno e licopeno em termos de média e desvio padrão em (a) mg g^{-1} a partir do cultivo da <i>Tetradismus</i> sp. sob $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 15,8 h de fotoperíodo; (b) mg L^{-1} a partir do cultivo da <i>Tetradismus</i> sp. sob $595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 24 h de fotoperíodo.....	129
Figura 5.5-10 - Produção de astaxantina (mg g^{-1}) pela microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> obtida em diferentes pesquisas	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.2-1- Espécies de microalgas transferidas para o gênero <i>Tetradismus</i>	39
Tabela 4.2-1 - Composição química do meio de cultivo BG-11.....	58
Tabela 4.2-2 - Metais traço presentes no meio BG-11	58
Tabela 4.2-3 - Composição química do meio de cultivo BBM.....	59
Tabela 4.6-1 - Matriz do delineamento composto central de purificação de FC.....	69
Tabela 4.6-2 - Planejamento experimental Plackett-Burman: matriz.....	71
Tabela 4.6-3 - Planejamento experimental Plackett-Burman: fatores codificados e níveis	72
Tabela 4.6-4 - Delineamento Composto Central Rotacional: matriz, fatores codificados e níveis.....	73
Tabela 5.1-1 - Biomassa média, desvio padrão (DP), erro padrão e produtividade média das microalgas <i>P. malhamensis</i> , <i>Micractinium</i> sp., <i>C. vulgaris</i> e <i>Tetradismus</i> sp. cultivadas por 6 dias em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.....	75
Tabela 5.1-2 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) fator único microalga para a variável resposta biomassa final estimada em cultivos de microalgas em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente	76
Tabela 5.1-3 - Biomassa e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com as microalgas <i>P. malhamensis</i> , <i>Micractinium</i> sp., <i>C. vulgaris</i> e <i>Tetradismus</i> sp. em meio BG-11-CNP e meio BG-11, em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.....	76
Tabela 5.1-4 - Parâmetros de ajuste do modelo segundo a resposta de biomassa.....	77
Tabela 5.1-5 - Valores máximos de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides totais (N = 1) por grama de biomassa, determinados do 5º dia de cultivo das microalgas <i>P. malhamensis</i> , <i>Micractinium</i> sp., <i>C. vulgaris</i> e <i>Tetradismus</i> sp., cultivadas em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente	78
Tabela 5.2-1 - Média \pm desvio padrão (DP) respectivos de clorofila <i>a</i> (Chla), clorofila <i>b</i> (Chlb) e carotenoides totais (CT) (N = 3) segundo extração por maceração e banho de ultrassom em meio BG-11 e BBM	80
Tabela 5.2-2 - Resumo dos resultados de <i>p</i> -valor da ANOVA ($\alpha = 0,05$) realizada entre as técnicas de extração de pigmentos maceração (MC) e banho de ultrassom (US), e entre os meios de cultivo BG-11 e BBM, de cultivo da <i>Tetradismus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente	80
Tabela 5.3-1 - Parâmetros cinéticos de produtividade de biomassa (P) ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e taxa de crescimento específico (μ) (d^{-1}) dos cultivos da <i>Tetradismus</i> sp. em fotobiorreatores tubular vertical irradiados por LED.....	85

Tabela 5.3-2 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta biomassa final dos cultivos de <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	85
Tabela 5.3-3 - Biomassa média final (X) (g L^{-1}) \pm desvio padrão (DP) relativos aos cultivos da <i>Tetrademus</i> sp. segundo os Experimento 1, 2 e 3 em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED.....	88
Tabela 5.3-4 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta carotenoides totais dos cultivos de <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	89
Tabela 5.3-5 - Carotenoides totais final (CT) (mg CT (gX)^{-1}), desvio padrão e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	91
Tabela 5.3-6 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> dos cultivos de <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	92
Tabela 5.3-7 - Clorofilas <i>a</i> (Chla) e <i>b</i> (Chlb) ($\text{mg Chl (g biomassa)}^{-1}$), desvio padrão (DP) e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED	94
Tabela 5.3-8 - Clorofilas <i>a</i> (Chla), clorofila <i>b</i> (Chlb) e carotenoides totais (CT) ($\text{mg pigmento (g biomassa)}^{-1}$) e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos cultivos da <i>Tetrademus</i> sp. em composições espectrais de maior produção de carotenoides nos experimentos anteriores	95
Tabela 5.4-1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, seus códigos e concentração de biomassa determinada em 14 dias de cultivo da <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.....	97
Tabela 5.4-2 - <i>P</i> -valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta biomassa medida diariamente, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores	99
Tabela 5.4-3 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de astaxantina em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3° ao 12° dia de cultivo.....	100
Tabela 5.4-4 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de β -caroteno em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3° ao 12° dia de cultivo	101
Tabela 5.4-5 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de licopeno em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3° ao 12° dia de cultivo	101
Tabela 5.4-6 - Efeito e <i>p</i> -valor ($\alpha = 0,10$) calculado para biomassa, astaxantina, β -caroteno e licopeno, determinadas no 3° e 7° dias de cultivo da <i>Tetrademus</i> sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED	102

Tabela 5.5-1 - Estatística descritiva: média, desvio padrão (DP), valor máximo e variância referente à resposta de biomassa de <i>Tetradismus</i> sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo o DCCR	107
Tabela 5.5-2 - Estatística descritiva: média, desvio padrão, valor mínimo e máximo e variância referente às respostas de astaxantina, β -caroteno e licopeno, em mg g^{-1} e mg L^{-1} , determinadas em cultivos da <i>Tetradismus</i> sp. seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional	111
Tabela 5.5-3 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta astaxantina em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	113
Tabela 5.5-4 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta astaxantina em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	115
Tabela 5.5-5 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de astaxantina em mg g^{-1} e mg L^{-1}	117
Tabela 5.5-6 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta β -caroteno em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	118
Tabela 5.5-7 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta β -caroteno em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	120
Tabela 5.5-8 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de β -caroteno em mg g^{-1} e mg L^{-1}	122
Tabela 5.5-9 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta licopeno em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	123
Tabela 5.5-10 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta licopeno em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp.	124
Tabela 5.5-11 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}	127
Tabela 5.5-12 - Matriz do DCCR para as respostas de biomassa, astaxantina, β -caroteno e licopeno, em três dias de cultivo da microalga <i>Tetradismus</i> sp. em fotobiorreator placa plana, irradiado por LED na faixa espectral vermelha e verde na proporção 50%:50%	128
Tabela 5.5-13 - Valores preditos e observados \pm IC (95%) referente à astaxantina, β -caroteno e licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AFC	Aloficocianina
ATP	Adenosina Trifosfato
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CT	Carotenoides Totais
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DO	Densidade Óptica
ECE	Eficiência de Conversão Energética
FB	Ficobilinas
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
FEC	Ficoeritrocianina
FS-I	Fotossistema I
FS-II	Fotossistema II
IC	Intervalo de confiança
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
PAR	Radiação fotossintética ativa
PB	Plackett-Burman
PCE	Eficiência de Conversão Fotossintética

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.1.1	Objetivos Específicos	19
2	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	20
2.1	PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS	20
2.1.1	Carotenoides	20
2.1.2	Clorofilas	23
2.1.3	Ficobilinas	25
2.2	MICROALGAS.....	26
2.2.1	Metabolismo: Produção de Energia	28
2.2.2	Coleta e Purificação da Cepa.....	32
2.2.3	Cultivo de Microalgas	34
2.2.4	<i>Tetrademus</i> sp.	37
2.3	SÍNTESE DO CAPÍTULO	41
3	ESTADO DA ARTE	42
3.1	EXPLORAÇÃO DE MICROALGAS	42
3.1.1	Energia Luminosa.....	45
3.1.2	Fonte de Carbono	51
3.1.3	Meios de Cultura	52
3.1.4	Cenário Brasileiro.....	54
3.2	SÍNTESE DO CAPÍTULO	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1	MICROALGAS, MANUTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO	57
4.2	PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES	57
4.3	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	60
4.3.1	Biomassa	60
4.3.2	Taxa de Crescimento Específico	60
4.3.3	Produtividade.....	61
4.4	FOTOBIORREATOR	61
4.4.1	Fotobiorreator Tubular Vertical Irradiado por Luz Fluorescente.....	61

4.4.2	Fotobiorreator Tubular Vertical Irradiado por LED.....	62
4.4.3	Fotobiorreator Placa Plana Irradiado por LED.....	63
4.4.4	Operação e Monitoramento	64
4.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS...	65
4.5.1	Carotenoides Totais e Clorofilas	65
4.5.2	Carotenoides em termos de β -caroteno, Astaxantina e Licopeno	65
4.5.3	Ficobilinas	66
4.6	EXPERIMENTOS.....	67
4.6.1	Experimento 1 – Seleção de Microalgas	67
4.6.2	Experimento 2 – Seleção de Métodos	68
4.6.3	Experimento 3 – Seleção da Fonte de Luz	69
4.6.4	Experimento 4 – Planejamento Experimental Plackett-Burman (PB)	70
4.6.5	Experimento 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	72
4.6.5.1	Validação Experimental	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	EXPERIMENTO 1 – SELEÇÃO DE MICROALGAS	74
5.2	EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DE MÉTODOS	79
5.3	EXPERIMENTO 3 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ.....	83
5.3.1	Biomassa	83
5.3.2	Carotenoides Totais.....	88
5.3.3	Clorofilas.....	92
5.3.4	Cultivo da <i>Tetrademus</i> sp. com composições espectrais Wh:Gr, Re:Gr e Re.....	95
5.4	EXPERIMENTO 4 – PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	97
5.4.1	Biomassa	97
5.4.2	Carotenoides.....	100
5.5	EXPERIMENTO 5 – PLANEJAMENTO DCCR	106
5.5.1	Biomassa	106
5.5.2	Carotenoides.....	108
5.5.3	DCCR: Superfícies de Resposta.....	112
5.5.4	Validação dos Modelos	128
5.6	SÍNTESE DO CAPÍTULO	131
6	CONCLUSÃO.....	133
	REFERÊNCIAS	134

APÊNDICE A – Seleção de Microalgas	147
APÊNDICE B – Seleção de Métodos.....	148
APÊNDICE C – Seleção da Fonte de Luz	149
APÊNDICE D – Planejamento Plackett-Burman.....	150

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, juntamente com o aumento do consumo per capita, a expansão urbana e as limitações no uso de terra, promoverão a elevação da demanda por recursos energéticos e alimentos nas próximas décadas (BRASIL; GARCIA, 2016; SAATH; FACHINELLO, 2018). Parte desta demanda pode ser suprida pelo cultivo de microalgas com capacidade de síntese de carboidratos, lipídios e proteínas. As microalgas já representam uma fonte importante de obtenção via natural desses compostos (bioprodutos), com aplicação ampla nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos e de bioenergia (ANDERSEN, 2013; GANGL et al., 2015; SUGANYA et al., 2016). A comercialização de bioprodutos de origem algal é em parte motivada pela existência de mais de 100 mil espécies (ANDERSEN, 2013); pelo seu cultivo não depender da fertilidade do solo; e por uma demanda social por produtos naturais e combustíveis com menor nocividade ao ambiente (BRASIL; GARCIA, 2016).

A ascensão da comercialização de bioprodutos de microalgas é confirmada pelos dados de produção mundial de biomassa em peso seco que triplicou entre 2004 a 2013, de 5 mil toneladas ano⁻¹ para 15 mil toneladas ano⁻¹ (BRASIL; GARCIA, 2016) com previsão de atingir o valor de 27,5 mil toneladas ano⁻¹ em 2024 (PRNewswire, 2018). O cultivo industrial de microalgas para obtenção dos bioprodutos clorofila (CYANOTECH, 2017), astaxantina (ALGA TECH, 2017; CYANOTECH, 2017) e β -caroteno (BEN-AMOTZ, 1995), ocorre especialmente, a partir do cultivo de cepas de *Spirulina platensis* (CYANOTECH, 2017), *Haematococcus pluvialis* (ALGA TECH, 2017) e *Dunaliella salina* (BEM-AMOTZ, 1995), respectivamente. Os bioprodutos de origem algal possuem preços de mercado atrativos e variável com o seu grau de pureza: a astaxantina é comercializada por 2.500 – 8.000 US\$/kg (BRASIL; GARCIA, 2016; SUGANYA et al., 2016), enquanto o β -caroteno apresenta valor variável de 300 – 3.000 US\$/kg (SUGANYA et al., 2016).

O elevado número de espécies de microalgas inexploradas, fomenta a necessidade de pesquisas científicas para consolidar métodos de cultivo de microalgas, com potencial para a síntese de biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado. Cada espécie de microalga apresenta particularidades metabólicas e respostas diferentes ao ambiente, dificultando a definição das condições de cultivo ou o método universal (GOMAA; AL-HAJ; ABED, 2016), especialmente quando se trata de cultivos de grande escala para atender a demanda industrial (JANSSEN et al., 2001). Portanto, para cada espécie de microalga e bioproduto de interesse, é recomendada uma investigação acurada quanto à definição da faixa do espectro

eletromagnético visível (BAER et al., 2016), intensidade luminosa, tempo de exposição a luz, entre outros fatores. Porém, as pesquisas sobre a adaptação e manipulação da energia luminosa são limitadas (RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017). A maioria dos estudos com microalgas avaliam os efeitos no crescimento e composição química decorrentes da emissão de energia luminosa na região espectral vermelha e azul (CHOI et al., 2015; GLEMSER et al., 2016). Para Schulze et al. (2014), há uma carência de estudos exploratórios sobre o potencial de síntese natural de bioprodutos de elevado valor, a partir de cultivos de microalgas irradiados com distintas faixas espectrais. Para Glemser et al. (2016), estes estudos exploratórios com distintas combinações de faixas espectrais, revelaria possíveis relações entre a fonte de energia luminosa e as diferentes respostas de absorção pelo pigmento em células de microalgas. Markou e Nerantzis (2013), apontam para a escassez de pesquisas com microalgas envolvendo a aplicação de processos de otimização das condições de estresse microalgal, como a fonte de luz; e da maximização da quantidade de bioproduto desejável. Contudo, Alcaíno; Baeza e Cifuentes (2016) destacam o aumento do interesse em aplicar técnicas de otimização em processos de produção de pigmentos.

Levando em conta o potencial microalgal inexplorado para a obtenção de produtos de alto valor (ALCAÍNO; BAEZA; CIFUENTES, 2016; PATIAS et al., 2017), e o número reduzido de estudos de fotoestimulação de microalgas e maximização de bioprodutos (MARKOU; NERANTZIS, 2013; RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017; SCHULZE et al., 2014), a presente pesquisa investigou a capacidade de síntese de carotenoides pela microalga *Tetradasmus* sp. por meio da sua fotoestimulação em distintas composições espectrais e intensidades luminosas, e realizou a maximização desta síntese pela otimização de modelos ajustados via planejamento experimental. As poucas investigações com a microalga do gênero *Tetradasmus* sp., antiga *Acutodesmos* sp. (WYNNE; HALLAN, 2015) envolvem sua capacidade de remoção de fármacos em meio aquoso (ESCAPA et al., 2017), e síntese de lipídios, proteínas, carboidratos (LEÓN-SAIKI et al., 2018a), clorofilas (XIONG et al., 2019), astaxantina, cantaxantina e β -caroteno (QIN; LIU; HU, 2019). A *Tetradasmus* sp. pertence ao grupo taxonômico das algas verdes, *Chlorophycophyta*, conhecidas pela sua capacidade de síntese de carotenoides (LEÓN-SAIKI et al., 2018a). Entretanto, não foram encontrados registros de fotoestimulação da *Tetradasmus* sp. à síntese de bioprodutos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Induzir a máxima produção dos carotenoides astaxantina, β -caroteno e licopeno mediante a fotoestimulação do crescimento da microalga *Tetradismus* sp., com a variação dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo.

1.1.1 Objetivos Específicos

Avaliar a capacidade de síntese de carotenoides pelas microalgas *Poteroochromonas malhamensis*, *Micractinium* sp., *Tetradismus* sp. e *Chlorella vulgaris* cultivadas em fotobiorreator.

Extrair os pigmentos clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*), carotenoides totais (CT) e ficobilinas (FB) de amostras celulares de microalgas, por técnicas de maceração e banho de ultrassom.

Determinar a faixa do espectro eletromagnético visível que estimula a síntese de carotenoides pela microalga *Tetradismus* sp., a partir do seu cultivo sob diferentes faixas espectrais e intensidades luminosas.

Investigar os efeitos dos fatores intensidade de energia irradiada, fotoperíodo, pH, concentração de NaCl e nitrogênio, na síntese de astaxantina, β -caroteno e licopeno pela *Tetradismus* sp. e no seu crescimento, a partir do cultivo da microalga seguindo o planejamento experimental Plackett-Burman (PB).

Ajustar modelos de regressão com os fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, para a resposta de carotenoides em cultivos da *Tetradismus* sp. seguindo um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS

2.1 PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Os produtos de destaque e interesse comercial advindos das microalgas compreendem os (1) carotenoides, especialmente o β -caroteno, a astaxantina (*astaxanthin*) e a luteína (*lutein*); as (2) ficobilinas (FB) ou ficobiliproteínas como a ficocianobilina ou ficocianina (FC) (*phycocyanin*), a ficoeritribilina ou ficoeritrina (FE) (*phycoerythrin*) e a aloficocianina (AFC) (*allophycocyanin*); os (3) ácidos graxos, entre tais os polissacarídeos insaturados e o Ômega-3; além de outros bioprodutos como os esteroides, polissacarídeos, polihidroxicanoatos ou PHAS (BOROWITZKA, 2013), clorofilas e biomassa.

2.1.1 Carotenoides

Com mais de 600 estruturas caracterizadas (FRASER; BRAMLEY, 2004), os carotenoides são compostos lipofílicos, e compõem um grupo de pigmentos que conferem tonalidades de cores vermelha, amarelo e alaranjado (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) a determinadas flores, frutos e até aos animais. Trata-se de uma classe de pigmentos bastante difundidos no ambiente natural e produzidos por organismos fotossintetizantes (FRASER; BRAMLEY, 2004) e determinados fungos e bactérias não fotossintetizantes (VARELA et al., 2015). Em termos moleculares, os carotenoides apresentam 40 átomos de carbono em sua estrutura, organizados na forma de tetraterpenóides C_{40} , ou mais especificadamente, arranjados em 8 estruturas moleculares isoprenóides, C_5 (GONG; BASSI, 2016). Exceções à regra são, por exemplo, a bixina e a crocetina que apresentam menos de 40 átomos de carbono em suas estruturas (VILLELA, 1976¹ apud MORAIS, 2006).

A biosíntese de carotenoides em microalgas envolve uma série complexa de reações bioquímicas, não totalmente conhecidas e compreendidas (VARELA et al., 2015). Por meio da enzima geranyl difosfato sintase (GPS ou preniltransferase) (ver Figura 2.1-1), ocorre à união entre as moléculas isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), ambas derivadas da molécula isoprenóide ou isopreno (C_5), para produzir geranyl pirofosfato (GPP),

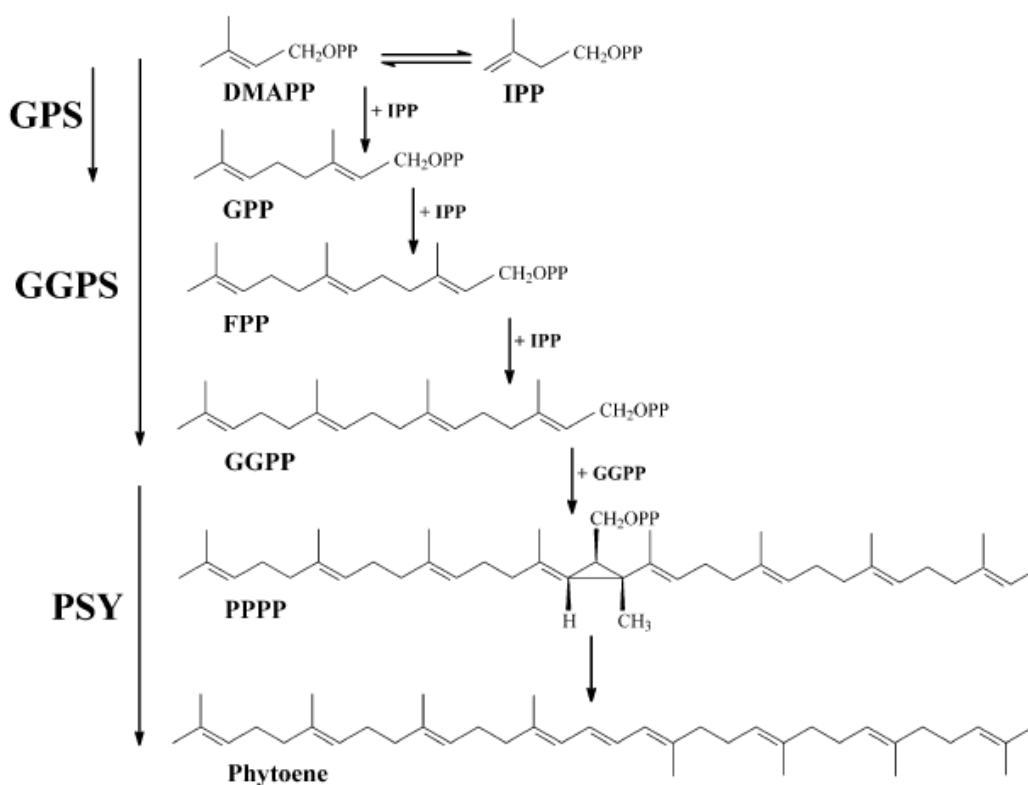
¹ VILLELA, G. G. **Pigmentos animais: zocromos**. Editado pela academia brasileira de ciências, 1976, p. 5-31.

² GOODWIN, T. W. **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. Academic Press, 1965.

³ BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A.; Depositante: BEN-GURION. **A procedure for large-**

com 10 átomos de carbono, C_{10} . A adição de mais uma molécula de IPP à GPP resulta na formação de farnesil pirofosfato (FPP) com 15 átomos de carbono, C_{15} . Via catálise geranylgeranyl difosfato sintase, a adição da terceira molécula de IPP à nova estrutura (agora FPP), forma geranylgeranyl difosfato (GGPP), C_{20} . A condensação de duas moléculas de GGPP forma o pré-fitoeno difosfato (PPPP). Na sequência, catalisada pela fitoeno sintase (PSY), ocorre eliminação do grupo difosfato e abstração estereoespecífica de prótons, resultando na formação da molécula de fitoeno (C_{40}), hidrocarboneto incolor, simétrico, contendo três ligações duplas conjugadas (FRASER; BRAMLEY, 2004). O número de ligações duplas conjugadas, bem como modificações cíclicas e oxigenadas, produz uma variedade de carotenoides. O PSY está entre as enzimas mais importantes no controle de formação de carotenoides. Em cultivo de certas microalgas, foi observado elevação do PSY (VARELA et al., 2015) em condições de estresse com consequente aumento da produção de carotenoides (HENRÍQUEZ et al., 2016; VARELA et al., 2015).

Figura 2.1-1- Síntese de fitoeno: precursor dos carotenoides



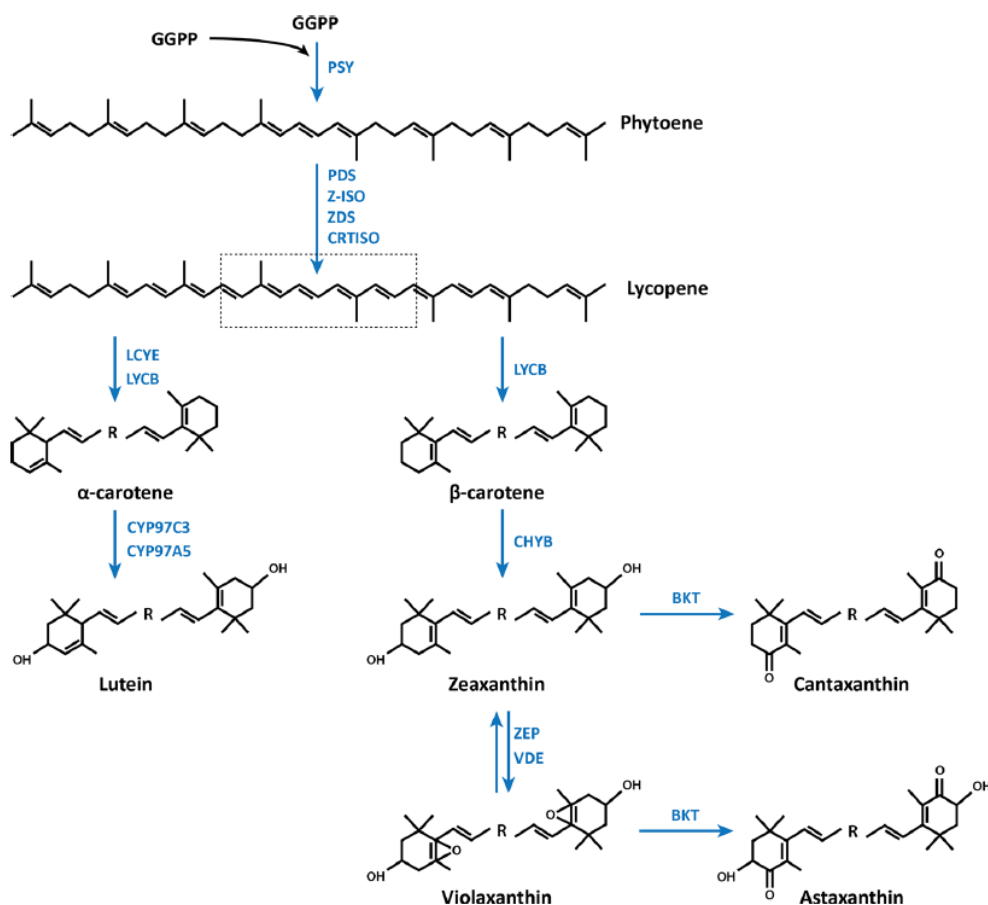
GPS: geranyl difosfato sintase; GGPS: geranylgeranyl difosfato sintase; PSY: fitoeno sintase; IPP: isopentenil difosfato; DMAPP: dimetilalil difosfato; GPP: geranyl pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato; GGPP: geranylgeranyl difosfato; PPPP: pré-fitoeno difosfato; Phytoene: fitoeno.

Fonte: Fraser e Bramley (2004).

A Figura 2.1-2 mostra a formação de carotenoides a partir da molécula fitoeno. Neste caso, ocorrem quatro desaturações sequenciais no fitoeno catalisadas pelas enzimas fitoeno

desaturase (PDS) e ζ -caroteno desaturase (ZDS), formando pró-licopeno, que pela ação da caroteno isomerase (CRTISO) se transforma em licopeno. A partir da molécula de licopeno, pode ser produzido o α -caroteno, pela ação conjunta de licopeno ϵ -ciclase (LCYE) e licopeno β -ciclase (LYCB). A hidroxilação do α -caroteno catalisada por duas monoxigenases, citocromo P450 ϵ -hidroxilase (CYP97C3) e citocromo P450 β -hidroxilase (CYP97A5), resulta em luteína. Ou o licopeno pode ser ciclizado na extremidade por licopeno β -ciclase (LYCB), produzindo β -caroteno, que por sua vez pode ser hidroxilado pela enzima caroteno β -hidroxilase (CHYB) para produzir zeaxantina. A zeaxantina pode ser convertida em cantaxantina pela ação da β -caroteno oxigenase (BKT); ou em violaxantina pela zeaxantina epoxidase (ZEP). Em condições de estresse ou alta intensidade luminosa, a violaxantina pode ser despoxidada para zeaxantina pela violaxantina de-epoxidase (VDE). Por fim, com a ação da BKT a violaxantina pode ser convertida em astaxantina (VARELA et al., 2015).

Figura 2.1-2 - Síntese de carotenoides nas Chlorophytes



GGPP: geranylgeranyl difosfato; PSY: fitoeno sintase; PDS: fitoeno desaturase; Z-ISO: caroteno ζ -isomerase; ZDS: ζ -caroteno desaturase; CRTISO: caroteno isomerase; LCYE: licopeno ϵ -ciclase; LYCB: licopeno β -ciclase; CYP97C3: citocromo P450 ϵ -hidroxilase; CYP97A5: citocromo P450 β -hidroxilase; CHYB: caroteno β -hidroxilase; BKT: β -caroteno oxigenase; ZEP: zeaxantina epoxidase; VDE: violaxantina de-epoxidase; Phytoene: fitoeno; Lycopene: licopeno; Carotene: caroteno; Lutein: luteína; Cantaxanthin: cantaxantina; Zeaxanthin: zeaxantina; Violaxanthin: violaxantina; Astaxanthin: astaxantina.

Fonte: Varela et al. (2015).

Os carotenoides são geralmente divididos em primário, como àqueles considerados essenciais para a sobrevivência do organismo; e secundário que inclui os carotenoides acumulados diante da exposição do organismo à estímulos específicos (HENRÍQUEZ et al., 2016). Contudo, os carotenoides também podem ser classificados em (i) carotenoides hidrocarbonados que são os carotenos, por exemplo, o α -caroteno e β -caroteno; e (ii) carotenoides oxigenados, que contém o grupo denominado por xantofilas como a luteína, violaxantina, zeaxantina, fucoxantina e piridina (HENRÍQUEZ et al., 2016; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004).

Outra classificação mais acurada, enquadra os carotenoides em 7 categorias: (i) **hidrocarbonetos** formados estruturalmente apenas por átomos de carbono e hidrogênio; (ii) **alcoóis** que apresentam em sua estrutura o grupo hidroxila ligado aos anéis de iononas; (iii) **cetonas**, semelhante aos alcoóis, o grupo das cetonas apresentam os grupos carbonilas ligadas aos anéis de iononas; (iv) **epóxidos** que apresentam átomos de oxigênio ligados aos carbonos de modo a formar ciclos; (v) **éteres**, neste caso os carotenoides apresentam átomos de oxigênio intercalados entre os átomos de carbono; (vi) **ácidos**, consistem nos carotenoides com o grupo ionona ausente, e presença do grupo carboxila ligado à extremidade da cadeia carbônica; e (vii) **ésteres** representam os carotenoides que apresentam um grupo carboxil entre os carbonos (GOODWIN, 1965² apud MORAIS, 2006).

Adicionalmente, os carotenoides com propriedades antioxidantes são de difícil extração e armazenamento diante de sua sensibilidade a luz, ao calor e a presença do oxigênio (GONG; BASSI, 2016). Os carotenoides estão situados nos tilacoides e participam dos processos fotossintéticos como pigmentos acessórios nos chamados centros de captação de luz ou *Light Harvesting Complexes* (NISAR et al., 2015).

2.1.2 Clorofilas

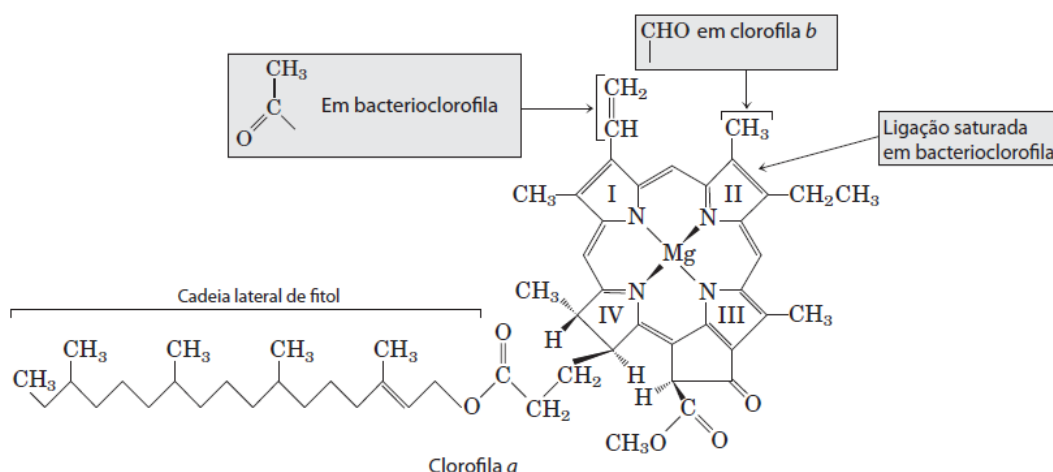
As clorofilas (Chl) compreendem um grupo de pigmentos importante para as reações fotossintéticas, presentes na maioria das clorofíceas (algas verdes), clamidofíceas (flageladas), zignemafíceas, carofíceas (algas verdes), euglenofíceas e rafidofíceas (algas vermelhas) (BICUDO; MENEZES, 2006). As clorofilas estão presentes em elevada quantidade nos tilacoides (estrutura interna do cloroplasto), e possuem duas bandas de absorção: azul ou azul

² GOODWIN, T. W. **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. Academic Press, 1965.

esverdeado (450-475 nm) e vermelho (630-675 nm), o que resulta em na emissão da cor verde (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; NELSON; COX, 2014).

As moléculas de clorofila são formadas por complexos derivados da porfirina e consistem quatro anéis pirrólicos (porfirinas ou clorinas) ligados a um átomo central de magnésio e um álcool terpenoide de cadeia longa (exceto para a clorofila *c*). A estrutura de anel é macrocíclica assimétrica totalmente insaturada (BICUDO; MENEZES, 2006; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; SCHOEFS, 2002). Estruturalmente, os vários tipos de moléculas de clorofila (*a*, *b*, *c* e *d*) diferem em seus substituintes de grupos laterais no anel tetrapirrole. A clorofila *a*, presente em todos os fotoautotróficos, se caracteriza por apresentar um grupo metil ligado ao carbono 3 do anel 2, enquanto que a clorofila *b*, este grupo metil é substituído por um grupo aldeído (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004), conforme Figura 2.1-3.

Figura 2.1-3 - Estrutura química de clorofilas



Fonte: Nelson e Cox (2014).

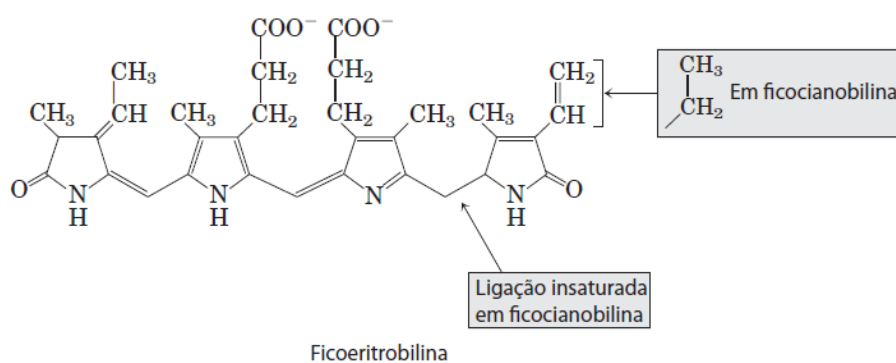
A absorção de energia luminosa pelas clorofilas é fundamental para desenvolvimento das reações fotossintéticas, contudo o excesso de luz pode inibir a fotossíntese através da fotoinibição e fotooxidação. A fotoinibição (processo reversível) envolve danos aos centros de reação, especialmente no fotosistema II (FS-II, apresentado no item 2.2.1), que quando superexcitados pelo excesso de energia luminosa perdem a proteína (D1) envolvida na transferência de elétrons entre P680 (Centro de reação do FS-II) e PQ (Plastoquinona). A fotooxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem luz em excesso, ficam por muito tempo excitados e interagem com o O₂ produzindo radicais livres, como superóxido (O₂⁻), podendo destruir os pigmentos.

Há algumas defesas bioquímicas utilizadas pelas plantas, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que destrói os radicais livres. No entanto, estas defesas são insuficientes à exposição prolongada à alta luminosidade (TAIZ et al., 2017).

2.1.3 Ficobilinas

Compreendem o grupo das ficobilinas as estruturas (i) alofococyanina (AFC) de coloração verde azulado; faixa de absorção máxima de $\lambda_{\text{max}} = 650-660$ nm e de emissão de luz no comprimento de onda 660 nm; a (ii) ficocianina (FC) de coloração azul; absorção em $\lambda_{\text{max}} = 610-625$ nm e emissão em 637 nm; a (iii) ficoeritrina (FE) de coloração roxo, absorção em $\lambda_{\text{max}} = 490-570$ nm e emissão em 577 nm (NELSON; COX, 2014); e a (iv) ficoeritrocianina (FEC) de coloração laranja, absorção máxima em $\lambda_{\text{max}} = 560-600$ nm e emissão de luz em 607 nm (BEALE, 1993; BRYANT, 1979; PAWAR; PURANIK, 2014). A Figura 2.1-4 ilustra a fórmula estrutural das moléculas ficoeritrobilina e ficocianobilina.

Figura 2.1-4 - Estrutura química da ficoeritrobilina e ficocianobilina



Fonte: Nelson e Cox (2014).

As ficobilinas são essencialmente hidrofílicas (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) e constituem pigmentos acessórios para a captação de energia luminosa de cianobactérias (algas verde-azuladas procarióticas), de *Rhodophytas* (algas vermelhas eucarióticas), de *Cryptomonads* (alga unicelular biflagelada eucariótica) e de *Cyanelles* (organelas endossimbióticas) (GLAZER, 1994). Especificadamente as cianobactérias da classe *Cyanophyceae* do gênero *Spirulina* (ou *Arthrospira*), e as algas vermelhas dos gêneros *Porphyridium*, *Rhodella* e *Galdieria*, apresentam em sua constituição as ficobilinas: AFC, FC, FE (NELSON; COX, 2014), e a FEC. Enquanto que nas algas do filo *Cryptophyta* e *Glaucophyta* estão presentes duas estruturas de ficobilinas: a FC e a FE (PAWAR; PURANIK, 2014).

As cianobactérias, quando cultivadas em meio nutriente contendo nitrogênio em concentração satisfatória ou não limitante, possuem composição rica em ficobilinas (BEALE, 1993). As ficobilinas possuem inúmeras aplicações comerciais, desde pigmentos corante, antioxidante, anti-inflamatório (KWAK et al., 2012), marcadores fluorescentes para uso em citometria de fluxo (GLAZER, 1994) e terapia fotodinâmica do câncer (HU et al., 2008).

De acordo com o grau de pureza do substrato, células de microalgas contendo C-ficocianina podem custar de 500 a 100.000 US\$/kg (BOROWITZKA, 2013). O grau de pureza pode ser determinado pela razão entre as absorbâncias 620 nm e 280 nm, que representam os respectivos comprimentos de onda das ficocianinas e das demais proteínas. Extratos com baixa pureza (entre 0,7 a 1,0) são destinados à indústria alimentícia, extratos com média pureza (em torno de 3,9) podem apresentar valor de mercado mais atrativo, e extratos de grau analítico (ou com pureza maior ou igual a 4,0) são bastante requisitados na indústria de fármacos e área da medicina (HERRERA et al., 1989; RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001).

2.2 MICROALGAS

As microalgas possuem tamanho variável entre 1 a 2 μm (NELSON; COX, 2014) e estão distribuídas de modo unicelular, ou organizadas na forma de colônias ou filamentos (TOMASELLI, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As espécies móveis possuem flagelos como estruturas locomotoras, ou técnicas de locomoção por secreção de mucilagem. Entretanto, a maioria das microalgas não apresenta estruturas para mobilidade, e sua locomoção é dependente da dinâmica de fluxo do meio ao qual estão inseridas (TOMASELLI, 2004).

Em termos de organização celular interna, as microalgas são classificadas em eucariontes (ou *Eukaria*) e procariontes (atualmente dividido em dois grupos, *Bacteria* e *Archaea*). Ambas apresentam estruturas semelhantes e de igual função, como a membrana plasmática lipoproteica semipermeável que circunda o citoplasma; o citosol, solução aquosa que compõe o citoplasma; os ribossomos; proteossomos e o material genético (NELSON; COX, 2014). Particularidade é observada quanto à existência da membrana nuclear que envolve o genoma, a qual está presente nos organismos eucariontes, de modo que o conjunto nucleóide com parede celular é denominado por núcleo; e ausente nos procariontes, em que o genoma permanece denominado por nucleóide (NELSON; COX, 2014; TOMASELLI, 2004).

Grande número das microalgas apresentam organização celular interna eucariótica, e apenas um grupo específico são enquadradas como procarióticas, a citar as cianobactérias (GRIMA; FERNÁNDEZ; MEDINA, 2013), também conhecidas por algas azul-esverdeadas (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004). Há autores que consideram errôneo o uso da denominação “microalgas” às cianobactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os organismos eucariontes apresentam organelas com funções específicas, como: mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (NELSON; COX, 2014; TOMASELLI, 2004). Particularmente, as células eucarióticas de plantas e microalgas apresentam organelas como os (i) vacúolos, que degradam e armazenam metabólitos; os (ii) cloroplastos, que atuam na absorção de luz e consequente produção de adenosina trifosfato (ATP) e carboidratos; os (iii) tilacoides, estrutura interna dos cloroplastos circundados pelo estroma, em que ocorre a síntese de energia; etc. (NELSON; COX, 2014). Especificadamente os filos *Rhodophyta* e *Cryptophyta* possuem no interior dos tilacoides as ficobiliproteínas ou ficobilinas (TOMASELLI, 2004), pigmentos acessórios comumente encontrados nas cianobactérias (NELSON; COX, 2014).

As algas eucarióticas podem se reproduzir de forma assexuada ou sexuada. A divisão assexuada de uma alga unicelular compreende o seu crescimento ou interfase, em que a alga aumenta em tamanho e número de constituintes celulares, de modo que cada célula-filha contenha compostos, organelas e material genético (DNA), necessários à continuidade de seu desenvolvimento pleno. Na sequência, ocorre à divisão do núcleo por mitose, e consequente formação de dois núcleos que se movem para as extremidades opostas da célula (TOMASELLI, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A célula então se divide em duas células completas, processo denominado por citocinese (TOMASELLI, 2004).

Na reprodução sexuada eucariótica, ocorre a fertilização entre gametas com consequente formação de um zigoto que após processos de meiose eclode novas algas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Já nas microalgas procarióticas, a divisão celular ocorre comumente por fissão binária ou por fragmentação (hormogonia), e a troca de material genético pode ocorrer por transformação ou conjugação (TOMASELLI, 2004).

As microalgas são classificadas quanto à fonte de carbono em autotróficas e heterotróficas, quando requerem carbono inorgânico e orgânico, respectivamente (SCHULZE et al., 2014), e são classificadas em mixotróficas quando possuem capacidade em assimilar ambas as fontes de carbono (NELSON; COX, 2014). No ambiente natural, microrganismos autotróficos e heterotróficos completam um ciclo de nutrientes e energia tendo como força

propulsora a luz solar. Neste ciclo, microrganismos autotróficos assimilam a energia solar e CO_2 atmosférico para a síntese de compostos orgânicos de carbono e de nutrientes, os quais são fonte de energia para microrganismos heterotróficos, que por sua vez liberam carbono e nutrientes na forma inorgânica, disponíveis para a assimilação pelos autotróficos, e assim sucessivamente. Desta forma, os microrganismos autotróficos são denominados por produtores (primários) e os heterotróficos por consumidores (ESTEVEVES, 2011; NELSON; COX, 2014).

2.2.1 Metabolismo: Produção de Energia

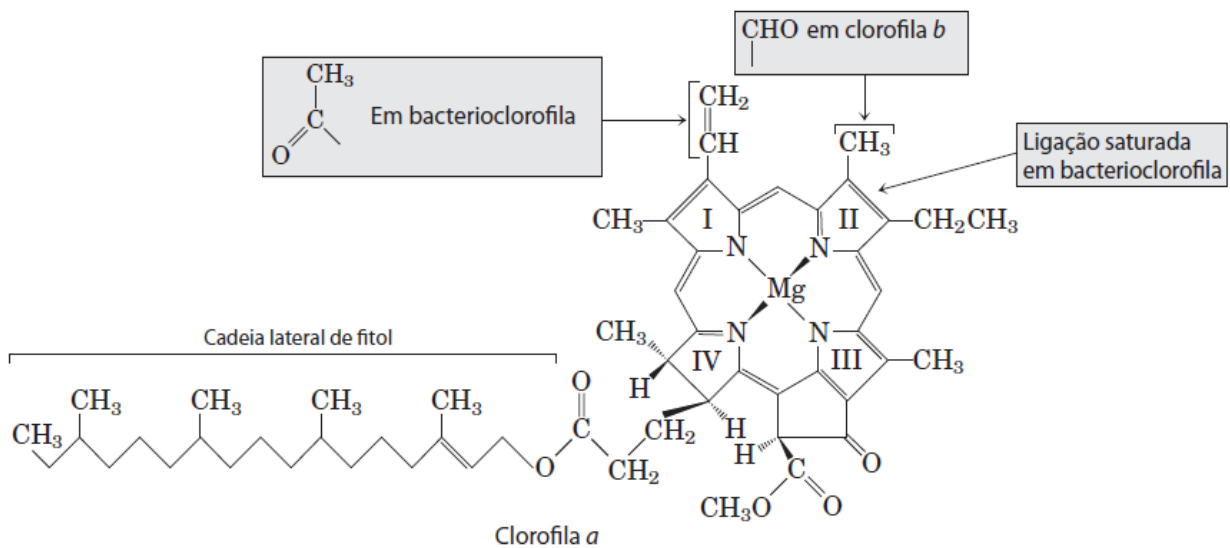
A fotossíntese engloba reações diretamente e indiretamente dependentes da luz para a produção de energia e síntese de compostos. As reações metabólicas diretamente dependentes da luz acumulam distintas denominações, como fase clara (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004), fotoquímica (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997) e reações luminosas (NELSON; COX, 2014). Já as ditas indiretamente dependentes da luz, são denominadas por reações de assimilação de carbono, fixação de carbono (NELSON; COX, 2014) ou fase escura, e consistem em reações consequentes da fase luminosa, ou seja, dependentes dos subprodutos originados durante a fase clara (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997). As reações da fotossíntese fase clara ocorrem nos tilacoides das microalgas, estruturas internas dos cloroplastos que contém as clorofilas (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997), e no citoplasma de cianobactérias (NELSON; COX, 2014).

A fase clara compreende a absorção de energia luminosa por complexos ordenados de distintos pigmentos receptores de fótons, os fotossistemas. Os fótons assimilados pelas moléculas são transferidos às moléculas vizinhas com destino ao centro de reação fotoquímica, no qual há clorofila capacitada na transdução da energia luminosa em energia química (NELSON; COX, 2014). Especificadamente durante a fase clara, além da fotólise da água com liberação de H^+ e O_2 , o centro de reação fotoquímica formado pela clorofila, fotossistema II (FS-II) é excitado pela luz em 680 nm e transfere energia na forma de elétrons ao longo da membrana, com auxílio de estruturas transportadoras ou complexo de citocromos. Este processo impulsiona a cadeia protomotiva, que consiste na passagem de prótons através da membrana (a partir do estroma no sentido do lúmen do tilacoide), e consequentemente promove a fosforilação do adenosina difosfato (ADP) para adenosina trifosfato (ATP) pela estrutura ATP-sintase. Ainda, os elétrons advindos do FS-II suprem o déficit de elétrons de outro centro de reação fotoquímica composto por clorofila, o fotossistema I (FS-I), o qual

depois de excitado pela energia especialmente em 700 nm, também perde elétrons para a cadeia transportadora de éxcitons que promove a redução de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADP^+) a fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (NADPH). Salienta-se que o déficit de elétrons do FS-I é suprido pela fotólise da água. Assim, a fase fotoquímica promove a produção de energia na forma das moléculas de NADPH e ATP (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; NELSON; COX, 2014; PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

As clorofilas são os principais pigmentos responsáveis pela absorção da luz necessária ao processo fotossintético. Destaque especial à clorofila *a* que absorve radiação eletromagnética visível em comprimentos de onda de 680 e 700 nm, e em segundo plano à clorofila *b* que assimila luz visível na faixa de 450 e 650 nm. A Figura 2.2-1 apresenta o arranjo estrutural molecular das clorofilas (NELSON; COX, 2014).

Figura 2.2-1 - Estrutura química das clorofilas *a* e *b*



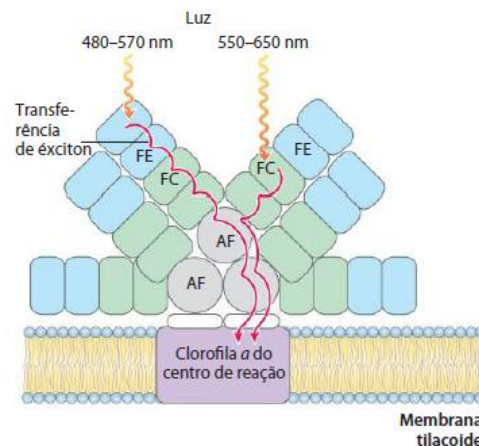
Fonte: Nelson e Cox (2014).

Contudo, o campo do espectro visível compreende o range de 400 a 700 nm, e a absorção de radiação eletromagnética distinta das praticadas pelas clorofilas *a* e *b*, pode ocorrer através de outras estruturas contidas nos cloroplastos (OOMS et al., 2016), que são os denominados pigmentos acessórios (NELSON; COX, 2014). Os principais pigmentos acessórios englobam os carotenoides β -caroteno (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) e luteína presentes na maioria dos espécimes fotossintetizantes (NELSON; COX, 2014), e os pigmentos acessórios ficobilinas como a ficoeritrobilina e ficocianobilina

(MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) contidos especialmente nas cianobactérias e algas vermelhas (NELSON; COX, 2014).

Nas cianobactérias e algas vermelhas, o complexo ordenado de ficobilinas, proteínas e clorofilas forma a estrutura denominada por ficobilissomo, no qual os pigmentos de ficobilinas ligados a proteínas formam: a ficoeritrina que absorve luz em 480-570 nm, e a ficocianina que absorve luz em 550-650 nm (NELSON; COX, 2014). Ambas transferem a energia absorvida para a ficobilina aloficocianina, que por sua vez a transmite à clorofila *a* num processo conhecido como transferência de éxcitons, em que um *quantum* de energia absorvida é passada de uma molécula excitada para uma molécula vizinha (BEALE, 1993; NELSON; COX, 2014), conforme ilustrado na Figura 2.2-2. Salienta-se que os pigmentos ficobilinas possuem boa faixa do espectro ao absorverem luz verde-azulado, verde, amarelo e alaranjado (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004).

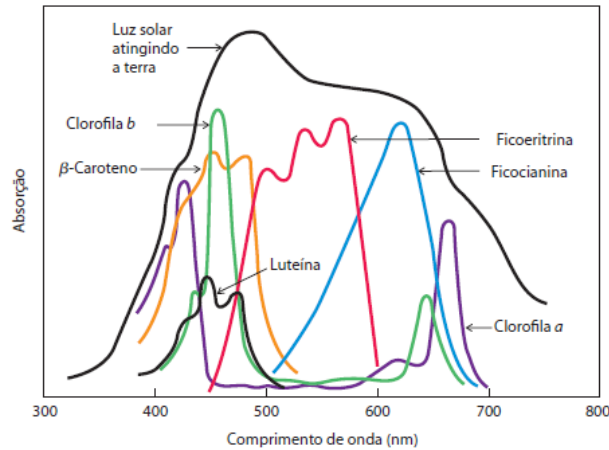
Figura 2.2-2 - Ilustração da estrutura do ficobilissomo



Legenda: FE: ficoeritrina; FC: ficocianina; AF: aloficocianina.
Fonte: Nelson e Cox (2014).

Deste modo, o conjunto de pigmentos fotossintetizantes e acessórios representa um fotossistema conforme supracitado, onde pode ocorrer a captação de luz em distintos comprimentos de onda de acordo com os pigmentos presentes; entretanto, apenas poucas moléculas de clorofilas são capacitadas na transdução de energia luminosa ou fótons em energia química (NELSON; COX, 2014). A Figura 2.2-3 apresenta a faixa do espectro visível e os respectivos comprimentos de onda de absorção típicos dos pigmentos fotossintetizantes e acessórios.

Figura 2.2-3 - Comprimento de onda de absorção de clorofilas e pigmentos acessórios



Fonte: Nelson e Cox (2014).

Conforme ilustrado na Figura 2.2-3, o espectro visível corresponde à faixa do espectro propulsor das reações da fotossíntese e varia do vermelho (700 nm) – com menor frequência e maior comprimento de onda –, ao violeta (300 nm) – com maior frequência e menor comprimento de onda (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004). Logo, a energia luminosa de um fóton ou *quantum* de energia é menor próxima do vermelho (150 kJ/Einstein ou 150 kJ/mol de fóton), e maior em torno do violeta (300 kJ/Einstein ou 300 kJ/mol de fóton). Esta energia (E) pode ser estimada por meio da Equação (1) de Planck (NELSON; COX, 2014):

$$E = \frac{h \cdot c \cdot N_{av}}{\lambda} \quad (1)$$

Em que, h : constante de Planck [$6,626 \cdot 10^{-34}$ J s], c : velocidade da luz [$3 \cdot 10^8$ m s⁻¹], N_{av} : Constante de Avogadro [$6,022 \cdot 10^{23}$] e λ : comprimento de onda [m]. Adicionalmente, a faixa do espectro visível é conhecida como radiação fotossintética ativa (PAR – *Photosynthetically Active Radiation*) (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) que corresponde a 43% do total de energia solar incidente na Terra, e a 28% em termos de fótons (OOMS et al., 2016).

A continuidade do fenômeno de fotossíntese é processada pela fase escura, que compreende a fixação do CO₂ com consumo das moléculas energéticas NADPH e ATP produzidas durante a fase clara. Assim, o CO₂ é transformado em açúcar ou outro composto pelo Ciclo de Calvin-Benson, que compreende as seguintes fases: (1) Carboxilação: reação entre a molécula de CO₂ e a pentose ribulose bifosfato, catalisada pela proteína rubisco, e com consequente formação de fosfoglicerato; (2) Redução: fosforilação do fosfoglicerato à

difosfoglicerato com gasto de ATP, seguido de redução do difosfoglicerato à fosfogliceraldeído com gasto de NADPH; (3) Regeneração: a ribulose bifosfato é regenerada a partir de uma série de reações complexas e conclui o ciclo para nova fixação de CO₂; e (4) Produção: envolve principalmente a síntese de carboidratos, mas também de amido, ácidos graxos e orgânicos, e outros, dependendo das condições de irradiação, concentração de O₂ e CO₂, e nutrientes presentes (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004).

Entretanto, é plausível destacar que a alta razão entre O₂/CO₂ favorece reações de descarboxilação, ou seja, processos de respiração. Logo, a manutenção da elevada produtividade de microalgas está relacionada à baixa razão entre os elementos supracitados, o que é conseguido com o enriquecimento do meio através da adição de CO₂, e da remoção do O₂ por agitação ou outro método (LEE; PALSSON, 1994; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004). Por fim, em termos de intensidade de irradiação, os organismos fotossintetizantes podem adaptar-se rapidamente as condições de luminosidade, de modo a aumentar o número de centros de captação de luz nos fotossistemas em condições restritas de irradiação, assim como reduzi-los quando há luminosidade acima do ótimo (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004).

2.2.2 Coleta e Purificação da Cepa

As microalgas distribuem-se comumente em ambientes aquáticos continentais e marinhos, mas também estão presentes no solo e em simbiose com plantas e animais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; SILVA; ANDRADE; SCHERER, 2014). O ambiente de coleta de microalgas com propósitos de cultivo *indoor* ou *outdoor* deve estar em conformidade com os objetivos do cultivo, espécies de interesse e subprodutos desejados (SILVA; ANDRADE; SCHERER, 2014). A aquisição de uma cepa pura de interesse requer um trabalho minucioso de coleta do material em campo e principalmente, de purificação laboratorial do material coletado até a obtenção da cepa (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

A coleta da microalga de interesse em seu habitat usual permite adquirir uma amostra que provavelmente contenha a cepa de interesse. A purificação da amostra, de modo a eliminar microrganismos indesejáveis envolve técnicas repetitivas de separação e manutenção dos fatores ambientais que favoreçam o desenvolvimento da microalga de interesse (LEE et al., 2013). Entre os fatores ambientais, o controle do pH, do oxigênio dissolvido, da temperatura e da salinidade, aliado a fonte de luz e um meio de cultura seletivo rico em

carbono e nutrientes podem auxiliar no processo de purificação da cepa (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG; 1997). Neste contexto, a determinação dos parâmetros pH, profundidade de coleta, concentração de oxigênio dissolvido e temperatura do ambiente de coleta, podem facilitar a definição das condições ótimas de laboratório para a manutenção das cepas (SILVA; ANDRADE; SCHERER, 2014).

Após a sua coleta, o isolamento de microalgas fotoautotróficas de ambientes aquáticos envolve a adoção de técnicas de concentração por filtração ou centrifugação, seguido de incubação por 2 a 3 semanas em placa de *Petri* contendo meio nutritivo Agar (substrato), e iluminação constante. Decorrido o tempo de incubação, distintas colônias se formarão ao longo da placa, sendo necessário coletá-las separadamente e transferi-las a um novo meio. Isso pode ser viabilizado com auxílio de um microscópio de dissecação e micropipetas (LEE et al., 2013). Além do plaqueamento em meio substrato sólido, o isolamento ou a purificação da cepa, pode ser desenvolvido em meio de cultura líquido, e ambas as técnicas podem ser complementadas pelos procedimentos de repicagem, geração de gradiente por centrifugação, irradiação de luz ultravioleta, filtração e pelo uso de antibióticos para remoção de bactérias e fungos (LEE et al. 2013; PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1997).

As células podem ser mantidas por longo período em baixa iluminação e temperatura ambiente de 20 a 25°C, ou até em temperaturas inferiores em câmaras de nitrogênio líquido (LEE et al., 2013). A avaliação quantitativa do cultivo pode empregar técnicas diretas de contagem celular manual, contagem automática por citometria, e automatizada por citometria de fluxo. Entretanto, a técnica indireta de densidade óptica (DO) confere eficácia e robustez na quantificação celular, pois compreende a correlação entre a quantidade de luz absorvida por uma suspensão celular, e o número de células ou de biomassa contida na suspensão (LEE et al., 2013). Também são métodos indiretos, a determinação de proteínas, DNA, oxigênio dissolvido e dióxido de carbono.

A partir da biomassa, distintos parâmetros cinéticos e estequiométricos podem ser calculados, sendo a produtividade do cultivo de microalgas realizada por meio do monitoramento da taxa de crescimento específica (FU et al., 2012; KHALILI et al., 2015) e da eficiência fotossintética, a qual prevê a real quantidade de energia luminosa absorvida pelos fotossistemas de reação (MOOIJ et al., 2016; VEJRAZKA et al., 2013). A eficiência fotossintética pode ser expressa na forma de (1) massa de biomassa por fótons de energia luminosa absorvida ou (2) concentração de oxigênio produzido por fótons de energia luminosa absorvida (VEJRAZKA et al., 2013).

2.2.3 Cultivo de Microalgas

A comercialização em larga escala dos produtos biotecnológicos sintetizados por microalgas culmina na necessidade de um modelo de produção que atenda as demandas do mercado, e concomitantemente, apresente boa relação custo-benefício. Entretanto, apesar das inúmeras investigações realizadas ao longo dos anos sobre a exploração de microalgas, há ainda grandes lacunas em aberto, especialmente quanto às técnicas e metodologias ótimas para se produzir de modo eficaz, economicamente viável e adequado para processos de escala industrial (GOMAA; AL-HAJ; ABED, 2016).

O sistema de cultivo de microalgas pode ser classificado em (i) **aberto**, também denominado por *open ponds* (BLANCO et al., 2007; GLEMSER et al., 2016; HERRERA et al., 1989), que são as lagoas abertas bastante empregadas para a produção de microalgas em escala industrial, as quais requerem grande área para sua implantação, e apresentam como principais desafios o gerenciamento dos fatores temperatura e irradiação, dada a variação natural diurna e anual de tais fatores (SÁNCHEZ et al., 2008); e (ii) **fechado** (DEL CAMPO et al., 2001; GLEMSER et al., 2016), popularmente denominado por reator ou fotobiorreator para sistemas fotoautotróficos. O sistema de cultivo fechado, ainda é categorizado em *indoor* e *outdoor* (SÁNCHEZ et al., 2008), sendo o primeiro desenvolvido em ambiente protegido de intempéries atmosféricas, ao contrário do segundo que é desenvolvido sob condições de ambiente externo.

Neste contexto, a intensidade de irradiação está entre os principais fatores que regem a elevada produtividade de microalgas (OOMS et al., 2016), e as experimentações *indoor* têm substituído à irradiação natural por irradiação artificial especialmente com a adoção de lâmpadas fluorescentes (CAMPENNI et al., 2013; LIAO et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2008), e lâmpadas LED - *Light Emitting Diode* (FU et al., 2012; KIM et al., 2015; LEE; PALSSON, 1994). Em cultivos abertos e fechados *outdoor*, normalmente esta demanda energética é suprida pela própria energia eletromagnética solar (DEL CAMPO et al., 2001; RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001), fato que promove robustez ao processo e colabora com a competitividade desses métodos de cultivo frente aos sistemas fechados *indoor* de irradiação artificial (BOROWITZKA, 2013).

Entretanto, os biorreatores fechados (*indoor e outdoor*) possuem inúmeras vantagens quando comparados aos abertos: (1) maior controle das condições ambientais; (2) maior razão superfície de contato em detrimento do volume; (3) maior controle da transferência de gases;

(4) redução do efeito de evaporação; (5) maior controle da temperatura; (6) facilidade de instalação em qualquer ambiente; (7) maior proteção de modo a reduzir a probabilidade de contaminação; e (8) alta produtividade de células (CHEN, 1996). Mas também possuem algumas desvantagens como (1) a limitação do número de células com o biorreator; (2) a possibilidade de contaminação por bactérias; (3) a inibição do crescimento pela presença, mesmo em baixas concentrações, de substâncias orgânicas solúveis; e (4) a incapacidade de produção de certos pigmentos devido à limitação de luz (CHEN, 1996).

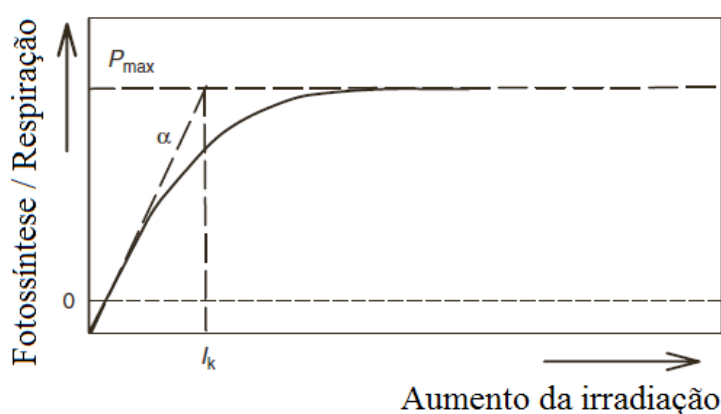
Em termos de modelo e configuração espacial de sistemas fechados, distintos estudos têm atenção voltada ao desenvolvimento de fotobiorreatores (GLEMSER et al., 2016; JANSSEN et al., 2001) nas geometrias espacial tubular (BLANCO et al., 2007) ou coluna vertical (CAMPENNI et al., 2013; KIM et al., 2015; SÁNCHEZ et al., 2008), horizontal, em alfa e *air lift*, além das configurações em placas plana (MOOIJ et al., 2016) e tanque agitado (RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001).

Porém, independente do modo de cultivo, se sistema aberto ou fechado, a otimização do cultivo de microalgas em fotobiorreatores a partir da definição das condições ótimas operacionais de pH, temperatura, fluxo de ar e intensidade luminosa, por exemplo, permite ganhos em produtividade e reduções no consumo de energia e no custo total do processo de produção (MANIRAFASHA et al., 2016). A alta produtividade está relacionada à fonte e a distribuição da energia luminosa, ao balanço de gás dióxido de carbono (OOMS et al., 2016) e a manutenção de um meio nutriente com o propósito de suprir a demanda metabólica das microalgas (SILVA; PAIXÃO; ALVES, 2016). A produtividade também é dependente de um sistema de agitação para manter em suspensão as cepas e sólidos particulados, de modo a evitar a mortandade de espécimes e a proliferação de microrganismos indesejáveis, diante da elevada susceptibilidade de contaminação (LEE; PALSSON, 1994); e do controle da concentração do oxigênio molecular, subproduto da fotossíntese que em elevadas concentrações pode promover efeito inibidor no crescimento das algas (LEE; PALSSON, 1994; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004).

Em todos os casos, a força motriz do sistema é a energia eletromagnética solar ou artificial, as quais têm suas magnitudes estimadas pela taxa fotossintética (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004). A determinação da taxa máxima fotossintética a partir da saturação da irradiação é crucial para o planejamento das atividades operacionais a serem desenvolvidas no fotobiorreator (LIAO et al., 2014; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; OOMS et al., 2016), e este parâmetro pode ser indiretamente determinado pela

correlação positiva entre a evolução da concentração do oxigênio e a intensidade de irradiação, pelo método da curva luz-resposta fotossintética representado na Figura 2.2-4. Neste caso, α representa a inclinação inicial da curva, ou razão entre P_{max} – máxima taxa fotossintética que considera o saldo de oxigênio diante de sua produção pela fotossíntese e consumo pela respiração –, e I_k – irradiação de saturação. Em condições de baixa intensidade luminosa, a taxa fotossintética depende linearmente da irradiação. O aumento excessivo da intensidade de irradiação reduz a eficiência fotossintética até que esta atinja a saturação. A continuidade da irradiação acima da condição ótima (intensidade de luz relacionada a saturação da taxa fotossintética) pode promover a redução da taxa fotossintética, fenômeno conhecido por fotoinibição (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; OOMS et al., 2016). A taxa fotossintética máxima estimada durante estudos com cultivos *outdoor* de microalgas encontra-se em torno de 8% a 12% (OOMS et al., 2016).

Figura 2.2-4 - Representação gráfica da curva luz-resposta fotossintética



Fonte: Masojidek; Koblížek e Torzillo (2004).

Já a taxa de crescimento celular envolve a contagem das células, uma técnica trabalhosa que em muitos casos é substituída pela adoção de métodos alternativos indiretos de densidade óptica (ATTA et al., 2013; FU et al., 2012; LIAO et al., 2014), peso seco (ATTA et al., 2013; KIM et al., 2015; LIAO et al., 2014), clorofila (FU et al., 2012; KIM et al., 2015) e concentração de carbono (FU et al., 2012). A densidade óptica, leitura da absorvância característica da microalga em questão, pode ser relacionada com o peso seco determinado por gravimetria a partir de uma curva de calibração (LIAO et al., 2014).

Além do monitoramento das taxas fotossintética e de crescimento, ao longo do processo de cultivo das microalgas, periodicamente também devem ser executados os procedimentos de (1) colheita ou recuperação da biomassa de microalgas diluída

(MANIRAFASHA et al., 2016) com ruptura celular por centrifugação, filtração, maceração, ultrassom ou liofilização; (2) extração do bioproduto de interesse com adição de solventes; e (3) quantificação (LAWRENZ; FEDEWA; RICHARDSON, 2011). O rendimento da técnica adotada na colheita ou mesmo na extração é afetado pelas propriedades da parede da microalga, como resistência à tração e permeabilidade. Logo, uma investigação acurada sobre o procedimento de maior eficiência diante de particularidades da parede celular, é fundamental para que as indústrias alcancem rendimentos competitivos e minimizem custos do processo (BAUDELET et al., 2017).

2.2.4 *Tetradismus* sp.

O gênero *Tetradismus* sp. pertence à subfamília *Scenedesmoidea*, família *Scenedesmaceae*, ordem *Sphaeropleales*, classe *Chlorophyceae*, subfiló *Chlorophytina* e filo *Chlorophyta* (ALGAEBASE, 2017; BAUDELET et al., 2017). As primeiras espécies classificadas no gênero *Tetradismus* sp. foram identificadas, principalmente, da Europa, Ásia (Sibéria), África (Moçambique) e Estados Unidos (Figura 2.2-5). No Brasil, há registro de documentação da espécie *Tetradismus lunatus* (BICUDO; MENEZES, 2006). Geralmente, a microalga *Tetradismus* sp. ocorre em colônias com quatro células e raramente com duas, oito ou uma única célula (BICUDO; MENEZES, 2006). Quando agrupadas em quatro, especialmente observa-se a configuração de dois planos que se interceptam perpendicularmente (Figura 2.2-6a), sendo que cada plano representa a união de duas células (Figura 2.2-6b). Diferente do gênero *Scenedesmus* sp., em que a união entre as quatro células pode ser representada por um único plano no espaço, conforme ilustrado na Figura 2.2-6c (SMITH, 1913).

A distinção entre os gêneros *Tetradismus* e *Scenedesmus* gerou discussões entre pesquisadores que julgavam tratar-se de organismos idênticos (CHODAT, 1913) e os que afirmavam serem organismos distintos (SMITH, 1913; WEST, 1915). Desde então, vários gêneros e espécies foram transferidos para gênero *Tetradismus*. Atualmente o gênero *Acutodesmus* é taxonomicamente aceito como *Tetradismus*, assim como a espécie *A. wisconsinensis* é no presente, denominada por *T. wisconsinensis* (WYNNE; HALLAN, 2015). A Tabela 2.2-1 apresenta espécies distintas que são taxonomicamente aceitas como pertencentes ao gênero *Tetradismus*.

Figura 2.2-5 - Ilustração morfológica das espécies *Tetradasmus cumbriacus*, *Tetradasmus lunatus*, *Tetradasmus wisconsinensis* e *Tetradasmus sibiricus*, publicada em 1953

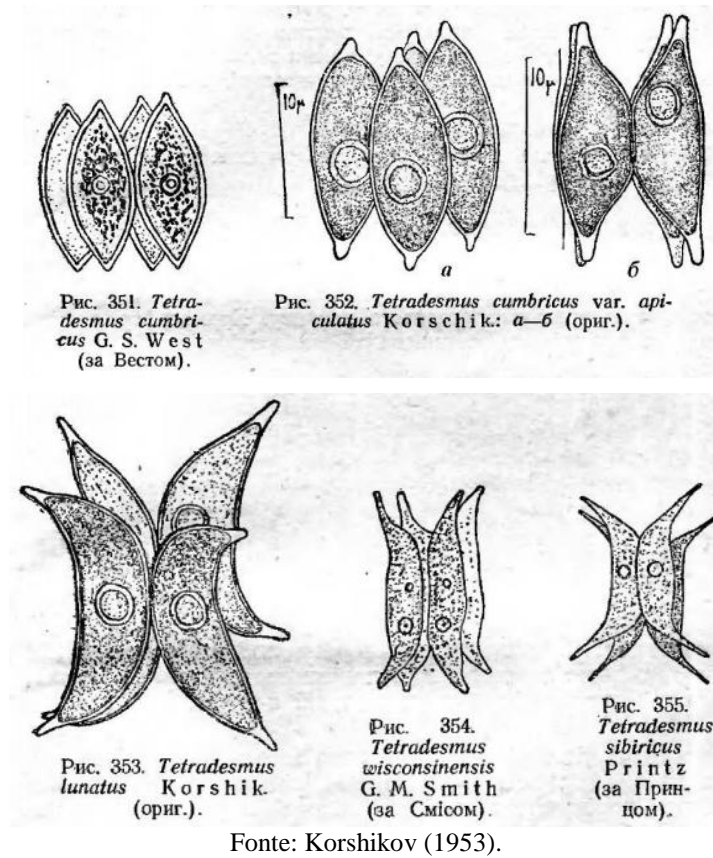


Figura 2.2-6 - Ilustração morfológica de microalga publicada em 1913. (a) Arranjo em três dimensões da colônia de quatro células de *Tetradasmus* sp.; (b) Seção longitudinal da colônia de *Tetradasmus* sp.; (c) Colônia de *Scenedesmus acutus*

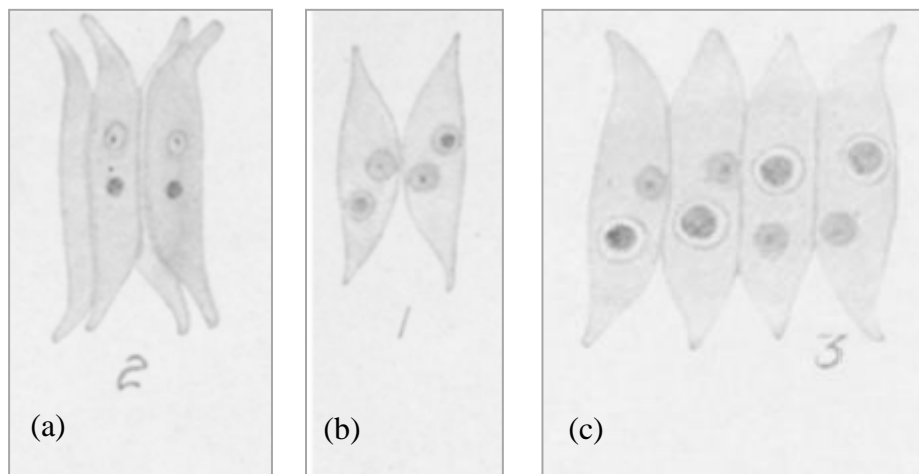


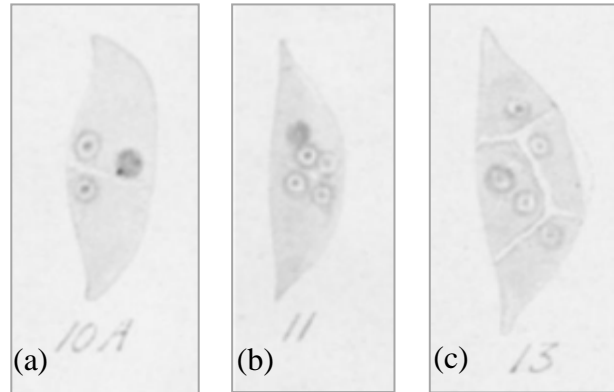
Tabela 2.2-1- Espécies de microalgas transferidas para o gênero *Tetradismus*

Espécie/gênero de microalga	Nomenclatura correntemente aceita
<i>Scenedesmus wisconsinensis</i> <i>Acutodesmus wisconsinensis</i>	<i>Tetradismus wisconsinensis</i>
<i>Scenedesmus acuminatus</i> <i>Acutodesmus acuminatus</i>	<i>Tetradismus acuminatus</i>
<i>Acutodesmus bernardii</i> <i>Scenedesmus bernardii</i> <i>Acutodesmus pectinatus</i>	<i>Tetradismus bernardii</i>
<i>Scenedesmus dimorpha</i> <i>Acutodesmus dimorphus</i>	<i>Tetradismus dimorphus</i>
<i>Keratococcus dissociatus</i> <i>Scenedesmus dissociatus</i> <i>Acutodesmus dissociatus</i>	<i>Tetradismus dissociatus</i>
<i>Acutodesmus distendus</i>	<i>Tetradismus distendus</i>
<i>Acutodesmus</i> <i>Scenedesmus antillarum</i>	<i>Tetradismus incrassatulus</i>
<i>Acutodesmus nygaardii</i> <i>Scenedesmus javanensis</i>	<i>Tetradismus nygaardii</i>
<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Acutodesmus obliquus</i> <i>Scenedesmus basilensis</i> <i>Scenedesmus acutus</i> <i>Scenedesmus bijugatus</i>	<i>Tetradismus obliquus</i>

Fonte: Wynne e Hallan (2015).

A reprodução da microalga *Tetradismus* sp. ocorre de forma assexuada. Mais especificadamente, o núcleo da célula mãe se divide em dois, um para cada célula filha, e se alinham ao longo do eixo conforme ilustrado na Figura 2.2-7a. Após o alinhamento, tem-se início a clivagem do citoplasma celular a partir da extremidade da célula em direção ao centro, em que cada porção celular ou futura célula filha, conterá metade do material protoplasmático (SMITH, 1913). Na sequência, ocorre uma segunda divisão nuclear, seguida por uma nova clivagem entre as células, como retratado nas Figuras 2.2-7b e 2.2-7c (SMITH, 1913).

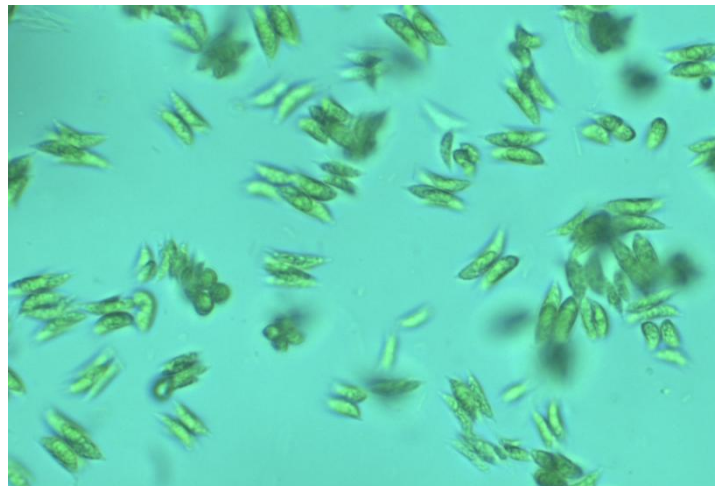
Figura 2.2-7- Ilustração morfológica da reprodução assexuada da *Tetradismus* sp. publicada de 1913. (a) Primeira divisão nuclear e clivagem celular; (b) Segunda divisão nuclear; (c) Segunda clivagem celular



Fonte: Smith (1913).

Os ajustes de classificação taxonômica de microalgas são constantes e acredita-se que isso viabilizará por parte das indústrias, um controle maior dos processos de extração; além de promover maior aceitação pelos consumidores de produtos derivados de algas (BAUDELET et al., 2017). Na literatura existem raras pesquisas com a microalga *Tetradismus*, possivelmente devido aos ajustes taxonômicos supracitados. A Figura 2.2-8 apresenta uma imagem de microscopia da espécie *Tetradismus* sp. com 97% de similaridade com a *T. acuminatus*, catalogada por Schuelter et al. (2019).

Figura 2.2-8 - Imagem de microscopia da *Tetradismus acuminatus*



Fonte: Schuelter et al. (2019).

2.3 SÍNTESE DO CAPÍTULO

No capítulo foram abordados conceitos e informações básicas sobre: bioprodutos, metabolismo, isolamento e cultivo de microalgas. Entre os bioprodutos, foram conceituados os carotenoides, clorofilas e ficobilinas. As clorofilas foram classificadas como os principais pigmentos absorvedores de energia luminosa em seres fotossintéticos, enquanto os carotenoides e as ficobilinas foram enquadrados como pigmentos acessórios de absorção de energia luminosa em faixas espectrais diferentes das clorofilas, presentes em organismos a depender da espécie. A síntese de bioprodutos de alto valor pelas microalgas foi apontada como dependente de inúmeros fatores, como o metabolismo microalgal, técnicas de cultivo e fonte de energia luminosa. Por fim, discorreu-se sobre o cultivo de microalgas em fotobiorreator, que sob energia luminosa natural ou artificial, pode assumir distintas geometrias: tubular vertical ou horizontal, placa plana, em alfa, lagoas, etc.

3 ESTADO DA ARTE

3.1 EXPLORAÇÃO DE MICROALGAS

A síntese de compostos químicos a partir de uma fonte de energia eletromagnética natural tem sido estudada há décadas por pesquisadores como retratam os estudos desenvolvidos por Arnon et al. (1974), Bennett e Bogorad (1973), Herrera et al. (1989), Lee e Palsson (1994). Contudo, até o presente, este processo de síntese considerado sustentável é único e exclusivo de organismos fotossintéticos (OOMS et al., 2016), fato que incentivou os cultivos de plantas e microalgas para a obtenção de bioprodutos farmacêuticos, nutricionais (LEU; BOUSSIBA, 2014), e especialmente para a produção de biocombustíveis (OOMS et al., 2016). A retomada dos estudos mais aprofundados sobre o assunto ganhou fôlego diante da diversidade de espécies de microalgas, do histórico de evolução filogenética (BOROWITZKA, 2013) e da demanda crescente por biocombustíveis dada à redução dos recursos fósseis naturais (OOMS et al., 2016; SEVERES et al., 2017).

O crescente interesse nos setores de biocombustíveis e de produtos de alto valor culminou em um novo conceito de biorrefinaria que une as gerações de extratos de lipídios e carboidratos para alimentar a produção energética, e de metabólitos secundários com valor agregado (MARKOU; NERANTZIS, 2013). A ascensão do mercado de microalgas pode ser confirmada pelos dados de produção mundial de biomassa em peso seco que triplicou entre 2004 a 2013, de 5 para 15 mil toneladas ano⁻¹ (BRASIL; GARCIA, 2016), e estima-se alcançar 27,5 mil toneladas em 2024 (PRNewswire, 2018).

A indústria química, que inclui os segmentos da farmácia, cosmética, alimentos funcionais, nutracêutica, aquicultura e de biocombustíveis, apresenta demanda por pigmentos, polissacarídeos, triglicerídeos, ácidos graxos e vitaminas (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015). *Commodities* estes, que são denominados por produtos biotecnológicos quando adquiridos via fonte natural, pela exploração de microalgas, por exemplo. Os cultivos dos gêneros *Arthrospira* (*Spirulina sp.*) e *Chlorella sp.*, foram pioneiros para a obtenção de pigmentos para a indústria de cosméticos e alimentícia (proteína) (BRASIL; GARCIA, 2016).

Dentre os produtos biotecnológicos de interesse, os pigmentos β -caroteno, zeaxantina, astaxantina e a luteína estão entre os carotenoides mais importantes comercialmente (MALDONADO-ROBLEDO et al., 2003). Entretanto, os únicos bioprodutos de alto valor

obtidos a partir da síntese de algas e comercializados em escala industrial são o β -caroteno e a astaxantina, sintetizados respectivamente pelas algas *Dunaliella salina* ou *D. bardawil* (BEN-AMOTZ, 1995) e *Haematococcus pluvialis* (BOUSSIBA et al., 1997³ apud LEU; BOUSSIBA, 2014).

Neste contexto, o β -caroteno de origem natural está entre os primeiros bioprodutos de alto valor comercializados (BOROWITZKA, 2013), com preço médio variável de 300 – 3.000 US\$/kg (SUGANYA et al., 2016). A produção deste biopigmento teve início em 1980 por quatro companhias: a *Koor Foods* (Israel), *Western Biotechnology Ltd* (Austrália), *Betatene* (Austrália) e a *Nutralite* (USA). A companhia israelita pertence à japonesa *Nikken Shohonsha Co*, já as australianas pertencem a BASF e a americana não se encontra mais no mercado. Neste segmento, a Austrália se destaca pelo elevado potencial competitivo com as companhias *Hutt Lagoon* ao Oeste do país e a *Whyalla* ao sul (BOROWITZKA, 2013).

A astaxantina, sintetizada pela alga verde *Haematococcus pluvialis*, cujo valor de mercado varia entre 2.500 US\$/kg (SUGANYA et al., 2016) e 8.000 US\$/kg (BRASIL; GARCIA, 2016), é produzida em escala comercial para suprir demandas da indústria alimentícia na forma de suplemento alimentar, pigmento de peixes (GANGL et al., 2015), na prevenção de infecções bacteriológicas e no tratamento de doenças vasculares e câncer (HU et al., 2008). Ainda, devido a sua propriedade antioxidante, a astaxantina também têm despertado o interesse da indústria farmacêutica e cosmética (GANGL et al., 2015).

Desde 1998 a companhia *Algae Technology*, uma parceria entre a empresa israelita *Kibbutz Ketura* e a britânica JCA, produz astaxantina a partir do cultivo da *H. pluvialis* para atender o mercado de cosméticos e alimentos, que inclui pigmentos, suplemento alimentar humano e animal (ALGA TECH, 2017). Outras empresas que produzem astaxantina são as chinesas *Algae Health* da *BBG Company* (ALGAE HEALTH, 2017), e a *Yunnan Alphy Biotech Co, Ltd* (NATURAL ASTAXANTHIN, 2017). Já a *Cyanotech*, situada em Kona Coast, no Hawaii (EUA), além de produzir astaxantina a partir da *Haematococcus sp.*, também produz biomassa a partir de cultivos da *Spirulina sp.* (CYANOTECH, 2017). Apesar das distintas companhias produtoras de astaxantina, acredita-se que há poucas investigações quando a obtenção deste caroteno via micro-organismo (ALCAÍNO; BAEZA; CIFUENTES, 2016).

³ BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z.; RICHMOND, A.; Depositante: BEN-GURION. A **procedure for large-scale production of astaxanthin from *Haematococcus*** [patent]. University of the Negev, Israel, assignee. WO 97/28274. 1997.

A China, o Japão e os EUA, são os países que se destacam na produção de bioprodutos de alto valor agregado de origem algal (BRASIL; GARCIA, 2016). No mercado de produtos via microalga, a empresa americana TerraVia é pioneira no setor de especiarias, linha que tem se mostrado promissora por envolver produtos alimentares com elevada pureza e caráter nutricional (TERRAVIA, 2017).

Há poucos registros de cultivos de microalgas em escala industrial para a obtenção dos bioprodutos luteína e ficobilinas. A luteína, outro carotenoide, porém do grupo xantofilas (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004) possui aplicações na indústria farmacêutica e nutracêutica. A luteína está presente nas flores de calêndula em concentrações atrativas correspondentes a 0,03% de seu peso seco (SÁNCHEZ et al., 2008); na constituição de frutas; e em cultivos de microalgas do gênero *Muriellopsis* sp., de modo a representar de 0,4 – 0,6% da massa seca (BLANCO et al., 2007). A mesma microalga (*Muriellopsis* sp.) já apresentou concentração de luteína de até 35 mg L⁻¹ de cultura (DEL CAMPO et al., 2000).

O desenvolvimento tecnológico do mercado de bioprodutos de origem algal, impulsionou a comercialização da luteína nos segmentos da indústria. A movimentação anual de produtos contendo a luteína em sua formulação é estimada em cerca de US\$ 190 milhões na indústria farmacêutica, US\$ 110 milhões na nutracêutica e alimentícia, US\$ 175 milhões em rações para animais, e US\$ 2 bilhões na indústria de cosméticos (SUGANYA et al., 2016).

Já as ficobilinas, pigmentos que apresentam elevado valor de mercado conforme o seu grau de pureza (HERRERA et al., 1989; RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001), 500 a 100.000 US\$/kg (BOROWITZKA, 2013), estão presentes especialmente em cianobactérias e algas vermelhas (GLAZER, 1994; NELSON; COX, 2014). Os estudos com tais microalgas apontam para uma correlação negativa entre a concentração do pigmento e a intensidade de energia incidente, situação caracterizada pelo considerável teor de pigmentos acessórios (ficobilinas), contudo deficitária quantidade de centros de reação, responsáveis pela transdução da energia luminosa em química, e outros componentes fotossintéticos (BEALE, 1993).

Em termos de ácidos graxos, os polissacarídeos insaturados e o ômega-3, estão entre as substâncias mais requisitadas comercialmente, e cabíveis de síntese por algas como *Pavlova lutheri*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis*, *Oculata*, *Rhodomonas salina* e *Tetraselmis uecica* (GANGL et al., 2015). Entretanto, salienta-se o interesse na produção em grande escala dos biocombustíveis (SEVERES et al., 2017).

3.1.1 Energia Luminosa

De certa forma, a força motriz que rege as reações fotoquímicas envolvidas na fotossíntese é a energia luminosa e por este motivo, distintas fontes (KIM et al., 2015; LEE; PALSSON, 1994; MOOIJ et al., 2016), intensidades (MOOIJ et al., 2016; SÁNCHEZ et al., 2008) e fotoperíodos de luz têm sido testados (LIAO et al., 2014; VEJRAZKA et al., 2013) com o propósito de evitar a fotoinibição pelo excesso de irradiação e de oxigênio molecular; e otimizar a taxa de crescimento microbiológico (DARKO et al., 2016) e de síntese de bioprodutos de alto valor (BAER et al., 2016; KIM et al., 2015).

A fonte de energia luminosa compreende basicamente a luz natural e artificial (SCHULZE et al., 2014). A luz artificial fluorescente é bastante empregada em substituição à luz solar, contudo não representa fielmente o espectro visível, de modo a promover alterações no processo fotossintético natural (DARKO et al., 2016). Neste contexto, as lâmpadas de LED se destacam por emitir faixas espectrais estreitas essenciais à fotossíntese. Ainda, acredita-se que além da biomassa, outros compostos metabólitos podem ser modificados a partir desta emissão de energia eletromagnética específica (DARKO et al., 2016; GLEMSER et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Assim, os cultivos de microalgas com energia luminosa em diferentes comprimentos de onda por meio de lâmpadas de diodos emissores de luz ou LEDs de distintas cores, têm despertado o interesse da comunidade científica (ATTA et al., 2013; CHEN et al., 2010; KHALILI et al., 2015; KIM et al., 2015; MOOIJ et al., 2016; WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016; SEVERES et al., 2017). Neste contexto, a *Spirulina platensis* (procarionte) cultivada por 5 dias em diferentes espectros de luz (branco, vermelho, amarelo, verde e azul) e intensidades ($0 - 3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mostrou concentração mínima de biomassa quando cultivada na luz azul, independente da intensidade, e maior concentração de biomassa ($0,45 \text{ g L}^{-1}$), clorofila (8 mg L^{-1}) e ficobilina ($0,08 \text{ g L}^{-1}$), quando cultivada na luz vermelha com intensidade máxima (CHEN et al., 2010).

A produtividade algal em termos de biomassa ou de biopigmentos é intrínseca à espécie em questão, e por vezes inerente à fonte de luz. As microalgas *Chlamydomonas Reinhardtii*, *Galdieria sulphuraria* e *Porphyridium purpureum*, foram cultivadas em distintas combinações do espectro eletromagnético visível, e cada qual apresentou respostas ótimas de produtividade e de produção de ficobilinas em comprimentos de onda específicos. A *Chlamydomonas Reinhardtii* mostrou maior produtividade ($252,2 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) quando cultivada

com 80% de luz vermelha, acrescida de 10% de luz verde e 10% de luz azul. Diferente da *Galdieria sulphuraria* que apresentou maior produtividade ($304,2 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) com 100% de luz vermelha e maior produção de ficobilinas ($4,99 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) com 60% de luz vermelha acrescida com 40% de luz azul. Já a *Porphyridium purpureum* apresentou tanto a máxima produtividade ($311,6 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$) quanto à máxima produção de ficobilinas ($16,93 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$), quando cultivada em 40% de luz vermelha acrescida com 40% de luz verde e 20% de luz azul (BAER et al., 2016).

O cultivo da *Gracilaria tikvahiae* também foi investigado em diferentes fontes de luz ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): fluorescente; vermelho; verde; azul; 50:50% de vermelho e verde; 50:50% de vermelho e azul; 50:50% de verde e azul; e vermelho, verde e azul nas proporções 40:40:20%, 40:20:40% e 20:40:40% (KIM et al., 2015). Estatisticamente, o ensaio realizado com “50:50% de luz vermelha e azul” promoveu a máxima produção de carotenoides ($\sim 0,25 \text{ mg g}^{-1}$) e de clorofila ($\sim 1,75 \text{ mg g}^{-1}$), e a mínima taxa de crescimento específico ($\sim 6,2\% \text{ d}^{-1}$). Já a máxima produção de ficoeretrina foi obtida com 100% de luz azul ($\sim 10 \text{ mg g}^{-1}$), e quanto à produção de ficocianina foi estatisticamente igual segundo todas as fontes de luz (KIM et al., 2015).

A identificação de carotenoides como biomarcadores para classificar linhagens de microalgas desconhecidas com base em seus perfis de pigmentos foi abordada por Paliwal et al. (2016), que segregaram 57 espécies de microalgas a partir de sua composição em carotenoides. Na ocasião, *Acutodesmus dimorphus* CCNM 1045 [*T. Dimorphus* (Winne; Hallan, 2015)] e *Ankistrodesmus* sp. CCNM 1031, por exemplo, cultivadas em luz fluorescente na intensidade de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (12:12h) apresentaram valores de astaxantina de $0,07 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,98 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$, e de β -caroteno de $0,32 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,09 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. Minhas et al. (2016) analisaram 22 microalgas quanto ao potencial de síntese de carotenoides, em cultivos sob $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (fluorescente) com fotoperíodo de 16:08 h, e determinaram os maiores valores de astaxantina ($1,54 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,62 \text{ mg g}^{-1}$) nos cultivos das microalgas *Scenedesmus bijugus* [*T. obliquos* (Winne; Hallan, 2015)] e *Coelastrella* sp (V3), respectivamente.

O gênero de microalga *Scenedesmus* sp. têm sido investigado quanto ao seu potencial de produção de carotenoides (PŘIBYL et al., 2015). Quando cultivada em fotobiorreator tubular fechado *indoor*, irradiado PAR na intensidade de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e com borbulhamento por ar enriquecido com 2% de CO_2 , a *Scenedesmus* sp. apresentou taxa máxima de crescimento específico de $2,695 \pm 0,014 \text{ d}^{-1}$, concentração de biomassa em peso

seco de 12 g L^{-1} e produção de carotenoides totais (CT) (após 14 dias de cultivo) de $19,01 \pm 1,45 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ou $2,08 \pm 0,03\%$ em peso seco (PŘIBYL et al., 2015). Adicionalmente, o crescimento celular da *Scenedesmus* sp. se mostrou tolerante a variações de temperatura, de 30 a 40°C, não sendo evidenciado diferença estatística no crescimento máximo observado entre as temperaturas (PŘIBYL et al., 2015).

A microalga *Chlorella* sp. cultivada por 20 dias em diferentes intensidades e fontes de luz (100% LED branco, 100% vermelho e 50:50% de vermelho e azul), obteve produção máxima de biomassa quando sob a luz vermelha com azul na intensidade de 500 lux, e máxima produção de lipídios quando cultivada sob a luz vermelha na intensidade de 220 lux (SEVERES et al., 2017). *Chlorella vulgaris* cultivada em fotobiorreatores alimentados com diferentes fontes de luz, natural (380-760 nm), fluorescente (380-760 nm), vermelha (660 nm) e azul (460 nm), com a intensidade de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, apresentou a maior biomassa em peso seco com a fonte de luz fluorescente ($1,95 \text{ g L}^{-1}$), seguida da luz natural ($\sim 1,7 \text{ g L}^{-1}$), vermelha ($\sim 1,25 \text{ g L}^{-1}$) e azul ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) (KHALILI et al., 2015).

Em termos de intensidade luminosa, a *C. vulgaris* cultivada nas intensidades de irradiação de 50, 80 e $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e sob o fotoperíodo de 16h:08h, apresentou crescimento satisfatório quando a irradiação foi de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A intensidade $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi insuficiente ao crescimento celular, e $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ promoveu a fotoinibição da microalga (KHALILI et al., 2015). A microalga *Porphyridium cruentum* desenvolveu crescimento ótimo com a intensidade de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e inibição de crescimento sob intensidade de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (YOU; BARNETT, 2004). Enquanto a *Pseudoneochloris marina* cultivada em luz fluorescente com intensidade variável de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $364 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (24:00 h) e temperatura de 20°C a 36°C, apresentou maior síntese de carotenoides ($3,77 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$) com $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 20°C (GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019).

Entretanto, a observação do fenômeno de fotoinibição é dependente de particularidades da microalga e de condições do cultivo. A microalga *Ankistrodesmus falcatus* apresentou aumento da síntese de carotenoides com a elevação da intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($2,94 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$) para $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($3,12 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$) e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($4,23 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$), em cultivos da microalga com luz fluorescente e fotoperíodo 12:12 h (GEORGE et al., 2014). Mesma tendência observada no cultivo da *Tetraselmis* sp., em que foram avaliados os efeitos dos fatores intensidade luminosa ($84 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $133 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $183 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), pH (6, 7 e 8) e salinidade (20, 30 e 40), sendo observada maior síntese de

carotenoides de $0,042 \text{ mg g}^{-1}$ sob as condições de iluminação contínua em $183 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pH de 7 e salinidade de 40 (DAMMAK et al., 2018). Enquanto a *Chlorella vulgaris* quando cultivada em luz azul nas intensidades de 100, 200 e $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16h:08 h, apresentou maior concentração de biomassa ($2,3 \text{ g L}^{-1}$) na intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. E uma concentração menor ($0,817 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida sob indícios de fotoinibição com $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ATTA et al., 2013).

Além da possibilidade de ocorrência do fenômeno de fotoinibição (LIAO et al., 2014; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; OOMS et al., 2016), a manutenção de uma cultura de microalgas sob condições elevadas de irradiação promove a absorção excessiva de fótons acima da sua capacidade de transdução em energia química, os quais são perdidos na forma de calor (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012; MOOIJ et al., 2016). A alteração a nível molecular nos centros de reação fotossintéticos, com o propósito de reduzir o número de unidades absorvedoras de fótons, e assim minimizar a quantidade de luz captada, foi desenvolvida, mas sem sucesso diante da complexidade metabólica envolvida (MOOIJ et al., 2016).

A redução da perda de energia luminosa na forma de calor pode ocorrer pela otimização da fonte de luz, e sua mensuração pode ser realizada em termos de Eficiência de Conversão Energética (ECE) ou Eficiência de Conversão Fotossintética (PCE - *Photo Conversion Efficiency*). Ao se comparar distintas fontes de energia luminosa (LED) com intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii*, foram calculados os valores de ECE (%) para as seguintes configurações de luz: 90:10% de região espectral vermelha e azul (14,78%); 100% vermelha (12,24%); 80:20% de vermelha e azul (10,97%); 100% azul (6,25%); 100% branca (5,02%); 90:10% azul e vermelha (4,8%); e 100% verde (3,85%) (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016). A absorção efetiva de fótons ocorre já nos primeiros 2 mm de espessura de um fotobiorreator e o grau de absorção de fótons pela biomassa é dependente do comprimento de onda, conforme aponta pesquisa desenvolvida com *Chlamydomonas reinhardtii*, em que as fontes de luz vermelha e azul são preferencialmente absorvidas quando comparadas à luz verde (MOOIJ et al., 2016).

Além do tipo de fonte, o aumento da intensidade luminosa é outro fator que pode corroborar com a redução da ECE. Mais especificadamente, o cultivo da espécie *Chlamydomonas reinhardtii* sob a configuração de luz “90:10% de região espectral vermelha e azul” nas intensidades de 25, 50, 100, 150 e $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, promoveu ECE respectivos de 15,60%; 12,24%; 11,50%; 7,06% e 6,74% (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016).

Contudo, ao se trabalhar com o mesmo intervalo de intensidades ($25\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mas com uma fonte de luz branca (LED branco quente), a ECE apresenta variação muito baixa, com valor médio de $8,21\% \pm 1,33$ (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016).

Entretanto, em cultivos com elevada densidade de células, a produtividade de biomassa é inversamente proporcional à absorção específica de luz pelas células, dado que a alta velocidade de saturação do fotossistema promove desperdício de energia luminosa, fato que conduz a um menor rendimento de produção de biomassa (MOOIJ et al., 2016). Isso fica evidente ao se comparar os resultados de absorção máxima de fótons por unidade de biomassa com o rendimento de produção de biomassa em cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*. Neste caso, os valores de absorção máxima de fótons foram de $0,015 \text{ mol mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em luz azul (458 nm), e $0,005 \text{ mol mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em luz amarela (596 nm). Por outro lado, os valores de produtividade de biomassa foram de $54 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ na luz amarela (na intensidade de $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sendo 97:03% amarela e azul); e de $29 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ na luz puramente azul ou vermelha, ambas com $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (MOOIJ et al., 2016).

Elevada intensidade luminosa geralmente promove alta concentração de biomassa. A *Spirulina platensis* cultivada com energia luminosa promovida por lâmpadas fluorescentes, foi avaliada quanto a sua produtividade em duas intensidades de luz: a primeira em torno de 2.000 a 3.000 lux, e a segunda de 4.800 a 6.000 lux. Neste caso, o aumento da intensidade promoveu aumento significativo ($\alpha = 0,05$) da biomassa e dos pigmentos C-ficocianina, C-ficoeritrina e aloficocianina, contudo, também promoveu redução dos pigmentos clorofila e carotenoides (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

Conforme já discutido, o excesso de irradiação pode não ser totalmente absorvido pelas microalgas ou mesmo causar a fotoinibição (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; OOMS et al., 2016). Um método de cultivo que almeja reduzir este desperdício de energia, e conseqüentemente aumentar a eficiência do processo, emprega alterações no fotoperíodo e uso da técnica *flashing*, em que o primeiro prevê mudanças em termos de horas no ciclo de luz/escuro e o segundo propõe alterações na frequência do ciclo luz/escuro (LIAO et al., 2014; VEJRAZKA et al., 2013). O ciclo luz/escuro é dependente da concentração de biomassa no sistema, em que o aumento na concentração de biomassa promove aumento do período escuro ou área escura e, portanto, uma diminuição no período de luz ou ciclo de trabalho. Isso pode afetar a produtividade, bem como o crescimento de algas (VEJRAZKA et al., 2013); e aumentar a mortalidade das células contidas nas regiões subjacentes, sem acesso satisfatório a irradiação, de modo a formar zonas mortas (MOOIJ et al., 2016).

O cultivo da *Ankistrodesmus falcatus* na intensidade de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em diferentes condições de fotoperíodos, exemplifica a identificação da fotoinibição a partir do excesso de horas de irradiação de energia luminosa, em que foram determinadas as seguintes concentrações de carotenoides: $0,35 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$ (00:24 h); $1,99 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$ (06:18 h); $4,21 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$ (12:12 h); $2,8 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (18:06 h) e $2,51 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$ (24:00 h) (GEORGE et al., 2014).

A definição do *flashing* e do fotoperíodo está condicionada à espécie de microrganismo e ao produto final de interesse. O cultivo da microalga *Acutodesmus obliquus* em fotobiorreator com os espectros vermelho e azul, apresentou após 18 dias de cultivo um crescimento celular e composição de ácidos graxos mais elevados quando aplicado à técnica do *flashing* (CHOI et al., 2015). Em termos de fotoperíodo, as microalgas *Spirulina sp.* e *Synechococcus nidulans* submetidas aos fotoperíodos de 24:00 h e 12h:12 h e luminosidade constante de 3.200 lux, apresentaram concentração máxima de biomassa com o fotoperíodo de 24 horas de iluminação. Contudo, ambas apresentaram concentração máxima de ficobilina, pigmento de interesse, durante a experimentação com fotoperíodo de 12:12 h. No caso, após 10 dias de cultivo da *Spirulina sp.*, a concentração de ficobilina com 24 horas de iluminação foi de $50,80 \pm 0,06 \text{ mg g}^{-1}$, inferior e estatisticamente diferente ($\alpha = 0,05$) da concentração medida com 12:12 h de $74,67 \pm 1,92 \text{ mg g}^{-1}$ (PRATES, 2015).

A mesma microalga, *Spirulina sp.*, cultivada por 10 dias com o fotoperíodo de 12:6:6 h (luz fluorescente: LED verde: escuro), promoveu ao final do tempo de cultivo a concentração de ficobilina de $126,39 \text{ mg g}^{-1}$. Esta considerável concentração foi 2,73 vezes superior ao ensaio controle de 12:12 h (luz fluorescente: escuro) (PRATES, 2015).

Em termos de cultivos com luz natural, a *Muriellopsis sp.* cultivada em fotobiorreator *outdoor*, apresentou as concentrações de biomassa e de luteína correlacionadas positivamente com o índice de irradiação solar médio (DEL CAMPO et al., 2001), sendo de 0,87 e 0,88, respectivamente (BLANCO et al., 2007). Pesquisas desenvolvidas na Espanha determinaram produções de luteína de $63,6 \pm 4,9$; $173,8 \pm 7,7$ e $180,2 \pm 9,0 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, para valores de irradiação solar de 11,1, 21,9 e 25,3 $\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; e produções de biomassa de $14,6 \pm 0,7$; $40,6 \pm 2,6$ e $40,8 \pm 1,6 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectivamente às radiações supracitadas com cultivo de *Muriellopsis sp.* em sistema fechado e *outdoor* (DEL CAMPO et al., 2001).

Quando cultivada durante a primavera em fotobiorreator aberto e *outdoor*, a produção de luteína de $72,6 \pm 12,3 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e biomassa seca de $12,9 \pm 1,7 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ocorreram

durante os níveis de irradiação média de $22,3 \pm 2,6 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (BLANCO et al., 2007). Em termos máximos e mínimos, isso corresponde à produtividade máxima de luteína e biomassa de $100 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e $20 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, para o índice de irradiação de $28 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, e produtividade mínima para os mesmos compostos, de luteína e biomassa de $30 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e $8 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, para um índice de irradiação de $8 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (BLANCO et al., 2007).

O monitoramento dos parâmetros de radiação, clorofila, luteína e biomassa, conduzido no mês de maio na Espanha com culturas de *Muriellopsis* sp., mostrou radiação máxima de $1.900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ às 14:00 h; concentração máxima de clorofila de 3,9% (peso seco) às 10:00 h; máximo de luteína $5,7 \text{ mg g}^{-1}$ (peso seco) às 12:00 h; e biomassa (peso seco) máxima de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ às 18:00 h (DEL CAMPO et al., 2001). Estudo similar de variação diária da biomassa e da luteína com a radiação fotossintética ativa mostrou radiação máxima de $1.240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ entre às 14:00 h e 16:00 h, e densidade de células de $0,77 \text{ g L}^{-1}$ próximo das 20:00 h (BLANCO et al., 2007), padrão de comportamento semelhante ao encontrado por Del Campo et al., (2001). Contudo, quanto à produção de luteína, Blanco et al. (2007) determinaram concentração máxima próximo das 17:00 h (5 mg g^{-1} em peso seco) diferente de Del Campo et al. (2001) que a determinaram a produção máxima da substância as 12:00 h.

3.1.2 Fonte de Carbono

Além das condições de operação da energia luminosa, a disponibilidade do dióxido de carbono em sistemas de cultivo de microalgas fotoautotróficas constitui um fator essencial para uma elevada produtividade (LEE; PALSSON, 1994; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004; OOMS et al., 2016). A assimilação do dióxido de carbono depende do seu estado, se dissociado como HCO_3^- e CO_3^{2-} , ou não dissociado, H_2CO_3 e CO_2 (LEE; PALSSON, 1994), e da espécie de microalga.

A determinação do teor ótimo de carbono corrobora com o aumento da produtividade, em estudo com a *Micractinium inermum* cultivada com ar enriquecido com 5% de CO_2 (v/v), que teve produtividade máxima 10,4 vezes superior se comparada à produtividade máxima atingida com o cultivo da espécie alimentado apenas com ar atmosférico concentrado em 0,04% de CO_2 (SMITH et al., 2015). Estudo desenvolvido com *Chlorella vulgaris* mostrou que a concentração de 2,5% (v/v) de CO_2 foi satisfatória ao desenvolvimento da microalga, e concentrações superiores, 5,0% e 9,5% (v/v), do elemento apresentaram baixo efeito na taxa de crescimento (FU et al., 2012).

A fonte de carbono assimilável é bastante particular da espécie de microalga em questão. A microalga *Micractinium pusillum* cultivada sob sistema autotrófico e mixotrófico mostrou maior taxa de crescimento médio (1º, 2º e 3º dias de cultivo) diante da fonte de 10 mM de carbono orgânico na forma de glicose ($0,865 \text{ d}^{-1}$) e menor com a fonte inorgânica ($0,2 \text{ d}^{-1}$). Contudo, esta espécie de microalga cultivada em distintas concentrações de acetato de sódio (5, 10 e 20 mM) apresentou taxas de crescimento elevadas nos três primeiros dias, e muito baixa ou nula nos dias subsequentes de cultivo (BOUARAB; DAUTA; LOUDIKI, 2004).

O mesmo gênero de microalga, *Micractinium inermum*, cultivado por 14 dias em sistema autotrófico e mixotrófico alimentado com $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de acetato de sódio ou de glicose, apresentou maior taxa de crescimento com o substrato glicose ($2,46 \text{ d}^{-1}$), seguido do acetato de sódio ($2,18 \text{ d}^{-1}$) e autotroficamente com CO_2 ($0,38 \text{ d}^{-1}$) (SMITH et al., 2015). Em termos de produtividade máxima da *Micractinium inermum*, foram mensurados valores de $373,37 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $351,50 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $10,55 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, com mixotrófico (glicose), mixotrófico (acetato de sódio) e autotrófico (SMITH et al., 2015).

A fonte de carbono pode promover alterações na concentração de pigmentos e no tempo de percurso da fase de crescimento exponencial. *Micractinium inermum* cultivada autotroficamente desenvolveu crescimento exponencial ao longo de 21 dias, o que representou uma concentração média de clorofila de 2,53% (peso seco). Já o cultivo mixotrófico com acetato de sódio promoveu um percentual de clorofila de 1,89% (peso seco) ao longo de um crescimento exponencial de 2 dias (SMITH et al., 2015). Entretanto, se cultivada em sistema mixotrófico alimentado com glicose, o percentual do pigmento foi de 0,28% após a fase exponencial de 2 dias de cultivo (SMITH et al., 2015).

3.1.3 Meios de Cultura

Os inúmeros meios de cultura e respectivas composições estão disponíveis no mercado e são de fácil acesso. Contribuem para a diversidade de meios de cultura os assim denominados: BG-11, BG-11(N), Bold 3N, Bristol, Chu's, Euglena, Malt, Volvox, Waris, WC, entre outros (UTEX, 2019). Como as microalgas respondem de forma diferente às condições ambientais, há distintas investigações quanto aos efeitos causados na produtividade ou síntese de compostos diante do cultivo em diferentes meios nutrientes e de alterações na composição de meios de cultura largamente utilizados (BLANCO et al., 2007; FU et al., 2012; KHALILI et al., 2015). Neste contexto, a microalga *Ankistrodesmus falcatus* sintetizou

concentrações distintas de carotenoides conforme o meio de cultivo utilizado: BG-11 ($4,02 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$), CHU 10 ($2,31 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$), Zarrouk ($2,27 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$) e BBM ($1,79 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$) (GEORGE et al., 2014).

As alterações mais habituais na constituição do meio de cultivo envolvem a variação das concentrações de nitrogênio. Neste contexto, a adição de $0,132 \text{ g L}^{-1}$ de ureia como fonte de nitrogênio em cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11, promoveu maior estabilidade do pH e maior concentração de células em peso seco ($2,1 \text{ g L}^{-1}$) durante 8 dias de cultivo, se comparado a outras fontes de nitrogênio: nitrato de sódio, cloreto de amônio e carbonato de amônio (KHALILI et al., 2015).

Ainda em termos de fonte de nitrogênio, a *Spirulina platensis* foi cultivada em meio enriquecido com duas fontes distintas de nitrogênio, KNO_3 ou ureia ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), e sob duas faixas de intensidade luminosa, 2.000 a 3.000 lux e 4.800 a 6.000 lux. Os autores constataram maior produtividade de biomassa e síntese de pigmentos carotenoides (2.000 a 3.000 lux), C-ficocianina, aloficocianina e C-ficoeritrina (4.800 a 6.000 lux), estatisticamente superior ($\alpha = 0,05$) no cultivo com presença de ureia (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012).

Além da alteração da concentração de um elemento específico, é possível realizar alteração de todos os elementos que constituem o meio de cultivo por técnicas de planejamento e otimização, com o propósito de maximizar o bioproduto de interesse. A otimização do meio F/2 auxiliada pelo planejamento experimental Plackett-Burman (PB), promoveu aumento em 26% da síntese de β -caroteno pela microalga *Nannochloropsis oculata* ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 24:00 h) de $0,1117 \text{ mg g}^{-1}$ (F/2) para $0,141 \text{ mg g}^{-1}$ (F/2 ótimo) (EL-SHEEKH et al., 2016).

O cultivo da microalga *Muriellopsis* sp. em meio Arnon et al., (1974), modificado pela adição de 20 mM NaNO_3 , 4 mM K_2HPO_4 e 2 mM NaCl foi avaliado quanto à produção de carotenoides, e mostrou que 1% da biomassa seca era composta por carotenoides, sendo 50% de luteína, 16% de β -caroteno, 17% de *neoxanthin* e 17% de *violaxanthin* (BLANCO et al., 2007). Os mesmos autores, ao avaliarem a influência na produtividade de luteína e concentração de biomassa decorrente da variação da concentração do hidróxido de sódio (2 – 200 mM), constataram um aumento da produtividade de luteína em 40% ao aumentar a concentração padrão do meio de 2 mM de NaCl para 75 mM de NaCl ; e ausência de

correlação positiva significativa entre a concentração de biomassa e a concentração do sal (BLANCO et al., 2007).

A ausência ou escassez de nutrientes também tem gerado resultados interessantes em cultivos de microalgas, sendo considerada uma forma de cultivo sobre estresse (MARKOU; NERANTZIS, 2013). A *Chlorella zofingiensis* cultivada em meio M-8 modificado em sistema fotoautotrófico, alimentado com luz visível na intensidade de $245 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e em condições de depleção de nitrogênio, produziu de 0,8 a $4,5 \text{ mg g}^{-1}$ de carotenoides totais (MULDERS et al., 2014).

3.1.4 Cenário Brasileiro

O governo brasileiro tem investido em pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias de exploração de microalgas, especialmente para a obtenção de biocombustíveis e seus derivados (DANTAS, 2013) e outros bioprodutos (COLLARES, 2016). A soma dos investimentos resultou em 26 milhões de reais nos últimos 8 anos, e segundo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC) este valor tende a aumentar devido a demanda brasileira por biocombustíveis, aliada aos fatores ambientais que favorecem o cultivo de microalgas em território brasileiro (COLLARES, 2016).

Para o desenvolvimento de pesquisas e formulação de produtos biotecnológicos de origem algal, se faz necessário um banco de cepas livre de contaminações. Atualmente, o Brasil possui este material em distintas instituições de ensino e pesquisa, com destaque para o Banco de Microrganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K), do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), que fundado em 1975 conta com mais de 200 cepas de microalgas marinhas e estuarinas, e uma dezena de cepas de água doce (IOUSP, 2017). Além da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que conta com 8 cepas de microalgas importadas do banco de cepas de *Provasoli Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton* (CCMP – USA), para a manutenção de suas pesquisas com moluscos marinhos, e desde 2003 com a implantação do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), a instituição tem desenvolvido pesquisas científicas e tecnológicas com vistas à produção de biocombustíveis e bioprodutos (UFSC, 2017).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), mais especificadamente a Embrapa Agroenergia, iniciou em 2012 a criação de um banco de cepas oriundas de distintitos biomas brasileiros, com o objetivo de fomentar suas pesquisas com melhoramento genético de

microalgas e aproveitamento de bioprodutos no modelo de biorrefinaria (BRASIL; GARCIA, 2016). Outra linha de pesquisa em andamento no Brasil pela Fiocruz visa à obtenção de compostos de origem algal com poder de inibição do desenvolvimento do vírus da gripe, influenza A. Neste contexto, a partir da investigação de 40 estirpes foi verificado que três delas apresentaram ação contra o vírus da gripe (CHIES, 2016).

Comercialmente, o extrato de microalgas integra a formulação de produtos da indústria de cosméticos, higiene pessoal e nutrição humana e animal (BRASIL; GARCIA, 2016). Outras pesquisas em desenvolvimento remetem ao consórcio entre empreendimentos que utilizam (1) resíduos agrícolas no cultivo de microalgas; (2) produtos biotecnológicos de origem algal como a biomassa; e (3) a capacidade de sequestro de carbono devido ao cultivo de microalgas (DANTAS, 2013).

A iniciativa privada no mercado de microalgas ainda é incipiente no Brasil. Uma parceria *Joint Venture* entre a Bunge Brasil e a TerraVia (Califórnia – EUA), culminou em uma unidade anexa a Bunge Moema, para a produção de óleos renováveis, como o AlgaPrime™ DHA, ou ácido docosahexaenóico, que trata-se de um ácido graxo ômega-3 de cadeia longa fundamental para a nutrição humana e animal (BUNGE, 2016). Adicionalmente, entre outros produtos a Fazenda Tamanduá situada na Paraíba, comercializa *Spirulina* sp., em pó e em cápsula, como suplemento alimentar humano rico em proteínas e com ação antioxidante (FAZENDA TAMANDUÁ, 2017).

3.2 SÍNTESE DO CAPÍTULO

Pesquisas em busca de novas fontes de biocombustíveis impulsionaram estudos com microalgas, as quais podem sintetizar além de moléculas com caráter combustível, bioprodutos de alto valor agregado, como a astaxantina, β -caroteno, luteína, zeaxantina, entre outros com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e na área da saúde. Industrialmente, as microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Dunaliella salina* são dominantes em cultivos para a extração de astaxantina e β -caroteno. Enquanto a *Spirulina* sp. e a *Chlorella* sp. são preferenciais para a obtenção de ficobilinas e clorofilas, respectivamente. Isso tem incentivado a comunidade científica a investigar outros gêneros e espécies de microalgas com potencial para atender a demanda industrial por estes bioprodutos. Os avanços científicos nesta área revelaram várias microalgas como a *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus bijugus* e *Coccomyxa onubensis* com habilidade de síntese de carotenoides totais

(4,23 mg L⁻¹), astaxantina (1,54 mg g⁻¹) e β-caroteno (2,13 mg g⁻¹), respectivamente. As pesquisas também mostraram que cada espécie de microalga responde metabolicamente de modo particular as condições de cultivo. Fato que reforça a importância de investigações em espécies de microalgas inexploradas quanto a sua resposta às condições de cultivo em termos de energia luminosa, fotoperíodo, pH, salinidade, temperatura, concentração de nutrientes, entre outros. Portanto, nesta pesquisa diferentes microalgas foram investigadas quanto às respectivas capacidades de síntese de carotenoides, cuja produção foi maximizada a partir da definição das condições de cultivo via métodos de planejamento experimental e otimização de processos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICROALGAS, MANUTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO

A presente pesquisa esta vinculada ao Projeto CNPq n° 400771/2014-4, intitulado por *Cultivo de algas em um novo foto-bioreator para o sequestro de dióxido de carbono a partir de diferentes tipos de gases residuais e síntese de produtos de alto valor*. O Projeto é coordenado pelo professor Doutor Aparecido Nivaldo Módenes, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Desta forma, o isolamento das microalgas do gênero *Tetradasmus* sp., *Micractinium* sp., espécies *Poteroochromonas malhamensis* e *Chlorella vulgaris*.; e as técnicas para sua manutenção; foram desenvolvidos durante etapas do Projeto CNPq n° 400771/2014-4 que precederam o presente estudo, e podem ser consultadas em Hinterholz et al. (2017) e Schuelter et al. (2019).

Previamente aos cultivos em fotobiorreator, na fase de aclimatação, as microalgas foram cultivadas em meio BG-11 (UTEX, 2019) e temperatura ambiente, por cerca de 5 dias. O cultivo foi desenvolvido no interior de frascos erlenmeyer (com capacidade volumétrica de 250 mL), com a extremidade superior vedada por plástico filme (PARAFILM®). No período de aclimatação foram mantidas: agitação constantemente (65 rpm), energia luminosa na região espectral visível ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e fotoperíodo de 24:00 h (luz:escuro).

4.2 PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES

BG-11 líquido

Para compor o meio BG-11, foram preparadas as soluções estoque apresentadas nas Tabelas 4.2-1 e 4.2-2. A preparação do meio de cultivo, compreendeu a adição ordenada de 10 mL L^{-1} de cada solução estoque de 1 a 8 (Tabela 4.2-1), e 1 mL L^{-1} da solução estoque 9 (Tabela 4.2-2), em água destilada e deionizada. A solução final foi esterilizada em autoclave vertical (Primatec) a 1 atm por 20 min., e armazenada em refrigerador (UTEX, 2019).

Tabela 4.2-1 - Composição química do meio de cultivo BG-11.

Ordem	Componente	Quantidade (mL L ⁻¹)	Concentração	
			da Solução Estoque (g 200 mL ⁻¹)	Concentração Final (mM)
1	NaNO ₃	10	30,0	17,6
2	K ₂ HPO ₄	10	0,8	0,23
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	1,5	0,3
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	0,72	0,24
5	Ác. cítrico·H ₂ O	10	0,12	3,1·10 ⁻²
6	Citrato de Ferro e Amônio	10	0,12	2,1·10 ⁻²
7	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10	0,02	2,7·10 ⁻³
8	Na ₂ CO ₃	10	0,4	0,19
9	Solução de metais traço (Tabela 4.2-2)	1	-	-

Fonte: UTEX (2019).

Tabela 4.2-2 - Metais traço presentes no meio BG-11

Ordem	Componente	Concentração (g L ⁻¹)	Concentração Final (mM)
1	H ₃ BO ₃ (Baker 0084)	2,86	46,0
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O (Baker 2540)	1,81	9,0
3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma Z 0251)	0,22	0,77
4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (J.T. Baker 3764)	0,39	1,6
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O (MCIB 3M11)	7,9 10 ⁻²	0,3
6	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (Mallinckroft 4544)	4,94 10 ⁻²	0,17

Fonte: UTEX (2019).

BG-11 solidificado

Para a solidificação do meio de cultivo BG-11, paralelamente a solução descrita anteriormente (BG-11 líquido), uma solução de Agar (15 g L⁻¹) foi preparada e autoclavada (1 atm por 20 min.). Na solução de Agar foi adicionado 1 mL de solução esterilizada de tiosulfato de sódio penta-hidratado (248 g L⁻¹; 1 mM). Em capela de fluxo laminar, a solução contendo Agar e tiosulfato de sódio penta-hidratado foi misturada ao meio BG-11 líquido, ambos na faixa de temperatura de 45 a 50°C (UTEX, 2019). A mistura foi distribuída em placas *petri*, e após a sua solidificação, as placas *petri* foram fechadas, vedadas com plástico filme (PARAFILM®), e armazenadas em refrigerador.

BG-11-CNP

Foi preparado o meio BG-11 líquido, descrito anteriormente, e adicionado a este: 1,2 g L⁻¹ de glicose (SMITH et al., 2015); 0,40 g L⁻¹ NaNO₃ e 0,05 g L⁻¹ KH₂PO₄ (KHALILI

et al., 2015). A solução foi esterilizada em autoclave vertical (Primatec) a 1 atm por 20 min., e armazenada em refrigerador.

BBM

Para compor o meio BBM (basal bold meio), foram preparadas as soluções estoque apresentadas na Tabela 4.2-3. A solução final foi esterilizada em autoclave vertical (Primatec) a 1 atm por 20 min., e então armazenada em refrigerador.

Tabela 4.2-3 - Composição química do meio de cultivo BBM

Reagentes	Concentração Final (mg/L)	Solução Estoque (g/L)	Volume Adicionado (mL)
NaNO ₃	750	25,0	30
K ₂ HPO ₄	75	7,5	
KH ₂ PO ₄	175	17,5	10
NaHCO ₃	75	7,5	
CaCl ₂ .2H ₂ O	13	2,5	
MgSO ₄ .7H ₂ O	50	10,0	5
EDTA-Na ₂	50	25,0	
FeCl ₃ .6H ₂ O	4	2,0	
H ₃ BO ₃	4	2,0	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50	0,75	
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,24	0,12	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,24	0,12	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,06	0,03	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2	0,1	

Fonte: Nichols (1973).

Acetona 80%

Para cada 8 partes de acetona, foram adicionadas 2 partes de água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada previamente ao seu uso.

Solução Tampão de Fosfato de Potássio 0,1 M, pH 6,8

Foi preparado 25 mL de cada uma das soluções aquosas: K₂HPO₄ a (1 M) e KH₂PO₄ (1 M). O volume de 24,85 mL da solução K₂HPO₄ (1 M) foi misturado com 25 mL da solução KH₂PO₄ (1 M); e 400 mL de água destilada e deionizada. A solução foi completada para o volume de 500 mL com água destilada, e o pH da solução final foi verificado.

4.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

4.3.1 Biomassa

A concentração celular foi estimada pela Equação 2, obtida pela análise de regressão entre a biomassa e leitura da densidade óptica em 683 nm (DO_{683}) em espectrofotômetro (Spectrophotometer UV-1800/Shimadzu).

$$DO_{683} = 1,998 \text{ gL}^{-1} (R = 0,9966) \quad (2)$$

A biomassa foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico. Neste, foi medida a massa (M_0) do filtro *Whatman GF/C* (tamanho de poro 1,2 μm) em balança analítica (Shimadzu), após o seu armazenado em estufa a 80°C por 1 h, e dessecador por 20 min. O volume de 10 mL (de cultivo de microalga) foi filtrado, e o filtro (contendo a massa celular) foi secado em estufa por 24 h a 80°C, e teve sua massa (M_1) medida (SÁNCHEZ et al., 2008). A Equação 3 foi utilizada para estimar o valor de biomassa:

$$X = \frac{(M_1 - M_0)}{V} \quad (3)$$

Em que, X : biomassa (g L^{-1}); M_1 : massa do filtro contendo a massa celular após a etapa de secagem em estufa (g); M_0 : massa do filtro sem a massa celular (g); e V : volume de amostra filtrada (L). A biomassa foi fracionada em 6 diluições (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0), e cada diluição foi mensurada quanto à DO_{683} . As informações de concentração e absorvância foram correlacionadas na forma da Equação 2 (FU et al., 2012; KHALILI et al., 2015; WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016).

4.3.2 Taxa de Crescimento Específico

A taxa de crescimento específico (μ) (d^{-1}) foi estimada a partir da regressão dos dados da fase logarítmica de multiplicação celular, conforme Equação 4 (ATTA et al., 2013; HAN et al., 2015; SETYONINGRUM; NUR, 2015).

$$\mu = \frac{(\ln X_t - \ln X_0)}{t_x - t_0} \quad (4)$$

Em que: X_0 e X_t (g L^{-1}) representam, respectivamente, a concentração celular inicial e final do cultivo; e t_0 e t (d) representam, respectivamente, o tempo inicial e final do cultivo.

4.3.3 Produtividade

A produtividade (P) ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi estimada pela Equação 5.

$$P = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (5)$$

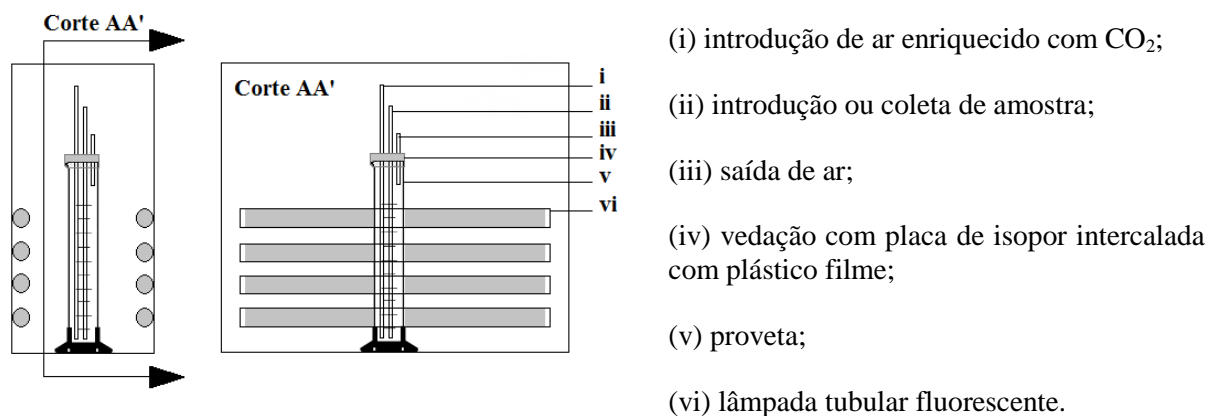
Em que: X_0 e X (g L^{-1}) representam, respectivamente, a concentração celular inicial e final do cultivo; e t_0 e t (d) representam, respectivamente, o tempo inicial e final do cultivo (HAN et al., 2015).

4.4 FOTOBIORREATOR

4.4.1 Fotobiorreator Tubular Vertical Irradiado por Luz Fluorescente

Os cultivos foram realizados em proveta de vidro com capacidade volumétrica de 250 mL. A parte superior da proveta foi vedada com uma placa de isopor intercalada com plástico filme (PARAFILM®), onde foram feitos três acessos: (1) um para a entrada do ar enriquecido com CO_2 ; (2) outro para a adição de meio de cultivo ou coleta de material; e (3) outro para a saída de gás. O transporte do ar enriquecido com CO_2 para o interior da proveta, ocorreu de forma descendente através de uma pipeta graduada (2 mL), e de modo ascensional no meio fluido contido na proveta. A proveta foi disposta entre dois conjuntos paralelos constituídos de quatro lâmpadas fluorescentes tubulares cada, cuja distância foi de 10 cm entre proveta e lâmpada. A Figura 4.4-1 ilustra o fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.

Figura 4.4-1 - Ilustração do fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente



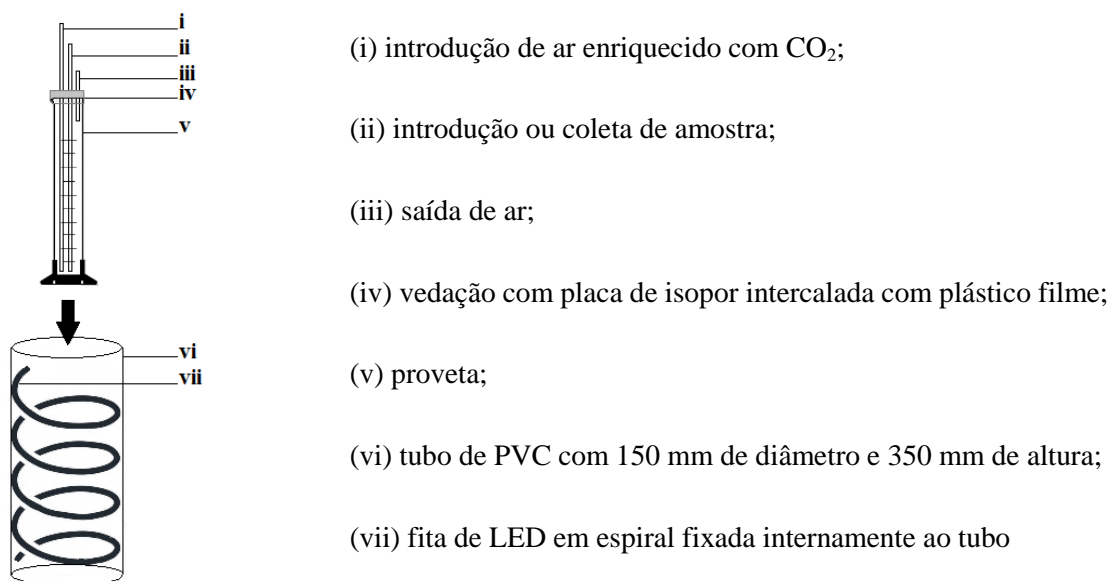
Fonte: O autor.

4.4.2 Fotobiorreator Tubular Vertical Irradiado por LED

O fotobiorreator foi constituído por uma proveta de vidro com capacidade volumétrica de 500 mL. A parte superior da proveta foi vedada com uma placa de isopor intercalada com plástico filme (PARAFILM®), onde foram feitos três acessos: (1) um para a entrada do ar enriquecido com CO₂; (2) outro para a adição de meio de cultivo ou coleta de material; e (3) outro para a saída de gás. O transporte do ar enriquecido com CO₂ para o interior da proveta, ocorreu de forma descendente através de uma pipeta graduada (2 mL) e de modo ascensional no meio fluido contido na proveta. A proveta foi introduzida no interior de uma tubulação de PVC, com 150 mm de diâmetro e 350 mm de altura. A Figura 4.4-2 apresenta um desenho ilustrativo do fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED.

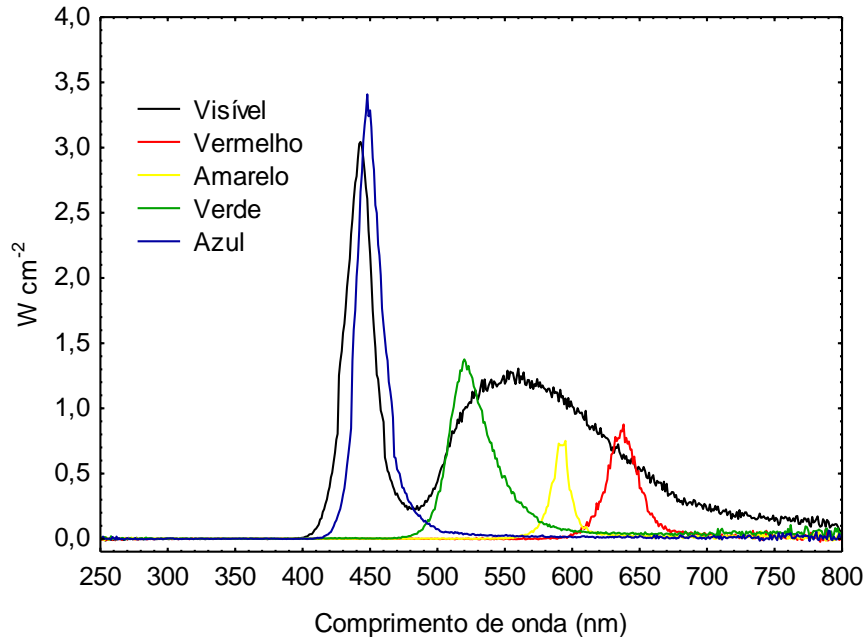
As fitas de lâmpadas de diodo (4,8 W m⁻¹, 12 V, Maxtel) foram dispostas internamente em espiral, ao longo da tubulação de PVC. Foi utilizado cerca de 1 m de fita de LEDs (60 lâmpadas de diodo) para cada região espectral. Na região espectral, em que 1 m de fita não foi suficiente para promover a intensidade desejada, foi adicionada uma metragem maior de fita de LED, até esta satisfazer a intensidade de trabalho. A intensidade foi ajustada por *dimmer* (controlador de intensidade). A Figura 4.4-3 apresenta os respectivos espectros de emissão das fitas de LED visível, vermelha, amarela, verde e azul usados neste trabalho, os quais foram obtidos usando o *spectrofluorimeter* (modelo LS 55, Perkin Elmer).

Figura 4.4-2 - Ilustração do fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED



Fonte: O autor.

Figura 4.4-3 - Espectros de emissão das fitas de LED visível, vermelha, amarela, verde e azul

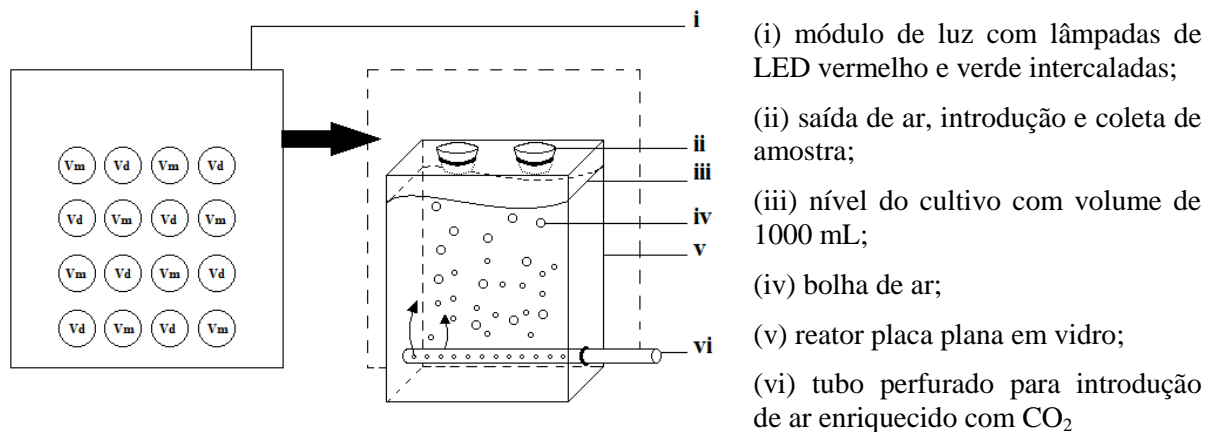


Fonte: O autor.

4.4.3 Fotobiorreator Placa Plana Irradiado por LED

O fotobiorreator placa plana com capacidade volumétrica de 1.000 mL foi construído em vidro (0,2 x 0,25 x 0,3 m). O ar enriquecido com CO₂ foi distribuído no fotobiorreator por uma mangueira flexível (3 mm de diâmetro interno, perfurada a cada 10 mm de extensão) situada no fundo do fotobiorreator. A introdução de meio de cultura ou inoculo, coleta e a saída de gás, foram realizados por meio de orifícios situados na parte superior do fotobiorreator. A Figura 4.4-4 apresenta uma ilustração do fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

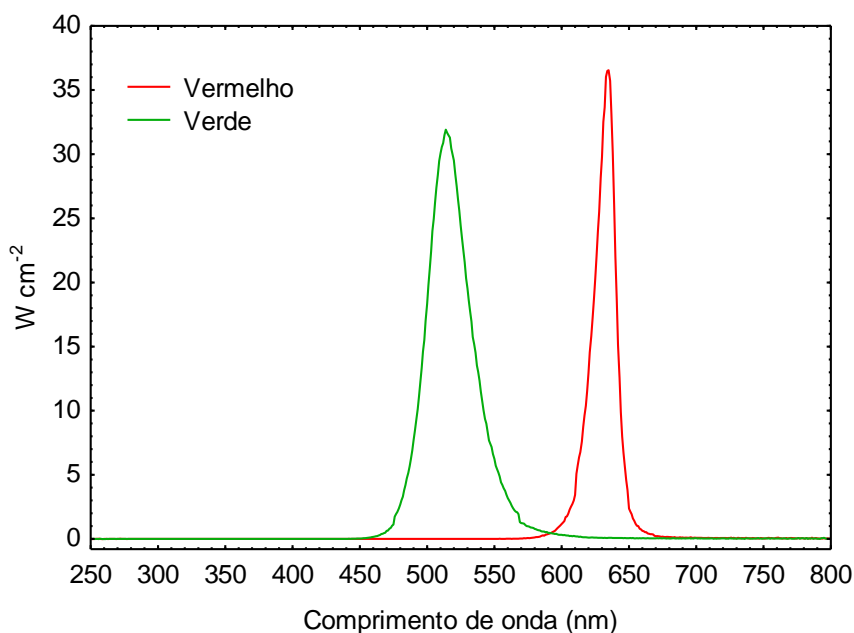
Figura 4.4-4 - Ilustração do fotobiorreator placa plana irradiado por LED



Fonte: O autor.

O fotobiorreator foi irradiado com lâmpadas de diodo (LED bulbo 7W – Ourolux) com intensidade de trabalho regulada com o número de lâmpadas ligadas. A distância entre a fonte de energia luminosa e o fotobiorreator foi de 5 cm. A Figura 4.4-5 apresenta os respectivos espectros de emissão das lâmpadas de LED vermelha e verde usados neste trabalho, os quais foram obtidos usando o *spectrofluorimeter* (modelo LS 55, Perkin Elmer).

Figura 4.4-5 - Espectros de emissão das lâmpadas de LED vermelha e verde



Fonte: O autor.

4.4.4 Operação e Monitoramento

Durante os cultivos em fotobiorreator, foi introduzida a vazão de 30 L h⁻¹ de ar concentrado de CO₂, suficiente o bastante para evitar a descarboxilação (LEE; PALSSON, 1994; MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004). O ar foi fornecido por meio de um compressor; e o CO₂, através de um cilindro de gás comprimido. O monitoramento da vazão de ar, e do porcentual de CO₂ presente, foi realizado respectivamente por: rotômetros e equipamento *Combustion Test Kit* (modelo 10-5033, Bacharach). O pH e a temperatura foram monitorados por meio de pHmetro (modelo mPA210, marca MS Tecnopon Instrumentação), e de um termômetro digital, respectivamente.

A iluminância foi medida por luxímetro (modelo ITLD 270 *Light Meter*, Luxímetro Instrutemp). A leitura de densidade óptica foi realizada por meio de espectrofotômetro (modelo V-1100D Spectrophotometer, Pró-Análise), sempre após o reabastecimento de água evaporada (PŘIBYL et al., 2015).

4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

4.5.1 Carotenoides Totais e Clorofilas

Para a mensuração do conteúdo de carotenoides totais (CT), clorofila *a* (*Chla*) e clorofila *b* (*Chlb*), o método adaptado de Wagner, Steinweg e Posten (2016), envolveu a centrifugação de 5 mL de cultivo microalgal a 3.000 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi congelado a -15°C por 24 h. Após o descongelamento da amostra, foi adicionado à mesma, 5 ml de solução de acetona (80%). A amostra celular em solução de acetona permaneceu por 20 min. em banho de ultrassom; e foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 min. O processo foi repetido até a descoloração da biomassa. O sobrenadante foi transferido para um recipiente protegido da luz, e mensurado quanto a absorvância nos comprimentos de onda de 470; 646,8 e 663,2 nm, contra um branco de acetona (80%). A concentração de pigmento ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foi estimada de acordo com as Equações 6, 7 e 8 (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001):

$$Chla = (12,25 \times A_{663,2}) - (2,79 \times A_{646,8}) \quad (6)$$

$$Chlb = (20,31 \times A_{646,8}) - (5,10 \times A_{663,2}) \quad (7)$$

$$CT = \frac{(1000 \times A_{470} - 1,82 \times Chla - 85,02 \times Chlb)}{198} \quad (8)$$

Em que, *Chla*: Clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$); *Chlb*: clorofila *b* ($\mu\text{g mL}^{-1}$); *CT*: carotenoides totais; $A_{646,8}$: absorvância em 646,8 nm; $A_{663,2}$: absorvância em 663,2 nm; e A_{470} : absorvância em 470 nm.

4.5.2 Carotenoides em termos de β -caroteno, Astaxantina e Licopeno

Uma alíquota de cultivo celular foi coletada do fotobiorreator, centrifugada a 3.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimentado foi lavado com água destilada deionizada e centrifugado novamente (3.000 rpm por 5 min.). A amostra celular sedimentada foi protegida da luz e congelada a -15°C. Na sequência, a amostra celular foi liofilizada por 48 h (com início: 228 μHg [-58°C]; meio: 171 μHg [-60°C], 144 μHg [-61°C]; e final: 143 μHg [-61°C]). A massa celular liofilizada seguiu para a etapa de extração, na qual, foram

adicionados 7 micropérolas de vidro, e 1 mL de dimetil sulfóxido – DMSO (previamente aquecido a 50°C por 30 min.). A massa em solução de DMSO foi agitada em vortex por 1 min. quatro vezes, com intervalos de repouso de 15 min. Após a adição de 3 mL de acetona p.a., a amostra permaneceu em banho de ultrassom por 20 min. A amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 min. e o sobrenadante foi reservado. Estes procedimentos de extração foram repetidos até a descoloração da massa celular. Por fim, foi adicionado ao sobrenadante, 5 mL de solução de cloreto de sódio e 5 mL de éter de petróleo. A amostra foi agitada, e após a separação das fases, foi realizada a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 448:474:470 nm referentes ao β -caroteno, astaxantina e licopeno (FONSECA et al., 2011; KIM; KEASLING, 2001; MACHADO; BURKERT, 2015). A Equação 9 foi utilizada para estimar a concentração de carotenoides totais em termos de β -caroteno, astaxantina e licopeno (DAVIES, 1976⁴ apud MACHADO; BURKERT, 2015).

$$C[\mu g g^{-1}] = \frac{A.V.10^6}{A_{1cm}^{1\%}.100.m} \quad (9)$$

Em que, C: carotenoides (astaxantina, β -caroteno ou licopeno); A: é a absorbância; V: é o volume (mL); $A_{1cm}^{1\%}$: é a absortividade específica (1.600 para astaxantina, 2.592 para β -caroteno ou 3.450 para licopeno); m: biomassa (g).

4.5.3 Ficobilinas

Para a extração de FB, uma alíquota de 5 mL de amostra foi coletada do fotobiorreator e concentrada por centrifugação a 3.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi resuspenso com a adição de 5 mL de solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8. Na sequência, a amostra em solução de tampão de fosfato de potássio foi protegida da luz, e submetida a ciclos de congelamento (-15°C) e descongelamento (5°C). Após nova centrifugação (3.000 rpm por 10 min.), foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante (extrato) – por meio de um espectrofotômetro modelo UV-1800 da Shimadzu –, nos comprimentos de onda 545:620:750 nm, adotando-se o tampão de fosfato de potássio como prova em branco. As concentrações de FC ($\mu g L^{-1}$) e de FE ($\mu g L^{-1}$) foram estimadas pelas Equações 10 e 11, respectivamente (LAWRENZ; FEDEWA; RICHARDSON, 2011).

⁴ DAVIES, B. H. **Chemical Biochemistry Plant Pigments**. In: GOODWINT, T. W. (ed.). New York: Academic Press, 1976.

$$FC = \frac{(A_{620} - A_{750})}{1,9 \times 10^6} \times 264000 \times \frac{V_a}{V_t} \times 10^6 \quad (10)$$

$$FE = \frac{(A_{545} - A_{750})}{2,41 \times 10^6} \times 240000 \times \frac{V_a}{V_t} \times 10^6 \quad (11)$$

Em que, FC : concentração de ficocianina [$\mu\text{g L}^{-1}$]; FE : concentração de ficoeritrina [$\mu\text{g.L}^{-1}$]; A_{545} : absorvância em 545 nm; A_{620} : absorvância em 620 nm; A_{750} : absorvância em 750 nm; V_a : volume de amostra; e V_t : volume de tampão de fosfato de potássio.

4.6 EXPERIMENTOS

4.6.1 Experimento 1 – Seleção de Microalgas

As microalgas *Poterochromonas malhamensis*, *Micractinium* sp., *Chlorella vulgaris* e *Tetradismus* sp. (com 97% de similaridade com *T. acuminatus*) (SCHUELTER et al., 2019) foram cultivadas em meio BG-11, e em meio BG-11 modificado (denominado por BG-11-CNP), composto pelos elementos do meio original do BG-11, acrescido de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de glicose (SMITH et al., 2015), $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ e $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ (KHALILI et al., 2015).

Os cultivos foram desenvolvidos por 6 dias em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente (Figura 4.4-1). Para induzir a síntese de carotenoides pelo estresse luminoso (ALCAÍNO et al., 2016; LAMERS et al., 2010; MARKOU; NERANTZIS, 2013; PŘIBYL et al., 2015), as microalgas na concentração celular inicial de $0,73 \text{ g L}^{-1}$ foram cultivadas com elevada intensidade ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e fotoperíodo de 24:00 h (luz:escuro). A agitação constante dos cultivos foi realizada pela introdução de ar enriquecido com 5,5% de CO_2 (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016). O experimento foi desenvolvido em temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH de $7,1 \pm 0,1$, e oxigênio dissolvido de $6 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$.

Foram realizadas mensurações de biomassa, clorofilas **a** e **b**, e carotenoides totais. Em posse dos resultados, com auxílio do *Software Statistica 7.0* a seleção das microalgas ocorreu por meio de (i) Análise de Variância com 95% de intervalo de confiança (IC); (ii) Teste de Tukey com 95% de intervalo de confiança; e (iii) Avaliação dos valores máximos de pigmentos.

4.6.2 Experimento 2 – Seleção de Métodos

A microalga *Tetradismus sp.* na concentração celular inicial de $0,03 \text{ g L}^{-1}$ foi cultivada simultaneamente em meio BG-11 (UTEX, 2019) e BBM (NICHOLS, 1973) durante 8 dias em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente (Figura 4.4-1). Para induzir o estresse luminoso nas microalgas (ALCAÍNO et al., 2016; LAMERS et al., 2010; MARKOU; NERANTZIS, 2013; PŘIBYL et al., 2015), foi estabelecido o fotoperíodo de 24 h com luz na intensidade de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A agitação constante foi promovida pelo borbulhamento de ar enriquecido com $6,3 \pm 3,5\%$ (v / v) de CO_2 (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016). O experimento foi desenvolvido em temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, e pH de $7,3 \pm 0,3$.

Os pigmentos clorofilas **a** e **b** (Chla e Chlb) e carotenoides totais (CT) foram extraídos por duas técnicas distintas: (i) maceração manual por 5 min; e (ii) banho de ultrassom a 20°C por 20 min. Os demais procedimentos metodológicos pré e pós-extração, assim como a quantificação, seguiram as metodologias descritas em 4.5.1, subitem *Extração com Acetona*, que prevê as etapas de centrifugação, congelamento – descongelamento, adição de acetona como solvente e quantificação, conforme proposto por Lichtenthaler e Buschmann (2001).

Quanto às ficobilinas ficoeretrina (FE) e ficocianina (FC) foram investigados: (i) o número de ciclos de congelamento e descongelamento (Cong-Desc) necessários à extração dos pigmentos, conforme metodologia descrita em 4.5.3; e (ii) o nível de pureza da FC. Após o processo de extração de ficobilinas (4.5.3), a purificação da FC, envolveu as seguintes etapas adicionais: precipitação da FC pela adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e armazenamento da solução final (amostra em solução de sulfato de amônio) sob refrigeração a 4°C (CHEN et al., 2017).

Os fatores concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e tempo de armazenamento, foram avaliados quanto aos seus efeitos na variável resposta nível de pureza da FC, por meio do delineamento composto central apresentado na Tabela 4.6-1. O grau de pureza adimensional foi determinado pela razão entre as absorvâncias medidas nos comprimentos de onda 620 nm e 280 nm, que representam os respectivos comprimentos de onda das ficocianinas e das demais proteínas (HERRERA et al., 1989; RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001).

Os parâmetros foram estatisticamente avaliados via *Software Statistica 7.0* quanto: (i) Análise de Variância a 95% de intervalo de confiança; e (ii) Teste de Tukey com 95% de intervalo de confiança.

Tabela 4.6-1 - Matriz do delineamento composto central de purificação de FC

Fator	Código	Níveis				
		-2	1	0	1	2
Tempo (h)	X ₁	48	72	96	120	144
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	X ₂	40	50	65	80	90
Repetições		1	3	3	3	1

4.6.3 Experimento 3 – Seleção da Fonte de Luz

Foram desenvolvidos 3 experimentos de fotoestimulação da *Tetradismus* sp. com as faixas espectrais visível (Wh), vermelho (Re), amarelo (Ye), verde (Gr) e azul (Bl), bem como, um experimento adicional foi realizado com o objetivo de reproduzir as combinações espectrais que favoreceram a síntese de carotenoides pela microalga.

Experimento 1 – a *Tetradismus* sp. na concentração inicial de 0,03 g L⁻¹, foi cultivada por 12 dias em fotobiorreatores tubular vertical irradiados com LED (Figura 4.4-2) na faixa espectral visível, complementada por uma faixa espectral específica na proporção 86,7%:13,3%, respectivamente. Foram realizadas as seguintes combinações do espectro de energia nas intensidades de 95 e 190 μmol m⁻² s⁻¹: visível:vermelho, visível:amarelo, visível:verde, visível:azul e o tratamento controle de 100% visível.

Experimento 2 – a *Tetradismus* sp. na concentração inicial de 0,03 g L⁻¹, foi cultivada por 12 dias em fotobiorreatores tubular vertical irradiado por LED (Figura 4.4-2) na faixa espectral vermelha, complementada por uma faixa específica do espectro eletromagnético, na proporção 50%:50%. Foram realizadas as seguintes combinações do espectro nas intensidades de 25 e 50 μmol m⁻² s⁻¹: vermelho:amarelo, vermelho:verde, vermelho:azul e o tratamento controle de 100% vermelho.

Experimento 3 – a *Tetradismus* sp. na concentração inicial de 0,89 g L⁻¹, foi cultivada por 6 dias em fotobiorreator tubular irradiado por LED (Figura 4.4-2) nas seguintes faixas do espectro eletromagnético: visível, vermelho, amarelo, verde e azul; nas intensidades de 13 e 25 μmol m⁻² s⁻¹.

A reprodução das composições espectrais que estimularam a maior síntese de carotenoides pela *Tetradismus* sp. em cada um dos experimentos anteriores foi realizada fixando as condições de concentração inicial, duração do cultivo e intensidade luminosa. Assim, a *Tetradismus* sp. na concentração inicial de 0,03 g L⁻¹ foi cultivada por 12 dias em

fotobiorreator irradiado com LED (Figura 4.4-2) na intensidade de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e faixas espectrais: visível:verde, vermelho:verde e vermelho.

Os cultivos foram desenvolvidos com agitação constante por borbulhamento de ar enriquecido com $8 \pm 2\%$ de CO_2 ; temperatura ambiente de $25 \pm 3^\circ\text{C}$; pH de $7,6 \pm 0,3$ e fotoperíodo de 24:00 h (luz:escuro). Foram monitorados os parâmetros de biomassa, carotenoides totais e clorofilas **a** e **b**. O tempo de cultivo variou de 6 a 12 dias, diante de estudos que obtiveram concentração de carotenoides já nos primeiros 5 a 6 dias de cultivo (GRAMA et al., 2014; LAMERS et al., 2010), e àqueles que presenciaram o acúmulo de carotenoides somente a partir da segunda semana de cultivo (PŘIBYL et al., 2015).

Para determinar se existe interação entre as i composições do espectro e as j intensidades de luz, bem como, se há diferença significativa entre as médias destes fatores utilizados em cada k tipo de cultivo, foi realizada análise de variância com 95% de intervalo de confiança, seguido de teste Tukey (IC = 95%) com auxílio do *Software Statistica 7.0*.

4.6.4 Experimento 4 – Planejamento Experimental Plackett-Burman (PB)

Após a seleção da composição espectral (Experimento 3, item 4.6.3) foi realizado o planejamento experimental Plackett-Burman como metodologia *screening design*, para selecionar variáveis independentes com efeito sobre as variáveis dependentes estudadas. Rodrigues e Lemma (2014) recomendam “a realização de no mínimo 4 ensaios a mais que o número de variáveis e a realização de no mínimo 3 repetições no ponto central”. Para investigar a influência de cinco fatores em dois níveis: superior (+1) e inferior (-1); foi utilizada a matriz PB apresentada na Tabela 4.6-2, com 12 ensaios únicos e 4 repetições no ponto central.

A matriz (Tabela 4.6-2) expõe cinco colunas referentes ao número de fatores [X_j , ($j = 1..5$)], e seis colunas referentes ao número de variáveis inertes [VI_j , ($j = 1..6$)] utilizadas para o cálculo do erro padrão. Os efeitos dos fatores $ef[X_j]$ foram calculados pela Equação 12, enquanto os efeitos das variáveis inertes $ef[VI_j]$, foram calculados pela Equação 13, e o erro padrão (E_p) foi estimado pela Equação 14.

Tabela 4.6-2 - Planejamento experimental Plackett-Burman: matriz

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	VI ₁	VI ₂	VI ₃	VI ₄	VI ₅	VI ₆
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

PC = ponto central; X = variáveis ou fatores; VI = variáveis inertes. Planejamento com 12 ensaios únicos e 4 ensaios no ponto central.

$$ef[X_j] = \frac{[\sum_{i=1..12} (x_{ij} * Y_{ij})]}{q} \quad (12)$$

$$ef[VI_j] = \frac{[\sum_{i=1..12} (x_{ij} * Y_{ij})]}{q} \quad (13)$$

Em que, x_{ij} representa o nível do fator codificado (+1) ou (-1); Y_{ij} é a variável resposta; e q consiste no número de variáveis inertes.

$$E_p = \left[\frac{1}{q} \sum_{j=1..6} (ef[VI_j])^2 \right]^{1/2} \quad (14)$$

Em que, q é o número de variáveis inertes, $ef[VI_j]$ são os efeitos das variáveis inertes.

Por meio do planejamento PB foram avaliados os fatores: energia irradiada (intensidade), fotoperíodo, pH, concentração de NaCl, e concentração de nitrogênio; quanto aos seus efeitos nas respostas de biomassa, carotenoides (astaxantina, β -caroteno e licopeno) e clorofilas (**a** e **b**). A Tabela 4.6-3 contém os cinco fatores codificados e níveis avaliados.

Tabela 4.6-3 - Planejamento experimental Plackett-Burman: fatores codificados e níveis

Fatores	Código	-1	0	1
¹ Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	X ₁	85	255	510
² Fotoperíodo (h)	X ₂	12	18	24
³ pH	X ₃	5	7	9
⁴ NaCl (g L^{-1})	X ₄	0	0,69	1,38
⁵ Nitrogênio (g L^{-1})	X ₅	0	0,49	0,74

¹ Os níveis foram escolhidos com base na condição de trabalho no laboratório. ² O limite inferior (12 h) foi definido diante da sua proximidade com a condição natural, e o superior (24 h) por se tratar da condição já adotada nas investigações preliminares. ³ Foram definidos níveis de pH de modo a contemplar condições ácida, neutra e básica. ⁴ As concentrações de NaCl, foram adotadas conforme Blanco et al.(2007). ⁵ O nível (-1) não considera a concentração do elemento contida no meio de cultivo BG-11.

Seguindo o planejamento experimental Plackett-Burman descrito, a *Tetradismus* sp. na concentração inicial de $0,14 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ foi cultivada em meio BG-11 por 14 dias em fotobiorreator placa plana irradiado por LED (Figura 4.4-4) composto por luz na região espectral vermelha e verde na proporção 50%:50%. A biomassa foi medida diariamente e os pigmentos carotenoides e clorofilas foram estimados diariamente a partir do 3º dia de cultivo. A significância dos fatores sobre a variável resposta foi estimada pela análise de variância (IC = 90%), enquanto a análise do efeito de cada fator sobre a variável resposta foi verificada pelo teste-*t* (IC = 90%), ambas com auxílio do *Software Statistica 7.0*.

4.6.5 Experimento 5 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O DCCR foi utilizado para determinar a influência de duas variáveis independentes, energia irradiada (intensidade) e fotoperíodo, na produção de astaxantina, β -caroteno, licopeno e biomassa, desencadeada pela microalga *Tetradismus* sp. O DCCR seguiu um experimento 2², acrescido de 4 ensaios nas condições axiais e 2 ensaios no ponto central, totalizando 10 ensaios. A Tabela 4.6-4 apresenta a matriz do planejamento experimental DCCR; os fatores codificados e seus níveis, respectivamente.

A microalga *Tetradismus* sp. na concentração inicial $0,15 \text{ g L}^{-1}$ foi cultivada por 7 dias em fotobiorreator placa plana irradiado por LED (Figura 4.4-4) composto pela região espectral do vermelho e verde na proporção 50%:50%. A biomassa foi determinada diariamente; e a concentração de astaxantina, β -caroteno e licopeno foi estimada a partir do 3º dia de cultivo. As respostas referentes aos pigmentos foram avaliadas em termos de massa de pigmento por biomassa (mg g^{-1}); e em massa de pigmento por volume de cultivo (mg L^{-1}).

Tabela 4.6-4 - Delineamento Composto Central Rotacional: matriz, fatores codificados e níveis

Ensaio	¹ Energia (X ₁)	² Fotoperíodo (X ₂)
	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(h)
1	160 (-1)	5,2 (-1)
2	510 (1)	5,2 (-1)
3	160 (-1)	20,8 (1)
4	510 (1)	20,8 (1)
5	85 (-1,414)	13 (0)
6	595 (1,414)	13 (0)
7	340 (0)	2 (-1,414)
8	340 (0)	24 (1,414)
9	340 (0)	13 (0)
10	340 (0)	13 (0)

¹Os níveis foram escolhidos com base nos resultados sugeridos pelo planejamento preliminar, Plackett-Burman; e na condição de trabalho no laboratório ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é a mínima quantidade de energia possível, por corresponder a energia de 2 lâmpadas, uma vermelha e outra verde). ²Optou-se por investigar um range maior do fotoperíodo. A matriz compreende 8 ensaios únicos e 2 ensaios no ponto central.

A partir dos resultados do Delineamento Composto Central Rotacional, com auxílio do *Software Statistica 7.0*, a significância dos fatores sobre a variável resposta foi estimada pela análise de variância (IC = 90%), enquanto a análise do efeito de cada fator sobre a variável resposta foi verificada pelo teste-*t* (IC = 90%). A adequabilidade do modelo (Equação 15) em ajustar-se aos dados amostrados foi avaliada pelos valores dos coeficientes determinação (R^2), bem como determinação ajustado (R_{aj}^2).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1^2 + \beta_3 x_2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_1 x_2 + e \quad (15)$$

As equações representativas dos resultados de carotenoides (astaxantina, β -caroteno e licopeno) em termos de mg g^{-1} e mg L^{-1} , tiveram suas variáveis independentes otimizados por meio do *Software Maple*.

4.6.5.1 Validação Experimental

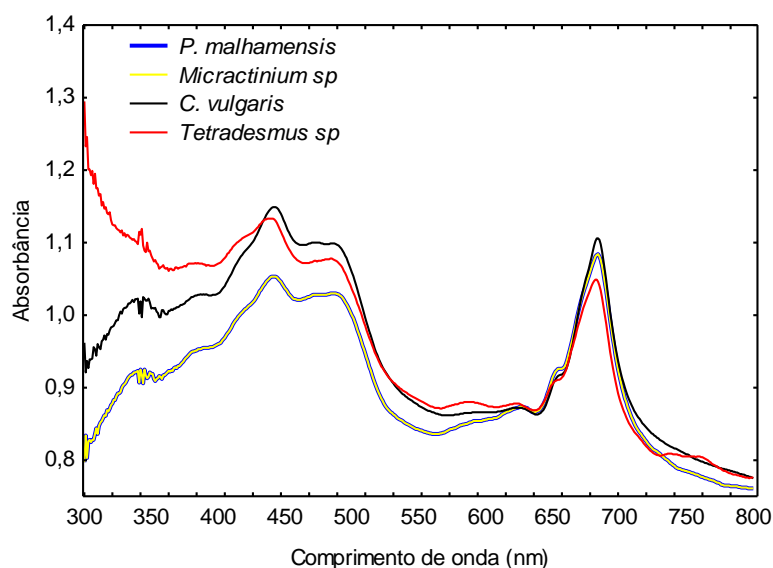
A concentração inicial de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de *Tetrademus* sp. foi cultivada sob as condições otimizadas de intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, sugeridos pela maximização dos modelos ajustados para as respostas de carotenoides. Os cultivos foram desenvolvidos em meio BG-11 por 7 dias em fotobiorreator placa plana irradiado por LED na faixa vermelha e verde na proporção 50%:50%. A validação foi verificada quando as respostas experimentais permaneceram dentro do intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) calculado para os valores de astaxantina, β -caroteno e licopeno preditos pelos modelos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1 – SELEÇÃO DE MICROALGAS

As microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradismus* sp., foram avaliadas quanto à produção de biomassa em peso seco e síntese dos pigmentos clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) e carotenoides totais (CT), quando cultivadas em meios BG-11-CNP e BG-11. A Figura 5.1-1 mostra o espectro eletromagnético de absorção respectivo por microalga.

Figura 5.1-1 - Espectro eletromagnético de absorção das microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradismus* sp.



A partir dos espectros apresentados na Figura 5.1-1, o comprimento de onda 683 nm (valor máximo da banda que inclui a faixa de absorção das clorofilas), foi relacionado com as concentrações de biomassa em peso seco para a obtenção de uma curva de calibração entre as variáveis, e consequentemente, determinação da concentração de biomassa a partir da leitura espectral em 683 nm (Equação 2, Item 4.3.1).

Os valores de biomassa alcançados no 6º dia de cultivo das microalgas em fotobiorreator tubular irradiado por luz fluorescente, bem como os respectivos valores de desvio padrão, erro padrão e de produtividade média, estão apresentados na Tabela 5.1-1, a qual mostra que as microalgas cultivadas em meio BG-11-CNP produziram valores de biomassa, superiores aos correspondentes estimados nos cultivos em meio BG-11.

Comparativamente, o meio de cultivo BG-11-CNP promoveu biomassa média geral⁵ de $4,72 \pm 0,63 \text{ g L}^{-1}$, superior a biomassa média geral estimada com o meio BG-11 de $3,32 \pm 0,44 \text{ g L}^{-1}$. Em meio BG-11-CNP também foram observados os maiores valores de produtividade. Ao alterar o meio de cultivo de BG-11-CNP para BG-11, foi observado redução de $44 \pm 1\%$ da produtividade média das microalgas *P. malhamensis* e *Micractinium* sp., e redução de $24 \pm 4\%$ da produtividade média das microalgas *C. vulgaris* e *Tetradescmus* sp.

Tabela 5.1-1 - Biomassa média, desvio padrão (DP), erro padrão e produtividade média das microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradescmus* sp. cultivadas por 6 dias em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Meio de cultivo	Microalga	N	Biomassa (g L ⁻¹)	Desvio padrão (g L ⁻¹)	Erro padrão (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ d ⁻¹)
BG-11-CNP	<i>P. malhamensis</i>	2	5,54	0,25	0,18	$0,80 \pm 0,78$
	<i>Micractinium</i> sp.	2	4,34	0,34	0,24	$0,60 \pm 0,80$
	<i>C. vulgaris</i>	2	4,88	0,37	0,26	$0,69 \pm 0,77$
	<i>Tetradescmus</i> sp.	2	4,10	0,23	0,16	$0,56 \pm 0,68$
Total		8	4,72	0,63	0,22	

Meio de cultivo	Microalga	N	Biomassa (g L ⁻¹)	Desvio padrão (g L ⁻¹)	Erro padrão (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ d ⁻¹)
BG-11	<i>P. malhamensis</i>	2	3,46	0,31	0,22	$0,46 \pm 0,71$
	<i>Micractinium</i> sp.	2	2,68	0,11	0,08	$0,33 \pm 0,55$
	<i>C. vulgaris</i>	2	3,72	0,14	0,10	$0,50 \pm 0,81$
	<i>Tetradescmus</i> sp.	2	3,42	0,20	0,14	$0,45 \pm 0,42$
Total		8	3,32	0,44	0,16	

A ANOVA ($\alpha = 0,05$) entre os fatores microalga e meio de cultivo para a resposta biomassa sugeriu efeito de interação significativo entre os fatores (p -valor = 0,0239), conforme Tabela A1 em Apêndice A.

A interação entre os fatores microalga e meio de cultivo, sugere que a resposta de biomassa para um dado gênero de microalga é dependente do meio de cultivo em questão, e vice e versa. Portanto, a análise de variância foi realizada com as respostas de biomassa agrupadas por meio de cultivo, conforme Tabela 5.1-2.

⁵ Biomassa média geral que computa os resultados de biomassa média referentes a todas das microalgas avaliadas: *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradescmus* sp., cultivadas em mesmo meio de cultivo.

Tabela 5.1-2 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) fator único microalga para a variável resposta biomassa final estimada em cultivos de microalgas em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Microalgas cultivadas em meio BG-11-CNP					
Fator	SQ	g.l.	QM	F _c	p-valor
Microalga	2,4534	3	0,8178	8,928	0,0303
Erro	0,3664	4	0,0916		
Microalgas cultivadas em meio BG-11					
Fator	SQ	g.l.	QM	F _c	p-valor
Microalga	1,1984	3	0,3995	9,466	0,0274
Erro	0,1688	4	0,0422		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F_c: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de biomassa (N = 2) estimados em no 6° dia de cultivo das microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradismus* sp.

A Tabela 5.1-2 mostra pela análise de variância que as microalgas produziram ao final de 6 dias de cultivo, concentrações de biomassa diferentes, tanto em meio BG-11-CNP (p -valor = 0,0303) quanto em meio BG-11 (p -valor = 0,0274). A Tabela 5.1-3 mostra o Teste de Tukey com 95% de intervalo de confiança realizado com as respostas de biomassa agrupadas por meio de cultivo.

Tabela 5.1-3 - Biomassa e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com as microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetradismus* sp. em meio BG-11-CNP e meio BG-11, em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Microalga	Biomassa (g L ⁻¹) em meio BG-11-CNP	Biomassa (g L ⁻¹) em meio BG-11
<i>Tetradismus</i> sp.	4,10 ^b	3,42 ^{a,b}
<i>Micractinium</i> sp.	4,34 ^{a,b}	2,68 ^b
<i>C. vulgaris</i>	4,88 ^{a,b}	3,72 ^a
<i>P. malhamensis</i>	5,54 ^a	3,46 ^{a,b}

Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) realizado com os resultados de biomassa (N = 2) estimados no 6° dia de cultivo das microalgas. O Teste Tukey realizado com a resposta de biomassa, ignorando o efeito de interação, pode ser consultado na Tabela A2 do Apêndice A.

Conforme a Tabela 5.1-3, a maior concentração de biomassa foi observada no cultivo da microalga *P. malhamensis* (5,54 g L⁻¹) em meio BG-11-CNP; resultado de biomassa semelhante (p -valor = 0,2935) foi observado no cultivo da *C. vulgaris* (4,88 g L⁻¹) e da *Micractinium* sp. (4,34 g L⁻¹), ambas em meio BG-11-CNP. Este fenômeno pode estar relacionado ao caráter mixotrófico das microalgas, que possuem a habilidade de assimilar tanto o carbono inorgânico CO₂, quando o carbono orgânico (NELSON; COX, 2014), neste

caso a glicose. A disponibilidade da glicose no meio de cultivo permite à microalga mixotrófica reduzir as etapas metabólicas decorrentes da fotofosforilação. Ainda, as fontes adicionais de nutrientes, NaNO_3 e KH_2PO_4 , podem ter influenciado positivamente a produção de biomassa, dado que concentrações insuficientes dos nutrientes podem limitar o crescimento celular (BEALE, 1993; KHALILI et al., 2015).

A Tabela 5.1-4 mostra os parâmetros de qualidade do ajuste dos modelos em meio BG-11-CNP e BG-11, e observa-se que os modelos são significativos ($\alpha = 0,05$) e explicam em aproximadamente 87% da variação de biomassa determinada após 6 dias de cultivo das microalgas. Adicionalmente, o gráfico de resíduos em função dos valores preditos (Figura 5.1-2) sugere que os modelos são adequados, diante da aleatoriedade ou ausência de padrões de distribuição dos dados e *outliers*.

Tabela 5.1-4 - Parâmetros de ajuste do modelo segundo a resposta de biomassa

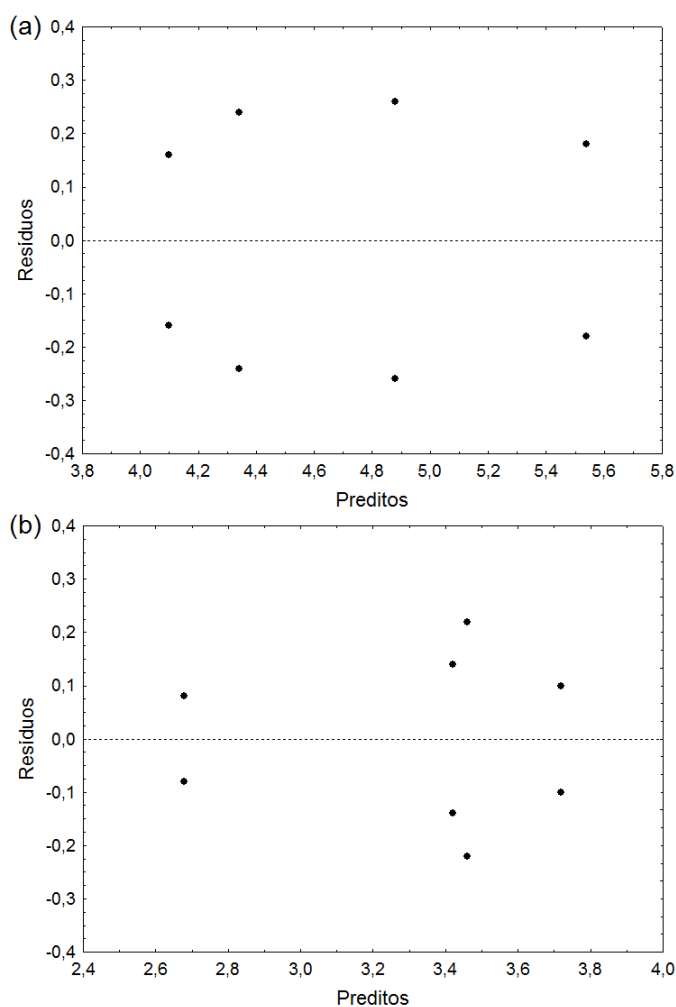
Meio de cultivo	Variável resposta	r	R ²	R ² _{aj}	Modelo			Resíduo			F _c	p-valor
					SQ	g.l.	QM	SQ	g.l.	QM		
BG-11-CNP	Biomassa	0,9328	0,8701	0,7726	2,4534	3	0,8178	0,3664	4	0,0916	8,9279	0,0303
BG-11	(g L ⁻¹)	0,9362	0,8765	0,7839	1,1984	3	0,3995	0,1688	4	0,0422	9,4660	0,0274

r: coeficiente de regressão; R²: coeficiente de determinação; R²_{aj}: coeficiente de determinação ajustado; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; g.l.: graus de liberdade; F_c: F calculado.

Na avaliação dos resultados de concentração dos pigmentos Chl*a*, Chl*b* e CT, as concentrações máximas foram observadas no 5º dia de cultivo. A Tabela 5.1-5 mostra os resultados de massa de pigmentos por massa de biomassa em peso seco.

Os cultivos realizados em meio BG-11 promoveram montantes superiores de Chl*a* (21%), Chl*b* (17%) e CT (8%), se comparados aos pigmentos produzidos nos cultivos desenvolvidos em BG-11-CNP. A máxima concentração de Chl*a* (10,74 mg g⁻¹) e de Chl*b* (14,69 mg g⁻¹), foram mensuradas no cultivo da *Micractinium* sp. A *Tetrademus* sp. foi a única microalga avaliada que produziu carotenoides nas presentes condições de cultivo, de 1,53 mg g⁻¹ em meio BG-11-CNP e de 1,67 mg g⁻¹ em meio BG-11.

Figura 5.1-2 - Gráficos de resíduos em função dos valores preditos para a variável biomassa (a) cultivos das microalgas em meio BG-11-CNP; (b) cultivos das microalgas em meio BG-11.



Fonte: O autor.

Tabela 5.1-5 - Valores máximos de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais (N = 1) por grama de biomassa, determinados do 5º dia de cultivo das microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium* sp., *C. vulgaris* e *Tetrademus* sp., cultivadas em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Microalga	Chla (mg g ⁻¹)		Chlb (mg g ⁻¹)		CT (mg g ⁻¹)	
	BG-11-CNP	BG-11	BG-11-CNP	BG-11	BG-11-CNP	BG-11
<i>P. malhamensis</i>	6,46	8,59	10,51	13,88	-	-
<i>Micractinium</i> sp.	7,19	10,74	11,79	14,69	-	-
<i>C. vulgaris</i>	7,20	7,78	11,64	12,64	-	-
<i>Tetrademus</i> sp.	3,30	3,37	1,67	1,77	1,53	1,67

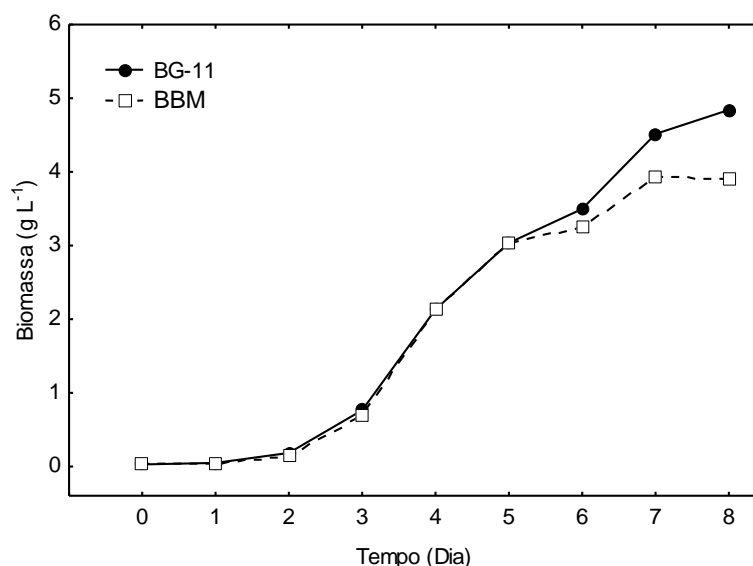
Diante dos resultados, optou-se por dar continuidade aos experimentos com a microalga *Tetrademus* sp. dada sua capacidade de síntese de carotenoides totais. Adicionalmente, não foram encontrados estudos científicos com este gênero de microalga,

quanto ao seu potencial de síntese de bioprodutos. Por fim, optou-se em permanecer com o meio BG-11, dado que este promoveu concentrações superiores de biopigmentos.

5.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DE MÉTODOS

Após 8 dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp., foi mensurada a concentração de biomassa em peso seco de $4,8 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ em meio BG-11, estatisticamente superior ($\alpha = 0,00001$) ao valor de $3,9 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ mensurado em meio BBM. A Figura 5.2-1 apresenta a evolução da taxa de crescimento algal ao longo dos dias de cultivo.

Figura 5.2-1 - Crescimento em biomassa da *Tetradismus* sp. cultivada em BG-11 e BBM, em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente



Fonte: O autor.

Em termos de biopigmentos clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais, a Tabela 5.2-1 resume as respectivas concentrações médias e desvios padrão, segundo as técnicas de extração (maceração e banho de ultrassom) e meios de cultivo (BG-11 e BBM). O cultivo da *Tetradismus* sp. desenvolvido em meio BBM, aliado a técnica de extração por banho de ultrassom, resultou nas maiores concentrações dos pigmentos Chl*a* ($3,90 \text{ mg g}^{-1}$), Chl*b* ($2,53 \text{ mg g}^{-1}$) e CT ($1,97 \text{ mg g}^{-1}$), conforme apresentado na Tabela 5.2-1.

Tabela 5.2-1 - Média \pm desvio padrão (DP) respectivos de clorofila *a* (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) e carotenoides totais (CT) (N = 3) segundo extração por maceração e banho de ultrassom em meio BG-11 e BBM

Pigmento	Técnica	Meio	Média \pm DP (mg g ⁻¹)
Chl <i>a</i>	Maceração	BG-11	2,64 \pm 0,33
		BBM	1,88 \pm 0,41
	Ultrassom	BG-11	3,20 \pm 0,73
		BBM	3,90 \pm 0,08
Chl <i>b</i>	Maceração	BG-11	1,63 \pm 0,25
		BBM	1,22 \pm 0,27
	Ultrassom	BG-11	2,03 \pm 0,46
		BBM	2,53 \pm 0,09
CT	Maceração	BG-11	1,57 \pm 0,11
		BBM	1,63 \pm 0,19
	Ultrassom	BG-11	1,54 \pm 0,09
		BBM	1,97 \pm 0,12

A Tabela 5.2-2 resume os resultados da análise de variância realizada entre os meios de cultivo e as técnicas de extração para os biopigmentos, clorofilas *a* e *b* e carotenoides totais. Para a as variáveis Chl*a* e Chl*b*, a ANOVA indicou a presença de interação entre os fatores técnica de extração e meio de cultivo (*p*-valor = 0,02416 e *p*-valor = 0,02966, respectivamente), ou seja, dependendo do meio utilizado, a técnica por banho de ultrassom extrairá maior quantidade de clorofilas. A continuidade da análise permite sugerir que as concentrações de Chl*a* e Chl*b* em meio BBM são superiores quando adotada a técnica de extração por banho de ultrassom (*p*-valor = 0,0011 e *p*-valor = 0,0014, respectivamente).

Tabela 5.2-2 - Resumo dos resultados de *p*-valor da ANOVA ($\alpha = 0,05$) realizada entre as técnicas de extração de pigmentos maceração (MC) e banho de ultrassom (US), e entre os meios de cultivo BG-11 e BBM, de cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente

Resposta	Teste	Fatores	<i>p</i> -valor
Chl <i>a</i>	MC	BG-11 x BBM	0,0678
	US	BG-11 x BBM	0,1776
	BG-11	MC x US	0,2925
	BBM	MC x US*	0,0011
Chl <i>b</i>	MC	BG-11 x BBM	0,1265
	US	BG-11 x BBM	0,1776
	BG-11	MC x US	0,2554
	BBM	MC x US*	0,0014
CT	MC	BG-11 x BBM	0,6681
	US	BG-11 x BBM*	0,0082
	BG-11	MC x US	0,7358
	BBM	MC x US	0,0640

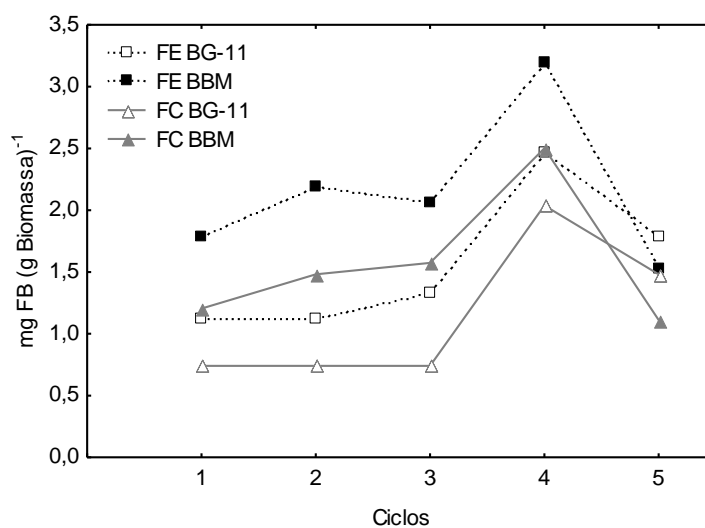
Legenda: Chl*a*: clorofila *a*; Chl*b*: clorofila *b*; CT: carotenoides totais; *Fator que gera resposta estatisticamente superior ($\alpha = 0,05$)

Quanto aos carotenoides totais, a ANOVA realizada entre os fatores com um intervalo de confiança de 95% também indicou a presença de interação entre os fatores (p -valor = 0,0471). E neste caso, a continuidade da análise sugere que a concentração de CT em meio BBM ($1,97 \pm 0,12 \text{ mg g}^{-1}$) é estatisticamente superior ao valor do pigmento em meio BG-11 ($1,54 \pm 0,09 \text{ mg g}^{-1}$), quando adotada a técnica de extração por ultrassom (p -valor = 0,00820), conforme Tabela 5.2-2.

Lawrenz, Fedewa e Richardson (2011) testaram diferentes técnicas de extração de biopigmentos e o procedimento de filtração seguido por congelamento – descongelamento e complementado por maceração, forneceu a menor eficiência de extração (< 5%) entre os protocolos testados. O mesmo procedimento de extração, porém, complementado por sonicação, promoveu uma eficiência em torno de 30%.

Quanto às ficobilinas, ou pigmentos ficoeritrina (FE) e ficocianina (FC), foram avaliadas duas questões referentes às técnicas de extração: (i) a primeira quanto ao número ciclos de congelamento – descongelamento necessário à extração das ficobilinas; e (ii) a segunda, a partir de um planejamento composto central (PCC), quanto à concentração ideal de solução de sulfato de amônio (x_2) e o tempo de armazenamento a 4°C (x_1) ótimos ao processo de purificação da FC. A Figura 5.2-2 apresenta a evolução média de extração de ficobilinas de cultivos da *Tetradismus* sp. em meio BG-11 e BBM, a cada ciclo de congelamento - descongelamento.

Figura 5.2-2 - Ciclos de congelamento – descongelamento para a extração das ficobilinas ficoeritrina (FE) e ficocianina (FC) da microalga *Tetradismus* sp. cultivada em meios BG-11 e BBM



Fonte: O autor.

Pela análise da Figura 5.2-2, a extração de ficobilinas foi máxima no quarto ciclo. Cada congelamento durou em torno de 12 horas, exceto no quinto ciclo, em que o congelamento durou em torno de 48 horas, fato que explica parte da queda abrupta registrada. As ficobilinas possuem elevado grau de degradação ao longo do tempo, caso o extrato celular não seja armazenado em condições de -80°C (LAWRENZ; FEDEWA; RICHARDSON, 2011).

A partir do PCC (descrito no item 4.6.2, Tabela 4.6-1) foram ajustados dois modelos quadráticos para a resposta FC ($\text{mg FC (g biomassa)}^{-1}$), Equação 16 ($R^2 = 0,77$; $\varepsilon = 0,08$) em meio BG-11 e Equação 17 ($R^2 = 0,76$; $\varepsilon = 0,11$) em meio BBM. Onde X_1 corresponde ao fator tempo de permanência em refrigeração e X_2 consiste na concentração da solução de sulfato de amônio.

$$\text{FC}_{\text{BG-11}} = 4,6024 + 0,0863 \cdot x_1 - 0,2693 \cdot x_2 - 0,0005 \cdot x_1^2 + 0,0021 \cdot x_2^2 \quad (16)$$

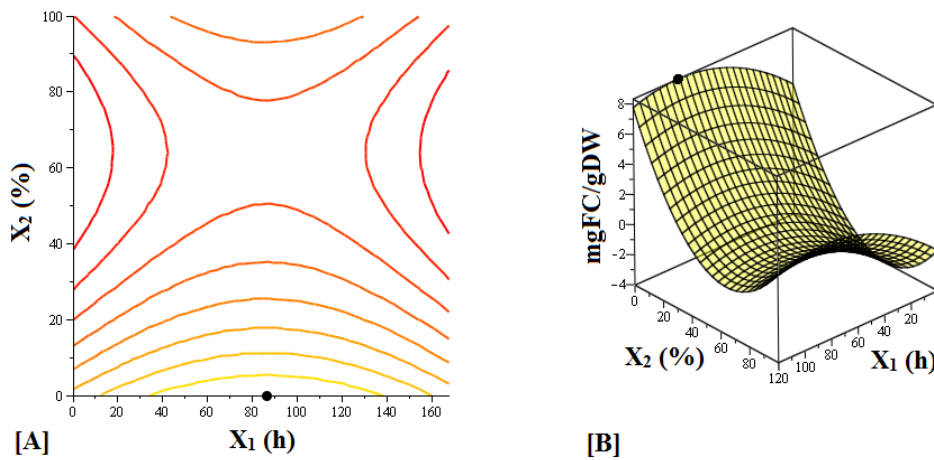
$$\text{FC}_{\text{BBM}} = 4,7446 + 0,0938 \cdot x_1 - 0,2896 \cdot x_2 - 0,0005 \cdot x_1^2 + 0,0023 \cdot x_2^2 \quad (17)$$

A maximização das Equações 16 e 17, encontrou a concentração de $8,33 \text{ mgFC (g biomassa)}^{-1}$ ($x_1 = 86,3 \text{ h}$ e $x_2 = 0\%$) em meio BG-11, e de $9,14 \text{ mgFC (g biomassa)}^{-1}$ ($x_1 = 93,8 \text{ h}$ e $x_2 = 0\%$) em meio BBM. Como as Equações 16 e 17 apresentam elevada similaridade optou-se por mostrar graficamente na Figura 5.2-3, a superfície de resposta para a FC em meio BG-11 (Equação 16), por esta conter o menor erro (a superfície de resposta para a FC em meio BBM pode ser visualizada na Figura B1 em Apêndice B).

Cabe destacar a partir do PCC e da maximização das Equações 16 e 17, que o procedimento de purificação de FC não foi eficiente, dado que a ausência da solução de sulfato de amônio, conforme sugerido pela maximização das equações ($x_2 = 0\%$), representa a ausência do processo de purificação. Ainda, o grau de pureza da ficocianina ($< 0,1$) sugeriu ausência do biopigmento e possível presença de proteínas.

A partir dos resultados, optou-se por dar continuidade na pesquisa com a adoção do método de extração dos pigmentos *Chla*, *Chlb* e CT por banho de ultrassom, e o cultivo da *Tetrademus* sp. em meio BG-11, diante de sua formulação acessível. Quanto às ficobilinas, optou-se por suspender seu estudo diante do insucesso no processo de purificação, e pela ausência de estudos do potencial de síntese de ficobilinas pela *Tetrademus* sp.

Figura 5.2-3 - Superfície de resposta de ficocianina (FC) em meio BG-11. (A) Gráfico de contorno com ponto ótimo. (B) Gráfico 3D com ponto ótimo



Fonte: O autor.

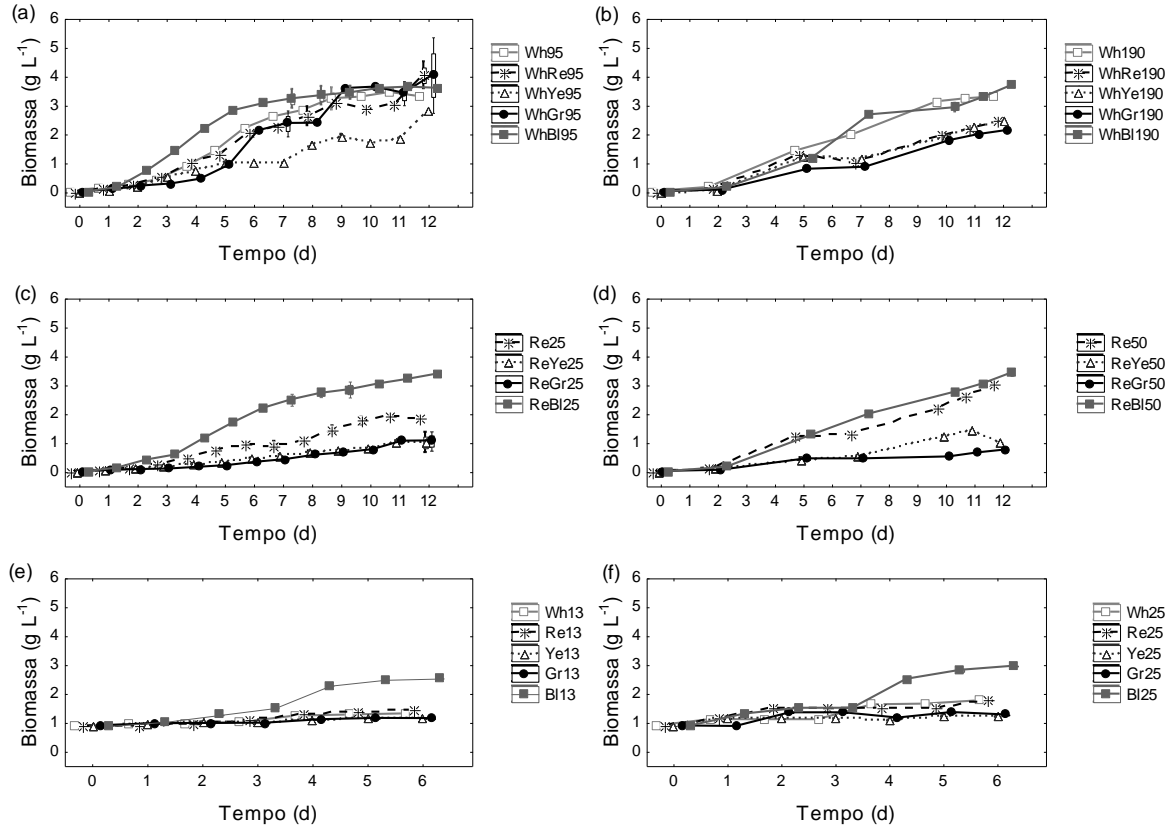
5.3 EXPERIMENTO 3 – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ

5.3.1 Biomassa

O espectro azul acelerou o crescimento da *Tetradismus* sp. nos três experimentos (Figura 5.3-1). O cultivo irradiado na composição Wh:Bl a $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5.3-1a) desenvolveu fase *lag* reduzida com crescimento exponencial a partir do 1º dia. Este cultivo foi superado em produção de biomassa ($3,45 \text{ g L}^{-1}$) no 9º dia, pelo cultivo irradiado com Wh:Gr a $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($3,59 \text{ g L}^{-1}$).

Nota-se que somente o cultivo irradiado com espectro visível (Wh) apresentou elevação da produtividade e taxa de crescimento específico ao utilizar a intensidade em dobro, neste caso de ~ 13 para $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bem como ao elevar de 25 para $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 5.3-1). Com o aumento para $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Experimento 1), os parâmetros cinéticos mostram crescimento lento em virtude da incidência de luz com intensidade acima da capacidade de absorção celular, fenômeno que causa a fotoinibição (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2004).

Figura 5.3-1 - Crescimento em biomassa da *Tetradismus* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED, referentes ao Experimento 1: (a) $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (b) $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Experimento 2: (c) $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (d) $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e Experimento 3 (e) $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (f) $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



Visível (Wh); Vermelho (Re); Amarelo (Ye); Verde (Gr); Azul (Bl); Intensidade de luz em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. N = 3. Fonte: O autor.

You e Barnett (2004) verificaram que a *Porphyridium cruentum* desenvolveu crescimento na intensidade de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e inibição com $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Khalili et al. (2015) também observaram maior crescimento da *Chlorella vulgaris* ao aumentar a intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e fotoinibição do crescimento sob a intensidade de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Enquanto Atta et al. (2013) cultivaram a *C. vulgaris* com energia luminosa na região espectral do azul, sob fotoperíodo de 16h:08h (claro:escuro); e alcançaram $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa na intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e $0,817 \text{ g L}^{-1}$ com $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ravelonandro et al. (2008) não observaram fotoinibição da *Spirulina platensis* ao cultivá-la com energia na região espectral verde sob as emissões de 400; 800; 1.000 e 1.200 lux (lumens m^{-2}).

Tabela 5.3-1 - Parâmetros cinéticos de produtividade de biomassa (P) ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e taxa de crescimento específico (μ) (d^{-1}) dos cultivos da *Tetrademus* sp. em fotobiorreatores tubular vertical irradiados por LED

Experimento 1					Experimento 2				Experimento 3					
Espectro		Intensidade			Espectro		Intensidade		Espectro		Intensidade			
86,7:13,3%		95	190		50:50%		25	50		100%		13	25	
	P	μ	P	μ		P	μ	P	μ		P	μ	P	μ
Wh:Re	0,34	0,42	0,20	0,37						Re	0,09	0,08	0,15	0,12
Wh:Ye	0,23	0,39	0,20	0,37	Re:Ye	0,08	0,31	0,08	0,29	Ye	0,04	0,04	0,06	0,05
Wh:Gr	0,34	0,42	0,18	0,36	Re:Gr	0,09	0,31	0,06	0,27	Gr	0,04	0,04	0,06	0,06
Wh:Bl	0,30	0,41	0,31	0,40	Re:Bl	0,28	0,41	0,28	0,39	Bl	0,27	0,17	0,35	0,20
Wh*	0,27	0,40	0,27	0,39	Re*	0,15	0,36	0,25	0,38	Wh*	0,07	0,06	0,15	0,11

* tratamento controle composto por LED 100%. Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. Intensidade em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Pela análise de variância, constata-se que os fatores composição do espectro de luz e intensidade luminosa, assim como a interação entre eles, promovem efeitos significativos nas respostas concentração de biomassa final para os três experimentos com *Tetrademus* sp. com reduzida variabilidade (Tabela 5.3-2). A Figura 5.3-2 mostra a resposta para a biomassa final nas diferentes composições espectrais e níveis de intensidade luminosa.

Tabela 5.3-2 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta biomassa final dos cultivos de *Tetrademus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

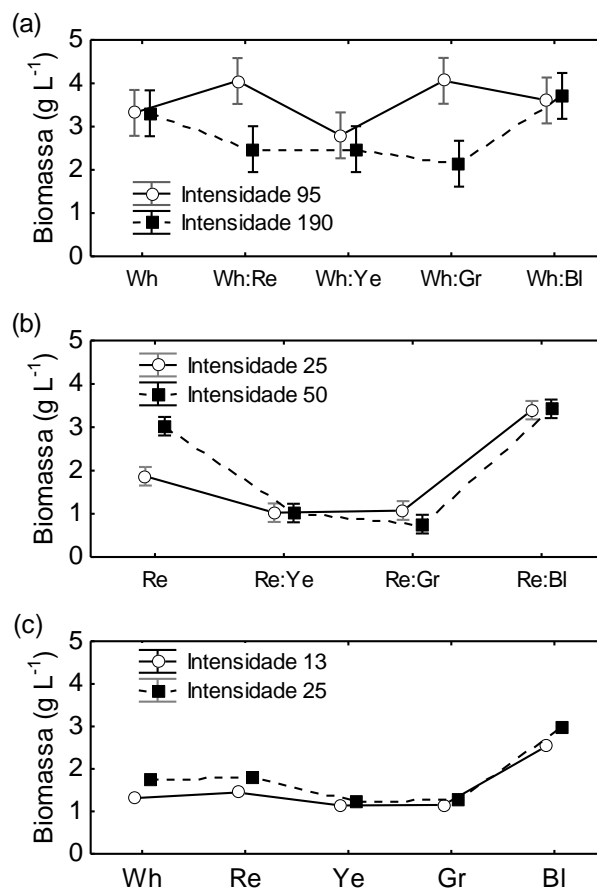
Fator	Experimento 1 (86,7%:13,3%)					Experimento 2 (50%:50%)					Experimento 3 (100%)				
	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor
X_1	4	3,3	0,8	4,2	0,0118	3	25,8	8,6	280	<0,0001	4	9,8	2,4	4655	<0,0001
X_2	1	4,2	4,2	21,4	0,0002	1	0,3	0,3	9,1	0,0081	1	0,6	0,6	1172	<0,0001
$X_1:X_2$	4	5,2	1,3	6,8	0,0013	3	1,9	0,6	20,4	<0,0001	4	0,2	0,04	84	<0,0001
Erro	20	3,9	0,2			16	0,5	0,03			20	0,01	5,12E ⁻⁴		
Total	29	16,6	0,6			23	28,5	1,2			29	10,61	0,4		

X_1 : composição espectral; X_2 : intensidade luminosa; g.l.: grau de liberdade; SS: soma de quadrados; MS: soma de quadrados médios; F_c: F calculado. Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. N = 3.

O aumento de 95 para 190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promoveu redução significativa da biomassa (p -valor = 0,0002) nos cultivos com Wh:Gr e Wh:Re (Tabela 5.3-2, Figura 5.3-2a), atribuído à irradiação de intensidade de luz (190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) acima da capacidade de absorção celular inicial (0,03 g L^{-1}), promovendo efeito de interação entre os fatores (p -valor = 0,0013). Esta reação da *Tetrademus* sp., sugere sensibilidade à exposição nas bandas do verde e vermelho. Ainda, as composições espectrais Wh:Gr e Wh:Re, ambas com 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, resultaram valores iguais de produtividade e taxa de crescimento específico (Tabela 5.3-1). Estes cultivos

alcançaram $4,06 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa no 12º dia, estatisticamente iguais a Wh:Bl-190, Wh:Bl-95, Wh-95; Wh-190 e Wh:Ye-95 (Tabela 5.3-3). Esta similaridade estatística pode ser consequência da elevada participação do espectro visível, Wh (86,7%), que supriu a demanda metabólica da microalga por energia e tornou insuficiente o acréscimo das bandas espectrais Re, Ye, Gr, e Bl (13,3%).

Figura 5.3-2 - Média \pm IC (95%) referente à concentração final de biomassa de *Tetrademus* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. (a) Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e testemunha Wh 100%; (b) Experimento 2, bicromático 50%:50% com testemunha Re 100%; e (c) Experimento 3, monocromático com testemunha Wh 100%.



Visível (Wh); Vermelho (Re); Amarelo (Ye); Verde (Gr); Azul (Bl); Intensidade de luz em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. N = 3.

Fonte: O autor.

No Experimento 2, as fontes de energia luminosa na região vermelha e azul favoreceram a produção de biomassa (Figura 5.3-1c,d), com maior valor de $3,42 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ medido com a composição Re:Bl-50, seguida de $3,39 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ com Re:Bl-25 e $3,02 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ com Re-50 (Tabela 5.3-3); todos com similaridades cinéticas de produtividade e taxa de crescimento específico (Tabela 5.3-1). Estas regiões espectrais englobam as faixas de

absorção das clorofilas *a* e *b* (NELSON; COX, 2014), responsáveis por desencadear as reações fotoquímicas de produção de energia na forma de ATP e NADPH, com consequente fixação de CO₂, síntese de carboidratos e crescimento celular (MASOJÍDEK, TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2004). O aumento da intensidade luminosa de 25 para 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ favoreceu o crescimento da microalga (*p*-valor = 0,0081) (Figura 5.3-2), contudo, ao efetuar a análise de variância excluindo o tratamento controle, Re-25 e Re-50, verificou-se ausência de interação entre os fatores composição espectral e intensidade (*p*-valor = 0,3083) e do efeito da intensidade na resposta de biomassa (*p*-valor = 0,3271), enquanto a composição espectral Re:Bl, independente da intensidade, favoreceu a produção de biomassa (*p*-valor < 0,00001).

No Experimento 3, a maior concentração de biomassa foi observada com a irradiação do espectro azul (Bl) (25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que resultou $2,97 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ ao final do 6^o dia de cultivo (Tabela 5.3-3). Ravelonandro et al. (2008) cultivaram microrganismo procariótico *Spirulina platensis* por 14 a 18 dias na intensidade de 1.000 lux sob diferentes espectros, e determinaram menor biomassa máxima e produtividade com luz azul ($1,73 \text{ g L}^{-1}$; $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), seguida do vermelho ($1,87 \text{ g L}^{-1}$; $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), visível ($2,28 \text{ g L}^{-1}$; $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e verde ($2,44 \text{ g L}^{-1}$; $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Em estudo com as faixas espectrais do visível, vermelho, amarelo, verde e azul, Chen et al. (2010), também estimaram menor concentração de biomassa em cultivos de *Spirulina platensis* com luz azul (<0,1 g L^{-1}) independente da intensidade (750 – 3.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e maior concentração de biomassa ($0,45 \text{ g L}^{-1}$) no cultivo com luz vermelha na intensidade máxima. Khalili et al. (2015) também mensuraram maior concentração de biomassa ($\sim 1,25 \text{ g L}^{-1}$) com a luz vermelha, comparada à azul ($\sim 1,0 \text{ g L}^{-1}$), em cultivos da *Chlorella vulgaris* irradiados com 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Severes et al. (2017) verificaram aumento da absorbância (600 nm) de *Chlorella* sp. com a elevação da intensidade de irradiação em 20 lux ($0,29 \pm 0,01$), 60 lux ($0,33 \pm 0,02$) e 220 lux ($0,46 \pm 0,02$). O aumento de biomassa com a elevação da intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ também foi observado no cultivo de *Nannochloropsis* sp. BR2 (MA et al., 2018), *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 (DUARTE; COSTA, 2018).

O crescimento celular diante de uma fonte de luz é particular da espécie de microalga e das condições de cultivo (GLEMSER et al., 2016; KHALILI et al., 2015). Neste trabalho, o cultivo da *Tetradismus* sp. com espectro visível resultou na máxima produção de biomassa de $3,32 \text{ g L}^{-1}$ na intensidade de 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 5.3-3), enquanto Pribyl et al. (2015) estimaram 12 g L^{-1} de biomassa e $2,695 \pm 0,014 \text{ d}^{-1}$ de taxa máxima de crescimento específico

ao cultivarem a *Scenedesmus* sp. com $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*Photosynthetically Active Radiation*) 24 h por dia.

Tabela 5.3-3 - Biomassa média final (X) (g L^{-1}) \pm desvio padrão (DP) relativos aos cultivos da *Tetradismus* sp. segundo os Experimento 1, 2 e 3 em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

Experimento 1 (86,7%:13,3%)		Experimento 2 (50%:50%)		Experimento 3 (100%)	
Espectro	$X \pm \text{DP}$	Espectro	$X \pm \text{DP}$	Espectro	$X \pm \text{DP}$
Wh:Gr-190	$2,14 \pm 0,01^c$	Re:Gr-50	$0,76 \pm 0,01^c$	Ye-13	$1,14 \pm 0,02^g$
Wh:Ye-190	$2,48 \pm 0,01^{b,c}$	Re:Ye-50	$1,02 \pm 0,01^c$	Gr-13	$1,15 \pm 0,01^g$
Wh:Re-190	$2,48 \pm 0,02^{b,c}$	Re:Ye-25	$1,03 \pm 0,35^c$	Ye-25	$1,22 \pm 0,01^f$
Wh:Ye-95	$2,80 \pm 0,02^{a,b,c}$	Re:Gr-25	$1,08 \pm 0,33^c$	Gr-25	$1,28 \pm 0,03^{e,f}$
Wh-190	$3,31 \pm 0,01^{a,b,c}$	Re-25	$1,87 \pm 0,01^b$	Wh-13	$1,31 \pm 0,02^e$
Wh-95	$3,32 \pm 0,01^{a,b,c}$	Re-50	$3,02 \pm 0,01^a$	Re-13	$1,44 \pm 0,01^d$
Wh:Bl-95	$3,60 \pm 0,03^{a,b}$	Re:Bl-25	$3,39 \pm 0,01^a$	Wh-25	$1,77 \pm 0,03^c$
Wh:Bl-190	$3,71 \pm 0,04^{a,b}$	Re:Bl-50	$3,42 \pm 0,10^a$	Re-25	$1,79 \pm 0,03^c$
Wh:Re-95	$4,05 \pm 0,47^a$	-	-	Bl-13	$2,54 \pm 0,01^b$
Wh:Gr-95	$4,06 \pm 1,31^a$	-	-	Bl-25	$2,97 \pm 0,03^a$

Wh:Gr-190: composto pelo espectro visível:verde com $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, etc. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias; médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste *Tukey*, $\alpha = 0,05$). $N = 3$.

5.3.2 Carotenoides Totais

A síntese de carotenoides totais pela *Tetradismus* sp. foi influenciada significativamente pelos fatores composição espectral, intensidade luminosa, e pela interação entre os fatores (Tabela 5.3-4). Apesar do predomínio de aumento na concentração de carotenoides com a elevação da intensidade luminosa, a maior intensidade ($190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não resultou necessariamente nas maiores concentrações de CT, possivelmente, pelo efeito significativo da composição espectral e casos de fotoinibição (Figura 5.3-3). A produção de carotenoides a partir da incidência de radiação eletromagnética, trata-se de uma resposta microalgal ao estresse luminoso (LAMERS et al., 2010; PŘIBYL et al., 2015).

O aumento da produção de carotenoides com a elevação da intensidade luminosa foi observada em outros estudos. Duarte e Costa (2018), após seis dias de cultivo, aumentaram em aproximadamente 79% a produção de carotenoides de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, ao elevar a intensidade de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ da irradiação azul. Com seis dias de cultivo em LED visível, Grama et al.

(2014) observaram maior síntese de cantaxantina pela *Acutodesmus sp.* ao elevar a energia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($0,94 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$) para $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($1,44 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como o aumento de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz visível, promoveu maior produção de β -caroteno pela *D. salina* (LAMERS et al., 2010).

No caso da *Spirulina plarensis* cultivada com energia luminosa promovida por lâmpadas fluorescentes, foi observado a redução de carotenoides ($2,90 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ para $2,65 \pm 0,12 \text{ mg g}^{-1}$) com aumento da intensidade média de 2.500 lux a 5.400 lux (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012). Redução da síntese de carotenoides totais pela *Chlamydomonas reinhardtii* ao elevar a intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($17,05 \text{ mg g}^{-1}$) para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($8,91 \text{ mg g}^{-1}$) e para $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($5,77 \text{ mg g}^{-1}$) da luz visível (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016). A *Acutodesmus sp.* também apresentou concentração de luteína decrescente com o aumento da intensidade luminosa (GRAMA et al., 2014). *Nannochloropsis sp.* teve produtividade e rendimentos máximos de carotenoides com baixa intensidade de luz (visível, azul royal, azul, alaranjado e vermelho) ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cerca de 2 vezes superiores aos da alta intensidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo de 16:08 h (luz:escuro) (MA et al., 2018).

Tabela 5.3-4 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta carotenoides totais dos cultivos de *Tetradasmus sp.* em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

Fator	Experimento 1 (86,7%:13,3%)					Experimento 2 (50%:50%)					Experimento 3 (100%)				
	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l	SQ	QM	F _c	p-valor
X ₁	4	5,4	1,3	23,1	<0,0001	3	35,9	12,0	70,8	<0,0001	4	1,7	0,4	7,6	0,0007
X ₂	1	9,1	9,1	156,5	<0,0001	1	6,2	6,2	36,5	<0,0001	1	19,4	19,4	340,3	<0,0001
X ₁ :X ₂	4	4,3	1,1	18,7	<0,0001	3	5,0	1,7	9,9	0,0006	4	2,6	0,6	11,2	0,001
Erro	20	1,2	0,06		<0,0001	16	2,7	0,17			20	1,1	0,06		
Total	29	20	0,7			23	49,8	2,2			29	24,8	0,9		

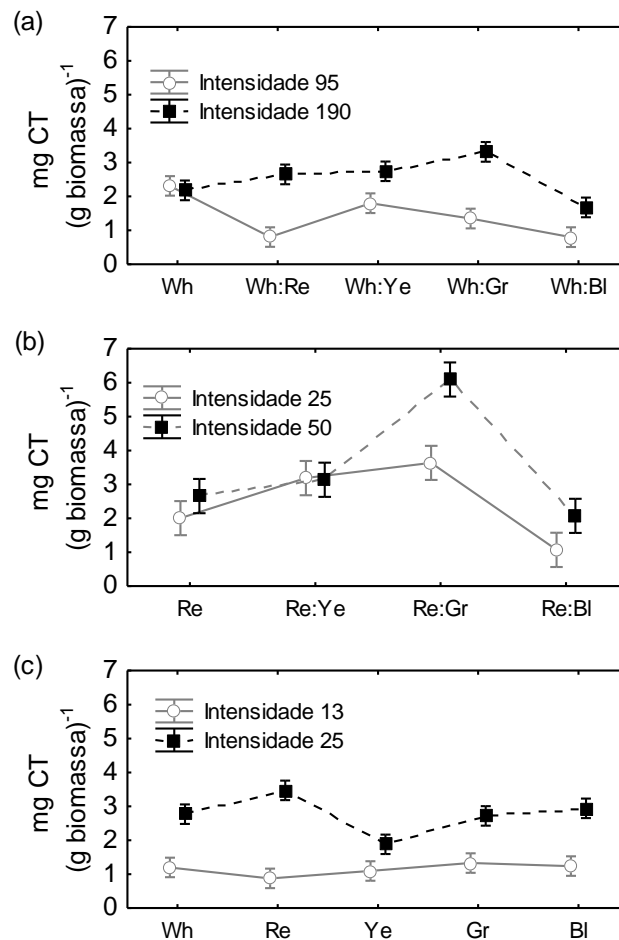
X₁: composição espectral; X₂: intensidade luminosa; g.l: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios. Biomassa (X₀). Experimento 1 e 2: X₀ = 0,03 g L⁻¹; 12 dias. Experimento 3: X₀ = 0,89 g L⁻¹; 6 dias. N = 3.

No Experimento 1, a maior concentração de CT ($3,31 \pm 0,26 \text{ mg g}^{-1}$) determinada na condição Wh:Gr-190 foi igual às mensuradas no Wh:Ye-190 ($2,74 \pm 0,37 \text{ mg g}^{-1}$) e no Wh:Re-190 ($2,65 \pm 0,19 \text{ mg g}^{-1}$) (Tabela 5.3-5).

Os cultivos desenvolvidos com $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Experimento 3) apresentaram a mesma produção de carotenoides, independente da composição espectral. Esta baixa energia fornecida foi suficiente para promover efeito em termos de biomassa (Figura 5.3-2c), mas não

foi satisfatória para aumentar à biossíntese de carotenoides (Figura 5.3-3c). A Tabela 5.3-5 mostra que a maior produção de carotenoides ($3,47 \pm 0,30 \text{ mg g}^{-1}$) observada com Re-25, foi estatisticamente igual à obtida com Bl-25 ($2,94 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$). O espectro de cor azul engloba a faixa de energia (440-485 nm) correspondente a da absorção de clorofilas, e a dos carotenoides como a luteína e o β -caroteno (NELSON; COX, 2014), fato que pode ter estimulado a síntese de carotenoides. Wagner, Steinweg e Posten (2016) em cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* na intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, observaram maior concentração de CT com luz verde ($19,87 \text{ mg g}^{-1}$), seguida da azul ($18,95 \text{ mg g}^{-1}$), visível ($17,05 \text{ mg g}^{-1}$) e vermelha ($15,02 \text{ mg g}^{-1}$).

Figura 5.3-3 - Média \pm IC (95%) referente ao valor de carotenoide total da *Tetradismus* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. (a) Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e testemunha Wh 100%; (b) Experimento 2, bicromático 50%:50% com testemunha Re 100%; e (c) Experimento 3, monocromático com testemunha Wh 100%



Visível (Wh); Vermelho (Re); Amarelo (Ye); Verde (Gr); Azul (Bl); Intensidade de luz em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. N = 3.
Fonte: O autor.

Tabela 5.3-5 - Carotenoides totais final (CT) (mg CT (gX)^{-1}), desvio padrão e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com *Tetrademus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

Experimento 1 (86,7%:13,3%)		Experimento 2 (50%:50%)		Experimento 3 (100%)	
Espectro	CT \pm DP	Espectro	CT \pm DP	Espectro	CT \pm DP
Wh:Bl-95	0,80 \pm 0,06 ^e	Re:Bl-25	1,07 \pm 0,12 ^e	Re-13	0,88 \pm 0,38 ^d
Wh:Re-95	0,80 \pm 0,10 ^e	Re-25	2,01 \pm 0,43 ^{d,e}	Ye-13	1,09 \pm 0,24 ^d
Wh:Gr-95	1,35 \pm 0,11 ^{d,e}	Re:Bl-50	2,07 \pm 0,21 ^{c,d,e}	Wh-13	1,20 \pm 0,13 ^{c,d}
Wh:Bl-190	1,68 \pm 0,28 ^{c,d}	Re-50	2,66 \pm 0,50 ^{b,c,d}	Bl-13	1,24 \pm 0,18 ^{c,d}
Wh:Ye-95	1,80 \pm 0,07 ^{c,d}	Re:Ye-50	3,14 \pm 0,83 ^{b,c,d}	Gr-13	1,33 \pm 0,19 ^{c,d}
Wh-190	2,18 \pm 0,33 ^{b,c}	Re:Ye-25	3,19 \pm 0,13 ^{b,c}	Ye-25	1,88 \pm 0,32 ^c
Wh-95	2,31 \pm 0,35 ^{b,c}	Re:Gr-25	3,63 \pm 0,27 ^b	Gr-25	2,72 \pm 0,20 ^b
Wh:Re-190	2,65 \pm 0,19 ^{a,b}	Re:Gr-50	6,09 \pm 0,29 ^a	Wh-25	2,77 \pm 0,18 ^b
Wh:Ye-190	2,74 \pm 0,37 ^{a,b}	-	-	Bl-25	2,94 \pm 0,08 ^{a,b}
Wh:Gr-190	3,31 \pm 0,26 ^a	-	-	Re-25	3,47 \pm 0,30 ^a

Wh:Gr-190: composto pelo espectro visível:verde com 190 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, etc. Biomassa (X). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias; médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Tukey, $\alpha = 0,05$). N = 3.

Com a composição Re:Gr na intensidade 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a *Tetrademus* sp. sintetizou 6,09 \pm 0,29 mg g^{-1} de carotenoides, maior produção registrada entre os Experimentos 1, 2 e 3. Kim et al. (2015), cultivaram a *Gracilaria tikvahiae* nas fontes de luz (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fluorescente; vermelho; verde; azul; vermelho:verde (50:50%); vermelho:azul (50:50%); verde:azul (50:50%); e vermelho:verde:azul nas respectivas proporções 40:40:20%; 40:20:40%; e 20:40:40%; e determinaram com “50% de luz vermelha e 50% de luz azul” a máxima produção de carotenoides ($>0,2 \text{ mg g}^{-1}$) e clorofila ($>1,6 \text{ mg g}^{-1}$), e a mínima taxa de crescimento específico ($\sim 6,2\% \text{ d}^{-1}$).

A menor produção de carotenoides (1,07 \pm 0,12 mg g^{-1}) estimada no Experimento 2 foi obtida com a composição espectral Re:Bl-25. A resposta à fotoestimulação é particular do metabolismo microalgal, Wagner, Steinweg e Posten (2016) estimaram 19,52 mg g^{-1} de carotenoides em cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* (25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sob luz Re:Bl na proporção 50:50%.

Com o espectro visível, a maior produção de carotenoides (2,77 \pm 0,18 mg g^{-1}) foi observada na intensidade de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no Experimento 3 (Tabela 5.3-5). A *Chlorella zofingiensis* cultivada em fotobiorreator com 245 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz visível e em condições de depleção de nitrogênio, produziu de 0,8 a 4,5 mg g^{-1} de carotenoides totais (MULDERS et al., 2014). Já as algas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* sintetizaram respectivamente 2,0 mg g^{-1} e 2,7 mg g^{-1} de CT quando cultivadas com 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

providos por lâmpadas fluorescentes (PATIAS et al., 2017). O gênero *Scenedesmus* sp. cultivado em luz visível com alta intensidade, $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostrou após 14 dias de cultivo, produção de $19,01 \pm 1,45 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ de carotenoides totais ou $2,08 \pm 0,03\%$ em peso seco (PŘIBYL et al., 2015). Enquanto a *Acutodesmus* sp. cultivada sob diferentes intensidades luminosas, $100 - 900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), apresentou concentração do carotenoide cantaxantina variável entre 0,65 e 0,85 mg g^{-1} de biomassa seca (GRAMA et al., 2014).

5.3.3 Clorofilas

A composição espectral, intensidade luminosa e a interação entre estes fatores promoveram efeitos significativos na concentração de clorofila *a* e clorofila *b*, nos Experimentos 1, 2 e 3 (Tabela 5.3-6).

Tabela 5.3-6 - ANOVA ($\alpha = 0,05$) dos fatores composição do espectro e intensidade luminosa para variável resposta clorofilas *a* e *b* dos cultivos de *Tetrademus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

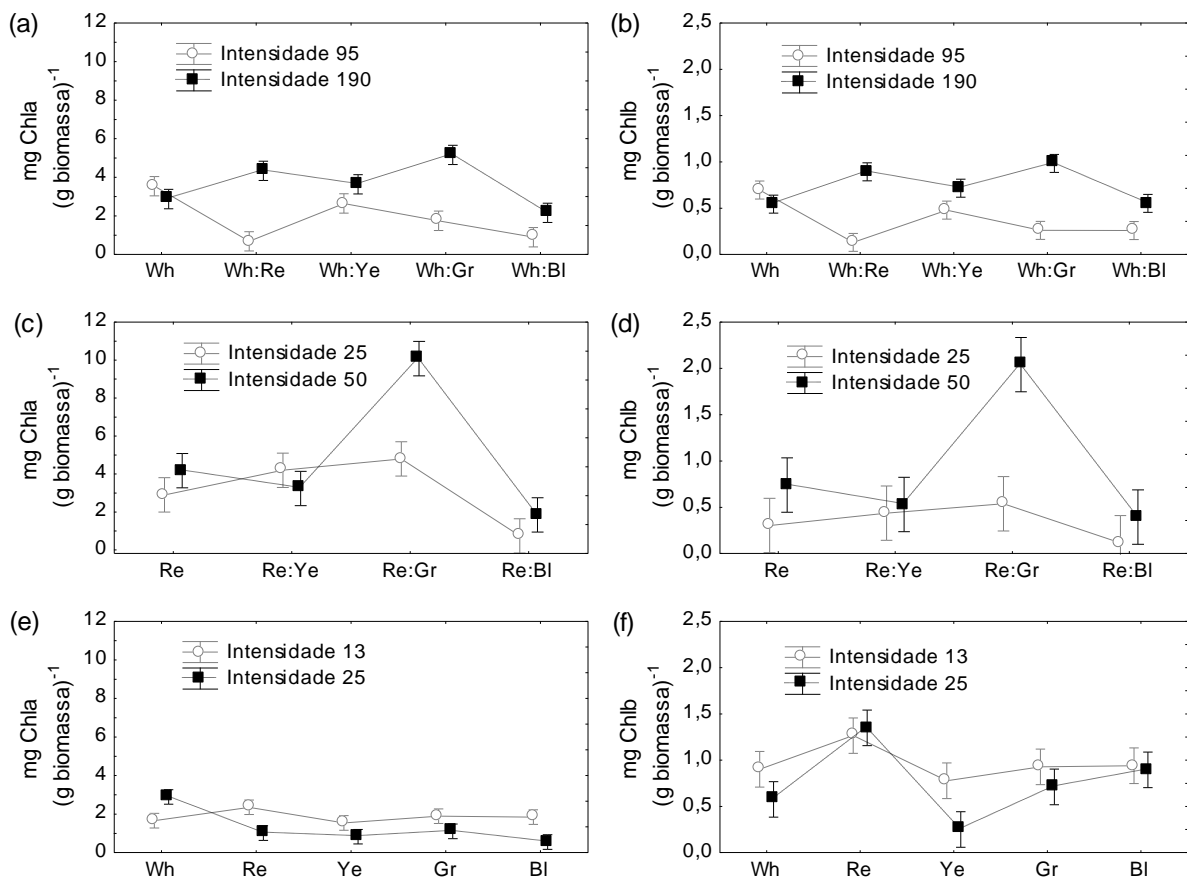
Fator	Experimento 1 (86,7%:13,3%)					Experimento 2 (50%:50%)					Experimento 3 (100%)				
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor
Clorofila a															
X ₁	4	14,5	3,6	20,8	<0,0001	3	116,7	38,9	71,2	<0,0001	4	4,8	1,2	12,2	<0,0001
X ₂	1	22,5	22,5	129,2	<0,0001	1	16,8	16,8	30,8	<0,0001	1	2,5	2,5	25,8	<0,0001
X ₁ :X ₂	4	19,6	4,9	28,1	<0,0001	3	30,6	10,2	18,7	<0,0001	4	6,7	1,7	16,8	<0,0001
Erro	20	3,5	0,17			16	8,8	0,6			20	2,0	0,10		
Clorofila b															
X ₁	4	0,2	0,05	8,0	0,0005	3	3,7	1,2	21,1	<0,0001	4	2,0	0,5	20,0	<0,0001
X ₂	1	1,0	1,0	159,3	<0,0001	1	2,0	2,0	34,8	<0,0001	1	0,3	0,3	12,5	0,0021
X ₁ :X ₂	4	0,9	0,2	33,1	<0,0001	3	1,8	0,6	10,4	0,0005	4	0,3	0,1	3,4	0,0298
Erro	20	0,1	0,01			16	0,9	0,06			20	0,5	0,03		

X₁: composição espectral; X₂: intensidade luminosa; g.l: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: soma de quadrados médios. F_c: F calculado. Biomassa (X). Experimento 1 e 2: X₀ = 0,03 g L^{-1} ; 12 dias. Experimento 3: X₀ = 0,89 g L^{-1} ; 6 dias. N = 3.

O aumento da intensidade luminosa promoveu aumento da concentração de clorofilas *a* e *b* nos Experimentos 1 e 2; e redução no Experimento 3 (Figura 5.3-4). A baixa intensidade luminosa ($13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pode ter estimulado a microalga a aumentar o número de centros de captação de energia (clorofilas) para suprir sua demanda metabólica. A redução da produção (ou degradação) de clorofila diante do aumento da intensidade luminosa foi observada no cultivo da *Dunaliella salina* ao elevar de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAMERS et al., 2010). A *Acutodesmus* sp. também apresentou concentração de clorofila *a* e *b*, decrescentes com o aumento da intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$^2 \text{ s}^{-1}$ (GRAMA et al., 2014). *Chlamydomonas reinhardtii* cultivada em luz visível apresentou redução da concentração de clorofilas ao elevar a intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($53,02 \text{ mgChla g}^{-1}$; $18,02 \text{ Chlb g}^{-1}$) para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($14,75 \text{ mgChla g}^{-1}$; $7,0 \text{ Chlb g}^{-1}$), mas leve aumento com intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($15,95 \text{ mgChla g}^{-1}$; $12,05 \text{ Chlb g}^{-1}$) (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016). Enquanto *Spirulina platensis* passou de $10,2 \text{ mg g}^{-1}$ para $13,2 \text{ mg g}^{-1}$ de clorofilas ao aumentar a intensidade de $2.750 \pm 250 \text{ lux}$ para $5.400 \pm 600 \text{ lux}$ (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012). *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, também aumentaram a produção de clorofilas com o aumento da irradiação de luz azul de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (DUARTE; COSTA, 2018).

Figura 5.3-4 - Média \pm IC (95%) referente ao valor de clorofila da *Tetrademus* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED. Experimento 1, bicromático 86,7%:13,3% e Wh 100% como tratamento controle: (a) clorofila **a**; (b) clorofila **b**. Experimento 2, bicromático 50%:50% com Re 100% como tratamento controle: (c) clorofila **a** (d) clorofila **b**; e Experimento 3, monocromático com Wh 100% como tratamento controle: Experimento 3: (e) clorofila **a** (f) clorofila **b**



Visível (Wh); Vermelho (Re); Amarelo (Ye); Verde (Gr); Azul (Bl); Intensidade de luz em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias. N = 3.
Fonte: O autor.

A Tabela 5.3-7 mostra que a maior produção de *Chla* ($10,08 \pm 0,75 \text{ g L}^{-1}$) e *Chlb* ($2,04 \pm 0,66 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida com a composição Re:Gr com $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa (Experimento 2), mesma condição que resultou maior concentração de CT (Tabela 5.3-5). Enquanto no Experimento 1, os maiores valores de clorofila *a* e *b* foram registrados com Wh:Gr-190 ($5,16 \pm 0,42 \text{ mg Chla g}^{-1}$; $0,98 \pm 0,03 \text{ mg Chlb g}^{-1}$) e Wh:Re-190 ($4,34 \pm 0,41 \text{ mg Chla g}^{-1}$; $0,89 \pm 0,05 \text{ mg Chlb g}^{-1}$). No Experimento 3, as maiores concentrações de *Chla* foram obtidas com as condições Wh-25 ($2,89 \pm 0,14 \text{ mg Chla g}^{-1}$) e Re-25 ($2,35 \pm 0,52 \text{ mg Chla g}^{-1}$). Este último também forneceu o maior valor de *Chlb* ($1,35 \pm 0,12 \text{ mg Chlb g}^{-1}$), entretanto, estatisticamente igual a outros 5 ensaios.

Tabela 5.3-7 - Clorofilas *a* (*Chla*) e *b* (*Chlb*) ($\text{mg Chl (g biomassa)}^{-1}$), desvio padrão (DP) e teste *Tukey* ($\alpha = 0,05$) relativos aos experimentos com *Tetradismus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED

Experimento 1 (86,7%:13,3%)			Experimento 2 (50%:50%)			Experimento 3 (100%)		
Espectro	<i>Chla</i> \pm DP	<i>Chlb</i> \pm DP	Espectro	<i>Chla</i> \pm DP	<i>Chlb</i> \pm DP	Espectro	<i>Chla</i> \pm DP	<i>Chlb</i> \pm DP
Wh:Re-95	$0,68 \pm 0,06^e$	$0,13 \pm 0,01^f$	Re:Bl-25	$0,74 \pm 0,06^d$	$0,11 \pm 0,01^b$	Bl-25	$0,55 \pm 0,06^e$	$0,89 \pm 0,07^{a,b}$
Wh:Bl-95	$0,90 \pm 0,08^e$	$0,26 \pm 0,03^{e,f}$	Re:Bl-50	$1,84 \pm 0,76^{c,d}$	$0,39 \pm 0,13^b$	Ye-25	$0,83 \pm 0,25^{d,e}$	$0,25 \pm 0,04^c$
Wh:Gr-95	$1,75 \pm 0,11^{d,e}$	$0,26 \pm 0,02^{e,f}$	Re-25	$2,90 \pm 0,56^{b,c}$	$0,30 \pm 0,05^b$	Re-25	$1,01 \pm 0,22^{c,d,e}$	$1,35 \pm 0,12^a$
Wh:Ye-95	$2,16 \pm 0,65^d$	$0,48 \pm 0,06^{d,e}$	Re:Ye-50	$3,24 \pm 1,07^{b,c}$	$0,53 \pm 0,03^b$	Gr-25	$1,10 \pm 0,15^{c,d,e}$	$0,71 \pm 0,13^{b,c}$
Wh-190	$2,64 \pm 0,15^{c,d}$	$0,54 \pm 0,13^{c,d}$	Re-50	$4,17 \pm 1,22^b$	$0,74 \pm 0,07^b$	Ye-13	$1,54 \pm 0,51^{b,c,d}$	$0,78 \pm 0,26^b$
Wh:Bl-190	$2,87 \pm 0,68^{c,d}$	$0,55 \pm 0,15^{c,d}$	Re:Ye-25	$4,20 \pm 0,11^b$	$0,44 \pm 0,03^b$	Wh-13	$1,66 \pm 0,05^{b,c,d}$	$0,90 \pm 0,07^{a,b}$
Wh-95	$3,54 \pm 0,60^{b,c}$	$0,70 \pm 0,12^{b,c,d}$	Re:Gr-25	$4,80 \pm 0,53^b$	$0,54 \pm 0,05^b$	Bl-13	$1,85 \pm 0,45^{b,c}$	$0,94 \pm 0,23^{a,b}$
Wh:Ye-190	$3,63 \pm 0,33^{b,c}$	$0,72 \pm 0,03^{b,c}$	Re:Gr-50	$10,08 \pm 0,75^a$	$2,04 \pm 0,66^a$	Gr-13	$1,89 \pm 0,28^{b,c}$	$0,93 \pm 0,14^{a,b}$
Wh:Re-190	$4,34 \pm 0,41^{a,b}$	$0,89 \pm 0,05^{a,b}$	-	-	-	Re-13	$2,35 \pm 0,52^{a,b}$	$1,27 \pm 0,26^a$
Wh:Gr-190	$5,16 \pm 0,42^a$	$0,98 \pm 0,03^a$	-	-	-	Wh-25	$2,89 \pm 0,14^a$	$0,58 \pm 0,04^{b,c}$

Wh:Gr-190: composto pelo espectro visível:verde com $190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa, etc. Biomassa (X_0). Experimento 1 e 2: $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. Experimento 3: $X_0 = 0,89 \text{ g L}^{-1}$; 6 dias; médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste *Tukey*, $\alpha = 0,05$). $N = 3$.

A síntese de clorofilas é dependente da espécie de microalga, a *Spirulina* sp. (procariótica) cultivada em diferentes fontes de luz, apresentou maior concentração de clorofilas, 8 mg L^{-1} , quando cultivada na luz vermelha com intensidade de $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (CHEN et al., 2010). Neste caso, em termos de mg L^{-1} , a luz vermelha também promoveu o maior resultado de concentração total de clorofilas, de $14,86 \text{ mg L}^{-1}$ no fotobiorreator Re-50 referente ao Experimento 2. O cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* na intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, promoveu concentração de *Chla* e *Chlb* elevadas nos reatores com luz vermelha ($40,82 \text{ mg Chla g}^{-1}$; $10,03 \text{ mg Chlb g}^{-1}$) e Re:Bl na proporção 50%:50% ($59,57 \text{ mg Chla g}^{-1}$; $20,18 \text{ mg Chlb g}^{-1}$) (WAGNER; STEINWEG; POSTEN, 2016).

5.3.4 Cultivo da *Tetrademus* sp. com composições espectrais Wh:Gr, Re:Gr e Re

Ao cultivar a *Tetrademus* sp. por 12 dias nos fotobiorreatores com Re; Wh:Gr e Re:Gr na intensidade de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi possível constatar que a síntese (mg g^{-1}) de carotenoides foi maior na primeira semana de cultivo, período de maior incidência de radiação por célula, e reduziu com o aumento da biomassa no fotobiorreator (efeito do sombreamento) (Tabela 5.3-8, Figura 5.3-5). As composições Re:Gr e Wh:Gr favoreceram a produção de CT e clorofilas, especialmente no 6º dia de cultivo. Entre os resultados do 9º dia, a composição Re:Gr resultou a maior produção de clorofilas em comparação com os demais arranjos espectrais (Tabela 5.3-8). A variação da concentração de clorofila no tempo sugere sua degradação do 6º para o 9º dia, diante da excessiva intensidade luminosa, e síntese de clorofilas do 9º ao 12º dia com a elevação da biomassa (e da taxa de sombreamento celular). Contudo, a avaliação dos resultados de carotenoides e clorofilas em $\mu\text{g mL}^{-1}$, sugere o predomínio de aumento da concentração de pigmentos com o tempo de cultivo. Duarte e Costa (2018) também observaram tendência de crescimento desses pigmentos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, ao cultivá-las por 18 dias com energia luminosa na região espectral azul.

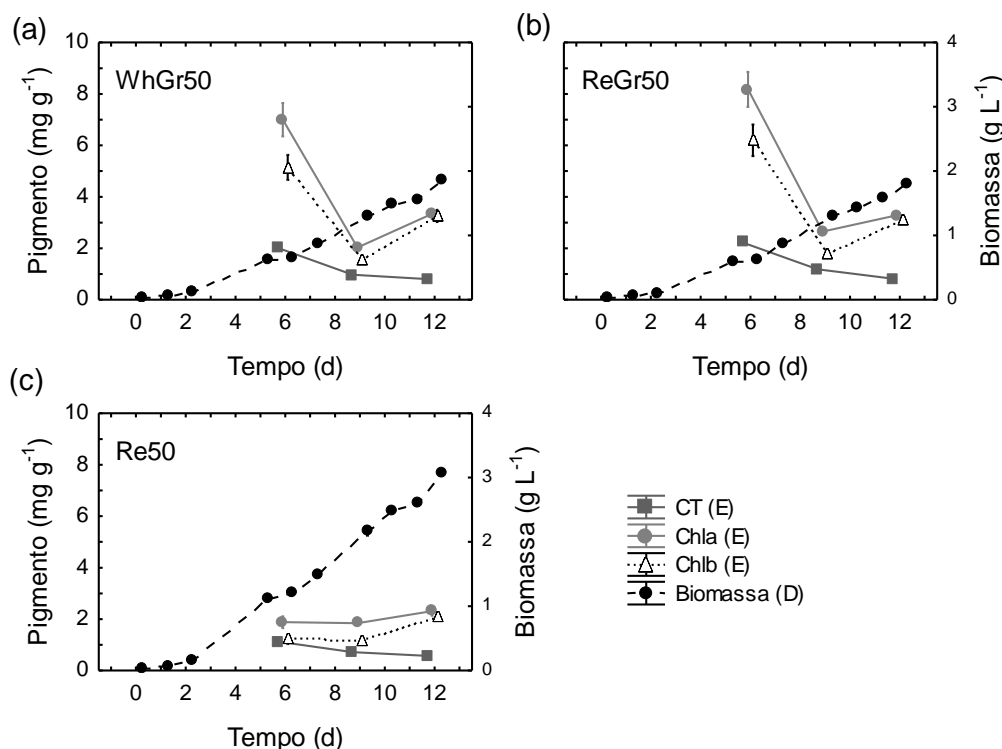
Tabela 5.3-8 - Clorofilas *a* (Chla), clorofila *b* (Chlb) e carotenoides totais (CT) ($\text{mg pigmento (g biomassa)}^{-1}$) e teste *Tukey* ($\alpha = 0,05$) relativos aos cultivos da *Tetrademus* sp. em composições espectrais de maior produção de carotenoides nos experimentos anteriores

Espectro	6º dia (N = 3)			9º dia (N = 2)			12º dia (N = 3)		
	Chla	Chlb	TC	Chla	Chlb	TC	Chla	Chlb	TC
WhGr50 (86,7:13,3%)	$7,0 \pm 1,2^a$	$5,1 \pm 0,9^a$	$2,0 \pm 0,2^a$	$2,0 \pm 0,2^b$	$1,6 \pm 0,004^b$	$1,0 \pm 0,2^a$	$3,3 \pm 0,3^a$	$3,3 \pm 0,4^a$	$0,8 \pm 0,02^a$
ReGr50 (50:50%)	$8,2 \pm 1,2^a$	$6,2 \pm 1,1^a$	$2,2 \pm 0,04^a$	$2,7 \pm 0,1^a$	$1,8 \pm 0,01^a$	$1,2 \pm 0,1^a$	$3,3 \pm 0,1^a$	$3,1 \pm 0,2^a$	$0,8 \pm 0,03^a$
Re50 (100%)	$1,9 \pm 0,4^b$	$1,2 \pm 0,3^b$	$1,1 \pm 0,1^b$	$1,8 \pm 0,05^b$	$1,2 \pm 0,03^c$	$0,7 \pm 0,03^b$	$2,3 \pm 0,3^b$	$2,1 \pm 0,3^b$	$0,6 \pm 0,05^b$

Intensidade luminosa: $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Wh - visível; Gr - verde; Re - vermelho. $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; 12 dias. N = 2 ou 3. Informações de biomassa podem ser consultadas na Tabela C1 em Apêndice C.

A continuidade da pesquisa, seguiu com o cultivo da *Tetrademus* sp. sob a composição espectral Re:Gr, por promover maior produção de carotenoides ($2,22 \text{ mg g}^{-1}$), apesar de estatisticamente igual a estimada com a composição Wh:Gr ($2,01 \text{ mg g}^{-1}$). O espectro vermelho estimulou o crescimento celular da microalga, contudo, a combinação com a região espectral verde (Re:Gr) desencadeou a síntese de pigmentos.

Figura 5.3-5 - Biomassa (ordenada direita) e carotenoides totais (CT), clorofila *a* (Chla) e clorofila *b* (Chlb) (ordenada esquerda) para o cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator tubular vertical irradiado por LED



Visível (Wh); Vermelho (Re); Verde (Gr). Intensidade luminosa em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Biomassa inicial, $X_0 = 0,03 \text{ g L}^{-1}$; Tempo de duração do cultivo de 12 dias. $N = 2$ ou 3 .

Fonte: O autor.

A região espectral de absorção de carotenoides compreende a faixa de 400-550 nm (MASOJÍDEK; KOBLÍŽEK; TORZILLO, 2004), enquanto a composição vermelha:verde engloba a faixa de 480-620 nm (Figura 4.4-3). Apesar da sobreposição parcial entre as duas faixas espectrais, sugere-se que houve indução da síntese de CT pelo estresse luminoso, não necessariamente em toda a faixa espectral de absorção de carotenoides. Outras pesquisas também encontraram maior concentração de CT em microalgas cultivadas em regiões espectrais diferentes da faixa típica de absorção dos carotenoides. Wagner, Steinweg e Posten (2016) cultivaram a *Chlamydomonas reinhardtii* na intensidade de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e observaram maior concentração de CT com luz verde ($19,87 \text{ mg g}^{-1}$), seguida da azul ($18,95 \text{ mg g}^{-1}$), visível ($17,05 \text{ mg g}^{-1}$) e vermelha ($15,02 \text{ mg g}^{-1}$), enquanto Kim et al. (2015) cultivaram a *Gracilaria tikvahiae* e verificaram maior síntese de carotenoides com a irradiação de luz na faixa do vermelho, comparativamente ao azul. Para Varela et al. (2015), a condição de luminosidade em excesso causa estresse na microalga, aumentando a produção da enzima fitoeno sintase (PSY) catalisadora da condensação de duas moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGPP) com formação de fitoeno, molécula precursora da formação

de todos os carotenoides. Segundo Alcaíno et al. (2016), Lamers et al. (2010), Markou e Nerantzis (2013) e Přibyl et al. (2015), a elevação da síntese de carotenoides está relacionada ao mecanismo de defesa da microalga à condição de estresse.

5.4 EXPERIMENTO 4 – PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

A microalga *Tetradismus sp.* foi cultivada por 14 dias em fotobiorreatores do tipo placa plana irradiado por LED na composição 50%:50% de luz na região espectral vermelha:verde, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman. Foram avaliadas seis respostas (biomassa, astaxantina, β -caroteno, licopeno, clorofila *a* e clorofila *b*), por meio da variação de 5 fatores, totalizando 12 ensaios únicos e 4 ensaios no ponto central.

5.4.1 Biomassa

A Tabela 5.4-1 apresenta os resultados do planejamento experimental PB para a resposta biomassa, medida diariamente ao longo do período de cultivo da *Tetradismus sp.*

Tabela 5.4-1 - Matriz do planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, seus códigos e concentração de biomassa determinada em 14 dias de cultivo da *Tetradismus sp.* em fotobiorreator placa plana irradiado por LED

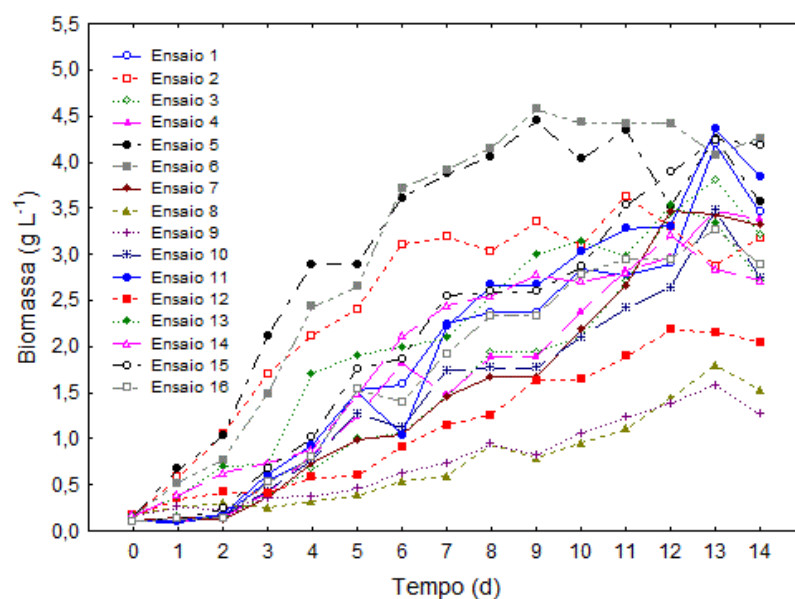
Ens ²	Fatores ¹					Resposta de biomassa (g L ⁻¹) ao longo do tempo													
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°
1	510(1)	12(-1)	9(1)	0(-1)	0(-1)	0,10	0,15	0,55	0,80	1,54	1,59	2,24	2,37	2,37	2,83	2,78	2,90	4,20	3,46
2	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0(-1)	0,58	1,05	1,70	2,12	2,40	3,11	3,19	3,04	3,35	3,09	3,63	3,30	2,87	3,18
3	85(-1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	0,15	0,14	0,37	0,67	0,99	1,06	1,45	1,94	1,94	2,10	2,70	3,44	3,80	3,21
4	510(1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	0,10	0,14	0,42	0,82	1,24	1,82	1,47	1,89	1,89	2,38	2,83	2,97	3,48	3,37
5	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	0,67	1,03	2,12	2,89	2,89	3,61	3,87	4,06	4,45	4,03	4,35	3,52	4,25	3,57
6	510(1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	0,52	0,77	1,49	2,43	2,65	3,71	3,92	4,15	4,57	4,43	4,42	4,42	4,07	4,26
7	85(-1)	24(1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	0,14	0,12	0,36	0,73	0,98	1,05	1,45	1,67	1,67	2,18	2,66	3,46	3,43	3,32
8	85(-1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0,74(1)	0,28	0,29	0,25	0,32	0,38	0,53	0,59	0,94	0,79	0,95	1,11	1,44	1,79	1,53
9	85(-1)	12(-1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	0,26	0,23	0,35	0,38	0,45	0,63	0,73	0,94	0,82	1,06	1,23	1,39	1,58	1,26
10	510(1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0,74(1)	0,11	0,16	0,42	0,78	1,27	1,12	1,74	1,77	1,77	2,10	2,42	2,64	3,48	2,75
11	85(-1)	24(1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	0,12	0,18	0,61	0,93	1,52	1,04	2,22	2,66	2,66	3,03	3,28	3,31	4,36	3,84
12	85(-1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	0,35	0,42	0,41	0,58	0,60	0,91	1,14	1,26	1,63	1,64	1,89	2,18	2,16	2,05
13	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	0,37	0,70	0,72	1,71	1,90	1,99	2,09	2,55	3,00	3,14	2,98	3,53	3,34	2,71
14	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	0,39	0,63	0,73	0,88	1,48	2,11	2,44	2,55	2,78	2,70	2,80	3,21	2,83	2,71
15	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	0,13	0,24	0,68	1,01	1,76	1,87	2,55	2,59	2,59	2,86	3,53	3,89	4,24	4,19
16	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	0,13	0,14	0,53	0,79	1,53	1,40	1,92	2,33	2,33	2,79	2,95	2,95	3,27	2,89

¹Fatores: X₁ = Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); X₂ = Fotoperíodo (h); X₃ = pH, X₄ = NaCl (g L⁻¹), X₅ = Nitrogênio (g L⁻¹);
²Ensaios; N= 2 ou 3.

Conforme a Tabela 5.4-1, os cultivos desenvolvidos no ensaio 5 (sob as condições de 510 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24 h de fotoperíodo, 5 de pH, 1,38 g L⁻¹ NaCl, e 0,74 g L⁻¹ de incremento de nitrogênio), e ensaio 6, (com 510 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 24 h, pH = 9, sem adição de

NaCl e com $0,74 \text{ g L}^{-1}$ de nitrogênio), promoveram as maiores concentrações de biomassa ($4,45 \text{ g L}^{-1}$ e $4,57 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente) durante o 9º dia de cultivo da microalga, a partir do qual inicia-se a fase de saturação da curva de crescimento. Figura 5.4-1 ilustra a evolução diária do crescimento da microalga ao longo do período avaliado.

Figura 5.4-1 - Crescimento em biomassa da microalga *Tetradismus* sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo um planejamento experimental Plackett-Burman



Ensaio 1: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=0$, $X_5=0$; Ensaio 2: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0$; Ensaio 3: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=0$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 4: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0$; Ensaio 5: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 6: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=0$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 7: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0$; Ensaio 8: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=9$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 9: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=1,38 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 10: $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=0$, $X_5=0,74 \text{ g L}^{-1}$; Ensaio 11: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=24 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=0$, $X_5=0$; Ensaio 12: $X_1=85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$, $X_3=5$; $X_4=0$, $X_5=0$; Ensaio 13, 14, 15 e 16: $X_1=255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $X_2=18 \text{ h}$, $X_3=7$; $X_4=0,69 \text{ g L}^{-1}$, $X_5=0,49 \text{ g L}^{-1}$. N= 2 ou 3. Fonte: O autor.

A análise da Figura 5.4-1 permite sugerir que as condições praticadas nos ensaios 2, 5 e 6, foram favoráveis ao crescimento da microalga, como sugere a fase exponencial respectiva dos ensaios. Em contrapartida, as condições testadas nos ensaios 8, 9 e 12, promoveram baixo crescimento da microalga, e conseqüentemente, menores valores de biomassa ao final de 14 dias de cultivo. O comportamento metabólico da microalga, diante dos ensaios supracitados, sugere que a emissão contínua de grande quantidade de energia luminosa, beneficiou o crescimento da microalga em massa, dado que os fatores energia (X_1) e fotoperíodo (X_2) são os únicos em nível máximo (+1) simultaneamente presentes nos ensaios 2, 5 e 6; mesmos fatores que estão simultaneamente presentes em nível mínimo (-1) nos ensaios 8, 9 e 12.

A ANOVA sugeriu efeito significativo (p -valor $< 0,10$) dos fatores energia e fotoperíodo no crescimento celular da microalga, ao longo de quase todo o período avaliado (energia: 3° ao 13° dia; e fotoperíodo: 3° ao 14° dia); enquanto os demais fatores exerceram efeitos em dias específicos (pH: 3° dia; NaCl: 3°, 8° e 10° dia; e nitrogênio: 3° dia). A Tabela 5.4-2 contém o p -valor calculado para cada fator ao longo de 14 dias de cultivo.

Tabela 5.4-2 - P -valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta biomassa medida diariamente, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores

Dia	p -valor				
	Energia (X_1)	Fotoperíodo (X_2)	pH (X_3)	NaCl (X_4)	N (X_5)
0	1,000000	1,000000	0,391002	0,391002	0,391002
1	0,201352	0,139811	0,194286	0,256983	0,311537
2	0,138366	0,142910	0,230083	0,358660	0,592525
3	0,000886	0,000948	0,006588	0,024770	0,057752
4	0,022861	0,024144	0,279687	0,510704	0,375975
5	0,001897	0,003140	0,141832	0,766089	0,630834
6	0,002896	0,007569	0,586863	0,307184	0,364505
7	0,003302	0,004149	0,185751	0,264089	0,608130
8	0,000308	0,000257	0,157549	0,028800	0,111297
9	0,002834	0,002417	0,235124	0,137403	0,487713
10	0,001261	0,001259	0,917732	0,034643	0,518534
11	0,006342	0,004114	0,804005	0,224861	0,504183
12	0,049080	0,011217	0,202918	0,141314	0,433277
13	0,084172	0,058442	0,385931	0,107613	0,515252
14	0,118880	0,067908	0,387348	0,270493	0,363830

Em negrito = p -valor significativo ($\alpha = 0,10$). Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

A Tabela 5.4-2, sugere que a partir do 3° dia de cultivo da microalga *Tetradismus* sp., os fatores energia e fotoperíodo promoveram efeitos significativos (p -valor $< 0,10$) no crescimento celular da microalga. Logo, o aumento da quantidade de energia luminosa irradiada (de 85 para 510 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e do tempo desta irradiação (de 12 para 24 h), promoveram condições favoráveis ao crescimento da microalga em massa (Figura 5.4-1).

Nos dias em que outros fatores, além da energia e do fotoperíodo, foram significativos, a análise acusou falta de ajuste. Este fato foi observado no 3°, 8° e 10° dias de cultivo da microalga, em que os dados apresentaram falta de ajuste com p -valor = 0,031957; p -valor = 0,017567; e p -valor = 0,059638, respectivamente.

5.4.2 Carotenoides

As Tabelas 5.4-3, 5.4-4 e 5.4-5 possuem os resultados de astaxantina, β -caroteno e licopeno, medidos diariamente a partir do 3º dia de cultivo, até o 12º dia. Conforme as Tabelas 5.4-3, 5.4-4 e 5.4-5, as condições experimentais praticadas nos ensaios 3, 10, 11, 15 e 16, favoreceram a síntese de astaxantina, β -caroteno e licopeno pela microalga *Tetrademus* sp. entre os dias 4 e 5. Com exceção dos ensaios 15 e 16 que correspondem a experimentos no ponto central, os ensaios 3, 10 e 11 possuem em comum a ausência de NaCl. Os ensaios 3 e 11 apresentam a mesma condição de intensidade luminosa ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de fotoperíodo (24 h); enquanto o ensaio 10 foi desenvolvido com 6 vezes mais energia ($510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), porém com a metade do fotoperíodo (12 h). A irradiação de energia com elevada intensidade luminosa por um longo período de tempo, como ensaios 2, 5 e 6 ($510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24 h), sugere efeito inibidor da síntese de carotenoides pela microalga, com valores de $2,09 \pm 1,04 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina, $1,89 \pm 1,26 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno e de $1,10 \pm 0,27 \text{ mg g}^{-1}$ de licopeno. Esta baixa síntese de carotenoides pode estar relacionada às condições de luminosidade favoráveis ao crescimento em massa da microalga, com biomassa média para o período de cultivo de $2,62 \pm 0,93 \text{ g L}^{-1}$; $3,24 \pm 1,20 \text{ g L}^{-1}$; $3,27 \pm 1,43 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 5.4-3 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de astaxantina em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3º ao 12º dia de cultivo

Ens ¹	Fatores ²					Resposta de astaxantina (mg g^{-1}) ao longo do tempo										
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	Média \pm DP
1	510(1)	12(-1)	9(1)	0(-1)	0(-1)	3,21	5,41	5,00	4,53	3,30	4,04	4,24	3,69	4,00	4,61	4,20 \pm 0,71
2	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0(-1)	4,33	3,52	2,48	2,12	1,60	1,56	1,36	1,14	0,76	1,13	2,00 \pm 1,14
3	85(-1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	2,63	6,42	5,72	4,81	4,25	4,00	4,68	3,77	4,55	6,10	4,69 \pm 1,15
4	510(1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	2,64	5,18	5,08	4,61	3,85	4,97	4,56	3,60	3,73	3,95	4,22 \pm 0,80
5	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	4,17	3,92	2,49	1,61	2,06	1,66	2,08	1,25	1,39	1,26	2,19 \pm 1,06
6	510(1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	3,71	4,05	2,02	2,39	1,79	1,35	1,85	1,43	1,02	1,31	2,09 \pm 1,02
7	85(-1)	24(1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	2,02	5,91	4,36	4,65	3,85	4,20	5,77	4,90	4,30	4,91	4,49 \pm 1,09
8	85(-1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0,74(1)	2,28	2,68	2,50	1,16	3,82	3,66	2,99	3,18	2,90	2,59	2,78 \pm 0,75
9	85(-1)	12(-1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	3,45	3,24	3,66	3,09	3,83	3,63	3,10	3,35	2,50	3,38	3,32 \pm 0,38
10	510(1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0,74(1)	2,32	6,69	4,93	4,61	3,86	4,32	4,76	3,65	2,92	3,92	4,20 \pm 1,20
11	85(-1)	24(1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	3,23	8,09	6,44	4,33	4,02	3,49	4,55	4,26	4,80	5,14	4,84 \pm 1,45
12	85(-1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	2,39	2,63	3,21	2,98	4,50	4,11	3,60	4,30	4,03	3,22	3,50 \pm 0,72
13	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	3,66	2,82	3,40	3,27	2,03	1,15	1,50	1,12	1,68	1,44	2,21 \pm 0,99
14	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	2,78	3,62	2,70	2,47	3,07	2,73	1,34	2,13	2,90	1,55	2,53 \pm 0,69
15	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	4,11	6,08	7,67	4,48	2,99	4,24	4,53	4,42	4,69	4,28	4,75 \pm 1,27
16	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	3,21	6,36	6,35	4,02	3,63	3,95	4,00	4,02	3,45	2,65	4,16 \pm 1,23

¹Ensaios; ²Fatores: X₁ = Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); X₂ = Fotoperíodo (h); X₃ = pH, X₄ = NaCl (g L^{-1}), X₅ = Nitrogênio (g L^{-1}). N = 1. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Tabela 5.4-4 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de β -caroteno em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3° ao 12° dia de cultivo

Ens ¹	Fatores ²					Resposta de β -caroteno (mg g ⁻¹) ao longo do tempo											
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	Média ± DP	
1	510(1)	12(-1)	9(1)	0(-1)	0(-1)	3,01	4,05	4,17	3,92	3,00	3,09	2,79	2,31	3,46	3,72	3,35 ± 0,61	
2	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0(-1)	4,85	3,67	2,35	1,99	1,37	1,46	1,20	1,04	0,69	0,70	1,93 ± 1,36	
3	85(-1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	2,46	5,46	4,89	4,21	3,90	3,44	3,55	3,09	3,99	5,15	4,01 ± 0,94	
4	510(1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	2,41	3,92	4,05	4,24	3,56	4,46	3,50	3,15	3,21	3,44	3,59 ± 0,60	
5	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	4,45	4,19	2,34	0,96	1,81	1,50	1,79	1,05	1,17	0,78	2,00 ± 1,31	
6	510(1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	4,10	4,27	1,93	2,16	1,59	1,32	1,64	1,23	0,87	0,81	1,99 ± 1,23	
7	85(-1)	24(1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	1,90	4,85	3,70	4,08	3,68	3,68	3,99	3,96	3,75	4,31	3,79 ± 0,76	
8	85(-1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0,74(1)	2,69	3,38	2,59	3,00	3,41	3,30	2,69	2,76	2,51	1,60	2,79 ± 0,54	
9	85(-1)	12(-1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	4,05	3,97	3,10	3,08	3,69	3,43	2,83	2,89	2,16	2,09	3,13 ± 0,68	
10	510(1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0,74(1)	2,47	5,19	4,04	4,19	3,48	3,57	3,49	3,31	2,57	3,24	3,56 ± 0,79	
11	85(-1)	24(1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	2,97	6,39	5,16	3,77	3,41	3,16	2,95	3,65	4,18	4,33	4,00 ± 1,08	
12	85(-1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	2,88	2,95	2,83	3,15	4,19	3,68	3,37	3,72	3,49	1,99	3,23 ± 0,61	
13	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	4,34	3,32	3,53	3,23	1,85	1,18	1,51	1,07	1,60	0,89	2,25 ± 1,23	
14	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	3,50	4,24	3,57	2,47	2,29	2,40	1,44	1,82	2,48	0,96	2,52 ± 1,01	
15	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	3,76	4,54	6,26	4,01	2,78	3,65	2,78	3,91	3,80	3,59	3,91 ± 0,98	
16	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	3,03	4,82	5,55	3,65	3,25	3,23	3,04	3,67	2,94	2,23	3,54 ± 0,97	

¹Ensaio; ²Fatores: X₁ = Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); X₂ = Fotoperíodo (h); X₃ = pH, X₄ = NaCl (g L⁻¹), X₅ = Nitrogênio (g L⁻¹). N = 1. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Tabela 5.4-5 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman contendo os fatores, códigos e concentração de licopeno em massa do pigmento por biomassa, estimada do 3° ao 12° dia de cultivo

Ens ¹	Fatores ²					Resposta de licopeno (mg g ⁻¹) ao longo do tempo											
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	Média ± DP	
1	510(1)	12(-1)	9(1)	0(-1)	0(-1)	1,64	2,78	2,62	2,41	1,75	2,09	2,08	2,21	2,10	2,39	2,21 ± 0,36	
2	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0(-1)	2,37	1,88	1,36	1,15	0,82	0,79	0,69	0,60	0,40	0,58	1,06 ± 0,64	
3	85(-1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	1,29	3,38	3,00	2,53	2,26	2,16	2,43	1,81	2,41	3,23	2,45 ± 0,64	
4	510(1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	1,34	2,68	2,62	2,42	2,04	2,63	2,33	1,92	1,96	2,01	2,20 ± 0,42	
5	510(1)	24(1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	2,20	2,10	1,32	0,86	1,06	0,84	1,07	0,65	0,72	0,65	1,15 ± 0,57	
6	510(1)	24(1)	9(1)	0(-1)	0,74(1)	2,00	2,17	1,09	1,29	0,91	0,68	0,95	0,74	0,53	0,67	1,10 ± 0,56	
±7	85(-1)	24(1)	9(1)	1,38(1)	0(-1)	1,01	3,08	2,35	2,43	2,03	2,27	2,89	2,56	2,28	2,61	2,35 ± 0,56	
8	85(-1)	12(-1)	9(1)	1,38(1)	0,74(1)	1,21	1,52	1,59	1,64	1,99	1,91	1,61	1,70	1,55	1,38	1,61 ± 0,23	
9	85(-1)	12(-1)	5(-1)	1,38(1)	0,74(1)	1,87	1,77	1,90	1,72	1,97	1,91	1,60	1,77	1,32	1,79	1,76 ± 0,19	
10	510(1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0,74(1)	1,19	3,44	2,56	2,42	2,01	2,27	2,40	1,93	1,54	2,00	2,18 ± 0,61	
11	85(-1)	24(1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	1,69	4,19	3,41	2,30	1,05	1,87	2,21	2,26	2,54	2,70	2,42 ± 0,88	
12	85(-1)	12(-1)	5(-1)	0(-1)	0(-1)	1,31	1,43	1,69	1,67	2,35	2,18	1,76	2,30	2,15	1,72	1,86 ± 0,37	
13	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	1,97	1,62	1,93	1,80	1,05	0,58	0,77	0,58	0,87	0,75	1,19 ± 0,57	
14	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	1,52	2,02	1,43	1,35	1,49	1,42	1,12	1,10	1,50	0,79	1,37 ± 0,33	
15	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	2,13	3,11	3,98	2,40	1,60	2,20	2,15	2,33	2,45	2,25	2,46 ± 0,65	
16	255(0)	18(0)	7(0)	0,69(0)	0,49(0)	1,63	3,28	3,35	2,17	1,94	2,03	2,06	2,13	1,84	1,38	2,18 ± 0,64	

¹Ensaio; ²Fatores: X₁ = Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); X₂ = Fotoperíodo (h); X₃ = pH, X₄ = NaCl (g L⁻¹), X₅ = Nitrogênio (g L⁻¹). N = 1. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

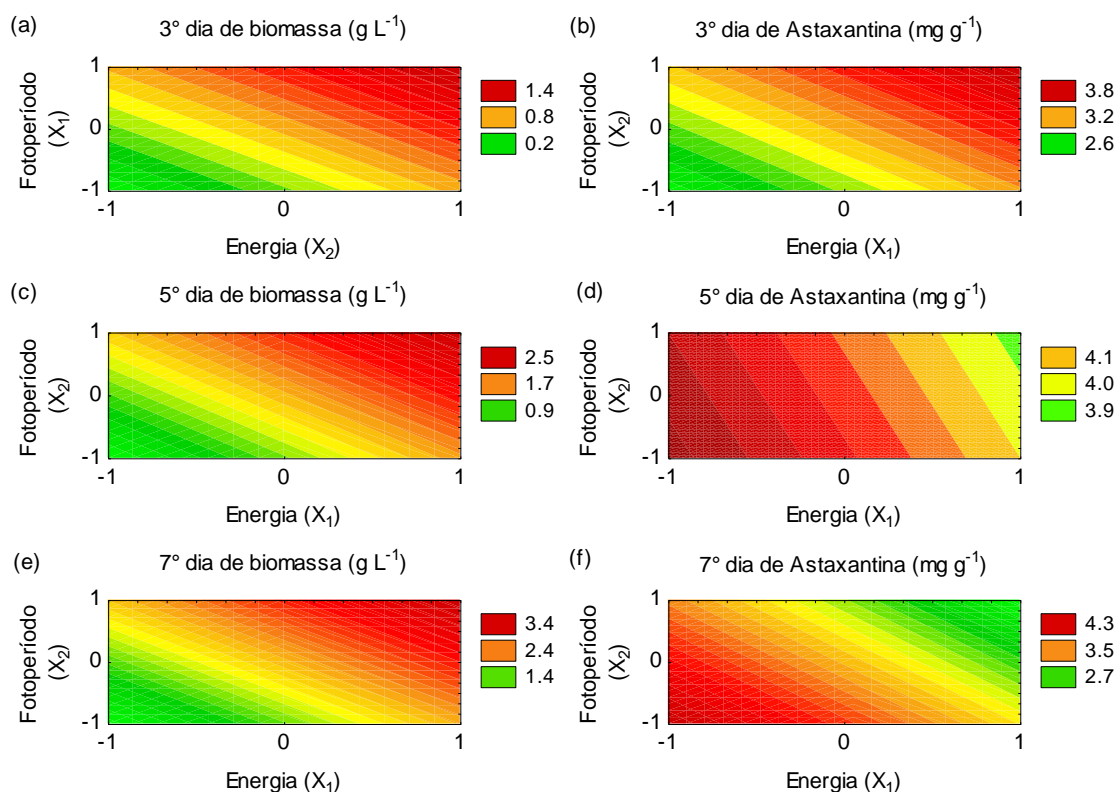
A avaliação estatística dos carotenoides permite sugerir que os fatores exerceram efeitos similares na síntese dos biopigmentos astaxantina, β -caroteno e licopeno, conforme Tabelas D1, D2 e D3 em Apêndice D, com influência especialmente dos fatores intensidade luminosa e fotoperíodo. Apesar do predomínio de efeitos não significativos (Tabelas D1, D2 e D3 em Apêndice D), observa-se do 3º ao 7º dia de cultivo, a inversão da tendência de síntese de carotenoides, conforme Tabela 5.4-6 e Figura 5.4-2 que apresenta este comparativo entre biomassa e astaxantina.

Tabela 5.4-6 - Efeito e *p*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para biomassa, astaxantina, β -caroteno e licopeno, determinadas no 3º e 7º dias de cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED

Resposta	3º dia				7º dia			
	Energia (X ₁)		Fotoperíodo (X ₂)		Energia (X ₁)		Fotoperíodo (X ₂)	
	Efeito	<i>p</i> -valor	Efeito	<i>p</i> -valor	Efeito	<i>p</i> -valor	Efeito	<i>p</i> -valor
Biomassa	0,7243	0,0009	0,7079	0,0009	1,4743	0,0033	1,3627	0,0041
Astaxantina	0,7318	0,1151	0,6319	0,1536	-1,3011	0,0424	-0,9325	0,0926
β -caroteno	0,7226	0,1066	0,5370	0,1882	-1,2423	0,0381	-0,9299	0,0766
Licopeno	0,3944	0,0968	0,3339	0,1363	-0,5089	0,0958	-0,6633	0,0521

Até o 3º dia de cultivo, período em que todos os experimentos possuíam baixa concentração de biomassa, as respostas de carotenoides determinadas nos experimentos 2, 5 e 6 (níveis máximos de energia, $510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e fotoperíodo, 24 h) influenciaram a resposta do planejamento experimental; dado que a incidência de energia luminosa promove estresse na microalga, e esta sintetiza carotenoides como um mecanismo de defesa ao estresse (ALCAÍNO et al., 2016; LAMERS et al., 2010; MARKOU; NERANTZIS, 2013; PŘIBYL et al., 2015). A partir do 3º dia de cultivo, com o crescimento exponencial da microalga nestes experimentos (2, 5 e 6), ocorreu aumento da taxa de sombreamento interna (de um indivíduo pelo outro), minimizando o efeito de estresse causado pela incidência de energia luminosa. Simultaneamente, nos experimentos 8, 9 e 12 (com níveis inferiores de intensidade de energia, $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e fotoperíodo, 12 h) ocorreu baixa velocidade de crescimento celular e, conseqüentemente, menor efeito do sombreamento interno no metabolismo microalgal de síntese de carotenoides. Assim, toda a energia irradiada nos experimentos 8, 9 e 12, promoveu estresse na microalga ao longo de todo o período de cultivo, diante de um crescimento celular praticamente linear. A Figura 5.4-2 ilustra graficamente este comportamento de concentração de biomassa e do pigmento astaxantina, por exemplo.

Figura 5.4-2 - Superfícies de resposta de biomassa: (a) 3° dia, (b) 5° dia, (c) 7° dia; Superfícies de resposta de astaxantina: (d) 3° dia, (e) 5° dia, (f) 7° dia



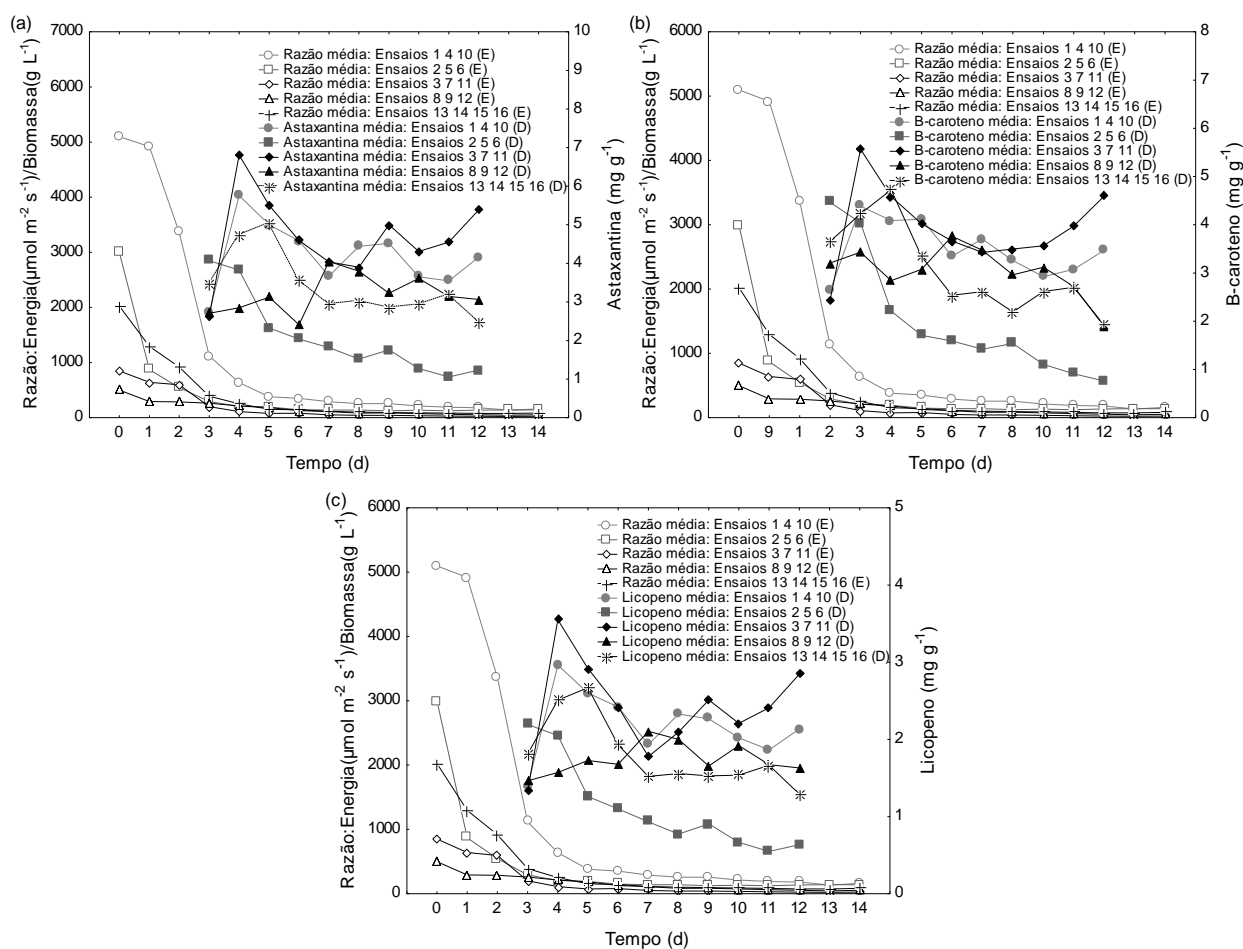
Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.
Fonte: O autor.

No caso da astaxantina, observa-se pela Figura 5.4-2b, que no 3° dia de cultivo (1° dia de medição dos pigmentos), há uma tendência semelhante à observada para a biomassa (Figura 5.4-2a), ou seja, há o aumento do pigmento/biomassa com o aumento dos níveis de energia e fotoperíodo. Esta tendência é significativa para a resposta em biomassa (Tabela 5.4-2), e não significativa para a resposta astaxantina (Tabela 5.4-6), mas destaca-se sua proximidade ao limite crítico de aceitação (semelhante para β -caroteno e licopeno, Tabela 5.4-6 ou Tabelas D1, D2 e D3 em Apêndice D). A partir do 4° dia de cultivo, observa-se que a redução dos níveis de energia e fotoperíodo promovem maior síntese de astaxantina (Figura 5.4-2d), de tal modo que esta nova tendência torna-se significativa no 7° dia de cultivo (Tabela 5.4-6). Esta nova tendência, também foi observada para os demais carotenoides, β -caroteno e licopeno, e para as clorofilas *a* e *b* (Tabelas D4 e D5 em Apêndice D).

É bastante provável que até o 3° dia de cultivo, período em que todos os ensaios possuíam baixa concentração de biomassa, as respostas de carotenoides determinadas nos ensaios 2, 5 e 6 (maior nível de energia e fotoperíodo) tenham influenciado a resposta do

planejamento experimental adotado. Dado que a maior incidência de energia luminosa promove estresse na microalga, e esta sintetiza carotenoides como um mecanismo de defesa ao estresse. A influência do sombreamento interno no tempo (parâmetro não controlado) pode ser observada na Figura 5.4-3, que ilustra o metabolismo de síntese de carotenoides da *Tetrademus* sp, diante da quantidade de energia irradiada por biomassa (razão entre a energia luminosa emitida e a concentração de biomassa diária). Contudo, devido a ausência de influência dos outros fatores, as respostas de astaxantina (bem como de β -caroteno e licopeno) decorrentes de ensaios com iguais condições de energia e fotoperíodo foram agrupadas de modo a retornar um valor médio diário; o qual foi relacionado à razão média de energia emitida por biomassa. Destaque para as condições de baixa energia associada ao alto fotoperíodo, e de alta energia associada a um baixo fotoperíodo.

Figura 5.4-3 - Comparativo entre a emissão de energia por biomassa e a concentração média de carotenoides na microalga *Tetrademus* sp. (a) Astaxantina; (b) β -caroteno e (c) Licopeno



Média (1, 4, 10): $X_1=510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $X_2=12 \text{ h}$; Média (2, 5, 6): $X_1 = 510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $X_2= 24 \text{ h}$; Média (3, 7, 11): $X_1 = 85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $X_2= 24 \text{ h}$; Média (8, 9, 12): $X_1 = 85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $X_2= 12 \text{ h}$. Média (13, 14, 15, 16): $X_1 = 255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $X_2= 18 \text{ h}$. (E) – Esquerda (D) – Direita. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Fonte: O autor.

A irradiação de $510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de energia (+1) por 24 h (+1) nos experimentos 2, 5 e 6, gerou estresse luminoso estimulando a síntese de carotenoides no 3º dia, contudo também resultou no elevado crescimento em biomassa ($3,0 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$), conforme sugerido pela fase exponencial dos experimentos (Figura 5.4-1); com consequente declínio da taxa de energia luminosa emitida por biomassa já nos primeiros dias (Figura 5.4-3a,b,c) diante do aumento da taxa de sombreamento interno, que resultou no decaimento da concentração de carotenoides no tempo. Em contrapartida, as condições testadas nos experimentos 8, 9 e 12 com $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-1) por 12h (-1), promoveram baixa variação da taxa de emissão de energia por biomassa, devido à baixa velocidade de crescimento da microalga, fato que permitiu a microalga sintetizar continuamente os carotenoides.

Os experimentos 3, 7 e 11, com $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (-1) por 24 h (+1), apresentaram a maior concentração média de carotenoides ($3,7 \pm 1,0 \text{ mg g}^{-1}$) por propiciar continuamente baixa quantidade de energia (Figura 5.4-3), sem estimular fortemente o crescimento em biomassa (Figura 5.4-1). Nos experimentos 1, 4 e 10 realizados com 6 vezes mais energia $510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (+1), e 1/2 do fotoperíodo 12:12 h (-1); a concentração média de carotenoides foi de $3,3 \pm 0,8 \text{ mg g}^{-1}$. Ou seja, a ausência de luz por 12 horas consecutivas ao longo do dia, inibiu o crescimento (Figura 5.4-1) e permitiu uma síntese de carotenoides contínua no tempo.

O aumento da quantidade de energia luminosa irradiada (de 85 para $510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e do tempo desta irradiação (de 12 para 24 h), promoveu condições favoráveis ao crescimento da microalga em biomassa, e desfavoráveis à síntese de carotenoides. Enquanto a associação dos fatores energia e fotoperíodo em níveis opostos conteve o crescimento em biomassa e favoreceu a síntese de carotenoides. Dammak et al. (2018) também observaram este fenômeno de redução da síntese de carotenoides pela *Tetraselmis* sp., ao aumentar a intensidade luminosa de 110 para $182 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em cultivos com salinidade entre 18 e 34; mas também verificaram elevação do conteúdo de carotenoides ao manter concomitantemente elevada intensidade luminosa ($>170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e salinidade (>34).

De modo geral, resultados obtidos com o planejamento experimental Plackett-Burman, sugerem influência significativa nas respostas de carotenoides, principalmente dos fatores quantidade de energia irradiada (intensidade) e fotoperíodo. Portanto, optou-se por investigar os efeitos destes fatores na variável resposta carotenoides por meio de um novo planejamento: o Delineamento Composto Central Rotacional.

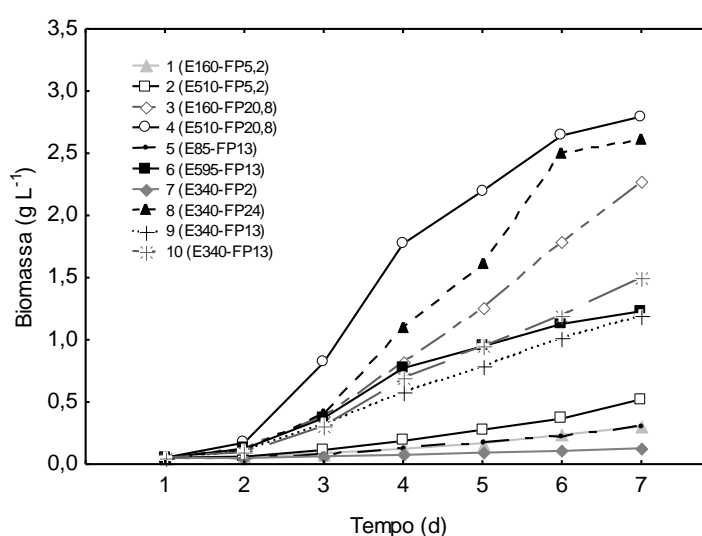
O resultado de *p*-valor para cada fator avaliado no planejamento PB, por dia de cultivo da *Tetrademus sp.* referentes as respostas de clorofila *a* e *b*, pode ser consultado nas Tabelas D4 e D5 em Apêndice D, em que foi observado tendência de maior produção dos pigmentos clorofilados, com a redução da quantidade de energia irradiada e do fotoperíodo. Para o pigmento clorofila *b*, foi observado falta de ajuste nos dias 5 (*p*-valor = 0,0424) e 6 (*p*-valor = 0,0904). Nestes casos, a falta de ajuste sugere que os modelos de regressão ajustados falharam em descrever adequadamente a relação funcional entre os fatores experimentais e a variável de resposta.

5.5 EXPERIMENTO 5 – PLANEJAMENTO DCCR

5.5.1 Biomassa

Seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR, a Figura 5.5-1 apresenta a evolução do crescimento celular da microalga *Tetrademus sp.*, quando cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED. A Tabela 5.5-1 apresenta entre outros resultados estatísticos, a média de biomassa no período estudado e a concentração máxima de biomassa alcançada ao final do cultivo, para cada ensaio desenvolvido segundo o DCCR.

Figura 5.5-1 - Crescimento em biomassa da microalga *Tetrademus sp.*, cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED na faixa espectral vermelha e verde, na proporção 50%:50%, seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional



Legenda: “1” = ensaio; “E160” = energia irradiada na intensidade de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; “FP5,2” = fotoperíodo de 5,2 horas com iluminação e 18,8 horas sem iluminação. N = 2.

Fonte: O autor.

Tabela 5.5-1 - Estatística descritiva: média, desvio padrão (DP), valor máximo e variância referente à resposta de biomassa de *Tetrademus* sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo o DCCR

Ensaio	Energia	Fotoperíodo	Biomassa (g L ⁻¹)		
	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(h)	Média \pm DP	Máximo	Variância
1	160 (-1)	5,2 (-1)	0,18 \pm 0,12	0,37	0,01
2	510 (1)	5,2 (-1)	0,29 \pm 0,25	0,77	0,06
3	160 (-1)	20,8 (1)	1,14 \pm 0,95	2,44	0,90
4	510 (1)	20,8 (1)	1,65 \pm 1,14	2,80	1,31
5	85 (-1,414)	13 (0)	0,18 \pm 0,13	0,40	0,02
6	595 (1,414)	13 (0)	0,71 \pm 0,46	1,23	0,22
7	340 (0)	2 (-1,414)	0,09 \pm 0,03	0,14	0,001
8	340 (0)	24 (1,414)	1,42 \pm 1,17	2,93	1,37
9	340 (0)	13 (0)	0,69 \pm 0,51	1,44	0,26
10	340 (0)	13 (0)	0,83 \pm 0,67	1,87	0,44

Biomassa inicial, $X_0 = 0,15 \text{ g L}^{-1}$, tempo de cultivo = 7 dias. N = 2

A Figura 5.5-1 e Tabela 5.5-1, mostram que o fornecimento de grande quantidade de energia por maior período de tempo, favorece o crescimento celular da *Tetrademus* sp., como pode ser visualizado nos ensaios 4 ($510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20,8 h) e 8 ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 24 h), que resultaram em valores máximos de biomassa de $2,80 \text{ g L}^{-1}$ e $2,93 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

A comparação dos resultados de evolução da biomassa mensurados nos ensaios 5 ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 13 h) e 6 ($595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 13 h), sugerem influência da quantidade de energia luminosa irradiada no cultivo da microalga. Neste caso, ao aumentar a energia irradiada de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mantendo o mesmo fotoperíodo, a biomassa média no período estudado aumentou em 3,9 vezes (75%), de $0,18 \text{ g L}^{-1}$ para $0,71 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 5.5-1).

George et al. (2014) verificaram aumento de 18% na produção de biomassa de *Ankistrodesmus falcatus*, ao elevarem a intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob o mesmo fotoperíodo 12:12h (luz:escuro). Ma et al. (2018) observaram aceleração do crescimento da *Nannochloropsis* sp. ao triplicar a intensidade de energia irradiada de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Khalili et al. (2015), observaram produção de $0,76 \text{ g L}^{-1}$ de *C. vulgaris* sob a irradiação de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $1,95 \text{ g L}^{-1}$ na intensidade de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e $1,17 \text{ g L}^{-1}$ com $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ devido a fotoinibição. a inibição do crescimento também foi observada por You e Barnett (2004), que estimaram razão de

crescimento maior ($0,38 \text{ d}^{-1}$) para *Porphyridium cruentum* na intensidade de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e menor ($0,37 \text{ d}^{-1}$) com intensidade de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Analogamente, o tempo de exposição à luz foi fundamental ao desenvolvimento da microalga, conforme sugere a evolução do crescimento da *Tetradismus* sp. nos ensaios 7 e 8, cultivada sob a mesma condição de quantidade de energia luminosa ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mas em diferentes tempos de exposição à luz, 2 h e 24 h, respectivamente (Figura 5.5-1). Neste caso, a exposição do cultivo à luz por 24 h, promoveu um crescimento em biomassa 15,8 vezes superior a exposição do cultivo à luz por 2 h (Tabela 5.5-1).

O aumento da produção de biomassa com a elevação da quantidade de horas de iluminação, já foi constatada pelos pesquisadores George et al. (2014) e León-Saiki et al. (2018b). León-Saiki et al. (2018b) verificaram relação positiva entre horas de iluminação e o crescimento em biomassa da *Tetradismus obliquus*, em cultivo com fornecimento de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 12 h ($1,07 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$), 14 h ($1,15 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$) e 16 h ($1,38 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$). George et al. (2014) cultivaram *Ankistrodesmus falcatus* sob irradiação de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em fotoperíodos diferentes (00:24 h; 06:18 h; 12:12 h; 18:06 h e 24:00 h). Eles verificaram aumento gradativo da biomassa com a elevação das horas de luz, até o ciclo 18:06 h; e redução da biomassa nas culturas iluminadas por 24 h.

5.5.2 Carotenoides

A síntese de carotenoides pela *Tetradismus* sp. também foi influenciada pelas condições de energia luminosa e fotoperíodo. A Figura 5.5-2 apresenta a evolução no tempo dos pigmentos astaxantina, β -caroteno e licopeno, determinados diariamente a partir do 3º dia de cultivo da microalga. Os resultados de pigmentos em termos de valor médio, desvio padrão, valor máximo e mínimo, e variância para cada condição experimental realizada segundo o DCCR, estão expostos na Tabela 5.5-2.

A fotoestimulação à síntese intracelular de carotenoides foi mais expressiva em condições de baixa intensidade de energia, como ocorreu no ensaio 5 sob irradiação de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 13 h (Figura 5.5-2a, c, e), em que a *Tetradismus* sp. acumulou $7,44 \pm 0,73 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina; $9,69 \pm 2,24 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno; e $4,22 \pm 0,25 \text{ mg g}^{-1}$ de licopeno (Tabela 5.5-2). Contudo, esta mesma condição experimental não favoreceu o crescimento celular da microalga, $0,18 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 5.5-1); tão pouco favoreceu a produção dos pigmentos por litro de cultivo, fato que resultou em concentrações de $1,85 \pm 0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de

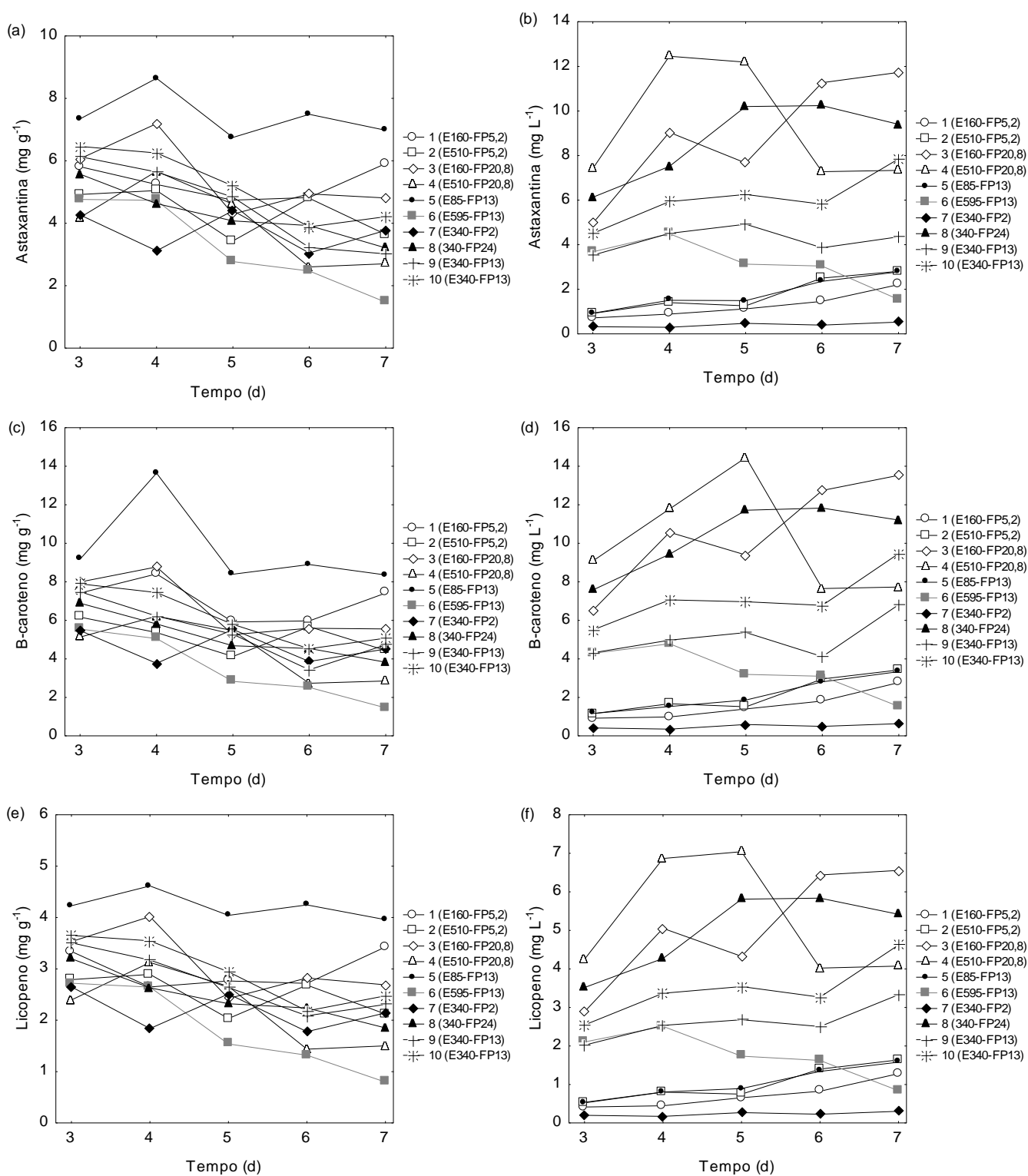
astaxantina; $2,14 \pm 0,91 \text{ mg L}^{-1}$ de β -caroteno; e $1,03 \pm 0,42 \text{ mg L}^{-1}$ de licopeno (Tabela 5.5-2). A baixa concentração dos pigmentos por litro de cultivo apresenta-se como um aspecto negativo, desinteressante industrialmente.

O aumento da intensidade de energia irradiada prejudicou a síntese de carotenoides pela *Tetradismus* sp., e impediu seu acúmulo intracelular. Porém, estimulou atividades metabólicas de crescimento da microalga. Os experimentos 3 ($160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 20,8 h) e 4 ($510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 20,8 h) exemplificam o exposto, pois, tratam-se de fotoperíodos idênticos, entretanto, ao aumentar a intensidade de energia irradiada de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a produção em biomassa média aumentou 31%, enquanto a síntese de carotenoides em mg g^{-1} foi reduzida em 29% (Figuras 5.5-2a, c, e; Tabela 5.5-2).

Irradiação de energia superior, como a praticada no experimento 6 ($595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 13 h), sugere a fotoinibição da microalga, por não estimular a síntese de carotenoides (Tabela 5.5-2) e tão pouco seu crescimento (Tabela 5.5-1). Além da possibilidade de ocorrência do fenômeno de fotoinibição (LIAO et al., 2014; MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2004; OOMS et al., 2016); a manutenção de uma cultura de microalgas sob condições elevadas de irradiação promove a absorção excessiva de fótons acima da sua capacidade de transdução em energia química, os quais são perdidos na forma de calor (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012; MOOIJ et al., 2016).

Por outro lado, a irradiação de energia luminosa por período de tempo elevado ($> 20 \text{ h}$), favoreceu a concentração de carotenoides por litro de cultura, justamente por estimular o crescimento da microalga. Os experimentos 3 ($160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 20,8 h); 4 ($510 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 20,8 h) e 8 ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 24 h) exemplificam isso ao produzirem $10,35 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$ de β -caroteno. Porém, os experimentos 4 e 8 também promoveram baixa fotoestimulação da síntese intracelular de carotenoides, ao gerar baixa massa de pigmento por massa celular: $4,48 \pm 1,59 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno; e $5,15 \pm 1,21 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno, respectivamente (conforme Tabela 5.5-2).

Figura 5.5-2 - Síntese de carotenoides da *Tetrademus* sp. cultivada em fotobiorreator placa plana irradiado por LED, seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional: (a) e (b) astaxantina em mg g^{-1} e mg L^{-1} ; (c) e (d) β -caroteno em mg g^{-1} e mg L^{-1} ; (e) e (f) licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}



Legenda: “1” = ensaio; “E160” = energia irradiada na intensidade de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; “FP5,2” = fotoperíodo de 5,2 horas com iluminação e 18,8 horas sem iluminação. N = 2.

Fonte: O autor.

Tabela 5.5-2 - Estatística descritiva: média, desvio padrão, valor mínimo e máximo e variância referente às respostas de astaxantina, β -caroteno e licopeno, em mg g^{-1} e mg L^{-1} , determinadas em cultivos da *Tetrademus* sp. seguindo o Delineamento Composto Central Rotacional

Ensaio	Astaxantina (mg g^{-1})				Astaxantina (mg L^{-1})			
	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância
1	5,31 \pm 0,54	4,74	5,92	0,29	1,28 \pm 0,59	0,72	2,21	0,35
2	4,37 \pm 0,77	3,43	5,05	0,59	1,78 \pm 0,83	0,92	2,81	0,68
3	5,46 \pm 1,16	4,30	7,19	1,35	8,93 \pm 2,77	4,96	11,73	7,67
4	3,95 \pm 1,30	2,60	5,67	1,70	9,34 \pm 2,73	7,28	12,45	7,44
5	7,44 \pm 0,73	6,75	8,64	0,54	1,82 \pm 0,75	0,93	2,79	0,56
6	3,24 \pm 1,46	1,47	4,77	2,13	3,18 \pm 1,08	1,55	4,49	1,17
7	3,72 \pm 0,63	3,05	4,40	0,39	0,40 \pm 0,10	0,29	0,53	0,01
8	4,28 \pm 0,88	3,21	5,57	0,78	8,70 \pm 1,81	6,13	10,24	3,28
9	4,57 \pm 1,40	3,02	6,13	1,97	4,24 \pm 0,54	3,54	4,92	0,30
10	5,20 \pm 1,16	3,89	6,46	1,35	6,07 \pm 1,20	4,51	7,85	1,43
Ensaio	β -caroteno (mg g^{-1})				β -caroteno (mg L^{-1})			
	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância
1	7,03 \pm 1,07	5,92	8,41	1,14	1,58 \pm 0,76	0,92	2,77	0,57
2	5,15 \pm 0,85	4,12	6,17	0,73	2,14 \pm 0,99	1,16	3,42	0,97
3	6,63 \pm 1,62	5,26	8,77	2,64	10,56 \pm 2,79	6,54	13,54	7,80
4	4,48 \pm 1,59	2,74	6,22	2,53	10,14 \pm 2,94	7,65	14,46	8,62
5	9,69 \pm 2,24	8,36	13,6	5,00	2,14 \pm 0,91	1,16	3,34	0,82
6	3,48 \pm 1,74	1,46	5,55	3,04	3,38 \pm 1,26	1,53	4,79	1,59
7	4,63 \pm 0,85	3,77	5,53	0,71	0,50 \pm 0,12	0,35	0,64	0,01
8	5,15 \pm 1,21	3,83	6,89	1,46	10,35 \pm 1,82	7,58	11,83	3,33
9	5,43 \pm 1,53	3,44	7,49	2,34	5,12 \pm 1,07	4,12	6,82	1,15
10	6,15 \pm 1,47	4,53	7,90	2,16	7,16 \pm 1,44	5,51	9,47	2,07
Ensaio	Licopeno (mg g^{-1})				Licopeno (mg L^{-1})			
	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância	Média \pm DP	Mínimo	Maximo	Variância
1	2,98 \pm 0,37	2,65	3,43	0,14	0,72 \pm 0,35	0,41	1,28	0,12
2	2,51 \pm 0,40	2,04	2,89	0,16	1,02 \pm 0,47	0,52	1,64	0,22
3	3,10 \pm 0,66	2,42	4,02	0,43	5,05 \pm 1,53	2,89	6,56	2,35
4	2,23 \pm 0,74	1,44	3,13	0,54	5,25 \pm 1,56	4,02	7,04	2,43
5	4,22 \pm 0,25	3,96	4,61	0,06	1,03 \pm 0,42	0,54	1,58	0,18
6	1,80 \pm 0,85	0,80	2,72	0,72	1,76 \pm 0,62	0,84	2,51	0,39
7	2,19 \pm 0,39	1,78	2,65	0,15	0,23 \pm 0,05	0,17	0,30	0,003
8	2,45 \pm 0,50	1,85	3,20	0,25	4,97 \pm 1,03	3,52	5,84	1,06
9	2,74 \pm 0,59	2,09	3,51	0,35	2,61 \pm 0,47	2,02	3,33	0,22
10	2,96 \pm 0,64	2,18	3,65	0,42	3,47 \pm 0,75	2,55	4,62	0,56

Média dos valores de carotenoides determinados do 3^o ao 7^o dias de cultivo da microalga *Tetrademus* sp.

Verifica-se que houve maior acúmulo de pigmentos na célula quando o cultivo foi desenvolvido sob menor intensidade luminosa; e maior acúmulo de células (com baixa massa

de carotenoides por célula), quando o cultivo foi desenvolvido com elevado fotoperíodo (>20 h).

Ao considerar condições de quantidade de energia irradiada e fotoperíodo que estimularam ambas as razões de carotenoides por massa celular e por volume de cultura, verificou-se que as condições praticadas no experimento 3 ($160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 20,8 h), se destacam neste aspecto, pois a *Tetrademus* sp. foi concomitantemente, fotoestimulada a sintetizar carotenoides – astaxantina ($5,46 \pm 1,16 \text{ mg g}^{-1}$), β -caroteno ($6,63 \pm 1,62 \text{ mg g}^{-1}$) e licopeno ($3,10 \pm 0,66 \text{ mg g}^{-1}$) –, e a praticar divisão celular (biomassa máxima de $2,14 \text{ g L}^{-1}$); fato que resultou em concentrações de $8,93 \pm 2,77 \text{ mg L}^{-1}$ de astaxantina; $10,56 \pm 2,79 \text{ mg L}^{-1}$ de β -caroteno; e $5,05 \pm 1,53 \text{ mg L}^{-1}$ de licopeno, conforme Tabela 5.5-2.

Este resultado é consistente com estudo de Ma et al. (2018), que relataram rendimentos máximos de carotenoides em *Nannochloropsis* sp. com baixa intensidade de luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cerca de 2 vezes superiores aos da alta intensidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro). Os autores observaram esta mesma tendência para a produtividade de carotenoides. Enquanto, George et al. (2014) verificaram que o aumento da quantidade de energia irradiada, de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), promoveu elevação da concentração de carotenoides em cultivo de *A. falcatus*, tanto em termos mássicos (de $16,02 \text{ mg g}^{-1}$ para $18,83 \text{ mg g}^{-1}$), quanto em concentração (de $2,94 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$ para $4,23 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$).

5.5.3 DCCR: Superfícies de Resposta

Os modelos ajustados a partir dos resultados diários de astaxantina, β -caroteno e licopeno (em mg g^{-1} e mg L^{-1}), contemplam todos os termos, inclusive os não significativos (p -valor > 0,10), para evitar a perda de informações pela exclusão de muitos coeficientes e diante do indício de um único termo significativo ou nenhum em determinadas situações. A ANOVA, Tabela 5.5-3, apresenta a significância linear, quadrática e de interação entre os fatores energia irradiada e fotoperíodo, quanto aos seus efeitos na variável resposta astaxantina em mg g^{-1} .

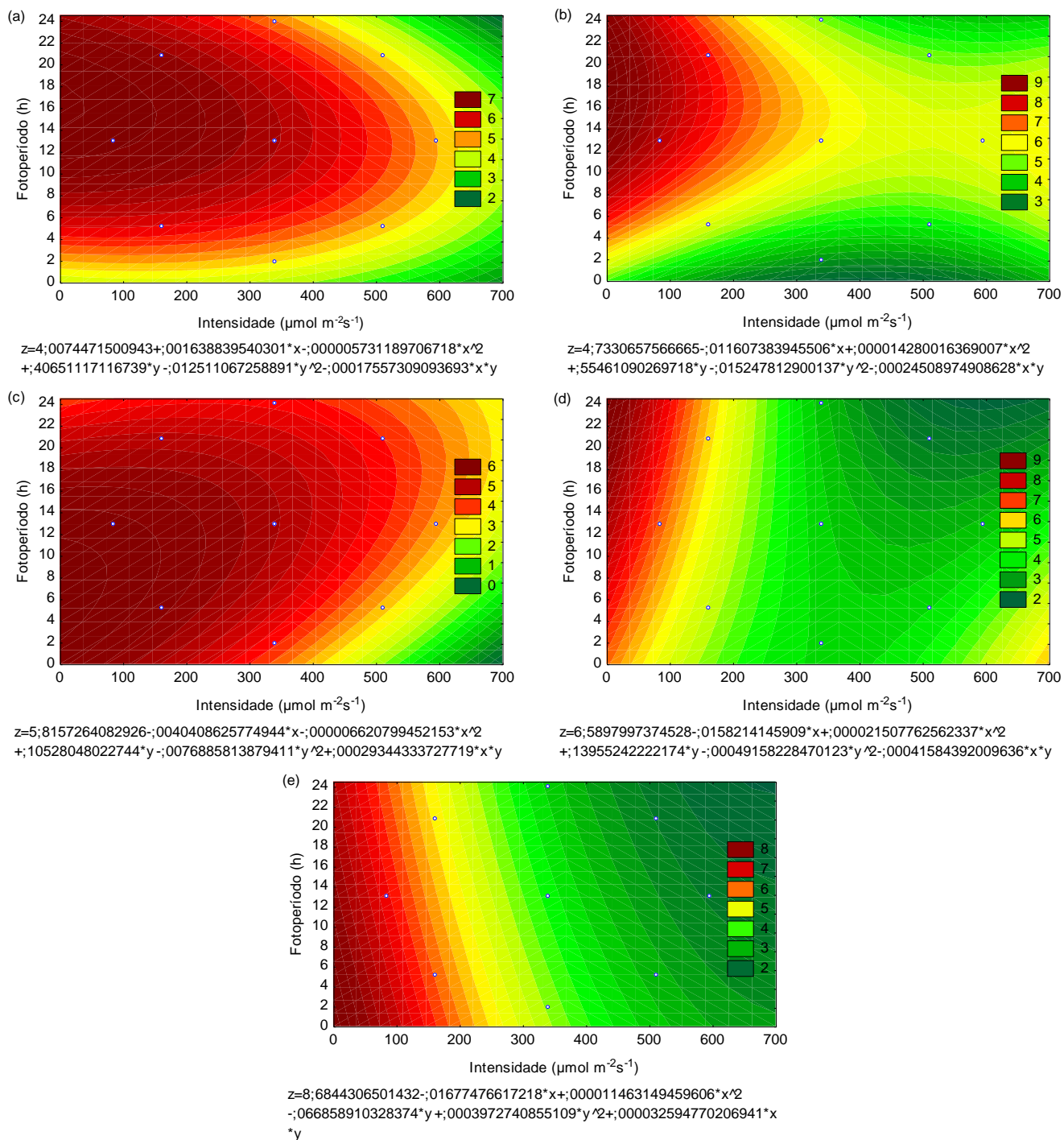
Tabela 5.5-3 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta astaxantina em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp.

Fator	Astaxantina (mg g^{-1})														
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor
	Dia 3					Dia 4					Dia 5				
Intensidade L (1)	1	5,07	5,07	94,74	0,0652	1	6,89	6,89	37,24	0,1034	1	5,48	5,48	85,39	0,0686
Intensidade Q	1	0,15	0,15	2,89	0,3385	1	0,96	0,96	5,19	0,2633	1	0,21	0,21	3,22	0,3239
Fotoperíodo L (2)	1	0,24	0,24	4,55	0,2791	1	2,81	2,81	15,17	0,1600	1	0,01	0,01	0,10	0,8029
Fotoperíodo Q	1	2,59	2,59	48,46	0,0908	1	3,85	3,85	20,82	0,1373	1	0,98	0,98	15,25	0,1595
(1) por (2)	1	0,23	0,23	4,29	0,2863	1	0,45	0,45	2,42	0,3637	1	0,64	0,64	10,00	0,1950
Falta de Ajuste	3	0,91	0,30	5,66	0,2975	3	2,35	0,78	4,24	0,3397	3	2,85	0,95	14,77	0,1885
Erro Puro	1	0,05	0,05			1	0,19	0,19			1	0,06	0,06		
Total	9	9,25				9	20,49				9	10,09			
	Dia 6					Dia 7									
Intensidade L (1)	1	11,73	11,73	53,78	0,0863	1	18,97	18,97	26,85	0,1214					
Intensidade Q	1	2,18	2,18	10,0	0,1950	1	0,62	0,62	0,88	0,5210					
Fotoperíodo L (2)	1	0,08	0,08	0,35	0,6600	1	1,01	1,01	1,43	0,4436					
Fotoperíodo Q	1	0,00*	0,00*	0,02	0,9142	1	0,00*	0,00*	0,00*	0,9613					
(1) por (2)	1	1,29	1,29	5,91	0,2484	1	0,01	0,01	0,01	0,9328					
Falta de Ajuste	3	4,26	1,42	6,52	0,2786	3	1,87	0,62	0,88	0,6351					
Erro Puro	1	0,22	0,22			1	0,71	0,71							
Total	9	20,06				9	23,07								

* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_c, F calculado. N = 2. Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Conforme a Tabela 5.5-3, no 3º dia de cultivo, o termo quadrático do fotoperíodo influenciou a síntese de astaxantina pela microalga (p -valor = 0,0908). O parâmetro linear de quantidade de energia irradiada também apresentou efeito significativo na síntese de astaxantina pela microalga nos dias 3 (p -valor = 0,0652), 5 (p -valor = 0,0686), e 6 (p -valor = 0,0863). Nestes dias, o fenômeno de fotoestimulação da *Tetradismus* sp., permitiu que esta acumulasse maior quantidade do pigmento no interior das células, quando irradiada por menor quantidade de energia (Figura 5.5-2a; Figura 5.5-3). A condição experimental praticada no ensaio 5 ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 13 h) resultou em $7,44 \pm 0,73 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina, valor mais próximo do ponto de máximo ótimo (conforme Figura 5.5-3).

Figura 5.5-3 - DCCR: superfície de resposta referente à Astaxantina (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



Fonte: O autor.

A Tabela 5.5-4 apresenta a significância ($\alpha = 0,10$) linear, quadrática e de interação entre os fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, quanto aos seus efeitos na variável resposta astaxantina em mg L^{-1} .

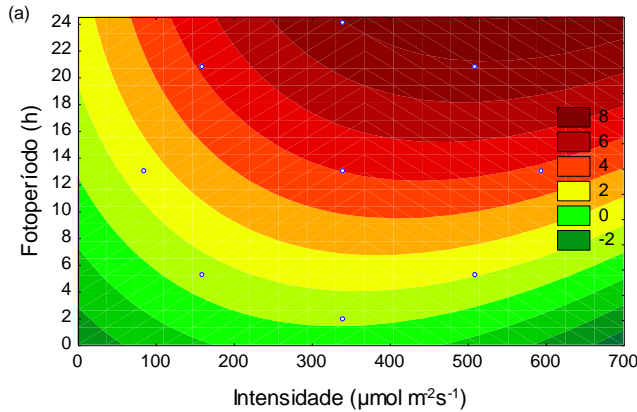
Tabela 5.5-4 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta astaxantina em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp.

Astaxantina (mg L^{-1})																	
Fator	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor		
		Dia 3					Dia 4					Dia 5					
Intensidade L (1)	1	5,58	5,58	11,80	0,1803	1	8,26	8,26	8,14	0,2146	1	6,33	6,33	7,12	0,2283		
Intensidade Q	1	2,10	2,10	4,44	0,2821	1	1,33	1,33	1,31	0,4567	1	7,19	7,19	8,09	0,2152		
Fotoperíodo L (2)	1	44,62	44,62	94,43	0,0653	1	107,59	107,59	106,1	0,0616	1	121,0	121,0	136,11	0,0544		
Fotoperíodo Q	1	0,22	0,22	0,46	0,6203	1	0,01	0,01	0,01	0,9241	1	0,34	0,34	0,39	0,6453		
(1) por (2)	1	1,23	1,23	2,61	0,3527	1	1,92	1,92	1,9	0,3997	1	4,68	4,68	5,27	0,2616		
Falta de Ajuste	3	2,08	0,69	1,47	0,5302	3	22,61	7,54	7,43	0,2619	3	8,1	2,70	3,03	0,3938		
Erro Puro	1	0,47	0,47			1	1,01	1,01			1	0,89	0,89				
Total	9	56,21					9	143,32					9	152,58			
		Dia 6					Dia 7										
Intensidade L (1)	1	0,44	0,44	0,2284	0,7162	1	3,55	3,35	0,58	0,5855							
Intensidade Q	1	2,13	2,13	1,12	0,4824	1	9,03	9,03	1,48	0,4384							
Fotoperíodo L (2)	1	102,56	102,56	53,70	0,0863	1	89,31	89,31	14,59	0,1630							
Fotoperíodo Q	1	1,78	1,78	0,93	0,5138	1	0,00*	0,00*	0,00*	0,9968							
(1) por (2)	1	6,37	6,37	3,33	0,3190	1	6,28	6,28	1,03	0,4958							
Falta de Ajuste	3	7,04	2,35	1,23	0,5665	3	12,06	4,02	0,66	0,6949							
Erro Puro	1	1,91	1,91			1	6,12	6,12									
Total	9	124,37					9	128,05									

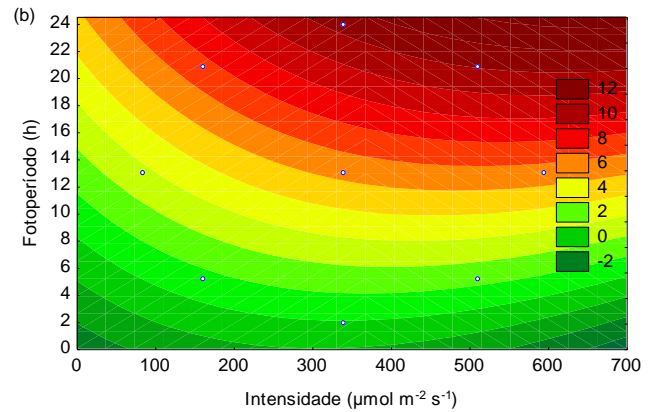
* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_{calc}, F calculado. N = 2. Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

A análise da Tabela 5.5-4, permite afirmar que nos dias 3, 4, 5 e 6, o termo linear do fotoperíodo exerceu influência significativa na produção de astaxantina em mg L^{-1} . Neste caso, o aumento do fotoperíodo ou tempo de irradiação de energia luminosa, favoreceu a concentração de massa de astaxantina por volume de cultivo. Ensaios desenvolvidos com fotoperíodo igual ou superior a 20,8 h geraram respostas de concentração de astaxantina em regiões próximas ao ponto máximo (Figura 5.5-4). A Tabela 5.5-5 mostra os modelos ajustados a partir da superfície de resposta de astaxantina determinada diariamente, além da previsão de pontos de máximo por meio da otimização dos fatores energia e fotoperíodo.

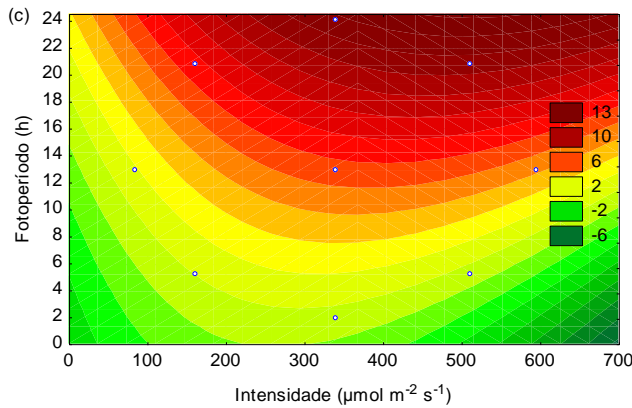
Figura 5.5-4 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Astaxantina (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



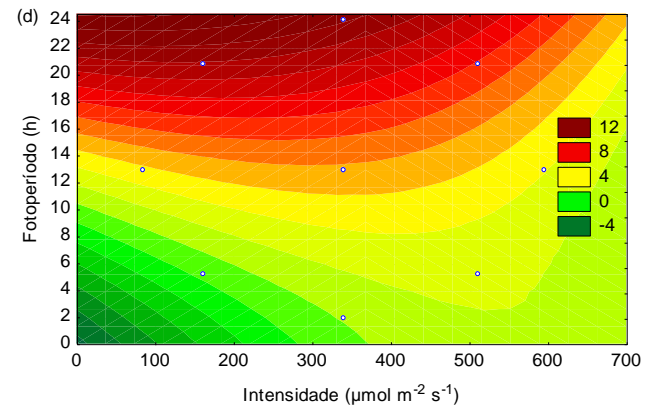
$$z = -2,7173343794351 + 0,013549280345011 * x - 0,000021101257608906 * x^2 + 26,118771793146 * y - 0,0036251382027041 * y^2 + 0,004069072000059 * x * y$$



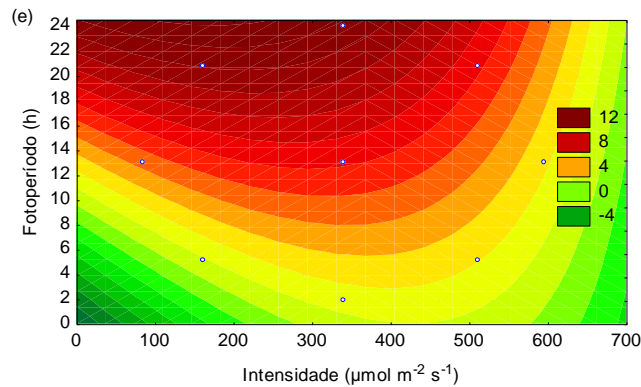
$$z = -2,6141169388348 + 0,010381721945561 * x - 0,000016816474014203 * x^2 + 32,507626951559 * y - 0,0093746349890865 * y^2 + 0,0050809266250357 * x * y$$



$$z = -2,7119361016332 + 0,020890176624792 * x - 0,000039076934407824 * x^2 + 11,536024369648 * y + 0,045616571815321 * y^2 + 0,0079228353657992 * x * y$$



$$z = -5,3353570948977 + 0,024952012890916 * x - 0,000021276241848768 * x^2 + 5,0001618807608 * y + 0,010357647149584 * y^2 - 0,00092397352329987 * x * y$$



$$z = -7,0473520984596 + 0,037521839832036 * x - 0,000043788807620615 * x^2 + 7,73406836996309 * y + 0,000097587372962287 * y^2 - 0,00091811375731556 * x * y$$

Fonte: O autor.

Tabela 5.5-5 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de astaxantina em mg g^{-1} e mg L^{-1}

Dia	Coeficientes do Modelo						Parâmetros Otimizados		Astaxantina	Ajuste do Modelo	
	Interseção	x_1	x_1^2	x_2	x_2^2	$x_1 \cdot x_2$	x_1	x_2	(mg g^{-1})	R^2	R_{Ajust}
3	4,0	$1,64 \cdot 10^{-3}$	$-5,63 \cdot 10^{-6}$	0,41	$-1,25 \cdot 10^{-2}$	$-1,76 \cdot 10^{-4}$	85	15,6	7,2	0,8960	0,7660
4	4,73	$-1,16 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-5}$	0,55	$-1,52 \cdot 10^{-2}$	$-2,45 \cdot 10^{-4}$	85	17,5	8,5	0,8762	0,7214
5	5,82	$-4,04 \cdot 10^{-3}$	$-6,62 \cdot 10^{-6}$	0,11	$-7,69 \cdot 10^{-3}$	$2,93 \cdot 10^{-4}$	85	8,5	6,0	0,7116	0,3510
6	6,59	$-1,58 \cdot 10^{-2}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	0,14	$-4,92 \cdot 10^{-4}$	$-4,16 \cdot 10^{-4}$	85	24	7,6	0,7766	0,4974
7	8,68	$-1,68 \cdot 10^{-2}$	$1,15 \cdot 10^{-5}$	-0,07	$3,97 \cdot 10^{-4}$	$3,59 \cdot 10^{-5}$	85	24	7,6	0,8884	0,7489
Dia	Interseção	x_1	x_1^2	x_2	x_2^2	$x_1 \cdot x_2$	x_1	x_2	(mg L^{-1})	R^2	R_{Ajust}
3	2,71	$1,35 \cdot 10^{-2}$	$-2,11 \cdot 10^{-5}$	0,26	$-3,63 \cdot 10^{-3}$	$4,07 \cdot 10^{-4}$	595	24	7,9	0,9546	0,8978
4	-2,61	$1,04 \cdot 10^{-2}$	$-1,68 \cdot 10^{-5}$	0,33	$-9,37 \cdot 10^{-4}$	$5,08 \cdot 10^{-4}$	671	24	12,2	0,8351	0,6291
5	-2,71	$2,09 \cdot 10^{-2}$	$-3,91 \cdot 10^{-5}$	0,12	$4,56 \cdot 10^{-3}$	$7,92 \cdot 10^{-4}$	511	24	12,9	0,9411	0,8675
6	-5,34	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$-2,13 \cdot 10^{-5}$	0,50	$1,04 \cdot 10^{-2}$	$-9,24 \cdot 10^{-4}$	85	24	12,7	0,9280	0,8380
7	-7,05	$3,75 \cdot 10^{-2}$	$-4,38 \cdot 10^{-5}$	0,73	$-9,76 \cdot 10^{-5}$	$-9,18 \cdot 10^{-4}$	177	24	12,0	0,8580	0,6806

R^2 , coeficiente de determinação; R_{Ajust} , coeficiente de determinação ajustado. Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

O 3º dia de cultivo da *Tetradismus* sp., resultou em modelos com maior representatividade dos dados experimentais de astaxantina em mg g^{-1} ($R^2 = 0,8960$ e $R_{\text{Ajust}} = 0,7660$) e em mg L^{-1} ($R^2 = 0,9546$ e $R_{\text{Ajust}} = 0,8978$), conforme Tabela 5.5-5. A otimização dos fatores para predição da variável resposta astaxantina em mg g^{-1} , sugere a irradiação de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade de energia ao cultivo, independente do dia avaliado. Ao fixar do tempo de cultivo em 3 dias, diante de modelos ajustados com maiores coeficientes de determinação e pela redução do efeito do sombreamento celular apontado pelos resultados do planejamento PB (item 5.4.2); observa-se que esta irradiação de energia ($85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) deve perdurar por 15,6 h para promover a síntese de $7,2 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina. Similarmente, a maximização da concentração de astaxantina, agora em mg L^{-1} , sugere a produção de $7,9 \text{ mg L}^{-1}$ de astaxantina ao cultivar a microalga por 3 dias sob irradiação de energia de $595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 24 h de fotoperíodo.

A análise realizada com os valores de astaxantina foi reproduzida com os dados de β -caroteno em mg g^{-1} , e mg L^{-1} , as respectivas análises de variância estão apresentadas nas Tabelas 5.5-6 e 5.5-7.

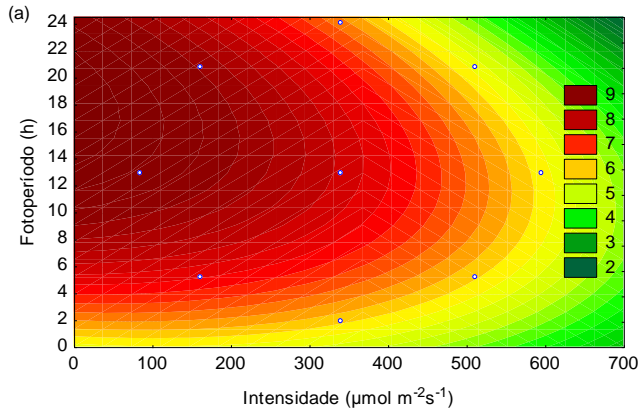
Tabela 5.5-6 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta β -caroteno em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp.

Fator	β -caroteno (mg g^{-1})														
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor
	Dia 3					Dia 4					Dia 5				
Intensidade L (1)	1	10,59	10,59	125,12	0,0568	1	8,42	8,42	11,32	0,1839	1	11,33	11,33	86,36	0,0682
Intensidade Q	1	0,18	0,18	2,14	0,3818	1	0,10	0,10	0,13	0,7781	1	0,01	0,01	0,06	0,8437
Fotoperíodo L (2)	1	0,31	0,31	3,72	0,3045	1	3,02	3,02	4,07	0,2930	1	0,04	0,04	0,30	0,6808
Fotoperíodo Q	1	2,83	2,83	33,43	0,1090	1	3,64	3,64	4,89	0,2703	1	0,35	0,35	2,66	0,3501
(1) por (2)	1	0,62	0,62	7,34	0,2251	1	2,61	2,61	3,52	0,3119	1	0,98	0,98	7,75	0,2236
Falta de Ajuste	3	0,92	0,31	3,64	0,3634	3	1,40	0,47	0,63	0,7033	3	5,24	1,75	13,31	0,1982
Erro Puro	1	0,08	0,08			1	0,74	0,74			1	0,13	0,13		
Total	9	15,53				9	21,27				9	18,11			
	Dia 6					Dia 7									
Intensidade L (1)	1	19,36	19,36	32,54	0,1104	1	30,19	30,19	492,4	0,0289					
Intensidade Q	1	3,13	3,13	5,26	0,2618	1	0,03	0,03	0,54	0,5975					
Fotoperíodo L (2)	1	0,66	0,66	1,11	0,4835	1	2,46	2,46	40,14	0,0996					
Fotoperíodo Q	1	0,05	0,05	0,08	0,8211	1	0,31	0,31	5,01	0,2676					
(1) por (2)	1	1,56	1,56	2,62	0,3523	1	0,02	0,02	0,39	0,6431					
Falta de Ajuste	3	6,68	2,23	3,74	0,3590	3	3,09	1,03	16,80	0,1770					
Erro Puro	1	0,59	0,59			1	0,06	0,06							
Total	9	31,90				9	36,29								

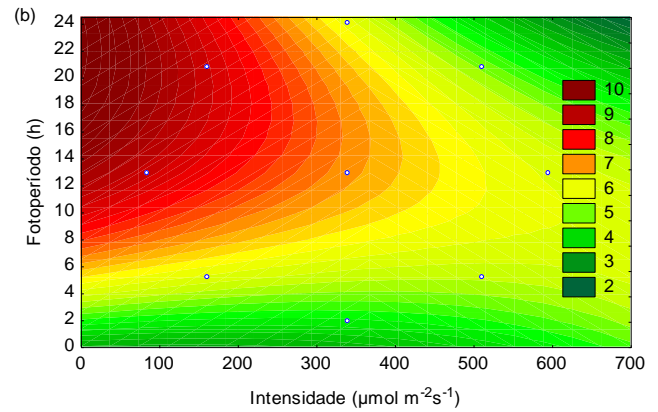
* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_c, F calculado. N = 2. Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Pela Tabela 5.5-6, verifica-se que a intensidade de energia irradiada (termo linear) exerceu influência estatística na síntese de β -caroteno pela microalga nos dias 3, 5 e 7. No 7º dia, além da influência da intensidade, também houve efeito do termo linear de fotoperíodo. A redução da intensidade de energia irradiada, estimulou a síntese do pigmento por massa celular, fenômeno especialmente visualizado no ensaio 5 com fatores de $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade e 13 h de fotoperíodo (Figura 5.5-5).

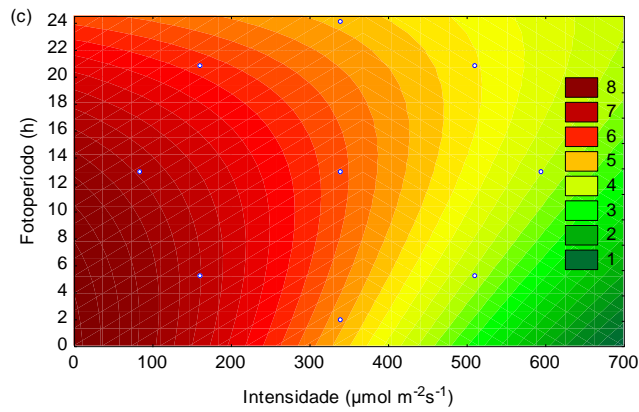
Figura 5.5-5 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de β -caroteno (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



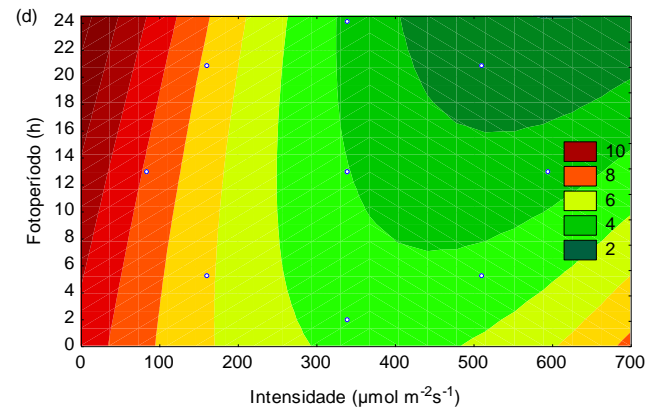
$$z=5;4067055951126+;001426357904208*x-;000006197880253844*x^2+;4618767855611*y-;013065932241068*y^2-;00028860817642845*x*y$$



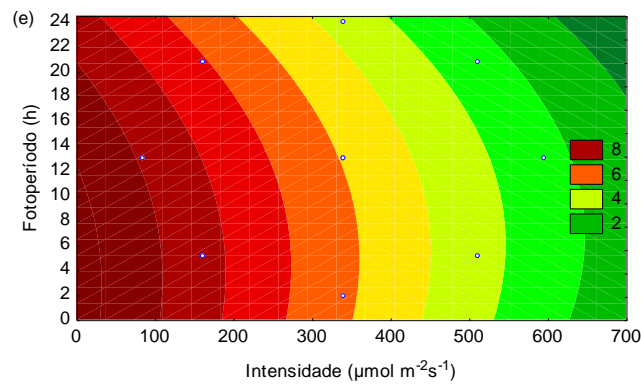
$$z=3;2287775169814-;0011367633795448*x+;000004563525018611*x^2+;66235965085214*y-;01481141766946*y^2-;00059200248499367*x*y$$



$$z=8;6183427557954-;010521092585611*x-;000001322674329157*x^2-;010944857715498*y-;0045902033552057*y^2+;00036201417248279*x*y$$



$$z=8;6727173008284-;020080959540585*x+;00002577141705945*x^2+;071346173715538*y+;0017296699610916*y^2-;00045730362289639*x*y$$



$$z=9;4047291384668-;01344837332891*x+;000002642473025248*x^2+;021588254942516*y-;0043028621797507*y^2+;000056919894157381*x*y$$

Fonte: O autor.

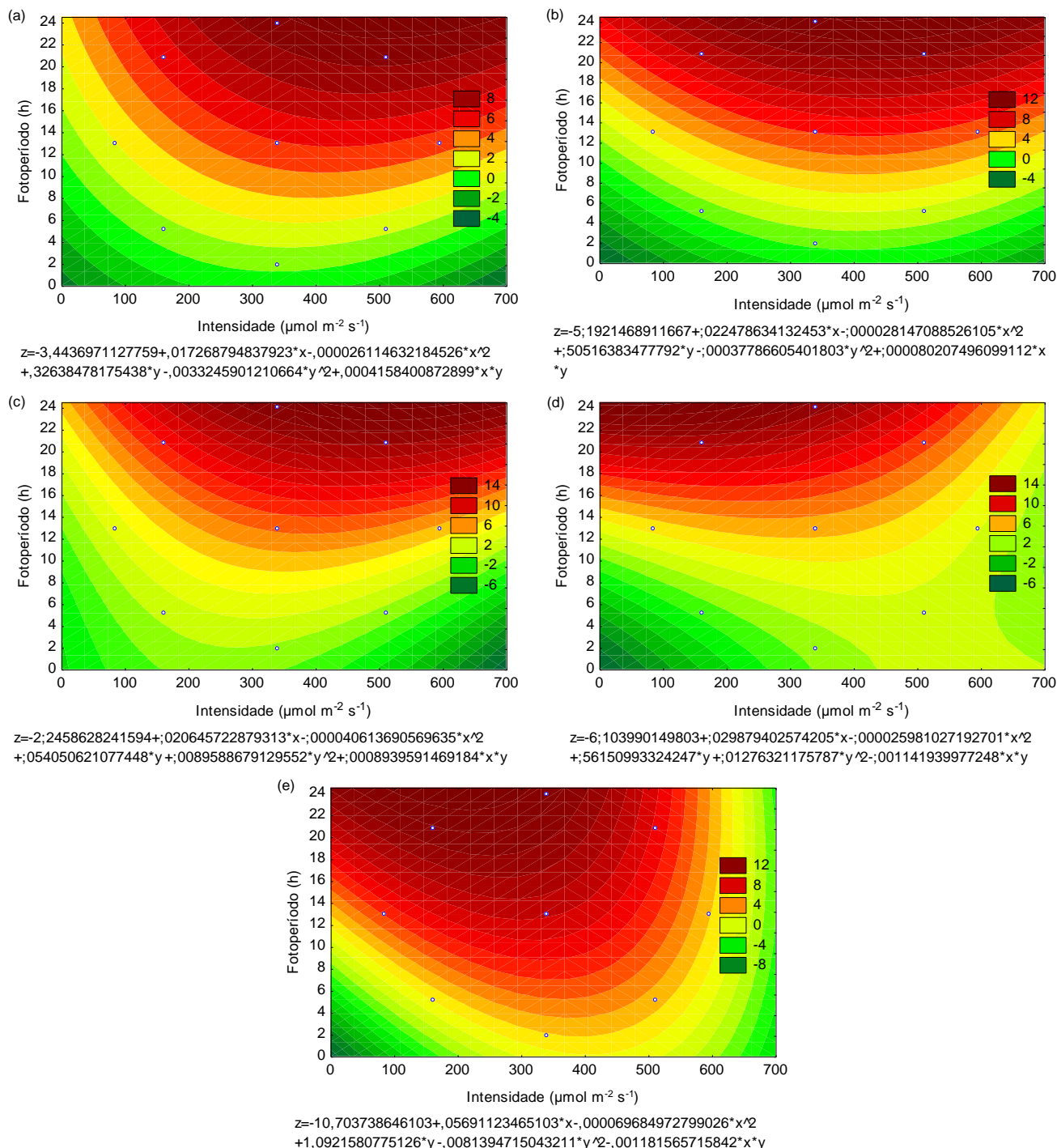
Pela Tabela 5.5-7, verifica-se que a produção de β -caroteno por volume de cultivo, foi influenciada pelo termo linear de fotoperíodo nos dias 3, 4 e 5. De modo que a aumento do tempo (superior a 20,8 h) de exposição da *Tetrademus* sp. a energia luminosa, culminou em maior acúmulo do pigmento por volume de cultivo (Figura 5.5-6). Os modelos ajustados para cada dia de medição de β -caroteno estão apresentados na Tabela 5.5-8, assim como a sugestão de parâmetros ótimos indicados pela maximização das equações. Os modelos contemplam os coeficientes significativos e não significativos pelos mesmos motivos apresentados anteriormente para astaxantina.

Tabela 5.5-7 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta β -caroteno em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetrademus* sp.

Fator	β -caroteno (mg L^{-1})														
	g.l.	SQ	QM	F_c	p -valor	g.l.	SQ	QM	F_c	p -valor	g.l.	SQ	QM	F_c	p -valor
	Dia 3					Dia 4					Dia 5				
Intensidade L (1)	1	6,77	6,77	9,48	0,1999	1	5,49	5,49	2,51	0,3584	1	6,45	6,45	5,04	0,2668
Intensidade Q	1	3,21	3,21	4,50	0,2804	1	3,73	3,73	1,71	0,4158	1	7,77	7,77	6,07	0,2454
Fotoperíodo L (2)	1	69,78	69,78	97,8	0,0642	1	132,31	132,3	60,55	0,0814	1	166,86	166,86	130,36	0,0556
Fotoperíodo Q	1	0,18	0,18	0,26	0,7015	1	0,002	0,002	0,001	0,9791	1	1,33	1,33	1,04	0,4939
(1) por (2)	1	1,29	1,29	1,81	0,4072	1	0,05	0,05	0,02	0,9064	1	5,96	5,96	4,66	0,2763
Falta de Ajuste	3	4,02	1,34	1,88	0,4817	3	16,48	5,49	2,51	0,4269	3	15,26	5,09	3,97	0,3496
Erro Puro	1	0,71	0,71			1	2,19	2,19			1	1,28	1,28		
Total	9	86,05				9	160,89				9	211,42			
Dia 6					Dia 7										
Intensidade L (1)	1	1,42	1,42	0,40	0,6406	1	6,66	6,66	1,89	0,4007					
Intensidade Q	1	3,18	3,18	0,90	0,5172	1	22,88	22,88	6,48	0,2383					
Fotoperíodo L (2)	1	126,59	126,59	35,7	0,1055	1	113,98	114,0	32,27	0,1109					
Fotoperíodo Q	1	2,7	2,7	0,76	0,5431	1	1,1	1,1	0,31	0,6762					
(1) por (2)	1	9,72	9,72	2,74	0,3458	1	10,41	10,41	2,95	0,3358					
Falta de Ajuste	3	8,23	2,74	0,77	0,6617	3	14,15	4,72	1,34	0,5495					
Erro Puro	1	3,54	3,54			1	3,53	3,53							
Total	9	158,79				9	172,52								

* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_c , F calculado. N = 2. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Figura 5.5-6 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de β -caroteno (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



Fonte: O autor.

No 3º dia de cultivo da *Tetradismus* sp., foi possível ajustar modelos que melhor representaram os valores experimentais de β -caroteno, seja em mg g^{-1} ($R^2 = 0,9350$) ou mg L^{-1} ($R^2 = 0,9450$). Assim como justificado para astaxantina, a predição da variável resposta β -caroteno no terceiro dia de cultivo, a partir da otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, sugeriu a irradiação $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 15,8 h para sintetizar

9,1 mg g⁻¹ de β-caroteno; e 595 μmol m⁻² s⁻¹ por 24 h de fotoperíodo para obtenção de 9,4 mg L⁻¹ do pigmento (Tabela 5.5-8).

Tabela 5.5-8 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de β-caroteno em mg g⁻¹ e mg L⁻¹

Dia	Coeficientes do Modelo						Parâmetros Otimizados		β-caroteno (mg g ⁻¹)	Ajuste do Modelo	
	Interseção	x ₁	x ₁ ²	x ₂	x ₂ ²	x ₁ · x ₂	x ₁	x ₂		R ²	R _{Ajust}
3	5,41	1,43.10 ⁻³	-6,19.10 ⁻⁶	0,46	-1,30.10 ⁻²	-2,89.10 ⁻⁴	85	15,8	9,1	0,9350	0,8538
4	3,23	-1,14.10 ⁻³	4,56.10 ⁻⁶	0,66	-1,48.10 ⁻²	-5,92.10 ⁻⁴	85	20,7	9,5	0,8990	0,7728
5	8,62	-1,05.10 ⁻²	1,32.10 ⁻⁶	-0,01	-4,59.10 ⁻³	3,62.10 ⁻⁴	85	2,2	7,7	0,7036	0,3330
6	8,67	-2,01.10 ⁻²	2,58.10 ⁻⁵	0,07	1,73.10 ⁻³	-4,57.10 ⁻⁴	85	24	8,9	0,7719	0,4867
7	9,40	-1,34.10 ⁻²	2,64.10 ⁻⁶	0,02	-4,30.10 ⁻³	5,69.10 ⁻⁵	85	3,1	8,3	0,9132	0,8046
Dia	Interseção	x ₁	x ₁ ²	x ₂	x ₂ ²	x ₁ · x ₂	x ₁	x ₂	(mg L ⁻¹)	R ²	R _{Ajust}
3	-3,44	1,73. 10 ⁻²	-2,61.10 ⁻⁵	0,33	-3,32.10 ⁻³	4,16.10 ⁻⁴	595	24	9,4	0,9450	0,8762
4	-5,19	2,24.10 ⁻²	-2,81.10 ⁻⁵	0,51	-3,78.10 ⁻⁴	8,02.10 ⁻⁵	434	24	12,0	0,8840	0,7389
5	-2,25	2,06.10 ⁻²	4,06.10 ⁻⁵	0,05	8,96.10 ⁻³	8,94.10 ⁻⁴	518	24	15,1	0,9218	0,8240
6	-6,10	2,99.10 ⁻²	-2,60.10 ⁻⁵	0,56	1,28.10 ⁻²	-1,14.10 ⁻³	85	24	14,8	0,9259	0,8332
7	-10,7	5,69.10 ⁻²	-6,97.10 ⁻⁵	1,09	-8,14.10 ⁻³	-1,18.10 ⁻³	205	24	13,7	0,8975	0,7694

R², coeficiente de determinação; R_{Ajust}, coeficiente de determinação ajustado. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Por fim, as Tabelas 5.5-9 e 5.5-10 apresentam por meio da ANOVA, a significância dos fatores energia irradiada e fotoperíodo, quanto aos seus efeitos na variável resposta licopeno em mg g⁻¹, e mg L⁻¹, respectivamente.

Os resultados apresentados na Tabela 5.5-9 sugerem que a fotoestimulação da microalga para a síntese de licopeno foi influenciada pela intensidade de energia irradiada (L) nos dias 3 (*p*-valor = 0,0485), 5 (*p*-valor = 0,0958) e 7 (*p*-valor = 0,0303); e ainda pelo fotoperíodo (Q) no dia 3 (*p*-valor = 0,0807). No dia 6, diversos fatores exerceram influência na síntese de licopeno, entretanto, verificou-se também a significância da falta de ajuste (*p*-valor = 0,0724), ou seja, a média dos valores de licopeno não se ajustou ao modelo proposto. A superfície de resposta referente aos resultados de licopeno em mg g⁻¹ podem ser visualizadas na Figura 5.5-7.

Tabela 5.5-9 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta licopeno em mg g^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetrademus* sp.

Fator	Licopeno (mg g^{-1})														
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _{cc}	p-valor
	Dia 3					Dia 4					Dia 5				
Intensidade L (1)	1	1,79	1,79	171,4	0,0485	1	1,54	1,54	21,95	0,1339	1	2,06	2,06	43,51	0,0958
Intensidade Q	1	0,04	0,04	4,27	0,2871	1	0,14	0,14	1,97	0,3944	1	0,01	0,01	0,25	0,7049
Fotoperíodo L (2)	1	0,04	0,04	4,07	0,2930	1	0,95	0,95	13,46	0,1694	1	0,00*	0,00*	0,00*	0,9915
Fotoperíodo Q	1	0,64	0,64	61,58	0,0807	1	1,18	1,18	16,73	0,1526	1	0,24	0,24	4,88	0,2660
(1) por (2)	1	0,08	0,08	7,79	0,2191	1	0,33	0,33	4,66	0,2761	1	0,23	0,23	4,89	0,2707
Falta de Ajuste	3	0,22	0,07	7,07	0,2682	3	0,70	0,23	3,34	0,3777	3	1,20	0,40	8,42	0,2468
Erro Puro	1	0,01	0,01			1	0,07	0,07			1	0,05	0,05		
Total	9	2,83				9	5,60				9	3,80			
	Dia 6					Dia 7									
Intensidade L (1)	1	4,01	4,01	926,5	0,0209	1	6,14	6,14	440,4	0,0303					
Intensidade Q	1	0,43	0,43	100,1	0,0634	1	0,005	0,004	0,33	0,6680					
Fotoperíodo L (2)	1	0,03	0,03	5,92	0,2483	1	0,39	0,39	28,22	0,1185					
Fotoperíodo Q	1	0,02	0,02	4,56	0,2788	1	0,10	0,10	7,11	0,2283					
(1) por (2)	1	0,44	0,44	101,3	0,0631	1	0,004	0,004	0,29	0,6834					
Falta de Ajuste	3	1,33	0,44	102,6	0,0724	3	0,65	0,22	15,66	0,1832					
Erro Puro	1	0,004	0,004			1	0,01	0,01							
Total	9	6,39				9	7,35								

* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_c, F calculado. N = 2. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

A Tabela 5.5-10 mostra a influência dos efeitos sobre a produção de licopeno em massa de pigmento por volume de cultivo da *Tetrademus* sp., e observa-se que o fator fotoperíodo (L) exerceu efeito significativo na produção do pigmento em todos os dias de cultivo avaliados, com exceção do último dia, 7. Verifica-se que o aumento do tempo de exposição à irradiação de luz, favoreceu o aumento da concentração de licopeno por volume de cultivo. Em que, de forma semelhante ao observado com os demais pigmentos, as condições do ensaio 8 ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 24 h) favoreceram a produção de licopeno (conforme Figura 5.5-8).

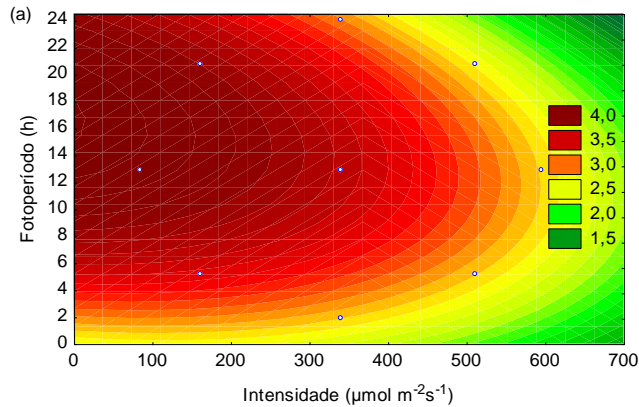
Tabela 5.5-10 - ANOVA ($\alpha = 0,10$) dos efeitos da intensidade de energia irradiada e do fotoperíodo, na variável resposta licopeno em mg L^{-1} , segundo dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp.

Fator	Licopeno (mg L^{-1})														
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor
	Dia 3					Dia 4					Dia 5				
Intensidade L (1)	1	1,76	1,76	12,72	0,1740	1	2,62	2,62	7,58	0,2218	1	2,06	2,06	5,56	0,2554
Intensidade Q	1	0,65	0,65	4,72	0,2745	1	0,52	0,52	1,50	0,4359	1	2,09	2,09	5,63	0,2540
Fotoperíodo L (2)	1	14,73	14,73	106,39	0,0615	1	33,72	33,72	97,41	0,0642	1	39,30	39,30	105,81	0,0617
Fotoperíodo Q	1	0,05	0,05	0,39	0,6446	1	0,01	0,01	0,02	0,9126	1	0,18	0,18	0,48	0,6135
(1) por (2)	1	0,38	0,38	2,73	0,3466	1	0,49	0,49	1,40	0,4463	1	1,68	1,68	4,52	0,2799
Falta de Ajuste	3	0,72	0,24	1,73	0,4967	3	6,64	2,21	6,39	0,2810	3	2,84	0,95	2,55	0,4243
Erro Puro	1	0,14	0,14			1	0,35	0,35			1	0,37	0,37		
Total	9	18,43				9	44,50				9	49,93			
	Dia 6					Dia 7									
Intensidade L (1)	1	0,23	0,23	0,77	0,5415	1	1,12	1,12	1,34	0,4535					
Intensidade Q	1	1,07	1,07	3,65	0,3068	1	5,26	5,26	6,31	0,2412					
Fotoperíodo L (2)	1	33,01	33,01	112,88	0,0597	1	28,24	28,24	33,91	0,1083					
Fotoperíodo Q	1	0,39	0,39	1,32	0,4563	1	0,27	0,27	0,33	0,6701					
(1) por (2)	1	2,24	2,24	7,66	0,2207	1	2,02	2,02	2,43	0,3632					
Falta de Ajuste	3	2,25	0,75	2,56	0,4233	3	3,53	1,18	1,41	0,5380					
Erro Puro	1	0,29	0,29			1	0,83	0,83							
Total	9	40,23				9	41,17								

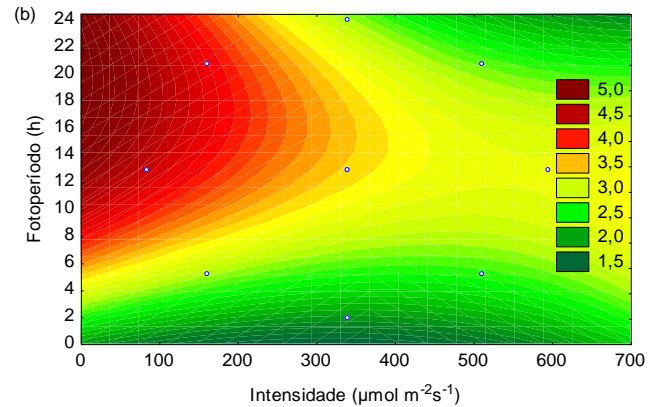
* $<0,00001$. Em negrito, efeitos significativos ($\alpha = 0,10$). L, linear; Q, quadrático; g.l., graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; F_c, F calculado. N = 2 Cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Os modelos quadráticos ajustados a partir resultados diários de licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1} , estão apresentados na Tabela 5.5-11, que inclui os coeficientes não significativos pelos mesmos motivos apresentados anteriormente para astaxantina e β -caroteno.

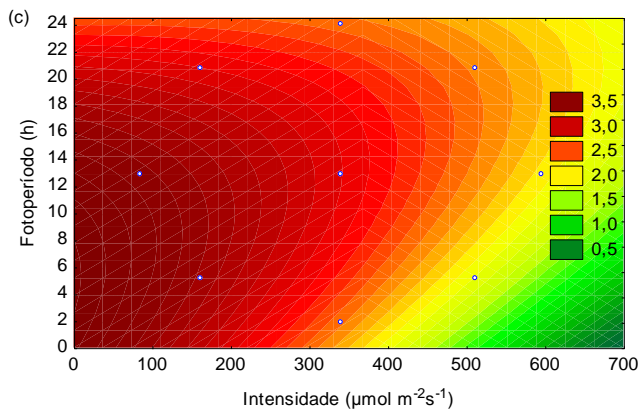
Figura 5.5-7 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Licopeno (mg g^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



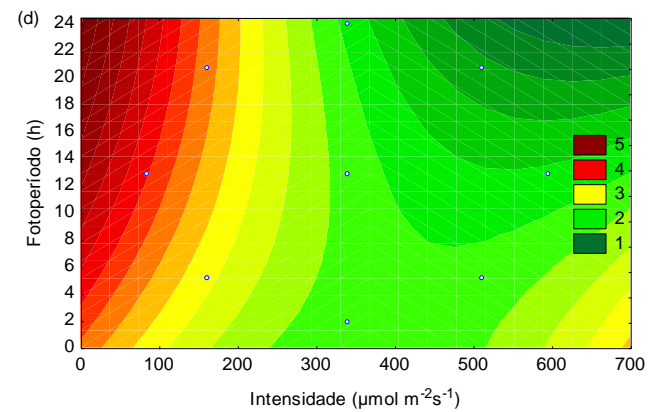
$$z=2;5067769136335+;00075576891685197*x-;000003079053918363*x^2 +;20658139698514*y-;0062374456090838*y^2-;00010458576353249*x*y$$



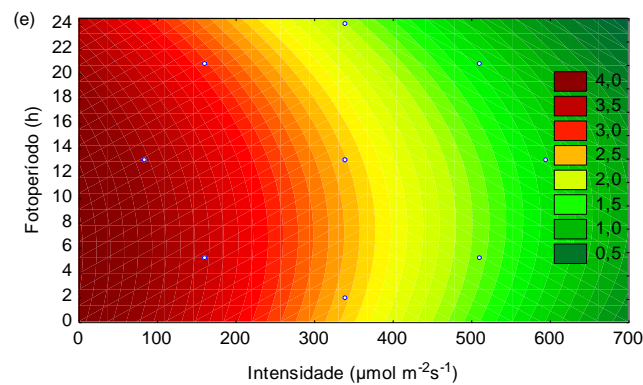
$$z=1;9187209348248-;0033768536774342*x+;000005417416283579*x^2 +;33353656449735*y-;0084272464657412*y^2-;00020972615386701*x*y$$



$$z=3;7263209450177-;0040844748019262*x-;000001584967481838*x^2 +;039880565881179*y-;003807051273358*y^2+;00017603375659775*x*y$$



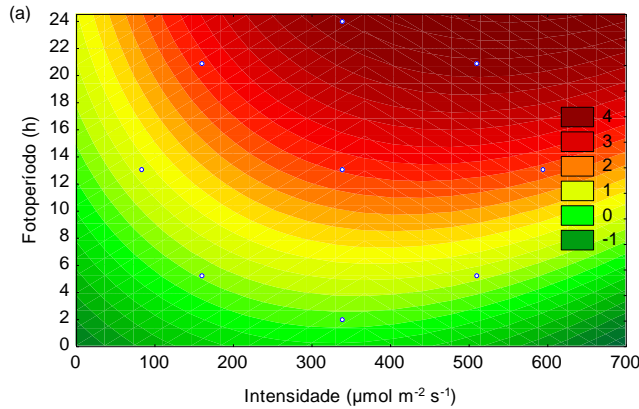
$$z=3;4406881973412-;0072608237349194*x+;000009591005967362*x^2 +;102373082975*y-;001091888975007*y^2-;00024254854152409*x*y$$



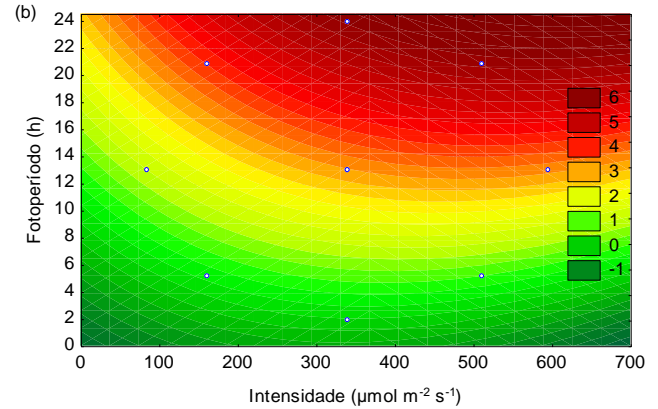
$$z=4;2591771206365-;0059012948308049*x+;000000988577315853*x^2 +;027270593926131*y-;0024468544280011*y^2+;000023487097036692*x*y$$

Fonte: O autor.

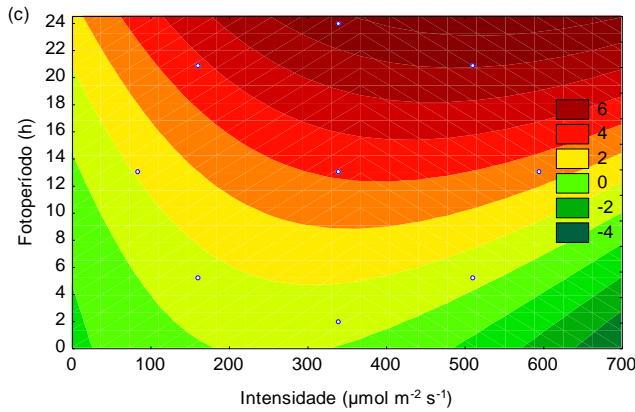
Figura 5.5-8 - DCCR: superfície de resposta referente à resposta de Licopeno (mg L^{-1}): (a) dia 3 (b) dia 4; (c) dia 5; (d) dia 6; e (e) dia 7.



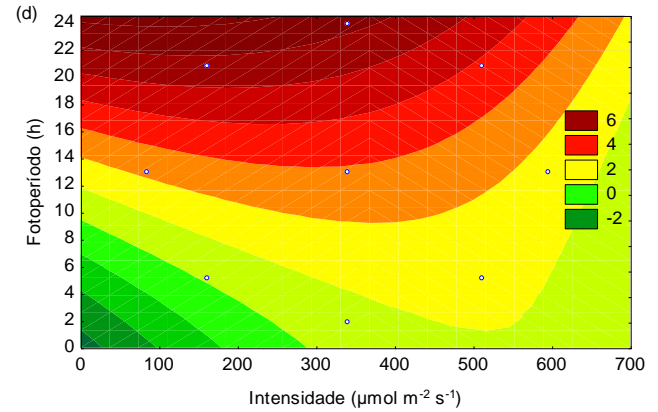
$$z = -1;5200729718418+;0076089079393448*x-;000011780457859463*x^2 +;14577225539148*y-;0018051215506454*y^2+;00022508311612895*x*y$$



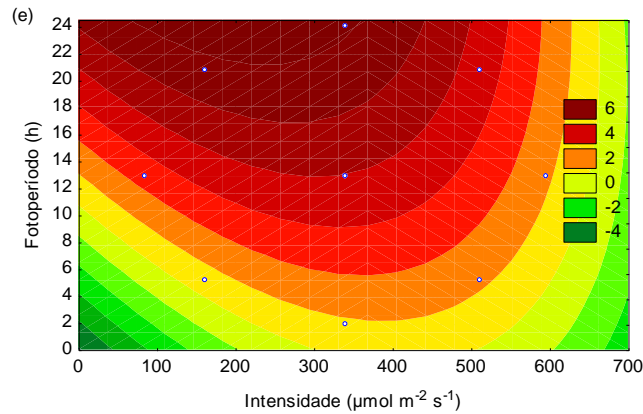
$$z = -1;7105408299606+;0069381200410514*x-;000010496924186052*x^2 +;19452417952398*y-;00063121613738451*y^2+;00025528365027142*x*y$$



$$z = -1;2653238925706+;010804078283982*x-;000021062530060417*x^2 +;040172375804766*y+;0032876699355031*y^2+;00047445579499786*x*y$$



$$z = -3;4393945497833+;016272386575534*x-;000015059383575144*x^2 +;31917612175871*y+;0048206280671848*y^2-;00054825587907011*x*y$$



$$z = -5;1212767980441+;027047240210331*x-;000033401194533206*x^2 +;52084239355979*y-;0040411785066228*y^2-;00052093514714337*x*y$$

Fonte: O autor.

Tabela 5.5-11 - Modelo ajustado e otimização dos fatores intensidade de energia irradiada e fotoperíodo, propostos para a predição de licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}

Dia	Coeficientes do Modelo						Parâmetros Otimizados		Licopeno (mg g^{-1})	Ajuste do Modelo	
	Interseção	x_1	x_1^2	x_2	x_2^2	$x_1 \cdot x_2$	x_1	x_2		R^2	R_{Ajust}
3	2,51	$7,56 \cdot 10^{-4}$	$-3,08 \cdot 10^{-6}$	0,21	$-6,24 \cdot 10^{-3}$	$-1,05 \cdot 10^{-3}$	85	15,8	4,1	0,9179	0,8152
4	1,92	$-3,38 \cdot 10^{-3}$	$5,42 \cdot 10^{-6}$	0,33	$-8,43 \cdot 10^{-3}$	$-2,1 \cdot 10^{-3}$	85	18,7	4,6	0,8616	0,6885
5	3,73	$-4,08 \cdot 10^{-3}$	$-1,58 \cdot 10^{-6}$	0,04	$-3,81 \cdot 10^{-3}$	$1,76 \cdot 10^{-4}$	85	7,2	3,6	0,6724	0,2629
6	3,44	$-7,26 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	0,10	$-1,09 \cdot 10^{-3}$	$-2,43 \cdot 10^{-3}$	85	24	4,2	0,7909	0,5294
7	4,26	$-5,9 \cdot 10^{-3}$	$9,89 \cdot 10^{-7}$	0,03	$-2,45 \cdot 10^{-3}$	$2,35 \cdot 10^{-5}$	85	6,0	3,9	0,9090	0,7952
Dia	Interseção	x_1	x_1^2	x_2	x_2^2	$x_1 \cdot x_2$	x_1	x_2	(mg L^{-1})	R^2	R_{Ajust}
3	-1,52	$7,61 \cdot 10^{-3}$	$-1,18 \cdot 10^{-5}$	0,15	$-1,81 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^{-4}$	595	24	4,5	0,9533	0,8950
4	-1,71	$6,94 \cdot 10^{-3}$	$-1,05 \cdot 10^{-5}$	0,19	$-6,31 \cdot 10^{-4}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$	622	24	6,7	0,8430	0,6468
5	-1,27	$1,08 \cdot 10^{-2}$	$-2,11 \cdot 10^{-5}$	0,04	$3,29 \cdot 10^{-3}$	$4,74 \cdot 10^{-4}$	527	24	7,4	0,9356	0,8551
6	-3,44	$1,63 \cdot 10^{-2}$	$-1,51 \cdot 10^{-5}$	0,32	$4,82 \cdot 10^{-3}$	$-5,48 \cdot 10^{-4}$	103	24	7,2	0,9368	0,8577
7	-5,12	$2,70 \cdot 10^{-2}$	$-3,34 \cdot 10^{-5}$	0,52	$-4,04 \cdot 10^{-3}$	$-5,21 \cdot 10^{-4}$	218	24	6,6	0,8940	0,7615

R^2 , coeficiente de determinação; R_{Ajust} , coeficiente de determinação ajustado. Cultivo da *Tetrademus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED.

Analogamente às análises realizadas com os pigmentos anteriores, o 3º dia de cultivo (com baixa influência do sombreamento celular) também apresentou o modelo com melhor ajuste aos dados experimentais realizados segundo o DCCR. Com representatividade de $R^2 = 0,9179$, o modelo sugere a síntese de $4,1 \text{ mg g}^{-1}$ de licopeno, a partir do cultivo da *Tetrademus* sp. irradiado por $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa por 15,8 h de fotoperíodo; e com representatividade de $R^2 = 0,9533$, o segundo modelo sugere a concentração de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de licopeno a partir do cultivo da microalga em $595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de energia e 24 h de fotoperíodo. Quando a predição da variável resposta em mg L^{-1} , verifica-se pela Tabelas 5.5-11, que o fotoperíodo sugerido pela otimização foi igualmente de 24 h.

A predição da variável resposta por intermédio dos modelos ajustados com os dados de astaxantina, β -caroteno e licopeno estimados no 3º dia de cultivo da *Tetrademus* sp., foi mais representativa do conjunto amostral, seja na unidade de mg g^{-1} ou mg L^{-1} . Conforme supracitado, não foi possível ajustar um modelo contemplando apenas os fatores significativos diante da perda de informações sugerida por R^2 ; e/ou pela acusação de um único parâmetro significativo em referência ao nível de significância adotado ($\alpha = 0,10$). Portanto, optou-se por continuar o trabalho com a validação dos modelos ajustados com dados do 3º dia, para a astaxantina, β -caroteno e licopeno, tanto em mg g^{-1} quanto em mg L^{-1} . Os resultados obtidos com o planejamento PB (item 5.4.2) sugerem a baixa influência do efeito de sombreamento

celular até o terceiro dia de cultivo da microalga, o que possibilita o acúmulo intracelular de carotenoides diante do estresse luminoso contínuo. Ainda, a obtenção do pigmento de interesse a partir do cultivo de microalgas por apenas 3 dias pode ser um aspecto positivo industrialmente. Os resultados experimentais de astaxantina, β -caroteno e licopeno (em mg g^{-1} e mg L^{-1}), determinados para o terceiro dia de cultivo da *Tetradismus* sp. seguindo o DCCR estão apresentados na Tabela 5.5-12.

Tabela 5.5-12 - Matriz do DCCR para as respostas de biomassa, astaxantina, β -caroteno e licopeno, em três dias de cultivo da microalga *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana, irradiado por LED na faixa espectral vermelha e verde na proporção 50%:50%

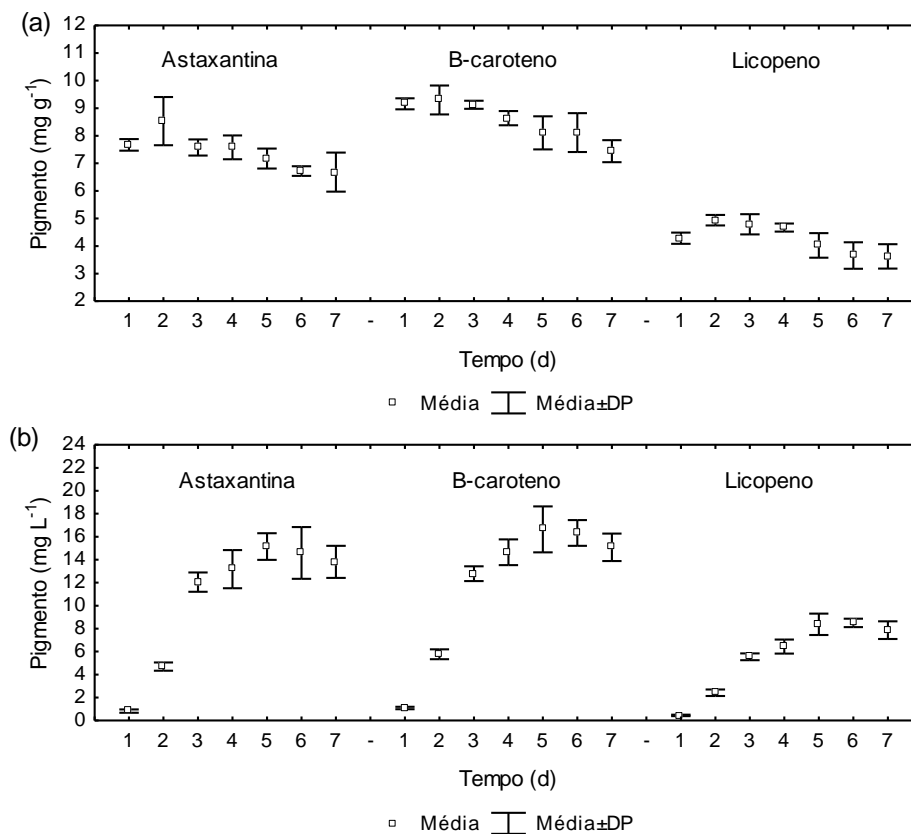
N	X_1	X_2	Biomassa		Astaxantina		β -caroteno		Licopeno	
			g L^{-1}	mg g^{-1}	mg L^{-1}	mg g^{-1}	mg L^{-1}	mg g^{-1}	mg L^{-1}	
1	160 (-1)	5,2 (-1)	$0,12 \pm 0,01$	$5,8 \pm 0,1$	$0,72 \pm 0,01$	$7,4 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,02$	
2	510 (1)	5,2 (-1)	$0,2 \pm 0,1$	$4,9 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,2$	$6,2 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,1$	
3	160 (-1)	20,8 (1)	$0,82 \pm 0,02$	$6,1 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$7,99 \pm 0,04$	$6,54 \pm 0,03$	$3,53 \pm 0,04$	$2,89 \pm 0,03$	
4	510 (1)	20,8 (1)	$1,77 \pm 0,02$	$4,2 \pm 0,5$	$7,4 \pm 0,9$	$5,1 \pm 0,5$	$9,1 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,5$	
5	85 (-1,414)	13 (0)	$0,13 \pm 0,01$	$7,4 \pm 0,2$	$0,93 \pm 0,02$	$9,2 \pm 0,1$	$1,16 \pm 0,01$	$4,2 \pm 0,1$	$0,54 \pm 0,01$	
6	595 (1,414)	13 (0)	$0,77 \pm 0,02$	$4,8 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	
7	340 (0)	2 (-1,414)	$0,08 \pm 0,01$	$4,3 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,5$	$0,41 \pm 0,04$	$2,7 \pm 0,3$	$0,20 \pm 0,02$	
8	340 (0)	24 (1,414)	$1,10 \pm 0,01$	$5,6 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	
9	340 (0)	13 (0)	$0,58 \pm 0,02$	$6,1 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	
10	340 (0)	13 (0)	$0,70 \pm 0,02$	$6,5 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	

N, Ensaio; X_1 , intensidade de energia irradiada ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); X_2 , fotoperíodo (h).

5.5.4 Validação dos Modelos

O cultivo da *Tetradismus* sp. sob as condições de intensidade de energia e fotoperíodo sugeridas pela otimização dos fatores, resultou nos valores (observados) de carotenoides apresentados na Figura 5.5-9. O valor de carotenoide mensurado no 3º dia do cultivo (mesmo período temporal dos modelos ajustados) foi comparado ao valor de carotenoide predito pelos modelos por meio da Tabela 5.5-13, e verifica-se que os resultados (observados) de carotenoides sintetizados pela *Tetradismus* sp. permaneceram dentro do intervalo de confiança calculado para os valores preditos pelos modelos.

Figura 5.5-9 - Determinação experimental diária de astaxantina, β -caroteno e licopeno em termos de média e desvio padrão em (a) mg g^{-1} a partir do cultivo da *Tetradismus* sp. sob $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 15,8 h de fotoperíodo; (b) mg L^{-1} a partir do cultivo da *Tetradismus* sp. sob $595 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e 24 h de fotoperíodo



Fonte: O autor.

Tabela 5.5-13 - Valores preditos e observados \pm IC (95%) referente à astaxantina, β -caroteno e licopeno em mg g^{-1} e mg L^{-1}

Energia ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fotoperíodo (h)	Unidade	Astaxantina		β -caroteno		Licopeno	
			Predito ¹	Observado ²	Predito	Observado	Predito	Observado
X_1	X_2							
85	15,8	(mg g^{-1})	$7,2 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,7$	$9,1 \pm 0,8$	$9,1 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,9$
595	24	(mg L^{-1})	$7,9 \pm 1,9$	$12,1 \pm 2,1$	$9,4 \pm 2,3$	$12,8 \pm 1,6$	$4,5 \pm 1,0$	$5,5 \pm 0,7$

¹Predito: valores estimados por meio do modelo ajustado com fatores intensidade e fotoperíodo otimizados.

²Observado: valores obtidos com o cultivo da *Tetradismus* sp. em fotobiorreator placa plana irradiado por LED em condições de intensidade e fotoperíodo otimizadas.

A determinação de condições ótimas de intensidade de energia e fotoperíodo (Tabela 5.5-13) pela aplicação de técnicas de planejamento experimental e otimização de processos, permitiu aumentar a síntese de carotenoides. Dammak et al. (2018) determinaram a concentração máxima de carotenoides de $0,042 \text{ mg g}^{-1}$, após processo de otimização via Box-Behnken das condições de cultivo ($183 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pH de 7, salinidade de 40) da microalga

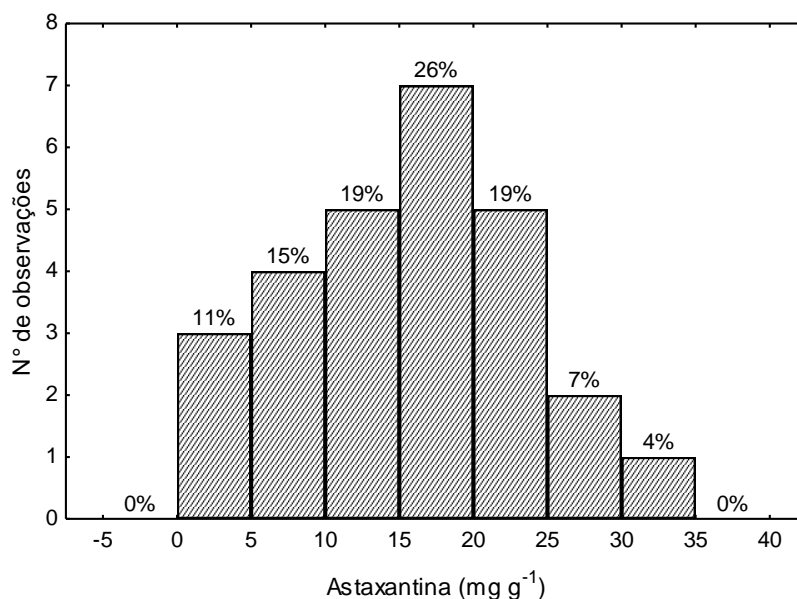
Tetraselmis sp. Enquanto, El-Sheekh et al. (2016) conseguiram aumentar ($\alpha = 0,05$) em 21% a concentração de β -caroteno na composição química da alga marinha *Nannochloropsis oculata*, de $0,11 \text{ mg g}^{-1}$ para $0,14 \text{ mg g}^{-1}$, a partir da otimização do meio de cultivo F/2 via Plackett-Burman. Gonçalves et al. (2019) avaliaram os efeitos ($\alpha = 0,05$) da intensidade luminosa ($140 - 364 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e da temperatura ($20 - 36^\circ\text{C}$) na síntese de carotenoides pela *Pseudoneochloris marina*, e observaram maior produção do pigmento acessório ($3,77 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$) no cultivo sob $140 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 20°C .

Comparativamente às investigações desenvolvidas para encontrar microalgas com potencial de síntese de carotenoides, destaca-se que Paliwal et al. (2016) investigaram 57 microalgas quanto à produção de carotenoides, a *Acutodesmus dimorphos* e *Scenedesmus* sp. produziram $3,1 \pm 4,4 \text{ mg g}^{-1}$ e $2,8 \pm 1,1 \text{ mg g}^{-1}$ de carotenoides, respectivamente; enquanto a máxima produção foi registrada com a *Anikistrodesmus* sp., de $7,2 \pm 2,4 \text{ mg g}^{-1}$. George et al. (2014) mensuraram a máxima concentração de carotenoides de $4,02 \pm 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$, em cultivos da *Ankistrodesmus falcatus*. Minhas et al. (2016) cultivaram 22 microalgas na intensidade de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 16:08 h de fotoperíodo, e determinaram $1,54 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina no cultivo da *Scenedesmus bijugus*.

Concentrações elevadas de carotenoides foram observadas por Přibyl et al. (2015), que após 14 dias de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., mensuraram produção do pigmento de $19,01 \pm 1,45 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ou $2,08 \pm 0,03\%$ em peso seco. Ahmed el al. (2014) isolaram de águas costeiras na Austrália, 12 microalgas com capacidade de síntese de carotenoides. Entre elas a *Dunaliella salina*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis* sp., com produção de respectiva de carotenoides: $6,8 \text{ mg g}^{-1}$ (18% em β -caroteno), $5,8 \text{ mg g}^{-1}$ (39% em astaxantina e 11% em β -caroteno), $2,1 \text{ mg g}^{-1}$ (50% em β -caroteno) e $2,0 \text{ mg g}^{-1}$ (16% em astaxantina e 24% em β -caroteno).

A *Dunaliella salina* é reconhecida por sua produção de β -caroteno, e por isso, é utilizada no setor industrial de produção natural do pigmento. Lamers et al. (2010) cultivaram *D. salina* em condições de estresse para induzir a síntese de carotenoides, e mensuraram $\sim 70 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno ao cultivar a microalga com $2.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e sob depleção de nitrogênio; $\sim 30 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno com $2.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sem depleção de nitrogênio; e $\sim 4 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno com $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e sem depleção de nitrogênio. Outra microalga largamente utilizada na produção industrial de carotenoides, agora de astaxantina, é a *Haematococcus pluvialis*. A Figura 5.5-10 apresenta um gráfico de frequência para produção de astaxantina em cultivos da *H. pluvialis*.

Figura 5.5-10 - Produção de astaxantina (mg g^{-1}) pela microalga *Haematococcus pluvialis* obtida em diferentes pesquisas



Fonte: A base de dados (27 observações) para gerar o gráfico de frequências foi obtida a partir dos artigos de revisão: Khoo et al. (2019); Kim et al. (2016).

Pela Figura 5.5-10, verifica-se do total de 27 observações de produção de astaxantina pela *H. pluvialis*, o maior número de observações (7) ou 26% permaneceu dentro do intervalo de 15 – 20 mg g^{-1} de astaxantina. E 4 observações ou 15%, permaneceram dentro do intervalo de 5 – 10 mg g^{-1} de astaxantina, intervalo onde se encontra o valor de astaxantina produzido pela *Tetradismus* sp. mensurado neste trabalho.

5.6 SÍNTESE DO CAPÍTULO

As microalgas *Poterioochromonas malhamensis*, *Micractinium* sp., *Chlorella vulgaris* e *Tetradismus* sp. foram cultivadas em fotobiorreator irradiado constantemente por luz fluorescente na intensidade de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e apenas a *Tetradismus* sp. apresentou capacidade de síntese de carotenoides totais em meio BG-11 (1,67 mg g^{-1}) e BG-11-CNP (1,53 mg g^{-1}). Nos ensaios de fotoestimulação da *Tetradismus* sp. cultivada em fotobiorreator irradiado por diferentes regiões do espectro eletromagnético visível, a concentração máxima de carotenoides totais (6,09 mg g^{-1}) foi obtida com a composição espectral vermelha:verde na intensidade de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O estresse causado à microalga com a composição espectral vermelha:verde, foi evidente ao elevar a intensidade de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fato que promoveu a inibição do crescimento da *Tetradismus* sp. com redução de 30% da

biomassa (de 1,08 g L⁻¹ para 0,76 g L⁻¹), porém, elevação de 40% da síntese de carotenoides (de 3,63 mg g⁻¹ para 6,09 mg g⁻¹).

Fixada a combinação espectral vermelha:verde (50%:50%), a investigação de outras condições no cultivo da *Tetrademus* sp. com efeito na síntese de carotenoides (via planejamento PB), sugeriu influência da intensidade luminosa, do fotoperíodo e do parâmetro não controlado: crescimento celular. A *Tetrademus* sp. em baixa concentração celular (3º dia de cultivo), sob nível superior de intensidade e fotoperíodo (510 μmol m⁻² s⁻¹; 24 h), sintetizou elevada concentração de carotenoides. Com o crescimento exponencial, a partir do 3º dia, ocorreu aumento do sombreamento celular, fato que reduziu o estresse luminoso e conseqüentemente, a síntese de carotenoides. O cultivo da *Tetrademus* sp. em níveis opostos de intensidade e fotoperíodo, reduziu o efeito do sombreamento celular ao controlar o crescimento em biomassa (seja pelo fornecimento de baixa luminosidade ou pelo reduzido tempo de iluminação), de modo a favorecer a síntese de carotenoides ao longo do tempo de cultivo.

Os efeitos da intensidade luminosa e do fotoperíodo na síntese de carotenoides pela *Tetrademus* sp. foram reavaliados via DCCR. De modo geral, a *Tetrademus* sp. aumentou a síntese do pigmento (mg g⁻¹) sob baixa intensidade luminosa e elevou a produção do pigmento (mg L⁻¹) com o aumento das horas de iluminação; e sob baixa intensidade e elevado tempo de iluminação (160 μmol m⁻² s⁻¹; 24 h) aumentou o valor de carotenoides tanto em mg g⁻¹ quanto em mg L⁻¹.

Com os resultados do 3º dia de cultivo da *Tetrademus* sp. foram ajustados modelos de predição de carotenoides. Na estimativa dos valores máximos de astaxantina, β-caroteno e licopeno, o processo de otimização sugeriu o cultivo da *Tetrademus* sp. na intensidade de 85 μmol m⁻² s⁻¹ por 15,8 h diárias de luz (para resposta em mg g⁻¹); e na intensidade de 595 μmol m⁻² s⁻¹ por 24 h (para a resposta em mg L⁻¹). O cultivo da microalga nas condições otimizadas permitiu alcançar valores de carotenoides dentro do IC (95%) dos modelos ajustados. Comparativamente ao resultado de carotenoides (1,67 mg g⁻¹) obtido no primeiro cultivo da *Tetrademus* sp., Experimento 1, o delineamento experimental e otimização do processo adotado neste estudo possibilitou elevar em 78% a concentração de carotenoides em termos de astaxantina (mg g⁻¹), 82% em termos de β-caroteno (mg g⁻¹) e 65% em licopeno (mg g⁻¹).

6 CONCLUSÃO

Dentre as microalgas *Poterioochromonas malhamensis*, *Micractinium* sp., *Chlorella vulgaris* e *Tetradismus* sp. cultivadas em fotobiorreator, esta última, *Tetradismus* sp., apresentou capacidade de síntese de carotenoides, cuja extração foi eficiente quando realizada por banho de ultrassom. As investigações de fotoestimulação da *Tetradismus* sp. sugeriram maior síntese de carotenoides quando a microalga foi cultivada com a combinação espectral vermelha:verde (50%:50%), e maior crescimento celular sob a luz azul. Na avaliação dos efeitos da intensidade de energia irradiada na combinação espectral vermelha:verde (50%:50%), fotoperíodo, pH, concentração de NaCl e de nitrogênio, sob a síntese de carotenoides e produção de biomassa pela microalga, foi observado efeito significativo da intensidade luminosa e do fotoperíodo. Em que o aumento da intensidade luminosa e do tempo de irradiação favoreceu o crescimento celular resultando na maior concentração de carotenoides em mg L^{-1} ; enquanto a associação da intensidade luminosa e fotoperíodo em níveis opostos conteve o crescimento em biomassa e favoreceu a síntese de carotenoides em mg g^{-1} . Foram ajustados modelos de regressão para predição de carotenoides a partir dos termos lineares e quadráticos dos fatores intensidade luminosa e fotoperíodo, cuja otimização permitiu estimar a máxima síntese de carotenoides pela microalga, resultado validado com 95% de intervalo de confiança. Deve-se notar que, comparando os resultados com os publicados, mostrou-se que a estratégia de pesquisa aplicada e os métodos estatísticos de desenho experimental são ferramentas muito eficazes para o desenvolvimento geral do processo. *Tetradismus* sp. pode ser considerada como uma fonte desafiadora de produção de carotenoides para atender às demandas da indústria química e alimentícia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.107>
- AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: an *in-vitro* study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436-441, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.012>.
- ALCAÍNO, J.; BAEZA, M.; CIFUENTES, V. Carotenoid Distribution in Nature. *In*: STANGE, C. (ed.). **Carotenoids in nature biosynthesis, regulation and function**. Germany: Springer, 2016, p. 3-34.
- ALGA TECH, 2017. Disponível em: <https://www.algatech.com/>. Acesso em: 27 ago. 2017.
- ALGAEBASE, 2017. Disponível em: <https://www.algaebase.com/>. Acesso em: 27 ago. 2017.
- ALGAE HEALTH, 2017. Disponível em: <https://www.algaehealthsciences.com/>. Acesso em: 27 ago. 2017.
- ANDERSEN, R. A. The Microalgal Cell. *In*: RICHMOND, A.; HU, G. (ed.). **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**. USA: Wiley Blackwell 2013, p. 3-20.
- ARNON, D. J.; McSWAIN, B. D.; TSUJIMOTO, H. Y.; WADA, K. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 357, p. 231-245, 1974.
- ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373-378, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>
- BAER, S.; HEINING, M.; SCHWERNA, P.; BUCHHOLZ, R.; HÜBNER, H. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. **Algal Research**, v. 14, p. 109-115, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.011>
- BAUDELETA, P. H.; RICOCHONB, G.; LINDERA, M.; MUNIGLIA, L. A new insight into cell walls of *Chlorophyta*. **Algal Research**, v. 25, p. 333-371, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>

- BEALE, S. I. Biosynthesis of phycobilins. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 785-802, 1993.
- BEN-AMOTZ, A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 65-68, 1995.
- BENNETT, L.; BOGORAD, A. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- BICUDO, CARLOS. E.; MENEZES, MARIÂNGELA. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil** (Chave para identificação e descrições). 2. ed. São Carlos: Rima, 2006.
- BLANCO, A. M.; MORENO, J.; DEL CAMPO, J. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. J. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1259–1266, 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0598-9
- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.
- BOUARAB, L.; DAUTA, A.; LOUDIKI, M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. **Water Research**, v. 38, p. 2706-2712, 2004. DOI:10.1016/j.watres.2004.03.021
- BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista**, v. 10, p. 6–11, 2016.
- BRYANT, D. A.; GUGLIELMI, G.; MARSAC, N. T.; CASTETS, A. M., COHEN-BAZIRE, G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. **Archives of Microbiology**, v. 123, p. 113-127, 1979.
- BUNGE, 2016. Disponível em: <http://www.bunge.com.br/Imprensa/Noticia.aspx?id=892>. Acesso em: 21 ago. 2017.
- CAMPENNI, L.; NOBRE, B. P.; SANTOS, C. A.; OLIVEIRA, A. C.; AIRES-BARROS, M. R.; PALAVRA, A. M. F.; GOUVEIA, L. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1383–1393, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-4570-6
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Focus Tibtech**, v. 14, 1996.

CHEN, H. B.; WU, J. Y.; WANG, C. F.; FU, C. C.; SHIEH, C. J.; CHEN, C. I.; WANG, C. Y.; LIU, Y. C. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 52-56, 2010.

CHEN, X.; WU, M.; YANG, Q.; WANG, S. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 468-474, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.005>

CHIES, V. Microalgas contra a gripe. **Agroenergia em Revista**, Ed. 10, p. 36-39, 2016.

CHODAT, ROBERT (1865-1934). Monographies d'algues em culture pure ([Reprod.]) par Dr. R. Chodat, 1913.

CHOI, Y. K.; KUMARAN, R. S.; JEON, H. J.; SONG, H. J.; YANG, Y. H.; LEE, S. H.; SONG, K. G.; KIM, K. J.; SINGH, V.; KIM, H. J. LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 145, p. 245-253, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.03.035>

COLLARES, D. Aposta na pesquisa com microalgas. **Embrapa: Agroenergia em Revista**, ed. 10, p. 4, 2016.

CUELLER-BERMUDEZ, S. P.; AGULLAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D. L.; ORNELAS-SOTO, N.; ROMERO-OGAWA, M. A.; PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 190-209, 2014. DOI:10.1111/1751-7915.12167

CYANOTECH, 2017. Disponível em: <http://www.cyanotech.com/index.html>. Acesso em: 27 ago. 2017.

DAMMAK, M.; HADRICH, B.; BARKALLAH, M.; HENTATI, F.; BEN, H.; PICHON, C.; DENIS, M.; FENDRI, I.; MICHAUD, P.; ABDELKA, S. Compound production through environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 510-518, 2018.

DANTAS, Danielli Matias de Macêdo. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M. R. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, B. 369, 2016. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0243>

DEL CAMPO, J. A.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, M. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae. Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp.* (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 51-59, 2000.

DEL CAMPO, J. A.; RODRÍGUEZ, H.; MORENO, J.; VARGAS, M. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Lutein production by *Muriellopsis sp.* in an outdoor tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 289-295, 2001.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures, **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1242-1245, 2018. DOI:10.1016/j.biortech.2017.09.143.

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; GHEDA, S. F.; EL-SHENODY, R. A. Application of Plackett-Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, p. 57-64, 2016. DOI:10.1016/j.ejar.2015.10.001.

ESCAPA, C.; COIMBRA, R. N.; PANIAGUA, S.; GARCÍA, A. I.; OTERO, M. Comparison of the culture and harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Tetradismus obliquus* for the removal of pharmaceuticals from water. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1179-1193, 2017. DOI: 10.1007/s10811-016-1010-5

ESTEVEZ, F. A. et al. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FAZENDA TAMANDUÁ, 2017. Disponível em: <https://www.fazendatamandua.com.br/index.php/spirulina/>. Acesso em: 21 ago. 2017.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L. DOS; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63 p. 1061-1067, 2004. DOI:10.1016/j.talanta.2004.01.015

FONSECA, R. A. DOS S. DA; RAFAEL, R. DA S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. DE M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011. DOI:10.5897/AJB10.1034.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004. DOI:10.1016/j.plipres.2003.10.002

FU, W.; GUDMUNDSSON, O.; FEIST, A. M.; HERJOLFSSON, G.; BRYNJOLFSSON, S.; PALSSON, B. O. Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 161, p. 242-249, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.004>

GANGL, D.; ZEDLER, J. A. Z.; RAJAKUMAR, P. D.; MARTINEZ, E. M. R.; RISELEY, A.; WŁODARCZYK, A.; PURTON, S.; SAKURAGI, Y.; HOWE, C. J.; JENSEN, P. E.; ROBINSON, C. Biotechnological exploitation of microalgae. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 22, p. 6975-6990, 2015. DOI:10.1093/jxb/erv426

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. DOI:10.1016/j.biortech.2014.08.086.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, p. 105-112, 1994.

GLEMSER, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRÜCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1077-1088, 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-7144-6

GOMAA, M. A.; AL-HAJ, L.; ABED, R. M. M. Metabolic engineering of cyanobacteria and microalgae for enhanced production of biofuels and high-value products. **Journal of Applied Microbiology**, 2016. DOI: 10.1111/jam.13232.

GONÇALVES, C. F.; MENEGOL, T.; RECH, R. Biochemical composition of green microalgae *Pseudoneochloris marina* grown under different temperature and light conditions. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101032, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101032>

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1396-1412, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>

GRAMA, B. S.; CHADER, S.; KHELIFI, D.; STENUIT, B.; JEFFRYES, C.; AGATHOS, S. N. Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara. **Biomass and bioenergy**, v. 69, p. 265-275, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.023>

GRIMA E. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R. Downstream processing of Cell Mass and Products. *In*: RICHMOND, A.; HU, Q. (ed.). **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**. USA: Wiley Blackwell, 2013, p. 267-309.

HAN, L.; PEI, H.; HU, W.; JIANG, L.; MA, G.; ZHANG, S.; HAN, F. Integrated campus sewage treatment and biomass production by *Scenedesmus quadricauda* SDEC-13. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 262-268, 2015.

HENRÍQUEZ, V.; ESCOBAR, C.; GALARZA, J.; GIMPEL, J. Carotenoids in microalgae. *In*: STANGE, C. (ed.). **Carotenoids in nature biosynthesis, regulation and function**. Germany: Springer, 2016, p. 219-238.

HERRERA, A.; BOUSSIBA, S.; NAPOLEONE, V.; HOHLBERG, A. Recovery of c-phycoocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, p. 325-331, 1989.

HINTERHOLZ, C. L.; SCHUELTER, A. R.; MÓDENES, A. N.; TRIGUEROS, D. E. G.; BORBA, C. E.; ESPINOZA-QUÍÑONES, F. R.; KROUMOV, A. Microalgae flat plate-photobioreactor (FP-PBR) system development: computational tools to improve experimental results. **Acta Microbiologica Bulgarica**, v. 33, p. 119-124, 2017.

HU, L.; HUANG, B.; ZUO, M.; WEI, H. Preparation of the phycoerythrin subunit liposome in a photodynamic experiment on liver cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, p. 1539-1546, 2008.

IOUSP – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2017. Disponível em <http://www.io.usp.br/index.php/infraestrutura/colecao-biologica>. Acesso em: 02 fev. 2017.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 298-305, 2001. PII: S0141-0229(01)00387-8

KHALILI, A.; NAJAFPOUR, G. D.; AMINI, G.; SAMKHANIYANI, F. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 284-290, 2015. DOI: 10.1007/s12257-013-0845-8

KHOO, K. S.; LEE, S. Y.; OOI, C. W.; FU, X.; MIAO, X.; LING, T. C.; SHOW, P. L.; Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>

KIM, S.; KEASLING, J. D. Nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 408-415, 2001. doi:10.1002/1097-0290(20000220)72.

KIM, D-Y.; VIJAYAN, D.; PREVEENKUMAR, R.; HAN, J-I.; LEE, K.; PARK, J-Y.; CHANG, W-S.; LEE, J-S.; OH, Y-K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 30-310, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>

KIM, J. K.; KRAEMER, G. P.; NEEFUS, C. D.; CHUNG, I. K.; YARISH, C. Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four

species of *Porphyra* (*Bangiales*, *Rhodophyta*) native to the New England coast. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 431-440, 2007. DOI: 10.1007/s10811-006-9150-7

KIM, J. K.; MAO, Y.; KRAEMER, G.; YARISH, C. Growth and pigment content of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan under fluorescent and LED lighting. **Aquaculture**, v. 436, p. 52-57, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.037>

KORSHIKOV, A. A. (1953). *Viznachnik prishnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales)* [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]. pp. 1-439. Kyjv [Kiev]: Akad. NAUK URSR.

KWAK, J. H.; BAEK, S. H.; WOO, Y.; HAN, J. K.; KIM, B. G.; KIM, O. Y.; LEE, J. H. Beneficial immunostimulatory effect of short-term *Chlorella* supplementation: enhancement of natural killer cell activity and early inflammatory response (randomized, double-blinded, placebo-controlled trial). **Nutrition Journal**, v. 11, p. 53, 2012.

LAMERS, P. P.; LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 4, 2010. DOI: 10.1002/bit.22725

LAWRENZ, E.; FEDEWA, E. J.; RICHARDSON, T. L. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 865-871, 2011. DOI: 10.1007/s10811-010-9600-0

LEE, C. G.; PALSSON, B. O. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 1161-1167, 1994.

LEE Y. K.; CHEN, W.; SHEN, H.; HAN, D.; LI, Y.; JONES, H. D. T.; TIMLIN, J. A. Basic culturing and analytical measurement techniques. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. USA: Wiley Blackwell, 2013, p. 37-68.

LEÓN-SAIKI, G. M.; FERRER LEDO, N.; LAO-MARTIL, D.; VAN DER VEEN, D.; WIJFFELS, R. H.; MARTENS, D. E. Metabolic modelling and energy parameter estimation of *Tetrademus obliquus*. **Algal Research**, v. 35, p. 378-387, 2018a. DOI:10.1016/j.algal.2018.09.008

LEÓN-SAIKI, G. M.; MARTÍ, T. C.; VAN DER VEEN, D.; WIJFFELS, R. H.; MARTENS, D. E. The impact of day length on cell division and efficiency of light use in a starchless mutant of *Tetrademus obliquus*. **Algal Research**, v. 31, p. 387-394, 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.027>

LEU, S.; BOUSSIBA, S. Advances in the production of high-value products by microalgae. **Industrial Biotechnology**, n. 3, v. 10, 2014.

LIAO, Q.; LI, L.; CHEN, R.; ZHU, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 186-191, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.119>

LICHTENTHALER, H.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. (ed.). **Current protocols on food analytical chemistry**. John Wiley & Sons, 2001, F4.3.1-F4.3.8.

MA, R.; THOMAS-HALL, S. R.; CHUA, E. T.; ELTANAHY, E.; NETZEL, M. E.; NETZEL, G.; LU, Y.; SCHENK, P. M. LED power efficiency of biomass, fatty acid, and carotenoid production in *Nannochloropsis* microalgae. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 118-126, 2018. DOI:10.1016/j.biortech.2017.12.096.

MACHADO, W. R. C.; BURKERT, J. F. DE M. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 209-219, 2015. DOI:10.5897/AJMR2014.7096.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SANOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 484-488, 2003. DOI: 10.1007/s00253-003-1315-6

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 282-296, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>

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, p. 1532-1542, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍŽEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. USA: Wiley Blackwell, 2004, p. 20-39.

MINHAS, A. K.; HODGSON, P.; BARROW, C. J.; SASHIDHAR, B.; ADHOLEYA, A. The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 556-565, 2016. DOI:10.1016/j.biortech.2016.03.121.

MOOIJ, T.; VRIES, G.; LATSOS, C.; WIJFFELS, R. H.; JANSSEN, M. Impact of light color on photobioreactor productivity. **Algal Research**, v. 15, p. 32-42, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.015>

MORAIS, Flávia Luisa de. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MULDERS, K. J. M.; JANSSEN, J. H.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. **Algal Research**, v. 6, p. 8-16, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.08.006>

NATURAL ASTAXANTHIN, 2017. Disponível em: <http://www.naturalastaxanthin.cc/>. Acesso em: 27 ago. 2017.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICHOLS H. W. Growth media—freshwater. *In*: STEIN, J. (ed.). **Handbook of phycolgical methods, culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University Press, 1973, p. 7–24.

NISAR, N.; LI, L.; LU, S.; KHIN, N. C.; POGSON, B. L. Carotenoid metabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, p. 68–82, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>

OOMS, M. D.; DINH, C. T.; SARGENT, E. H.; SINTON, D. Photon management for augmented photosynthesis. **Nature Communications**, v. 7, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12699

PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; PANCHA, I.; MAURYA, R.; CHOKSHI, K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal carotenoids: potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24-31, 2016. DOI:10.1016/j.algal.2016.01.017.

PATIAS, L. D.; FERNANDES, A. S.; PETRY, F. C.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. **Food Research International**, v. 100, p. 260-266, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.069>

PAWAR, S. T.; PURANIK, P. R. C-phycoyanin production by halotolerant cyanobacteria. **Phykos**, v. 44, p. 25-32, 2014.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PRATES, Denise da Fontoura. **Foto-estimulação de microalgas para a produção de ficocianina e outras biomoléculas utilizando diodos emissores de luz (LEDs)**. 2015. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2015.

PŘIBYL, P.; CEPÁK, V.; KAŠTÁNEK, P.; ZACHLEDER, V. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, v. 11, p. 22–27, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.020>

PRNewswire, 2018. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-algae-market-is-projected-to-be-worth-us11-bn-by-2024-at-a-cagr-of-739-global-industry-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-2016---2024-tmr-594253011.html>. Acesso em: 10 nov. 2018.

QIN, S.; LIU, G. X.; HU, Z. Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Process Biochemistry**, v. 43, p. 795-802, 2008. doi:10.1016/j.procbio.2008.03.010.

RAMANNA, L.; RAWAT, I.; BUX, F. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 765-773, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.202>

RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; CASSAN, C. J.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 842-848, 2008. DOI: 10.1002/jctb.1878

RITO-PALOMARES, M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 1273-1280, 2001.

RODRIGUES, Maria Isabel; LEMMA, Antonio Francisco. 3. ed. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2014.

SAATH, K. C. de O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195-2012, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; ACIÉN, F. G.; CERÓN, M. C.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA-GRIMA, E. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 719-729, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1494-2

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002. P I I : S0924-2244(02)00182-6

SCHUELTER, A. R.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; FIORINI, A.; TRIGUEROS, D. E. G.; VENDRUSCOLO, E. G.; ZAHARIEVA, M. M.; MÓDENES, A. N. Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 28-39, 2019. DOI:10.1016/J.BEJ.2019.01.007.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, 2014.

SETYONINGRUM, T.; M.; NUR, M. M. A. Optimization of C-phycoerythrin production from *S. platensis* cultivated on mixotrophic condition by using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 603-607, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.008>

SEVERES, A.; HEGDE, S.; D'SOUZA, L.; HEGDE, S. Use of light emitting diodes (LEDs) for enhanced lipid production in microalgae based biofuels. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 170, p. 235-240, 2017.

SILVA, M. R. L.; ANDRADE, D. S.; SCHERER, A. Coleta, isolamento, caracterização morfológica e manutenção in vivo de microalgas da coleção IPR. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (ed.). **Microalgas de águas continentais**. Londrina: IAPAR, 2014, p. 307.

SILVA, T. P.; PAIXÃO, S. M.; ALVES, L. Ability of *Gordonia alkanivorans* strain 1B for high added value carotenoids production. **RSC Advances**, v. 6, p. 58055-58063, 2016.

SMITH, G. M. *Tetrademus*, a new four-celled coenobitic alga. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 40, n. 2, p.75-87, 1913.

SMITH, R. T.; BANGERT, K.; WILKINSON, S. J.; GILMOUR, D. J. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 82, p. 73-86, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.023>

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2017-2023, 2017. DOI:10.1016/j.procbio.2006.04.018

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909-941, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.026>

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo; MØLLER, Ian Max; MURPHY, Angus. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TERRAVIA, 2017. Disponível em: <http://terravia.com/>. Acesso em: 21 ago. 2017.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004, p. 03-19.

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), 2017. Disponível em: <http://www.lca.ufsc.br/>. Acesso em: 03 fev. 2017.

UTEX – Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin, 2019. Disponível em: <https://utex.org/>. Acesso em: 19 jan. 2019.

VARELA, J. C.; PEREIRA, H.; VILA, M.; LEÓN, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, p. 423-436, 2015. DOI 10.1007/s11120-015-0149-2

VEJRAZKA, C.; JANSSEN, M.; BENVENUTI, G.; STREEFLAND, M.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency and oxygen evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* under continuous and flashing light. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1523-1532, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-4390-8

WAGNER, I.; STEINWEG, C.; POSTEN, C. Mono-and dichromatic LED illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space. **Biotechnology Journal**, v. 11, p. 1060-1071, 2016.

WEST, G. S. Algological notes. In: BRITTEN, J. (ed.). **XIV–XVII. Journal of Botany**. v. 53, p. 73-84. XVII. – The genus *Tetradismus*. v. 53, p. 82-84, 1915. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/108316#page/86/mode/1up>. Acesso em: 28 mai. 2019.

WYNNE, M. J.; HALLAN, J. K. Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*). **Feddes Repertorium**, v. 126, p. 83-86, 2015. DOI: 10.1002/fedr.201500021

XIONG, J. Q.; GOVINDWAR, S.; KURADE, M. B.; PAENG, K. J.; ROH, H. S.; KHAN, M. A.; JEON, B. H. Toxicity of sulfamethazine and sulfamethoxazole and their removal by a green microalga, *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere**, v. 218, p. 551-558, 2019. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.146.

YOU, T.; BARNETT, S. M. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 251-258, 2004. DOI:10.1016/j.bej.2004.02.004

ZHANG, Y.; BAO, K.; WANG, J.; ZHAO, Y.; HU, C. Performance of mixed LED light wavelengths on nutrient removal and biogas upgrading by different microalgal-based treatment Technologies. **Energy**, v. 130, p. 392-401, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2017.04.157>

APÊNDICE A – SELEÇÃO DE MICROALGAS

Tabela A1 – ANOVA ($\alpha=0,05$) com os fatores microalga e meio de cultivo para a variável resposta biomassa final estimada em cultivos de microalgas em fotobiorreator tubular vertical irradiado por luz fluorescente.

Fator	Biomassa Final (g L^{-1})				
	g.l.	SQ	QM	F _c	p-valor
Microalga	3	2,5	0,8	12,7	0,0021
Meio de cultivo	1	7,8	7,8	116,3	<0,0001
Microalga:Meio de cultivo	3	1,1	0,4	5,5	0,0239
Erro	8	0,5	0,1		
Total	15	12,0	0,8		

SQ: soma de quadrados; g.l.: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F_c: F calculado. ANOVA realizada com os resultados de biomassa (N=2) estimados no 6º dia de cultivo das microalgas *P. malhamensis*, *Micractinium sp.*, *C. vulgaris* e *Tetradismus sp.*, e meio BG-11-CNP e BG-11.

Tabela A2 – Teste *Tukey* (95%) para a resposta biomassa e fatores microalga e meio de cultivo.

Microalga	Meio de cultivo	\bar{X}_{med} (g L^{-1})	1	2	3	4
<i>Micractinium sp.</i>	BG-11	2,68		****		
<i>Tetradismus sp.</i>	BG-11	3,42	****	****		
<i>P. malhamensis</i>	BG-11	3,46	****	****		
<i>C. vulgaris</i>	BG-11	3,72	****			
<i>Tetradismus sp.</i>	BG-11-CNP	4,10	****		****	
<i>Micractinium sp.</i>	BG-11-CNP	4,34	****		****	
<i>C. vulgaris</i>	BG-11-CNP	4,88			****	****
<i>P. malhamensis</i>	BG-11-CNP	5,54				****

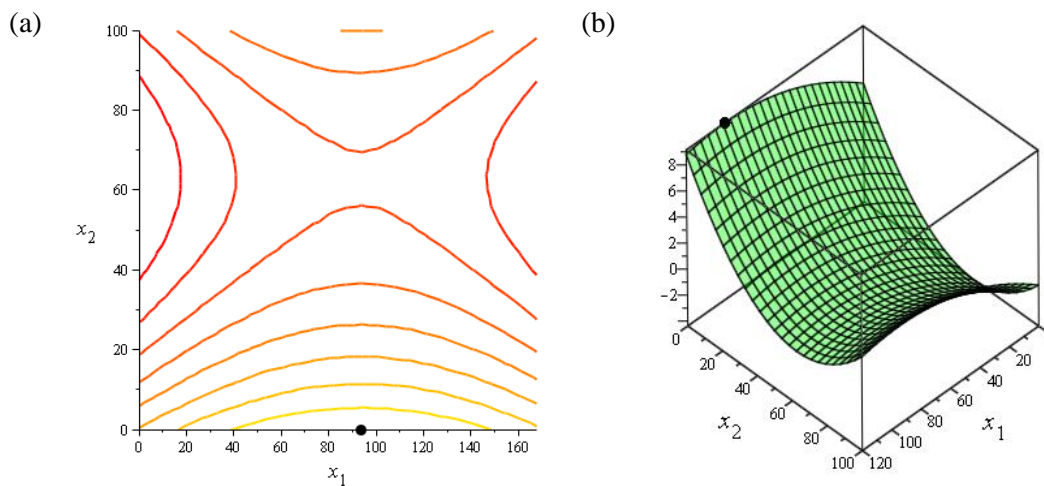
Tabela A3 – Parâmetros de ajuste do modelo para a variável resposta biomassa.

Variável dependente	Múltiplo r	Múltiplo R ²	Ajustado R ²	SQ Modelo	g.l. Modelo	QM Modelo	SQ Resíduo	g.l. Resíduo	QM Resíduo	F _c	p-valor
Biomassa	0,9774	0,9553	0,9162	11,44	7	1,63	0,5352	8	0,0669	24,42	0,00009

SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio; g.l.: graus de liberdade; F_c: F calculado.

APÊNDICE B – SELEÇÃO DE MÉTODOS

Figura B1 – Superfície de resposta de FC em meio BBM. (a) Gráfico de contorno com ponto ótimo. (b) Gráfico 3D com ponto ótimo.



x_1 : tempo de refrigeração em horas; x_2 : concentração de sulfato de amônio em porcentagem. Resposta de FC em mg por g de biomassa.

Fonte: O autor.

APÊNDICE C – SELEÇÃO DA FONTE DE LUZ

Tabela C1 – Média \pm desvio padrão (DP) de biomassa em g L^{-1} determinada mensurada nos cultivos da *Tetrademus* sp. com as composições espectrais WhGr, ReGr e Re na intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Dias	WhGr	GrRe	Re
0	$0,03 \pm 0,0001$	$0,03 \pm 0,0001$	$0,03 \pm 0,0001$
1	$0,05 \pm 0,001$	$0,06 \pm 0,0001$	$0,08 \pm 0,001$
2	$0,11 \pm 0,001$	$0,09 \pm 0,011$	$0,17 \pm 0,0001$
3	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd
5	$0,61 \pm 0,004$	$0,59 \pm 0,006$	$1,12 \pm 0,01$
6	$0,67 \pm 0,67$	$0,64 \pm 0,64$	$1,22 \pm 0,001$
7	$0,89 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,02$
8	nd	nd	nd
9	$1,30 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,03$	$2,16 \pm 0,12$
10	$1,51 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,04$	$2,49 \pm 0,02$
11	$1,56 \pm 0,01$	$1,59 \pm 0,04$	$2,61 \pm 0,02$
12	$1,85 \pm 0,02$	$1,80 \pm 0,03$	$3,06 \pm 0,02$

nd: não determinado. Wh - visível; Gr - verde; Re - vermelho.

APÊNDICE D – PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

Tabela D1 – *P*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta astaxantina medida diariamente entre o 3° e 12° dias de cultivo, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores.

Dia	<i>p</i> -valor				
	Energia (X ₁)	Fotoperíodo (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)	N (X ₅)
3	0,115094	0,153584	0,187758	0,533056	0,739236
4	0,976487	0,393216	0,814748	0,244372	0,584228
5	0,668028	0,920898	0,869507	0,470556	0,568100
6	0,731838	0,747496	0,345964	0,127462	0,169183
7	0,042369	0,092577	0,697317	0,321494	0,560676
8	0,363315	0,181172	0,529773	0,760159	0,495679
9	0,383312	0,643385	0,479190	0,553096	0,479425
10	0,195368	0,421976	0,659428	0,543627	0,404228
11	0,121660	0,505821	0,413805	0,275856	0,238850
12	0,138103	0,716899	0,319095	0,218670	0,405195

Em negrito = *p*-valor significativo ($\alpha = 0,10$).

Tabela D2 – *P*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta β -caroteno medida diariamente entre o 3° e 12° dias de cultivo, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores.

Dia	<i>p</i> -valor				
	Energia (X ₁)	Fotoperíodo (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)	N (X ₅)
3	0,106563	0,188188	0,074912	0,286280	0,31193
4	0,502165	0,097222	0,865277	0,149604	0,801250
5	0,533533	0,936192	0,774421	0,383475	0,534261
6	0,195754	0,152517	0,147518	0,178066	0,220197
7	0,038112	0,076559	0,610094	0,400197	0,571627
8	0,254018	0,161424	0,556564	0,914060	0,489625
9	0,183743	0,306676	0,447166	0,582436	0,576806
10	0,196806	0,455389	0,873634	0,645544	0,522189
11	0,084166	0,453475	0,346525	0,210220	0,182736
12	0,222499	0,998316	0,272093	0,247676	0,353742

Em negrito = *p*-valor significativo ($\alpha = 0,10$).

Tabela D3 – *P*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta licopeno medida diariamente entre o 3° e 12° dias de cultivo, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores.

Dia	<i>p</i> -valor				
	Energia (X ₁)	Fotoperíodo (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)	N (X ₅)
3	0,096837	0,136294	0,118811	0,439279	0,705504
4	0,917711	0,339482	0,795562	0,220454	0,596651
5	0,608790	0,921134	0,821584	0,492334	0,576823
6	0,353203	0,357609	0,198160	0,225844	0,314921
7	0,095775	0,052071	0,273590	0,762339	0,904301
8	0,325214	0,183117	0,514055	0,747830	0,477338
9	0,297003	0,565629	0,359868	0,540249	0,477176
10	0,231462	0,347550	0,652908	0,527672	0,343226
11	0,117110	0,503128	0,414126	0,277592	0,239644
12	0,125165	0,746274	0,326693	0,224547	0,414766

Em negrito = *p*-valor significativo ($\alpha = 0,10$).

Tabela D4 – *P*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta clorofila *a* medida diariamente entre o 3° e 12° dias de cultivo, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores.

Dia	<i>p</i> -valor				
	Energia (X ₁)	Fotoperíodo (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)	N (X ₅)
3	0,105308	0,940706	0,859817	0,950561	0,642403
4	0,109478	0,279814	0,217631	0,165767	0,249938
5	0,388939	0,186786	0,337838	0,147006	0,343782
6	0,045572	0,983636	0,058607	0,285743	0,186627
7	0,107787	0,141508	0,236680	0,464169	0,238466
8	0,066864	0,239009	0,320027	0,696162	0,233678
9	0,064301	0,120655	0,566917	0,608302	0,877299
10	0,049579	0,096108	0,714188	0,275618	0,628574
11	0,018485	0,079702	0,182106	0,747686	0,435074
12	0,017470	0,141587	0,307348	0,892904	0,141008

Em negrito = *p*-valor significativo ($\alpha = 0,10$).

Tabela D5 – *P*-valor ($\alpha = 0,10$) calculado para resposta clorofila *b* medida diariamente entre o 3° e 12° dias de cultivo, segundo um planejamento experimental Plackett-Burman com 5 fatores.

Dia	<i>p</i> -valor				
	Energia (X ₁)	Fotoperíodo (X ₂)	pH (X ₃)	NaCl (X ₄)	N (X ₅)
3	0,272124	0,465966	0,833042	0,816346	0,949802
4	0,202235	0,315025	0,373319	0,474917	0,758265
5	0,069178	0,024601	0,448858	0,050927	0,545280
6	0,021777	0,741748	0,028856	0,562648	0,148187
7	0,092852	0,141109	0,265770	0,780117	0,437837
8	0,035304	0,163442	0,346083	0,944781	0,152382
9	0,056925	0,054945	0,888100	0,767480	0,658573
10	0,057187	0,108018	0,616148	0,392981	0,592230
11	0,039482	0,189845	0,248887	0,890905	0,556565
12	0,021015	0,136185	0,367908	0,644666	0,089252

Em negrito = *p*-valor significativo ($\alpha = 0,10$).