

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

**NATHANYA NAYLA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO NO CULTIVO DE  
MICROALGAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Dourados - MS**

**2020**

NATHANYA NAYLA DE OLIVEIRA

**Efeito do nitrogênio, fósforo e potássio no cultivo de microalgas**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências Exatas e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental

Dourados – MS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O48e Oliveira, Nathanya Nayla De  
Efeito do nitrogênio, fósforo e potássio no cultivo de microalgas [recurso eletrônico] /  
Nathanya Nayla De Oliveira. -- 2021.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Gustavo Graciano Fonseca .  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da  
Grande Dourados, 2020.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. microalga. 2. nutrientes. 3. pigmentos. 4. parâmetros cinéticos. 5. Chlorella  
soroquiniana. I. Fonseca, Gustavo Graciano. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

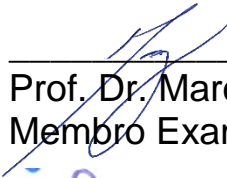
## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Efeito do nitrogênio, fósforo e potássio no cultivo de microalgas”**, de autoria de **NATHANYA NAYLA DE OLIVEIRA**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



---

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca  
Presidente da banca examinadora



---

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Membro Examinador (UFGD)



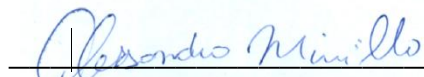
---

Prof. Dr. Dágon Manoel Ribeiro  
Membro Examinador (Biotecland )



---

Prof. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Membro Examinador (UFGD)



---

Prof. Dr. Dr. Alessandro Minillo  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 04 de Dezembro de 2020.

*Dedico este trabalho a  
todos que me  
acompanharam neste  
momento.*

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo, gostaria de deixar registrado que independente do que se faz, é necessário que se acredite.

O ato de acreditar em algo é racional. O mestrado me possibilitou enxergar que muitas coisas ainda serão modificadas, que não existe nada fixo, o sistema ainda não é perfeito e isso é bom, pois, te proporciona o acesso a inúmeras possibilidades, desde que você acredite naquilo que está fazendo.

Agradeço primeiramente à Deus.

A minha família (Papai, mamãe e maninha) que sempre me apoia, independente das circunstâncias.

Ao meu amor, Ramon, que me ajudou e me incentivou muito nessa fase final da construção deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Gustavo Graciano Fonseca, com quem pude aprender muitas coisas e compartilhar inúmeros momentos.

Ao grupo de Pesquisa (Bioengenharia) do qual faço parte já tem seis anos. E sou muito grata por todos os momentos que vivi lá, em especial nesses últimos dois anos, gostaria de agradecer a Val e o Otavio por sempre me incentivarem.

Gostaria de agradecer ao meu quarteto (Brenda, Otavio, Alex e eu), já que decidimos embarcar nessa jornada juntos mesmo que em diferentes programas.

A minha amiga do coração que sempre busca me apoiar em todos momentos da minha vida e com o mestrado não foi diferente, muito obrigada Midi.

Agradeço a UFGD por todo suporte, recurso e estrutura ao longo dos anos e aos órgãos de financiamento, Capes e CNPq.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$ABS_{Max}$	absorbância máxima
$CO_2$	dióxido de carbono
dS	derivada do substrato
dt	derivada do tempo
DT	tempo de duplicação/ tempo de geração
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
$K_s$	constante de afinidade do substrato
ln	logaritmo neperiano
nd	não determinado
pH	potencial hidrogenioionico
Pp	produtividade de produto
Px	produtividade de biomassa
S	concentração de substrato
Si	concentração inicial de substrato
Sf	concentração final de substrato final
t	tempo de cultivo
tf	tempo final de cultivo
ti	tempo de cultivo inicial
$Y_{x/s}$	fator de conversão de substrato em célula
xf	concentração final de biomassa final
xi	concentração inicial de biomassa
$X_{max}$	concentração máxima de biomassa
$\mu$	velocidade específica
$\mu_{max}$	velocidade específica maxima de crescimento
$\mu_s$	velocidade específica de consumo de substrato

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. ..... 70
- Figura 4.2.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*..... 71
- Figura 4.3.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*..... 72
- Figura 4.4.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*..... 73



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Bioprodutos de microalgas e aplicações por espécies. ....	25
<b>Tabela 2.2.</b> Parâmetros cinéticos determinados para diferentes espécies de microalgas.....	26
<b>Tabela 2.3.</b> Parâmetros cinéticos obtidos de cultivos de <i>Chlorella</i> .....	28
<b>Tabela 2.4.</b> Parâmetros cinéticos obtidos em cultivos de <i>Spirulina</i> .....	32
<b>Tabela 2.5.</b> Parâmetros cinéticos obtidos a partir de cultivos <i>Scenedesmus</i> . ..	35
<b>Tabela 2.6.</b> Parâmetros cinéticos obtidos a partir do cultivo de várias outras cepas de microalgas. ....	36
<b>Tabela 3. 1</b> Benéficos dos pigmentos Microalgais.....	44
<b>Tabela 3 2</b> Pigmentos, métodos de extração, identificação, quantificação de diversas microalgas.....	37
<b>Tabela 4.1.</b> Formulação dos meios de cultivo “NPK laboratorial”, utilizando os reagentes Ureia (fonte de nitrogênio), Cloreto de Potássio (fonte de potássio) e Ácido Fosfórico (fonte de fósforo), partindo da formulação tradicional utilizada em laboratório NPK (20-5-20 g.L <sup>-1</sup> ). ....	65
<b>Tabela 4.2.</b> Parâmetros Cinéticos da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada no fertilizante NPK e no “NPK laboratorial”, com e sem a suplementação de glicose.....	74

## RESUMO

As microalgas são microrganismos que vivem em ambientes aquáticos dulcícolas e marinhos. Apresentam a capacidade de realizar fotossíntese para a manutenção de seus processos bioquímicos. Diversos estudos estão sendo feitos com esses microrganismos devido a capacidade destes de produzir vários compostos de interesse biotecnológico, dentre estes compostos podem ser citados os ácidos graxos, proteínas, aminoácidos, pigmentos, entre outros, os quais podem ser destinados a diferentes ramos industriais. No entanto, para que se chegue no nível de aplicação, é necessário a otimização de diversas variáveis, bem como luminosidade, tipo de cultivo, meio de cultivo a ser utilizado. Sendo assim, o presente teve como objetivo estudar a fisiologia da espécie *Chlorella sorokiniana*. Logo, para se obter melhores conclusões sobre a fisiologia e adaptabilidade ao meio de cultivo proposto, fez-se uso de modelos matemáticos, os quais fornecem respostas rápidas sobre o crescimento, produtividade, entre outros, dos microrganismos. Sendo assim, o presente trabalho foi dividido em três artigos. O primeiro é um artigo de revisão sobre os parâmetros cinéticos e sua aplicabilidade nos estudos com diversas microalgas. O segundo artigo, trata-se de um artigo de revisão objetivando o conhecimento dos pigmentos microalgais, bem como das metodologias associadas a análise dos mesmos. O terceiro artigo, trata-se de um estudo fisiológico tendo como base os nutrientes do fertilizante NPK com o intuito de que variando as concentrações do mesmo, fosse possível observar uma influência no resultado dos principais parâmetros cinéticos, a velocidade máxima específica de crescimento e a produtividade de biomassa.

**Palavras-chave:** Parâmetros cinéticos; microalgas, pigmentos, fisiologia.

## ABSTRACT

Microalgae are microorganisms that live in freshwater and marine aquatic environments. They have the ability to perform photosynthesis for the maintenance of their biochemical processes. Several studies are being done with these microorganisms due to their ability to produce various compounds of biotechnological interest, among these compounds can be mentioned fatty acids, proteins, amino acids, pigments, among others, which can be destined to different industrial branches . However, in order to reach the application level, it is necessary to optimize several variables, as well as brightness, type of cultivation, cultivation medium to be used. Therefore, the present study aimed to study the physiology of the species *Chlorella sorokiniana*. Therefore, in order to obtain better conclusions about the physiology and adaptability to the proposed culture medium, mathematical models were used, which provide quick answers about the growth, productivity, among others, of microorganisms. Thus, the present work was divided into three articles. The first is a review article on kinetic parameters and their applicability in studies with several microalgae. The second article is a review article aimed at the knowledge of microalgal pigments, as well as the methodologies associated with their analysis. The third article is a physiological study based on the nutrients of the NPK fertilizer with the intuition that by varying its concentrations, it would be possible to observe an influence on the result of the main kinetic parameters, the specific maximum growth speed and the biomass productivity.

**Keywords:** Kinetic parameters; microalgae, pigments, physiology.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	IX
RESUMO .....	X
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO.....	2
2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS COM MICROALGAS .....	3
2.1 INTRODUÇÃO .....	6
2.2 MICROALGAS .....	6
2.3 PARÂMETROS CINÉTICOS.....	9
2.4 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FISIOLOGIA DA MICROALGA.....	13
2.4.1 MICROALGAS .....	13
2.4.2 FONTE DE CARBONO .....	13
2.4.3 OUTROS NUTRIENTES.....	14
2.4.4 PH, LUMINOSIDADE E FOTOPERÍODO .....	15
2.5 PARÂMETROS CINÉTICOS APLICADOS À MICROALGA .....	16
1.6 CONCLUSÃO .....	18
1.7 REFERÊNCIAS.....	20
3. PIGMENTOS MICROALGAIS E OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO .....	38
3.1 INTRODUÇÃO .....	39
3.2 PIGMENTOS MICROALGAIS.....	40
3.2.1 CAROTENOIDES: .....	41
3.2.2 FICOBILINAS.....	43
3.2.3 CLOROFILAS .....	43

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS .....	44
3.3.1 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES .....	44
3.3.2 EXTRAÇÃO DAS FICOBILINAS .....	44
3.3.3 EXTRAÇÃO DAS CLOROFILAS .....	46
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS.....	46
3.5. VANTAGENS E DESVANTAGENS .....	53
3.6 CONCLUSÃO .....	53
3.7 REFERÊNCIAS.....	54
4. ESTUDO DA FISIOLOGIA DE <i>CHLORELLA SOROKININANA</i> CTT 7727 EM ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS NUTRIENTES: NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO .....	59
4.1 INTRODUÇÃO .....	61
4.2.1 LOCAL.....	63
4.2.2 MICRORGANISMO .....	63
4.2.3 MEIO E MODO DE CULTIVO .....	63
4.2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS .....	66
4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	66
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
4.5 REFERÊNCIAS.....	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	79

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Esta dissertação constitui um conjunto de atividades realizadas pela aluna Nathanya Nayla de Oliveira durante a execução do mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, com ênfase na área de Tecnologia Ambiental, pela Universidade Federal da Grande Dourados, iniciado em 2018.

O objeto do presente estudo nesta dissertação foram as microalgas num contexto geral e em um contexto mais específico da espécie *Chlorella sorokiniana*. O tema da presente dissertação foi pensado a partir dos métodos e ferramentas que podem ser utilizados para otimizar o crescimento e desenvolvimento, bem como a síntese de bioprodutos microalgais.

Nesse sentido, o primeiro assunto abordado em um capítulo foram os parâmetros cinéticos, os quais são muito utilizados para verificar a fisiologia microbiana por meio de ferramentas matemáticas baseadas em cálculos. A partir destes cálculos é possível prever um comportamento fisiológico bem como elucidar um possível cenário econômico vantajoso, por meio da produtividade.

Visando então os bioprodutos das microalgas, com ênfase nos de alto valor agregado, foi discutido então a elaboração de um artigo de revisão, no qual foi abordado de forma breve os pigmentos e os métodos de extração, análise e identificação dos mesmos, uma vez que tais metodologias poderão posteriormente serem aplicadas em futuros trabalhos com microalgas pelo grupo de pesquisa em Bioengenharia, levando em consideração a estrutura laboratorial.

Posteriormente, objetivando uma melhor compreensão sobre a fisiologia da microalga *Chlorella sorokiniana* em relação aos nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio (N, P, K), foi realizado um estudo em condições heterotróficas no qual as ferramentas de avaliação utilizadas foram modelos matemáticos (parâmetros cinéticos), em especial, a velocidade específica máxima de crescimento, tempo de duplicação e produtividade celular.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho foi estruturado da seguinte maneira:

**Capítulo 1:** Determinação dos parâmetros cinéticos para aplicações biotecnológicas com microalgas;

**Capítulo 2:** Pigmentos microalgais e os métodos de extração, análise e identificação;

**Capítulo 3:** Estudo da fisiologia de *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 em ensaios com diferentes concentrações dos nutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio;

**Capítulo 4:** Considerações finais e sugestão de trabalhos futuros.

## 2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS COM MICROALGAS\*

\*Capítulo 11 do Livro: (2020) *Phycobiotechnology: Biodiversity and Biotechnology of Algae and Algal Products for Food, Feed, and Fuel*. CRC Press.

**Resumo.** Microalgas são microrganismos que apresentam capacidade de sequestrar CO<sup>2</sup> e utilizar processos bioquímicos para produzir compostos de relevante interesse biotecnológico, como: alimentos e rações, fármacos, cosméticos, biocombustíveis, entre outros. Sua aplicação industrial depende, entre outros fatores, da obtenção de altas produtividades celulares e de seus bioprodutos acumulados, como proteínas, carboidratos, lipídios com perfis específicos de ácidos graxos, corantes, antioxidantes, enzimas, entre outros. Isso está diretamente relacionado à genética celular, às condições de cultivo e à eficiência de recuperação de células e produtos. Portanto, é extremamente importante entender, em profundidade, a relação entre todas essas variáveis. As principais condições de cultivo que afetam a fisiologia das microalgas são seus requisitos ambientais e químicos, mais especificamente concentrações e fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, temperatura, fotoperíodo, pH, agitação, tempo de cultivo, tipo de biorreator e modo de cultivo. Uma forma simples de correlacionar esses parâmetros e avaliar a fisiologia celular é por meio da determinação dos parâmetros cinéticos da cultura. Esta é uma ferramenta matemática simples, que não requer uma infraestrutura analítica complexa para sua execução, gerando informações rápidas sobre o comportamento dos microrganismos, a fim de identificar com mais precisão as condições de cultivo mais adequadas para cada potencial aplicação biotecnológica, levando em consideração cada cepa. Entre os principais parâmetros cinéticos estão: velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_S$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), tempo de duplicação (TD), rendimento de biomassa ( $Y_{X/S}$ ), rendimento do produto ( $Y_{P/S}$ ), bem como biomassa ( $P_X$ ) e produtividades de produto ( $P_P$ ). Neste capítulo, parâmetros cinéticos em culturas de microalgas em diferentes condições de cultivo foram compilados na literatura, com o objetivo de sistematizar essas informações, buscando um melhor entendimento do metabolismo celular, para



obtenção de linhagens celulares e condições de crescimento otimizadas para cada aplicação biotecnológica específica.

**Palavras-chave:** Modelagem matemática; metabolismo; velocidade específica máxima de crescimento; produtividade.

**Abstract.** Microalgae are microorganisms whose ability to sequester CO<sub>2</sub> and use biochemical processes to produce compounds of relevant biotechnological interest has aroused great interest, be it food and feed, pharmaceuticals, cosmetics, biofuels, among others. Its industrial application depends, among other factors, on obtaining high cell productivities and accumulated products of interest, such as proteins, carbohydrates, lipids with specific fatty acids profiles, dyes, antioxidants, and enzymes, among others. This is directly related to cell genetics, culture conditions and the recovery efficiency of cells and products. Therefore, it is extremely important to understand, in depth, the relationship between all these variables. The main cultivation conditions that affect the physiology of microalgae are their environmental and chemical requirements, more specifically carbon, nitrogen, phosphorus and potassium concentrations and sources, temperature, photoperiod, pH, agitation, cultivation time, type of bioreactor and mode of cultivation. A simple way of correlating these parameters and evaluating the cellular physiology is through the determination of the kinetic parameters of culture. This is a simple mathematical tool, which does not require a complex analytical infrastructure for its execution, generating quick information about the behavior of microorganisms, in order to more accurately identify the most suitable growing conditions for each potential biotechnological application, taking into consideration each strain. Among the main kinetic parameters are specific substrate consumption rate ( $\mu_S$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ), doubling time (TD), biomass yield ( $Y_{X/S}$ ), product yield ( $Y_{P/S}$ ), as well as biomass ( $P_X$ ) and product ( $P_P$ ) productivities. In this chapter, kinetic parameters in microalgae cultures in different culture conditions were compiled from the literature, aiming to systematize this information, seeking for a better understanding of cellular metabolism, to obtain cell strains and optimized growth conditions for each specific biotechnological application.

**Keywords:** Mathematical modeling; metabolism; growth rate; productivity.

## **2.1 INTRODUÇÃO**

Nos dias atuais, nossa sociedade tem demonstrado uma preocupação em relação as matérias-primas não renováveis. Assim, iniciou-se a busca por fontes alternativas de matérias-primas renováveis que atendam aos requisitos de uma bioeconomia sustentável. Nesse cenário, as microalgas podem se apresentar como possíveis candidatas para resolver grande parte desse problema. A partir de seu crescimento e desenvolvimento, ela realiza a síntese e bioacumulação de produtos biotecnológicos interessantes no contexto industrial.

Esses bioprodutos podem ser polissacarídeos, proteínas, lipídeos, enzimas, entre outros metabólitos derivados do metabolismo da microalga. Consequentemente, existem várias aplicações industriais para cada um destes compostos, e. para biocombustíveis, alimentos, rações animais, aplicações cosméticas e farmacêuticas (HARISKOS e POSTEN, 2014).

Vários parâmetros podem influenciar o crescimento, desenvolvimento e síntese de bioprodutos por microalgas, como temperatura, fonte de carbono (mixotrófica, autotrófica ou heterotrófica), presença ou ausência de alguns macro e micronutrientes, luminosidade, pH, agitação / aeração, tempo de cultivo, tipo de biorreator, modo de cultivo, entre outros. Portanto, essas variáveis têm sido estudadas ao longo dos anos com o objetivo de otimizar as condições de cultivo para as diversas espécies de microalgas.

Nesse sentido, é importante avaliar os parâmetros cinéticos dos cultivos. São obtidos a partir de modelos matemáticos simples, fornecendo respostas sobre o comportamento microbiano em diferentes condições de cultivo, o que resulta em informações relevantes sobre a fisiologia e o metabolismo dos mesmos (HISS, 2001). Uma das principais vantagens da avaliação desses parâmetros é que não requer uma infraestrutura analítica complexa.

## **2.2 MICROALGAS**

O termo microalgas engloba um conjunto heterogêneo de microrganismos incluindo procariontes (cianobactérias) ou eucariontes (maior

parte das microalgas) (CASTRO-PUYANA et al. 2013) que em sua maioria apresenta a capacidade de utilizar o dióxido de carbono combinado com a luz solar, macro e micronutrientes presentes nos ambientes aquáticos para realizar seu processo fotossintético (TRAMOTIN et al. 2018). Uma das principais características das microalgas é o fato de realizarem fotossíntese, ou seja, são produtoras primárias que apresentam notável adaptabilidade a situações adversas.

As microalgas podem ser encontradas em ambientes aquáticos dulcícolas, marinhos, salobros, entre outros. Além disso, elas também podem ser utilizadas para realizar a biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados, contaminantes inorgânicos e matéria orgânica entre diversos outros (TORRES et al. 2017; DE MENDONÇA et al. 2018).

Os estudos com microalgas têm se intensificado ao longo dos anos devido ao fato de representarem um grupo heterogêneo de microrganismos que apresentam características interessantes de biossíntese e bioacumulação de produtos, que são excelentes fontes de matéria-prima para produção de diversos bioprodutos (ZHAN et al., 2017).

É importante destacar as muitas aplicações em que se enquadram (Tabela 2), por exemplo a produção de pigmentos, como o beta-caroteno (SRINIVASAN et al., 2015), que pode se apresentar como um suplemento na nutrição humana. Outro exemplo são os ácidos graxos, como os ácidos graxos poliinsaturados, que possuem atividade antioxidante e podem ser destinados à indústria farmacêutica, assim como muitos outros que podem ser destinados à produção de biodiesel (MIAZEK et al., 2017). Existem também microalgas produtoras de micosporina, que podem ser direcionadas a filtros solares (SATHASIVAM et al., 2017). Outras aplicações incluem, por exemplo esteróis, proteínas, bioetanol e bioplásticos (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1.** Bioprodutos de microalgas e aplicações por espécies.

<b>Bioproduto</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Microalga</b>
Pigmentos	Nutricionais e médicas	<i>Neochloris oleoabundans</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Arthrospira maxima</i> , <i>Synechococcus</i> sp.
Ácidos graxos	Farmacêutica e cosméticos	<i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella</i> sp. <i>Schizochytrium limacinum</i>
Micosporinas	Protetor Solar	<i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Scenedesmus</i> spp.
Esteróis	Alimentação animal	<i>Navicula incerta</i> , <i>Asterionella glacialis</i> , <i>Haslea ostrearia</i>
Proteínas	Nutrição humana e animal	<i>Tetraselmis</i> sp. <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Spirulina platensis</i> ; <i>Nannochloropsis</i> sp.
Lipídios em geral	Biodiesel	<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella</i> sp., <i>Schizochytrium limacinum</i>
Carboidratos	Bioetanol	<i>Nannochloropsis</i> sp. <i>Chlorella sorokiniana</i>

## 2.3 PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos são modelos matemáticos que favorecem o entendimento dos aspectos fisiológicos e bioquímico dos microrganismos, da mesma forma podem auxiliar no que diz respeito a otimização das condições de cultivos por meio dos resultados obtidos em um sistema produtivo e ainda proporcionar conclusões a sobre relação custo benefício (TRAMOTIN et al., 2018).

Um dos modelos propostos e aceito até hoje para explicar o crescimento dos microrganismos, e que também é utilizado para as microalgas, é o de Monod (Equação 2.3.1), o mesmo é baseado no consumo de nutrientes (HISS, 2001; TRAMOTIN et al., 2018).

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Equação 2.3.1}$$

Nesta equação o  $\mu$  = velocidade de crescimento específico ( $h^{-1}$ );  $\mu_{max}$  = velocidade de crescimento máximo específico ( $h^{-1}$ ); o  $K_S$  = constante de afinidade do substrato ( $g.L^{-1}$ ) e  $S$  = concentração do substrato ( $g.L^{-1}$ ).

Outra maneira de calcular a velocidade específica de crescimento é por meio da densidade ótica utilizada durante o cultivo, a mesma pode aparecer de forma variável em diversos estudos, alguns autores assumem como sendo 680 nm o melhor comprimento de onda (FAZELI DANESH et al., 2018). Sendo assim, segundo Widdel 2007 o cálculo da velocidade específica de crescimento é feito por meio da fórmula:

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Equação 2.3.2}$$

Nesta equação o  $\mu$  = velocidade de crescimento específico ( $h^{-1}$ );  $\ln$  = logaritmo neperiano;  $OD_2$  = densidade ótica final;  $OD_1$  = densidade ótica inicial;  $t_1$  = tempo inicial;  $t_2$  = tempo inicial e final do cultivo.

Outra forma para calcular a velocidade específica de crescimento é por meio da contagem celular, dessa maneira é realizada a contagem celular, sendo assim, pode-se fazer uso da equação descrita no trabalho realizado por Dewan et al., (2012):

$$\mu = \frac{d \ln(N)}{dt} \quad \text{Equação 2.3.3}$$

Nesta equação o  $\mu$  = velocidade de crescimento específico ( $h^{-1}$ );  $\ln$  = logaritmo neperiano;  $N$  = número de células;  $t$  = tempo de cultivo;  $d$  = derivada.

Já a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) é determinada como a inclinação dessa região linear (NASCIMENTO et al., 2016). Como o crescimento é determinado por uma taxa, a concentração de biomassa ( $X$ ) pode ser indicada pela concentração de massa celular seca ( $DW$ ), densidade óptica ( $OD$ ) ou contagem de células ( $N$ ), como já demonstrado anteriormente. Dessa forma, para calcular  $\mu_{\max}$  todos esses parâmetros devem ser obtidos durante a fase exponencial de crescimento, onde a velocidade específica de crescimento é constante e máxima (HISS, 2001).

$$\mu_{\max} = \frac{1}{X} \left( \frac{dX}{dt} \right) \quad \text{Equação 2.3.4}$$

$$\ln \frac{X_f}{X_i} = \mu_{\max} (t_f - t_i) \quad \text{Equação 2.3.5}$$

Nesta equação o  $\mu_{\max}$  = velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ );  $\ln$  = logaritmo neperiano;  $X$  = biomassa;  $X_i$  = biomassa inicial;  $X_f$  = biomassa final;  $t_i$  = tempo de cultivo inicial;  $t_f$  = tempo de cultivo final;  $d$  = derivada.

Outro parâmetro essencial para compreender aspectos fisiológicos das microalgas é o tempo de duplicação ou tempo de geração (HISS, 2001; FUENTES-GRÜNEWALD et al., 2013), o mesmo fornece uma resposta sobre o tempo necessário para que uma célula possa se dividir, sendo mais evidente durante a fase exponencial, porém pode ser influenciado por fatores ambientais. O tempo de duplicação também é importante pelo fato de fornecer uma possível resposta para questões industriais tais como: qual tipo de modo de cultivo (contínuo, semi contínuo, descontínuo) seria mais viável. O mesmo pode ser obtido através do  $\mu_{\max}$ , como é demonstrado nas equações a seguir:

$$\ln \frac{X}{X_1} = \mu_{\max} (t_f - t_i) \quad \text{Equação 2.3.6}$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad \text{Equação 2.3.7}$$

Nesta equação  $\ln$  = é o logaritmo neperiano;  $X$  = concentração celular final;  $X_i$  = concentração celular inicial;  $\mu_{max}$  = velocidade específica de crescimento máxima;  $t_f$  = tempo final da fase exponencial;  $t_i$  = tempo inicial da fase exponencial;  $t_d$  = tempo de duplicação.

Analogamente, a velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) pode ser calculada, de acordo com a Equação 2.3.8, que combinada com a Equação 2.3.4 dá a Equação 2.3.9.

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left( - \frac{dS}{dt} \right) \quad \text{Equação 2.3.8}$$

$$\mu_S = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Equação 2.3.9}$$

Onde:  $\mu_S$  = velocidade específica de consumo de substrato;  $d$  = derivada;  $X$  = concentração de biomassa;  $S$  = concentração de substrato;  $t$  = tempo de cultura;  $Y_{X/S}$  = rendimento de biomassa.

Os rendimentos são calculados com base no consumo de um substrato para a formação da biomassa ou de um produto específico. A partir da Equação 2.3.8, observa-se que o rendimento de biomassa ( $Y_{X/S}$ ) foi obtido a partir do quociente da variação da biomassa ( $X$ ) e do substrato ( $S$ ) (Equação 2.3.9). Da mesma forma, obtém o rendimento do produto ( $Y_{P/S}$ ) a partir do quociente da variação do produto ( $P$ ) e do substrato ( $S$ ) (Equação 2.3.9). Eles também são chamados de fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ). É importante destacar que os valores de absorbância medidos ou número de células devem ser convertidos em valores de massa usando uma relação linear de unidades de densidade óptica (ou células) por grama de massa de células secas para calcular o rendimento de biomassa.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 2.3.10}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 2.3.11}$$



Onde  $X_f$  = concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $X_i$  = concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_i$  = concentração inicial de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_f$  = concentração final de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_f$  = concentração final de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_i$  = concentração inicial de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Outros parâmetros essenciais para fornecer uma visualização da eficácia e eficiência de um processo de produção de microrganismos são a produtividade da biomassa ( $P_x$ ; Equação 2.3.12) e a produtividade do produto ( $P_p$ ; Equação 2.3.13) (RIBEIRO e HORII; 1999). Geralmente, são utilizadas as produtividades finais da biomassa e do produto, mas vale ressaltar que tais produtividades podem ser calculadas durante qualquer período do bioprocessamento. Na maioria dos casos, as produtividades finais ou máximas são alcançadas. A produtividade da biomassa da microalga é determinada principalmente a partir da biomassa seca, então a biomassa é centrifugada e submetida a uma metodologia de secagem e a produtividade é determinada após pesagem constante, em termos de concentração por tempo.

$$P_x = \frac{X_2 - X_i}{t} \quad \text{Equation 2.3.12}$$

$$P_p = \frac{P_2 - P_i}{t} \quad \text{Equation 2.3.13}$$

Onde  $X_2$  = representa a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) escolhida durante um período do processo produtivo ou pode ser a concentração celular máxima encontrada;  $X_i$  = concentração celular inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $t$  = tempo de cultivo, podendo ser total ou parcial, dependendo do período que onde a concentração celular foi escolhida;  $P_2$  = concentração de produto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) escolhida ou a concentração máxima de produto que foi formado;  $P_i$  = concentração inicial ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de produto;  $t$  = representa o tempo durante o processo de produção do produto, podendo ser parcial ou total. Sendo que o resultado final de ambas as produtividades é dado em  $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .

## **2.4 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FISILOGIA DA MICROALGA**

### **2.4.1 MICROALGAS**

As principais condições de cultivo que afetam a fisiologia das microalgas são seus requisitos ambientais e químicos, especificamente as fontes e concentrações de carbono (ZHAN et al., 2017), outros nutrientes, temperatura, fotoperíodo, pH, entre outras variáveis (KIM et al., 2012).

As microalgas apresentam necessidades específicas para melhor desempenho no crescimento, desenvolvimento e síntese de compostos essenciais. Porém, para atender a essas necessidades, estudos devem ser realizados de forma a otimizar as variáveis para obter as melhores condições de cultivo possíveis. Mais do que isso, é fundamental determinar os parâmetros cinéticos durante essas avaliações em diferentes condições de cultivo para melhor compreender a fisiologia e o metabolismo de cada cepa.

### **2.4.2 FONTE DE CARBONO**

Um requisito que precisa ser avaliado antes de iniciar um cultivo de microalgas é a fonte de carbono que será utilizada, pois pode influenciar o crescimento, a síntese e o acúmulo de biomoléculas. Para isso, existem diferentes tipos de metabolismo do carbono: mixotrófico, autotrófico e heterotrófico (ABREU et al., 2012; SALATI et al., 2017), dependendo da natureza da fonte de carbono, que pode ser inorgânica ou orgânica.

As culturas autotróficas são aquelas em que a fonte de carbono utilizada é o dióxido de carbono atmosférico inorgânico, portanto a microalga o captura e o utiliza para o processo fotossintético, por meio do qual produz a energia necessária para sobreviver, crescer e se reproduzir. Este sistema é comumente visto em ambientes naturais e artificiais (ZHAN et al., 2017).

A vantagem desse tipo de cultivo é a alta disponibilidade de dióxido de carbono atmosférico (GUPTA e PAWAR, 2018). Porém, as desvantagens estão relacionadas à dependência das condições climáticas, dificuldade de manutenção do ambiente para manter o mesmo asséptico, além da dificuldade

de implantação em ambientes abertos e devidos biorreatores, muitas vezes necessitando de aeradores para promover um maior contato da célula com o dióxido de carbono atmosférico, o que pode desencadear um alto custo (ZHAN et al., 2017).

Os cultivos heterotróficos são caracterizados pela ausência de luz e suplementação do meio de cultura com fontes orgânicas de carbono, por exemplo a glicose, glicerol, acetato, efluentes domésticos, entre outros. Essas culturas têm a vantagem de não depender da luminosidade, maior controle do processo de produção, maior crescimento celular, além da possibilidade de obter maior teor de lipídios nas células, que podem ser aplicados para a produção de biodiesel (DEVI et al., 2012; KATIYAR et al., 2017; MOHAN et al., 2015; ZHANG et al., 2013). A principal desvantagem é a contaminação principalmente quando o cultivo é realizado com glicose (ZHAN et al., 2017).

Os cultivos mixotróficos são caracterizados por utilizar uma fonte de carbono orgânico e uma fonte de carbono inorgânico (SALATI et al., 2017), ou seja, apresenta as vantagens do sistema autotrófico e heterotrófico na mesma cultura. Dessa forma, a microalga pode primeiro aproveitar o carbono orgânico e depois fazer uso do dióxido de carbono.

Esse sistema permite que a microalga sintetize os produtos que seriam encontrados separadamente em cada sistema de cultivo, além de um menor gasto energético que é encontrado no sistema autotrófico (ABREU et al., 2012). Tem como principais vantagens a obtenção de um alto e rápido crescimento celular, o que resulta em maiores produtividades de biomassa, e acúmulo de lipídios, além da diminuição da produção de dióxido de carbono, resultado do metabolismo heterotrófico (ZHAN et al., 2017).

### **2.4.3 OUTROS NUTRIENTES**

A nutrição das microalgas se caracteriza principalmente pela sua diversidade, pois existem algumas microalgas com maior demanda nutricional em relação a outras. Além da fonte de carbono, alguns macros e micronutrientes fazem parte das necessidades das microalgas, como nitrogênio e fósforo. Esses nutrientes afetam diretamente o metabolismo celular.

O nitrogênio é essencial porque é necessário na produção de proteínas e também na síntese de ácidos nucleicos, sendo um nutriente indispensável para a divisão celular. Conforme a concentração de nitrogênio é aumentada nos cultivos, torna-se possível obter um alto rendimento protéico, mas quando esse nutriente é limitado, algumas microalgas passam por um estresse e, assim, evitam a síntese protéica, acumulando lipídios, que em algum contexto pode ser interessante (JI et al., 2014).

O fosfato é importante na proliferação celular, pois também é necessário na síntese de ácidos nucleicos. Eles são importantes para manter a integridade celular, pois os fosfolipídios estão presentes na membrana celular. Este nutriente está associado aos maiores crescimentos alcançados em tempos mais curtos (PARK et al., 2014).

Existem vários meios de cultura para a produção de microalgas, mas é preciso sempre atentar para as necessidades nutricionais de cada espécie (e linhagem) e, claro, a concentração de cada um dos reagentes. Por exemplo, *Dunaliella salina* é uma microalga marinha, conseqüentemente há uma exigência da presença de sais em alta concentração para seu desenvolvimento (JOHNSON et al., 1968; MOROWVAT e GHASEMI, 2016). Além disso, alguns meios têm em sua composição fontes de carbono orgânico que podem estimular o aumento da produtividade celular, exemplo a glicose, quando comparada a algumas culturas autotróficas, mas novamente depende da espécie / cepa escolhida.

#### **2.4.4 pH, LUMINOSIDADE E FOTOPERÍODO**

O pH é uma variável importante a ser analisada antes e durante o cultivo de microalgas, pois pode afetar a disponibilidade dos elementos químicos no meio. Cada espécie de microalga possui um pH ideal para seu cultivo. Se o pH sofrer variações, isso poderia resultar em algum efeito na distribuição das espécies de dióxido de carbono, podendo modificá-lo. Além disso, afeta a disponibilidade de macro e micronutrientes e, portanto, afeta diretamente o meio de cultura e os aspectos fisiológicos da microalga (DE MELO et al., 2018).

As microalgas são altamente sensíveis às mudanças ambientais e químicas, então outros fatores que também podem influenciar tanto o

crescimento e a produção de biomassa e seu conteúdo intracelular são a intensidade de luz e o ciclo fotoperíodo (claro e escuro) escolhidos. Este último costuma ser utilizado como 12:12 ou 24h de claro e escuro, respectivamente, dependendo do objetivo.

Esses parâmetros acabam exercendo uma influência maior nas culturas autotróficas, uma vez que a maioria das microalgas necessitam de luz para realizar seu processo fotossintético (WAHIDIN et al., 2013). Porém, é necessário que a intensidade luminosa e o fotoperíodo escolhidos sejam suficientes para que a microalga não sofra com o excesso de luz ou mesmo a falta de luminosidade, que caracteriza a fotolimitação, ou seja, quando a intensidade luminosa ou exposição é superiora ao que as microalgas suportam (CHEN et al., 2011).

Esses fatores são considerados primordiais em um cultivo de microalga, visto que deve considerar as espécies de microalga, por apresentarem necessidades específicas, o volume da cultura, a densidade celular que pode ser desenvolvida ao longo do cultivo para melhorar a eficiência do crescimento da biomassa e a produtividade da biomassa (WAHIDIN et al., 2013). O excesso de iluminação, por exemplo pode estimular que o excesso de carboidratos / açúcares seja convertido em lipídios, reduzindo a divisão celular (MITRA et al., 2012).

## **2.5 PARÂMETROS CINÉTICOS APLICADOS À MICROALGA**

A determinação de parâmetros cinéticos de cultivos de microalgas é importante para o entendimento da fisiologia celular e a otimização dos sistemas de produção. Diversos dados referentes aos parâmetros cinéticos forma copilados da literatura e se encontram disponíveis nos apêndices, apresentados em forma de tabelas (Tabela 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6). Os parâmetros mais avaliados nos estudos com microalgas são a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e a produtividade de biomassa (Px) (Tabela 2.2). Esses dois parâmetros juntamente com a concentração máxima de biomassa (Xmax) foram compilados da literatura para microalgas do gênero *Chlorella* (Tabela 2.3), *Spirulina* (Tabela 2.4), *Scenedesmus* (Tabela 2.5), além de outras espécies (Tabela 2.6), a fim de fazer uma comparação em termos de fonte e concentração

de carbono, meio, temperatura, pH, fotoperíodo e intensidade luminosa, uma vez que aspectos químicos e físicos podem influenciar o cultivo de microalgas (Tabelas 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6).

Para as espécies de *Chlorella*, observa resultados de cultivos mixotróficos e heterotróficos, com diferentes fontes de carbono, desde glicose até subprodutos e resíduos industriais, além das culturas autotróficas com dióxido de carbono (Tabela 2.3). Por exemplo, pode-se observar que o estudo realizado por Mondal et al. (2014) a fonte de carbono que mais demonstrou viabilidade para cultivo da *Chlorella* sp. foi soro de queijo, pois resultou na maior concentração celular de 1,62 g L<sup>-1</sup> enquanto a cultura autotrófica apresentou concentração celular de apenas 0,69 g L<sup>-1</sup> (Tabela 1.3).

Outro exemplo é o estudo realizado por Salati et al. (2017), que avaliou diferentes subprodutos industriais como fonte de carbono para a microalga *Chlorella vulgaris*. Eles relataram que a maior concentração de células (2,59 g L<sup>-1</sup>) e produtividade celular (0,52 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foram obtidas com soro de queijo. Houve um aumento de 2 vezes em relação ao cultivo autotrófico que atingiu a concentração celular de 1,21 g L<sup>-1</sup> e produtividade celular de 0,24 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabela 2.3). De acordo com Abreu et al. (2012), quando se utiliza soro de queijo como fonte de carbono, é possível aumentar a concentração de células de 1,6 para 2,9 vezes em relação às culturas autotróficas.

Em um estudo conduzido por Barrocal et al. (2010) com *Spirulina maxima*, a vinhaça de beterraba em várias concentrações foi usada como fonte de carbono. Para o cultivo mixotrófico, a maior concentração celular obtida foi de 4,8 g L<sup>-1</sup> e a maior produtividade celular foi de 0,24 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> enquanto que para o cultivo autotrófico a concentração celular obtida foi de 4,0 g L<sup>-1</sup> e a produtividade celular foi 0,20 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tabela 2.4). A partir daí, conclui que não existem tais diferenças de crescimento considerando esses dois substratos.

Outra fonte de carbono amplamente utilizada em cultivos mixotróficos é o glicerol, resíduo industrial da produção de biodiesel. Um estudo realizado por Andruleviciute et al. (2014) mostraram que a maior concentração celular de 1,92 g L<sup>-1</sup> foi obtida para *Chlorella* sp. usando 5 g de glicerol por litro de meio (Tabela 2.3). Essa concentração foi a mesma que apresentou maior concentração celular de 2,15 g L<sup>-1</sup> e produtividade celular de 0,229 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *Scenedesmus* sp.

(Tabela 2.5). Porém, considerando a produtividade celular, melhores resultados foram obtidos com glicerol a  $2 \text{ g L}^{-1}$  para *Chlorella* sp. ( $0,227 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ; Tabela 2.3). Em relação aos cultivos autotróficos, foram obtidas concentrações celulares de  $1,58$  e  $1,67 \text{ g L}^{-1}$  e produtividades celulares de  $0,089$  e  $0,094 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para *Chlorella* sp. (Tabela 2.3) e *Scenedesmus* sp. (Tabela 2.5), respectivamente. Assim, pode-se concluir que *Chlorella* sp. tem seu metabolismo mais adaptado tanto para cultivo mixotrófico com glicerol quanto para cultivo autotrófico com dióxido de carbono quando comparado ao *Scenedesmus* sp.

Considerando outras espécies de microalgas, Morowvat e Ghasemi (2016), avaliando o tradicional meio de cultura Johnson para *Dunaliella salina*, mostrou que a glicose na concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$  foi a mais adequada para o aumento da produtividade celular, que foi de  $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para o meio otimizado com glicose, enquanto para o meio tradicional, sem glicose, foi de  $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Tabela 2.6).

Em relação às diferentes fontes de carbono, é possível observar que as culturas mixotróficas em geral apresentam maiores concentrações celulares e produtividades celulares do que as culturas autotróficas para a *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus* e outras microalgas (Tabelas 2.3, 2.4, 2.5 e 2.6). Justifica-se pelo fato de que quando uma fonte de carbono orgânico é adicionada e a luminosidade mantida, o crescimento e desenvolvimento de microalgas é induzido pelo aproveitamento de fontes de carbono orgânico e inorgânico, apresentando assim as vantagens dos metabolismos autotrófico e heterotrófico no mesmo cultivo (ZHAN et al., 2017).

## 1.6 CONCLUSÃO

Os parâmetros cinéticos são muito úteis para a avaliação de um processo produtivo em termos da influência das variáveis em um sistema complexo. Eles são de fácil determinação, pois é calculado a partir de ferramentas matemáticas simples e básicas. Os parâmetros cinéticos fornecem informações rápidas sobre o comportamento dos microrganismos, de forma a identificar com maior precisão as condições de cultivo mais adequadas para cada cepa levando em consideração o potencial de aplicações biotecnológicas. Para isso, é importante avaliar criticamente cada um desses parâmetros. Do

ponto de vista econômico, as produtividades máximas de biomassa e produto são os parâmetros mais importantes para definir processos, no entanto, as velocidade específicas máximas de crescimento e os rendimentos de biomassa e produto são cruciais para a compreensão da fisiologia e do metabolismo das diferentes cepas de microalgas.



## 1.7 REFERÊNCIAS

- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., Dragone, G. (2012) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol* 118, 61-66.
- Ali, S. A. M., Razzak, S. A., Hossain, M. M. (2015) Apparent kinetics of high temperature oxidative decomposition of microalgal biomass. *Bioresour Technol* 175, 569-577.
- Andrade, M. R., Camerini, F. V., Costa, J. A. V. (2008) Chemical carbon losses and growth kinetics in *Spirulina* cultures. *Quím Nova* 31, 2031-2034.
- Andruleviciute, V., Makareviciene, V., Skorupskaite, V., Gumbyte, M. (2014) Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. *J Appl Phycol* 26, 83-90.
- Baglieri, A., Sidella, S., Barone, V., Fragalà, F., Silkina, A., Nègre, M., Gennari, M. (2016) Cultivating *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae to degrade inorganic compounds and pesticides in water. *Environ Sci Poll Res* 23, 18165-18174.
- Barrocal, V. M., García-Cubero, M. T., Gonzáles-Benito, G., Coca, M. (2010) Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnol* 27, 851-856.
- Borkenstein, C. G., Knoblauchner, J., Frühwirth, H., Schagerl, M. (2011) Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. *J Appl Phycol* 23, 131-135.
- Braga, V. S., Mastrantonio, D. J. S., Costa, J. A. V., Morais, M. G. (2018) Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. *Bioresour Technol* 269, 221-226.
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Suárez-Alvarez, S. (2013) Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the microalga *Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405, 4607-4616.
- Chen, X., Goh, Q. Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W. N., Lau, R. (2011) Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresour Technol* 102, 6005-6012.
- Converti, A., Lodi, A., Del Borghi, A., Solisio, C. (2006) Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochem Eng J* 32, 13-18.
- Costa, J. A. V., Linde, G. A., Atala, D. I. P., Mibiell, G. M., Krüger, R. T. (2000) Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World J Microbiol Biotechnol* 16, 15-18.
- Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., Héroult, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J. P., Teissié, J. (2015) Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry* 103, 74-81.
- De Bhowmick, G., Subramanian, G., Mishra, S., Sen, R. (2014) Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study. *Algal Res* 6, 201-209.
- De Melo, R. G., Andrade, A. F., Bezerra, R. P., Correia, D. S., Souza, V. C., Brasileiro-Vida, A. C., Marques, D. A. V., Porto, A. L. F. (2018) *Chlorella*

- vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. *Chemosphere* 204, 344-350.
- De Mendonça, H. V., Ometto, J. P. H. B., Otenio, M. H., Marques, I. P. R., Reis, A. J. D. (2018) Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison between batch and continuous operation. *Sci Total Environ* 633, 1-11.
- Demirel, Z., Demirkaya, C., Imamoglu, E., Conk Dalay, M. (2016) Diatom cultivation and lipid productivity for non-cryopreserved and cryopreserved cells. *Agron Res* 14, 1266-1273.
- Devi, M. P., Subhash, G. V., Mohan, S. (2012) Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. *Renew Energy* 43, 276-283.
- Dewan, A., Kim, J., McLean, R. H., Vanapalli, S. A., Karim, M. N. (2012) Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays. *Biotechnol Bioeng* 109, 2987-2996.
- Dos Santos, R. R., Araújo, O. D. Q. F., De Medeiros, J. L., Chaloub, R. M. (2016) Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresour Technol* 204, 38-48.
- Ebrahimian, A., Kariminia, H.-R., Vosoughi, M. (2014) Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. *Renew Energy* 71, 502-508.
- Fakhry E. M., El Maghraby, D. M. (2015) Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Bot Stud* 56, 6.
- Fazeli Danesh, A., Mooij, P., Ebrahimi, S., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. (2018) Effective role of medium supplementation in microalgal lipid accumulation. *Biotechnol Bioeng* 115, 1152-1160.
- Freitas, B. C. B., Cassuriaga, A. P. A., Morais, M. G., Costa, J. A. V. (2017) Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. *Bioresour Technol* 238, 248-253.
- Gupta, S., Pawar, S. B. (2018) Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the quality of lipid for biodiesel application: effects of scale of cultivation and light spectrum on reduction of  $\alpha$ -linolenic acid. *Bioproc Biosys Eng* 41, 531-542.
- Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., Chiang, Y. W. (2017) Integrated *Haematococcus pluvialis* biomass production and nutrient removal using bioethanol plant waste effluent. *Proc Safety Environ Protec* 111, 128-137.
- Hariskos, I., Posten, C. (2014) Biorefinery of microalgae – opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnol J* 9, 739-752.
- Hiss, H. (2001) Cinética de processos fermentativos. *Biotecnologia Industrial*, 2, 93-122.
- Huang, Y. T., Lai, C. W., Wu, B. W., Lin, K. S., Wu, J. C., Hossain, M. S. A., Wu, K. C. W. (2017) Advances in bioconversion of microalgae with high biomass and lipid productivity. *J Taiwan Inst Chem Eng* 79, 37-42.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enz Microb Technol* 27,

- 631-635.
- Ji, M.-K., Yun, H.-S., Park, Y.-T., Kabra, A. N., Oh, I.-H., Choi, J. (2015) Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO<sub>2</sub> for biomass production. *J Environ Manag* 159, 115-120.
- Ji, Y., Hu, W., Li, X., Ma, G., Song, M., Pei, H. (2014). Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Bioresour Technol* 152, 471-476.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J Bacteriol* 95, 1461-1468.
- Katiyar, R., Gurjar, B. R., Bharti, R. K., Kumar, A., Biswas, S., Pruthi, V. (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. *Renew Energy* 113, 1359-1365.
- Khadim, S. R., Singh, P., Singh, A. K., Tiwari, A., Mohanta, A., Asthana, R. K. (2018) Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. *Bioresour Technol* 270, 20-29.
- Kim, G. Y., Heo, J., Kim, H. S., Han, J. I. (2017) Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresour Technol* 237, 72-77.
- Kim, J.-Y., Kim, H.-W. (2017) Photoautotrophic microalgae screening for tertiary treatment of livestock wastewater and bioresource recovery. *Water* 9, 192.
- Kim, W., Park, J. M., Gim, H. G., Jeong, S.-H., Kang, C. M., Kim, D.-J., Kim, S. W. (2012) Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioproc Biosys Eng* 35, 19-27.
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., Tys, J. (2014) Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioproc Biosys Eng* 37, 735-741.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A. K., Das, D. (2014) Evaluation and optimization of two stage sequential *in situ* transesterification process for fatty acid methyl ester quantification from microalgae. *Renew Energy* 68, 560-569.
- Mäki-Arvela, P., Hachemi, I., Murzin, D. Y. (2014) Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. *J Chem Technol Biotechnol* 89, 1607-1626.
- Miazeck, K., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D. (2017) Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment production. *Bioresour Technol* 230, 122-131.
- Mitra, D., Van Leeuwen, J. H., Lamsal, B. (2012) Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Res* 1, 40-48.
- Mohan, S. V., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R., Navaneeth, B. (2015) Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: progress and perspectives. *Bioresour Technol* 184, 169-178.
- Mondal, M., Ghosh, A., Sharma, A. S., Tiwari, O. N., Gayen, K., Mandal, M. K.,

- Halder, G. N. (2016) Mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. BTA 9031 and *Chlamydomonas* sp. BTA 9032 isolated from coal field using various carbon sources for biodiesel production. *Energy Conver Manag* 124, 297-304.
- Morowvat, M. H., Ghasemi, Y. (2016) Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatal Agricul Biotech* 7, 217-223.
- Muliterno, A., Mosele, P. C., Costa, J. A. V., Hemkemeier, M., Bertolin, T. E., Colla, L. M. (2005) Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. *Ciênc Agrotecnol* 29, 1132-1138.
- Nascimento, V. M., Silva L. F., Gomez J. G. C., Fonseca G. G. (2016) Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol. *Sci Agric* 73, 429-433.
- Nelson, D. R., Viamajala, S. (2016) One-pot synthesis and recovery of fatty acid methyl esters (FAMES) from microalgae biomass. *Catal Today* 269, 29-39.
- Ojo, E. O., Auta, H., Baganz, F., Lye, G. J. (2014) Engineering characterization of a shaken, single-use photobioreactor for early stage microalgae cultivation using *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour Technol* 173, 367-375.
- Pancha, I., Chokshi, K., Mishra, S. (2015) Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol* 179, 565-572.
- Park, W.-K., Moon, M., Kwak, M.-S., Jeon, S., Cho, G.-G., Yang, J.-W., Lee, B. (2014) Use of orange peel extract for mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*: increased production of biomass and FAMES. *Bioresour Technol* 171, 343-349.
- Reihner, C. O., Costa, J. A. V. (2006) Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 937-943.
- Ribeiro, C. A. F., Horii, J. (1999) Potentialities of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* for sugar cane juice fermentation. *Sci Agric* 56, 255-263.
- Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J. C. M. (2011) Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresour Technol* 102, 6587-6592.
- Salama, E. S., Kabra, A. N., Ji, M. K., Kim, J. R., Min, B., Jeon, B. H. (2014) Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresour Technol* 172, 97-103.
- Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., Mariani, P., Adani, F. (2017) Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresour Technol* 230, 82-89.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abdallah, E. F. (2017). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J Biol Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., Gruppen, H. (2011) Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresour Technol* 102, 9121-9127.
- Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertucco, A., Giacometti, G. M. (2012) Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresour Technol* 104, 523-529.

- Soares, B. M., Vieira, A. A., Lemões, J. S., Santos, C. M., Mesko, M. F., Primel, E. G., et al. (2012) Investigation of major and trace element distribution in the extraction–transesterification process of fatty acid methyl esters from microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour Technol* 110, 730-734.
- Song, M., Pei, H. (2018) The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. *Bioresour Technol* 263, 525-531.
- Srinivasan, R., Kumar, V. A., Kumar, D., Ramesh, N., Babu, S., Gothandam, K. M. (2015) Effect of dissolved inorganic carbon on  $\beta$ -carotene and fatty acid production in *Dunaliella* sp. *Appl Biochem Biotechnol* 175, 2895-2906.
- Sun, H., Kong, Q., Geng, Z., Duan, L., Yang, M., Guan, B. (2015) Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* 186, 67-73.
- Torres, E. M., Hess, D., McNeil, B. T., Guy, T., Quinn, J. C. (2017) Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and bioremediation potential. *Ecotoxicol Environ Safety* 139, 367-376.
- Tramontin, D. P., Gressler, P. D., Rörig, L. R., Derner, R. B., Pereira-Filho, J., Radetski, C. M., Quadri, M. B. (2018) Growth modeling of the green microalga *Scenedesmus obliquus* in a hybrid photobioreactor as a practical tool to understand both physical and biochemical phenomena in play during algae cultivation. *Biotechnol Bioeng* 115, 965-977.
- Turon, V., Baroukh, C., Trably, E., Latrille, E., Fouilland, E., Steyer, J.-P. (2015) Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: yields and kinetics. *Bioresour Technol* 175, 342-349.
- Volkman, J. (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 495-506.
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S. R. M. (2013) The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* 129, 7-11.
- Wang, X., Sheng, L., Yang, X. (2017) Pyrolysis characteristics and pathways of protein, lipid and carbohydrate isolated from microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* 229, 119-125.
- Yang, S., Liu, G., Meng, Y., Wang, P., Zhou, S., Shang, H. (2014) Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol* 172, 180-185.
- Yee, W. (2015) Feasibility of various carbon sources and plant materials in enhancing the growth and biomass productivity of the freshwater microalgae *Monoraphidium griffithii* NS16. *Bioresour Technol* 196, 1-8.
- Zhan, J., Rong, J., Wang, Q. (2017) Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *Int J Hydrog Energy* 42, 8505-8517.
- Zhang, T. Y., Wu, Y. H., Zhu, S. F., Li, F. M., Hu, H. Y. (2013) Isolation and heterotrophic cultivation of mixotrophic microalgae strains for domestic wastewater treatment and lipid production under dark condition. *Bioresour Technol* 149, 586-589.

1 **Tabela 2.1.** Bioprodutos de microalgas e aplicações por espécies.

Bioprodutos	Aplicações	Microalga	Referência
Pigmentos	Nutricionais e médicas	<i>Neochloris oleoabundans</i> <i>Dunaliella salina</i> , <i>Arthrospira maxima</i> , <i>Synechococcus</i> sp.	Castro-Puyana et al., 2013 Mäki-Arvela et al., 2014
Ácidos Graxos	Farmacêutica e cosmética	<i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella</i> sp.  <i>Schizochytrium limacinum</i>	Kumar et al. 2014 Salama et al. 2014 Kumar et al. 2014; Soares et al., 2012 Nelson and Viamajala, 2016
Micosporinas	Protetor solar	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus</i> spp.	Sathasivam et al., 2017
Esteróis	Alimentação animal	<i>Navicula incerta</i> , <i>Asterionella glacialis</i> , <i>Haslea ostrearia</i>	Volkman, 2003
Proteínas	Nutrição humana e animal	<i>Tetraselmis</i> sp. <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Spirulina platensis</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp.	Schwenzfeier et al., 2011 Coustets et al. 2015 Wang et al., 2017
Lípidios em geral	Biodiesel	<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella</i> sp., <i>Schizochytrium limacinum</i>	Salama et al. 2014 Nelson and Viamajala, 2016
Carboidratos	Bioetanol	<i>Nannochloropsis</i> sp. <i>Chlorella sorokiniana</i>	Wang et al., 2017 Freitas et al., 2017

2

**Tabela 2.2.** Parâmetros cinéticos determinados para diferentes espécies de microalgas.

Microalga	$\mu_{max}$	$D_T$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$P_x$	$P_p$	Objetivo do estudo	Referência
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	+	-	+	-	+	-	Caracterização do crescimento de microalgas em condições heterotróficas utilizando ácidos orgânicos como fonte de carbono.	Turon et al., 2015
<i>Botryococcus braunii</i>	+	-	-	-	+	+	Investigar o efeito da variação da intensidade da luz e do aumento do dióxido de carbono no crescimento de microalgas.	Huang et al., 2017
<i>Botryococcus braunii</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a influência do fotoperíodo no crescimento e produtividade de microalgas.	Krzemińska et al., 2014
<i>Chlorella minutissima</i>	-	-	-	-	+	+	Avaliar o uso de glicerol bruto de baixo custo em cultivo heterotrófico.	Katiyar et al., 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	-	+	-	+	+	Utilização da madeira de faia ( <i>Fagus sylvatica</i> ) para o crescimento de microalgas e produção de ácidos graxos e pigmentos.	Miazek et al., 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i>	+	-	+	-	+	-	Caracterização do crescimento de microalgas em condições heterotróficas utilizando ácidos orgânicos como fonte de carbono.	Turon et al., 2015
<i>Chlorella vulgaris</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a capacidade de remover poluentes orgânicos e inorgânicos de fontes agrícolas.	Baglieri et al., 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	+	-	Investigar a decomposição da biomassa de algas quando exposta a altas temperaturas.	Ali et al., 2015
<i>Chlorella vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-	Verificar como o crescimento influencia o tamanho da célula microalgal e investigar o possível efeito no conteúdo intracelular.	Dewan et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	+	+	Uso de efluente para cultivo de microalgas e produção de lipídios.	Ebrahimian et al., 2014
<i>Dunaliella salina</i>	-	-	-	-	+	-	Maximizar a produção de biomassa.	Khadim et al., 2018
<i>Monoraphidium griffithii</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a viabilidade do uso de várias fontes de carbono para estimular o crescimento e a produtividade da biomassa.	Yee, 2015
<i>Nannochloropsis oculata</i>	-	-	-	-	+	-	Investigar a decomposição da biomassa de algas quando exposta a altas temperaturas.	Ali et al., 2015
<i>Neochloris conjuncta</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a influência do fotoperíodo no crescimento e produtividade de microalgas.	Krzemińska et al., 2014
<i>Neochloris terrestris</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a influência do fotoperíodo no crescimento e produtividade de microalgas.	Krzemińska et al., 2014
<i>Neochloris texensis</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a influência do fotoperíodo no crescimento e produtividade de microalgas.	Krzemińska et al., 2014
<i>Scenedesmus abundans</i>	+	-	-	-	+	+	Verificar o efeito das luzes vermelha e branca em relação ao crescimento celular, assimilação de carbono, respiração celular, produção de pigmentos e lipídios e perfil de ácidos graxos.	Gupta and Pawar, 2018
<i>Scenedesmus obliquus</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a influência do fotoperíodo no crescimento e produtividade de microalgas.	Krzemińska et al., 2014
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	+	-	-	-	+	-	Avaliar a capacidade de remover poluentes orgânicos e inorgânicos de fontes agrícolas.	Baglieri et al., 2016
<i>Spirulina</i> sp.	+	+	-	-	+	-	Estimular o aumento de carboidratos nas células das microalgas.	Braga et al., 2018
Mix of microalgae	+	-	-	-	-	+	Otimização do meio de cultura para aumentar o acúmulo de lipídios.	Fazeli Danesh et al., 2018

$\mu_{max}$  = velocidade específica máxima de crescimento;  $D_T$ : tempo de duplicação;  $Y_{x/s}$  = rendimento de biomassa;  $Y_{p/s}$  = rendimento de produto;  $P_x$ : produtividade de biomassa;  $P_p$ : produtividade de produto; +: presença; -: ausência.





**Tabela 2.3.** Parâmetros cinéticos obtidos de cultivos de *Chlorella*.

Microalga	S (g L <sup>-1</sup> )	Fonte de carbona	$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	PP (h:h)	Xmax (g L <sup>-1</sup> )	Px (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	T (°C)	pH	Meio de Cultvo	Intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	-	-	0.158±0.016	8:16	1.58	0.089±0.003	22±2	7.6±0.2	Mod. BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Chlorella</i> sp.	2	Glicerol	0.342±0.029	8:16	1.65	0.227±0.027	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Chlorella</i> sp.	5	Glicerol	0.188±0.016	8:16	1.92	0.148±0.009	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Chlorella</i> sp.	10	Glicerol	0.122±0.003	8:16	1.70	0.138±0.003	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	*a	Dióxido de carbono	0.44	12:12	0.95	0.03	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	5	Acetate de sódio	1.21	12:12	1.45	0.06	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	5	Bicarbonato de sódio	0.27	12:12	0.71	0.01	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	5	Frutose	1.2	12:12	1.24	0.05	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	5	Permeado de soro de queijo	1.8	12:12	1.62	0.07	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella</i> sp. BTA 9031	5	Molasses	1.47	12:12	1.55	0.07	25	6.9	BG11	70	Mondal et al., 2016
<i>Chlorella emersonii</i>	*b	Dióxido de carbono	0.86	-	0.39	0.028	25	-	Watanabe	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella emersonii</i>	*b	Dióxido de carbono	0.46	-	1.11	0.079	25	-	Watanabe LN	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella emersonii</i>	*c	Dióxido de carbono	0.10±0.06	-	2.06	-	25	8	Jüttner	200	Borkenstein et al., 2011
<i>Chlorella emersonii</i>	*c	Dióxido de carbono do gás de combustão	0.13±0.08	-	2.00	-	25	8	Jüttner	200	Borkenstein et al., 2011
<i>Chlorella emersonii</i>	-	Efluente da pecuária	0.61			-	35	-	Mod. BG11	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella emersonii</i>	-	Efluente da pecuária	0.53			-	35	-	Mod. BG11	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella emersonii</i>	-	Efluente da pecuária	0.51			-	35	-	Mod. BG11	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella minutissima</i>	*b	Dióxido de carbono	0.43	-	0.46	0.032	25	-	Guillards	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella minutissima</i>	*b	Dióxido de carbono	0.43	-	0.22	0.016	25	-	Guillards LN	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella protothecoides</i>	10	Glicerol	0.91±0.1	24:00	2.67±0.3		24	-	BG11+pep.	100	Sforza et al., 2011

<i>Chlorella protothecoides</i>	10	Glicerol	0.87±0.01	-	1.10±0.2		24	-	BG11+pep.	Não informado	Sforza et al., 2011
<i>Chlorella protothecoides</i>	*b	Dióxido de carbono	0.33	-	0.03	0.002	25	-	Watanabe	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella protothecoides</i>	*b	Dióxido de carbono	0.27	-	0.33	0,023	25	-	Watanabe LN	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*b	Dióxido de carbono	0.58	-	0.04	0.002	25	-	Watanabe	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*b	Dióxido de carbono	0.19	-	0.07	0.004	25	-	Watanabe LN	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*e	Dióxido de carbono	0.05	-	-	6.00	32	7	TBP	180±20	Ojo et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*e	Dióxido de carbono	0.05	-	-	6.07	32	7	TBP	180±20	Ojo et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*e	Dióxido de carbono	0.09	-	-	6.05	32	7	TBP	180±20	Ojo et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*e	Dióxido de carbono	0.11	-	-	6.61	32	7	TBP	180±20	Ojo et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	*e	Dióxido de carbono	0.12	-	-	6.23	32	7	TBP	180±20	Ojo et al., 2014
<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	Efluente da pecuária	0.34				35	-	Mod. BG11 - nitrogen	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	Efluente da pecuária	0.45				35	-	Mod. BG11 - nitrogênio	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i>	-	Efluente da pecuária	0.33				35	-	Mod. BG11 – nitrogênio	160	Kim and Kim, 2017
<i>Chlorella variabilis</i>	-	-	0.04±0.02	-	3.76±0.02	0.63±0.02	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-	-	0.09±0.02	-	4.90±0.08	1.07±0.08	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-	-	0.38±0.04	-	8.11±0.04	1.76±0.04	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-	-	0.43±0.02	-	6.65±0.04	1.70±0.04	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-	-	0.31±0.04	-	6.00±0.06	1.32±0.06	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-		0.21±0.02	-	7.20±0.01	1.55±0.01	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella variabilis</i>	-		0.16±0.03	-	5.06±0.06	1.14±0.06	-	10±0.1	Zarrouk *f	1.88-555	De Bhowmick et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	2.2	Soro de queijo	-	12:12	2.59±0.04	0.52±0.02	25	8.4	BG11	370	Salati et al., 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	2.2	Ultrafiltrado digerido mais glicerol	-	12:12	1.67±0.03	0.33±0.04	25	8.4	BG11	370	Salati et al., 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	2.2	Resíduo de Vinho Branco	-	12:12	1.75±0.05	0.35 ± 0.02	25	8.4	BG11	370	Salati et al., 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Dióxido de carbono	-	12:12	1.21±0.02	0.24 ± 0.03	25	8.4	BG11	370	Salati et al., 2017

<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Solução de soro de leite em pó não hidrolisado	0.12±0.00	24:0	1.98±0.43	0.32 ± 0.13	30	-	-	70	Abreu et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Mistura de glicose e galactose	0.47±0.05	24:0	2.24±0.34	0.46±0.09	30	-	-	70	Abreu et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Solução de soro de leite em pó hidrolisado	0.43±0.00	24:0	3.58±0.12	0.75±0.01	30	-	-	70	Abreu et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	*h	Dióxido de carbono	0.13±0.01	24:0	1.22±0.12	0.10±0.01	30	-	-	70	Abreu et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Extrato de casca de laranja	-	24:0	2.20	0.183	26	4.4-8.5	Extrato de casca de laranja	160–180	Park et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	5	Glicose	-	24:0	0.65	0.052	26	4.4-8.5	Mod. BG11	160–180	Park et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Dióxido de carbono	-	24:0	0.44	0.036	26	4.4-8.5	BG11	160–180	Park et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	Lactose	0.29±0.02	-	1.60±0.01	0.12±0.01	27±1	6.8	BBM com soro de queijo	72±4	De Melo et al., 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.1 *g	Licor de milho	0.38±0.01	-	2.10±0.01	0.20±0.02	27±1	6.8	BBM com licor de maceração de milho	72±4	De Melo et al., 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.2 *g	Vinhaça	0.34±0.0	-	0.77±0.03	0.09±0.02	27±1	6.8	BBM com vinhaça	72±4	De Melo et al., 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	0.29±0.0	-	0.91±0.02	0.08±0.02	27±1	6.8	BBM	72±4	De Melo et al., 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/25 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.80±0.05	0.049	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/50 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.97±0.01	0.058	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/100 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	1.02±0.05	0.061	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/200 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.78±0.00	0.047	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/400 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.56±0.02	0.034	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/600 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.47±0.02	0.030	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	1/800 *d	Glutamato monossódico	-	24:0	0.43±0.01	0.028	25±3	7.0	MSGW	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Dióxido de carbono	-	24:0	0.35±0.02	0.022	25±3	7.0	BG11	30	Ji et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	Glicose	-	24	7.1	-	28	6.8	MBM	11.87	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Soro de soja	-	24	5	-	28	6.8	-	11.87	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Vinhaça fina	-	24	8.3	-	28	6.8	-	11.87	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	Glucose	-	24	5.6	-	28	6.8	MBM	Não informado	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Soro de soja	-	24	2.5	-	28	6.8	-	Não informado	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Vinhaça fina	-	24	5.8	-	28	6.8	-	Não informado	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Glicose *i	-	24	8.0±0.2	2.0± 0.05	28	6.8	MBM	11.87	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Soro de soja *i	-	24	6.3±0.1	1.6± 0.03	28	6.8	-	11.87	Mitra et al., 2012

<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Vinhaça fina *i	-	24	9.8±0.3	2.5± 0.08	28	6.8	-	11.87	Mitra et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	*b	Dióxido de carbono	0.99	-	0.41	0.041	25	-	Watanabe	25	Illman et al., 2000
<i>Chlorella vulgaris</i>	*b	Dióxido de carbono	0.77	-	0.52	0.037	25	-	Watanabe LN	25	Illman et al., 2000

S: Concentração da fonte de carbono;  $\mu_{max}$ : velocidade específica máxima de crescimento; PP: fotoperíodo; Xmax: concentração celular máxima; Px: produtividade celular; LN: baixo nitrogênio; TBP: meio de fosfato de base Tris; Mod.: modificado; \* a: 3% v / v de CO<sub>2</sub> com um fluxo de 0,25 L min<sup>-1</sup>; \* b: 5% v / v de CO<sub>2</sub> com um fluxo de 1,0 L min<sup>-1</sup>; \* c com gás de combustão, a concentração final de CO<sub>2</sub> foi 67,8 ± 3,5; e com o CO<sub>2</sub> puro foi de 71,2 ± 3,5 Kg; \* diluição d descrita em Ji et al., 2014, sem especificação; \* e: 2% v / v de CO<sub>2</sub> com vazão de 0,2 L min<sup>-1</sup>; \* f: relacionado às estações do ano; \* g: concentração em % v / v (mL / L); \* h: 2% v / v de CO<sub>2</sub>; \* i: refere-se ao uso de biorreator, os demais tratamentos neste estudo ocorreram em frascos Erlenmeyer; "-": Não mencionado.

**Tabela 2.4.** Parâmetros cinéticos obtidos em cultivos de *Spirulina*.

Microalga	S (g L <sup>-1</sup> )	Fonte de carbona	$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	PP (h:h)	Xmax (g L <sup>-1</sup> )	Px (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	T (°C)	pH	Meio de Cultvo	Intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Referência
<i>Spirulina maxima</i>	-	-	0.11±0.01	16:08	4.0±0.1	0.20±0.01	32	9.3	Schlösser	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maximas</i>	1	Vinhaça de beterraba	0.13±0.05	16:08	4.8±0.2	0.24±0.01	32	9.3	Schlösser+vinhaça	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	2	Vinhaça de beterraba	0.11±0.06	16:08	4.3±0.1	0.16±0.01	32	9.3	Schlösser+vinhaça	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	5	Vinhaça de beterraba	0.17±0.01	16:08	4.8±0.2	0.15±0.01	32	9.3	Schlösser+vinhaça	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	7	Vinhaça de beterraba	-	16:08	-	-	32	9.3	Schlösser+vinhaça	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	2	Vinhaça de beterraba	0.08±0.05	16:08	3.5±0.3	0.16±0.02	32	9.3	Schlösser+ vinhaça alcalinizada diluída	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	5	Vinhaça de beterraba	0.08±0.05	16:08	3.5±0.3	0.15±0.02	32	9.3	Schlösser+ vinhaça alcalinizada diluída	81	Barrocal et al., 2010
<i>Spirulina maxima</i>	-	-	0.97	12:12	-	-	30±3	9.5	AO	70	Dos Santos et al., 2016
<i>Spirulina maxima</i>	0.1 *a	Vinhaça de cana	0.28	12:12	0.676	-	30±3	9.5	AO	70	Dos Santos et al., 2016
<i>Spirulina maxima</i>	1.0 *a	Vinhaça de cana	0.14	12:12	0.716	-	30±3	9.5	AO	70	Dos Santos et al., 2016
<i>Spirulina maxima</i>	0.1 *a	Vinhaça de cana	0.54	-	-	-	30±3	9.5	AO	Não informado	Dos Santos et al., 2016
<i>Spirulina maxima</i>	1.0 *a	Vinhaça de cana	1.02	-	-	-	30±3	9.5	AO	Não informado	Dos Santos et al., 2016
<i>Spirulina platensis</i>	0.5	Glicose	0.1272	12:12	4.02±0.07	-	30	-	Zarrouk	24.3	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	0.5	Glicose	0.1104	12:12	5.35±0.05	-	30	-	Zarrouk	40.5	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	0.5	Glicose	0.3312	12:12	1.28±0.02	-	30	-	Zarrouk	24.3	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	0.5	Glicose	0.1512	12:12	5.38±0.09	-	30	-	Zarrouk	40.5	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	1.0	Glicose	0.0336	12:12	3.18±0.03	-	30	-	Zarrouk	24.3	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	1.0	Glicose	0.1152	12:12	3.09±0.02	-	30	-	Zarrouk	40.5	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	1.0	Glicose	0.0984	12:12	2.51±0.04	-	30	-	Zarrouk	24.3	Muliterno et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i>	1.0	Glicose	0.2328	12:12	1.50±0.04	-	30	-	Zarrouk	40.5	Muliterno et al., 2005

<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.17	-	-	0.29	30±1	9.5	Schlösser	55	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	1.7	-	-	0.42	30±1	9.5	Schlösser	80	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.19	-	-	0.62	30±1	9.5	Schlösser	120	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.13	-	-	0.18	30±1	9.5	Schlösser	550	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.12 *b	-	-	0.05	30±1	9.5	Schlösser	55	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.098 *b	-	-	0.054	30±1	9.5	Schlösser	55	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.081 *b	-	-	0.06	30±1	9.5	Schlösser	55	Converti et al., 2006
<i>Spirulina platensis</i> Paracas	16.8	Bicarbonato de sódio	0.031	12:12	-	0.019	30	-	Zarrouk	33.75	Reihner and Costa, 2006
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	16.8	Bicarbonato de sódio	0.034	12:12	-	0.022	30	-	Zarrouk	33.75	Reihner and Costa, 2006
<i>Spirulina platensis</i>	16.8	Bicarbonato de sódio	0.20	12:12	-	-	20	9	Zarrouk	25.65	Costa et al., 2000
<i>Spirulina platensis</i>	16.8	Bicarbonato de sódio	0.24	12:12	-	-	20	9	Zarrouk+0.003 g/L nitrato de sódio	25.65	Costa et al., 2000
<i>Spirulina platensis</i>	16.8	Bicarbonato de sódio	0.28	12:12	-	-	20	9	Zarrouk+0.015 g/L nitrato de sódio	25.65	Costa et al., 2000
<i>Spirulina platensis</i>	16.8	Bicarbonato de sódio	0.26	12:12	-	-	20	9	Zarrouk+0.030 g/L nitrato de sódio	25.65	Costa et al., 2000
<i>Spirulina platensis</i>	16.8	Bicarbonato de sódio	0.23	12:12	-	-	20	9	Zarrouk+0.060 g/L nitrato de sódio	25.65	Costa et al., 2000
<i>Spirulina platensis</i>	2.8	Bicarbonato de sódio	0.25	12:12	0.75	0.145	30	8.2	Mod. Zarrouk	43.2	Andrade et al., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	5	Bicarbonato de sódio	0.12	12:12	0.64	0.079	30	8.2	Mod. Zarrouk	43.2	Andrade et al., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	10	Bicarbonato de sódio	0.16	12:12	0.55	0.088	30	8.2	Mod. Zarrouk	43.2	Andrade et al., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	20	Bicarbonato de sódio	0.10	12:12	0.5	0.069	30	8.2	Mod. Zarrouk	43.2	Andrade et al., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	50	Bicarbonato de sódio	0.09	12:12	0.21	0.011	30	8.2	Mod. Zarrouk	43.2	Andrade et al., 2008
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.71	-	2.105	0.114	30±1	8.7	Paoletti+20% nitrato de potássio +15 mM cloreto de amônio	156±6	Rodrigues et al., 2011
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.75	-	2.613	0.135	30±1	8.7	Schlösser+20% nitrato de potássio +7.5 mM cloreto de amônio	156±6	Rodrigues et al., 2011
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.30	-	2.252	0.097	30±1	8.7	Schlösser+20% nitrato de potássio +7.5 mM cloreto de amônio	156±6	Rodrigues et al., 2011

<i>Spirulina platensis</i>	-	-	0.60	-	2.338	0.108	30±1	8.7	Schlösser+20% nitrato de potássio +7.5 mM cloreto de amônio +1:33 carbonato de sódio / hidrogenocarbonato de sódio	156±6	Rodrigues et al., 2011
----------------------------	---	---	------	---	-------	-------	------	-----	--	-------	------------------------

S: Concentração da fonte de carbono;  $\mu_{max}$ : velocidade específica máxima de crescimento; PP: fotoperíodo; Xmax: concentração celular máxima; Px: produtividade celular; \* a:% de v / v (mL / L); \* b: Os autores (Converti et al., 2006) utilizaram diferentes concentrações celulares iniciais, respectivamente: 0,15, 0,30 e 0,50 gL<sup>-1</sup>; Mod.: modificado; "-": Não mencionado.

**Tabela 2.5.** Parâmetros cinéticos obtidos a partir de cultivos *Scenedesmus*.

Microalga	S (g L <sup>-1</sup> )	Fonte de carbona	$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	PP (h:h)	Xmax (g L <sup>-1</sup> )	Px (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	T (°C)	pH	Meio de Cultvo	Intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Referência
<i>Scenedesmus</i> sp.	10	Glicose	0.23	12:12	0.757	0.079	25±2	-	BG11	150	Pancha et al., 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	-	-	0.124±0.027	8:16	1.67	0.094±0.006	22±2	7.6±0.2	Mod. BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Scenedesmus</i> sp.	2	Glicerol	0.154±0.023	8:16	1.87	0.141±0.029	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Scenedesmus</i> sp.	5	Glicerol	0.220±0.003	8:16	2.15	0.229±0.047	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Scenedesmus</i> sp.	10	Glicerol	0.127±0.011	8:16	-	0.092±0.007	22±2	7.6±0.2	BG11	~250	Andruleviciute et al., 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5	Águas residuais de alimentos +10% CO <sub>2</sub>	-	-	0.42	-	27	-	-	120	Ji et al., 2015
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	Águas residuais de alimentos r+14% CO <sub>2</sub>	-	-	0.44	-	27	-	-	120	Ji et al., 2015
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4	Xilose	0.21	24:0	2.2	-	-	-	BG11	160	Yang et al., 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4	Glicose	0.30	24:0	-	-	-	-	BG11	160	Yang et al., 2014
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2	Xilose	0.32	24:0	-	0.2113	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	4	Xilose	0.35	24:0	-	0.3614	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	6	Xilose	-	24:0	-	0.3108	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	8	Xilose	-	24:0	-	0.271	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	10	Xilose	0.35	24:0	-	0.2581	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0	Xilose	0.1	24:0	-	0.0186	25±1	7-7.5	BG11	60	Song and Pei, 2018

S: Concentração da fonte de carbono;  $\mu_{max}$ : velocidade específica máxima de crescimento; PP: fotoperíodo; Xmax: concentração celular máxima; Px: produtividade celular; Mod.: modificado; "-": Não mencionado.



**Tabela 2.6.** Parâmetros cinéticos obtidos a partir do cultivo de várias outras cepas de microalgas.

Microalga	S (g L <sup>-1</sup> )	Fonte de carbona	$\mu_{max}$ (d <sup>-1</sup> )	PP (h:h)	Xmax (gL <sup>-1</sup> )	Px (gL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	T (°C)	pH	Meio de Cultvo	Intensidade luminosa (umol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Dunaliella salina</i>	-	-	0.24	-	0.571	0.18	25	-	Johnson	60	Morowvat and Ghasemi, 2016
<i>Dunaliella salina</i>	15.0	Glicose	0.37	-	0.997	0.46	25	-	Johnson otimizado (com Glicose )	60	Morowvat and Ghasemi, 2016
<i>Dunaliella salina</i>	5	Bicarbonato de sódio	0.70	-	-	-	25	-	Mod. Johnson	340	Kim et al., 2017
<i>Dunaliella salina</i>	5	Bicarbonato de sódio	1.05	12:12	-	-	25	-	Mod. Johnson	340	Kim et al., 2017
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2.4	Acetate de sódio	-	12:12	0.834±0.031	-	24	8	MCM	~57	Sun et al., 2015
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2.4	Acetate de sódio	-	12:12	0.832±0.027	-	20	8	MCM	~57	Sun et al., 2015
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2.4	Acetate de sódio	-	12:12	0.863±0.030	-	18	8	MCM	~57	Sun et al., 2015
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2.4	Acetate de sódio	-	12:12	0.894±0.032	-	16	8	MCM	~57	Sun et al., 2015
<i>Haematococcus pluvialis</i>	*a	Dióxido de carbono	0.236	12:12	2.028±0.09	-	23±2	7	-	202.5-405	Haque et al., 2017
<i>Haematococcus pluvialis</i>	*a	Dióxido de carbono	0.280	12:12	2.836±0.03	-	23±2	7	-	202.5-405	Haque et al., 2017
<i>Haematococcus pluvialis</i>	*a	Dióxido de carbono	0.317	12:12	4.37±0.07	-	23±2	7	-	202.5-405	Haque et al., 2017
<i>Haematococcus pluvialis</i>	*a	Dióxido de carbono	0.013	12:12	0.259±0.02	-	23±2	7	-	202.5-405	Haque et al., 2017
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.61±0.03	-	25±2	7.5	f/2 solução Guillard *c	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.57±0.06	-	25±2	7.5	f/2 solução Guillard com baixo N *b	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.53±0.05	-	25±2	7.5	f/2 solução Guillard com baixo N *b	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.48±0.02	-	25±2	7.5	f/2 solução Guillard com baixo N *b	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.42±0.05	-	15	7.5	f/2 solução Guillard	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.45±0.04	-	20	7.5	f/2 solução Guillard	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.5±0.04	-	25	7.5	f/2 solução Guillard	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.53±0.02	-	30	7.5	f/2 solução Guillard	150	Fakhry and El Maghraby, 2015

<i>Nannochloropsis salina</i>	-	Dióxido de carbono atmosférico	-	12:12	0.51±0.02	-	35	7.5	f f/2 solução Guillard	150	Fakhry and El Maghraby, 2015
<i>Nannochloropsis salina</i>	10	Glicerol	0.36±0.2	24:0	0.43±0.2	-	24	-	f/2 solução Guillard mod.	100±10	Sforza et al., 2011
<i>Nannochloropsis salina</i>	10	Glicerol	0.01	-	0.05	-	24	-	Não informado	100±10	Sforza et al., 2011

S: Concentração da fonte de carbono;  $\mu_{max}$ : velocidade específica máxima de crescimento; PP: fotoperíodo; Xmax: concentração celular máxima; Px: produtividade celular; \* a: % de CO<sub>2</sub>: ar, 2,5, 5 e 10 v / v (mL / L); \* b: Baixo N: Baixo nitrogênio, respectivamente 25, 50 e 75% dos níveis originais usados no meio de controle; \* c: o meio de controle.

### 3. PIGMENTOS MICROALGAIS E OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO

**Resumo.** Há uma crescente demanda no sentido de utilizar os microrganismos fotossintéticos, em especial as microalgas para síntese ou acumulação de compostos de interesse biotecnológico. Tais compostos podem ser destinados para diversas aplicações como: alimentação animal e humana, produção de biocombustíveis, cosméticos, produtos farmacêuticos, entre outros. Tal fato, associado a diversidade de espécies de microalgas existentes, permite que se alcance o tão idealizado objetivo. No entanto, deve-se levar em consideração otimizações que são necessárias para que o sucesso do processo produtivo seja alcançado. Sendo assim, nesse contexto, os pigmentos provenientes das microalgas tem se destacado devido a seus benefícios à saúde humana na prevenção de diversas doenças. Então, visando um conhecimento sobre a classe de pigmentos existentes bem como os métodos de extração, análise e identificação esse artigo de revisão foi estruturado, para que assim fossem identificadas as vantagens e desvantagens de cada um. Após um levantamento de periódicos científicos, foi possível verificar a importância e associação dos pigmentos no tratamento ou prevenção de doenças. Além de verificar que cada classe de pigmentos apresenta características específicas tanto para extração e identificação. Em referência aos métodos de identificação, foi possível constatar que o uso métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a identificação é mais precisa e permite quantificar a quantidade de pigmento.

**Palavras-chave:** Microalga, Carotenoides, Clorofila, HPLC, Solvente.

**Abstract.** The crescent demand to use photosynthetic microorganisms, especially as microalgae for synthetic or accumulation of compounds of biotechnological interest. Such compounds could be used for several applications such as animal and human food, production of biofuels, cosmetics, and pharmaceutical products, among others. This fact, associated

with the diversity of existing microalgae species, allows us to achieve the long-dreamed objective. However, optimizations that are necessary for the success of the production process to be achieved must be taken into account. Thus, in this context, the pigments from microalgae have stood out due to their benefits to human health in preventing various diseases. So, a knowledge about the class of existing pigments as well as the methods of extraction, analysis and identification this review article was designed, so that the advantages and disadvantages of each one were assimilated. After conducting the search in scientific journals, it was possible to verify the importance and association of pigments in the treatment or prevention of diseases. In addition to checking that each class of pigments has characteristics that are both specific for extraction and identification. Referring to the identification methods, was possible to realize that when using HPLC the identification is more accurate and it is still possible to quantify the amount of pigment.

**Keywords:** Microalgae, Carotenoids, Chlorophyll, HPLC, Solvent.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são caracterizadas por um grupo bastante diversificado de micro-organismos, sendo este grupo composto por organismos eucariontes ou procariontes, dulcícolas ou marinhos, com aproximadamente 72.500 espécies e 16 classes já catalogadas (BLAIR, KOKABIAN e GUDE et al., 2014; SILVA et al., 2020).

A extensa diversidade de espécies permite que se obtenha uma variedade de bioprodutos, provenientes do metabolismo microalgal. Estes são carboidratos, lipídeos, proteínas, pigmentos, entre outros compostos. Outra particularidade interessante é que elas são versáteis no sentido de adaptabilidade a diferentes ambientes e condições climáticas. Tais características estimulam estudos fisiológicos, bem como dos métodos de recuperação celular, extração e purificação de produtos, entre outros. Além de incentivar investimentos, nos compostos considerados de alto valor agregado (FRANCHINO et al., 2013; HULTBERG, CARLSSON e

GUSTAFSSON, 2013; SALATI et al., 2017; GOSH et al., 2017; LEVASSEUR, PERRÉ e POZZOBON, 2020).

Os pigmentos das microalgas são compostos atribuídos a lista de produtos de valor econômico significativo. São componentes naturalmente sintetizados pelas microalgas e possuem propriedades antioxidantes, anticâncer, anti-inflamatório, entre outras. Quando extraídos, podem ser purificados e utilizados como um alimento nutricional, precursor de vitaminas, ou em cosméticos. Sendo assim, existe um apelo comercial farmacêutico, alimentício e das indústrias cosméticas (D’ALESSANDRO e ANTONIOSI FILHO, 2016; CHEW et al., 2017; HU et al., 2018).

Os grupos de pigmentos se dividem em carotenoides, ficobilinas e clorofilas (GUREV, DRAGANCEA e HARITONOV, 2020), cada qual com suas particularidades e benefícios à saúde humana. Portanto, essa revisão foi proposta no sentido de conhecer mais sobre a classificação dos ficopigmentos, os principais pigmentos encontrados nas microalgas, seus benefícios à saúde humana, além de abordar os métodos de extração, purificação (se necessário), análise, identificação, bem como as vantagens e desvantagens de cada método.

### **3.2 PIGMENTOS MICROALGAIS**

Os pigmentos provenientes das microalgas podem ser lipossolúveis ou hidrossolúveis. São classificados em três grupos: carotenoides, ficobilinas e clorofilas. São responsáveis por determinar a cor do microrganismo, por exemplo, a cor verde é característica das clorofilas, a cor amarela e laranja é característica dos carotenoides e a cor vermelha e azul é característica das ficobilinas (LEVASSEUR, PERRÉ e POZZOBON, 2020; GUREV, DRAGANCEA e HARITONOV, 2020).

Constituem uma diversidade de moléculas com algumas propriedades importantes, dentre elas a atividade antioxidante que é observada em diferentes espécies de microalgas, conseqüentemente diversas aplicações são evidenciadas, no entanto, vale destacar as relacionadas ao tratamento e

prevenção de doenças crônicas (Tabela 2.1) (RAPOSO, DE MORAIS e DE MORAIS, 2015).

### **3.2.1 CAROTENOIDES:**

São divididos em duas grandes classes, os carotenos ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno and licopeno), são constituídos basicamente de carbono e hidrogênio, a outra classe é das xantofilas (luteína, b-criptoxantina, zeaxantina, astaxantina e fucoxantina) constituídos basicamente de carbono, hidrogênio e oxigênio. Sendo o  $\beta$ -caroteno, luteína e astaxantina os mais estudados (GONG e BASSI, 2016; ZULUAGA et al., 2017).

Outra característica importante dos carotenoides está no fato de absorverem luz nas bandas espectrais visíveis, no qual a clorofila não absorve eficientemente (D’ALESSANDRO e ANTONIOSI FILHO, 2016).

Além disso, os carotenoides são indispensáveis na dieta humana devido ao fato de que seus compostos possuem propriedades indispensáveis a saúde, como por exemplo o fato de que os carotenoides podem atuar como precursores da vitamina A e a luteína é necessária para garantir a saúde dos olhos e conseqüentemente conservar a visão (AMENGUAL, 2019; GUREV, DRAGANCEA e HARITONOV, 2020).

#### **Luteína**

É um pigmento xantofílico primário presente em plantas e algas verdes. Auxilia no processo fotossintético durante a incidência luminosa, de modo que protege o sistema fotossintético de danos foto-oxidativos (HU et al., 2018). É acumulada na mácula do olho humano com o intuito de proteger os olhos de danos oxidativos e “melhorar a visão” (pois, auxilia protegendo a degeneração da macula), outros benefícios da luteína incluem: melhoras em doenças cardiovasculares, cânceres, entre outros. As principais espécies estudadas visando obter um maior conteúdo de luteína são: *Muriellopsis* sp., *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus* (LIN, LEE e CHANG, 2015; CHEN et al., 2016; GAYATHRI et al., 2016).

#### **Astaxantina**

É uma xantofila secundária e são os derivados oxigenados dos carotenoides, caracterizada por sua cor vermelho alaranjado. O que mais chama atenção nesse pigmento é sua atividade antioxidante, pois a é superior a outros carotenoides, tais como: zeaxantina, luteína, cantaxantina e  $\beta$ -caroteno e é 500 vezes mais potente que a vitamina E. As aplicações desse pigmento são diversas, tais como: atividade terapêutica para a síndrome do túnel do carpo, estimulação do sistema imune, atividade antiinflamatória, tratamento de dores musculares e prevenção de câncer. O principal gênero produtor de astaxantina é o *Haematococcus* (FASANO et al. 2014; KIM et al., 2016; HOSSAIN et al., 2017; HU et al., 2018; GUREV, DRAGANCEA e HARITONOV, 2020).

### **Zeaxantina**

É uma xantofila encontrada em organismos que fazem fotossíntese, flores, vegetais, microalgas, entre outros. É um derivado dos carotenoides contendo oxigênio em sua composição, se classificando como um pigmento xantofílico. São solúveis em solventes orgânicos. Dentre suas aplicações, vale destacar a associação desse pigmento para reduzir o risco de doenças oculares, como por exemplo a catarata. Outras aplicações da zeaxantina são a prevenção do câncer e melhorar a disfunção cardíaca associada a idade. Os principais gêneros que apresentam o pigmento são: *Nannochloropsis*, *Dunaliella*, entre outros (Faé Neto, Borges e Mendes, 2018; Huang et al., 2018; Zhang et al., 2018; EI-Baz et al., 2019).

### **$\beta$ -caroteno**

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento laranja-amarelado. Sua demanda é consideravelmente alta, pois, o mesmo pode ser utilizado como corante para alimentos e também como um suplemento nutricional. Sua principal característica que lhe confere tamanha importância, está associada ao fato de ser o precursor da vitamina A (retinol) essencial para os olhos (AMENGUAL, 2019; D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016). Um dos gêneros mais estudados em relação a síntese deste pigmento é o *Dunaliella* (ZULUAGA et al., 2017).

### **3.2.2 FICOBILINAS**

São pigmentos solúveis em água, são classificados como fáceis de isolar e de purificar (D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016).

#### **Ficocianina**

É acumulado em ficobilisomos (órgãos especializados), os quais participam da fotossíntese. São os principais pigmentos coletores de luz em cianobactérias com uma absorção máxima de 620 nm. São compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, neuroprotetores e hepatoprotetores. O principal gênero associado a esses pigmentos é o *Spirulina* (MARTELLI et al., 2014; D'ALESSANDRO e ANTONIOSI FILHO, 2016; HU et al., 2018; SAHNI et al., 2019).

### **3.2.3 CLOROFILAS**

São pigmentos esverdeados lipossolúveis. São os responsáveis pela conversão da energia solar em energia química. A maior parte das microalgas possuem a clorofila do tipo a, porém algumas espécies também possuem a clorofila b e c. A estrutura de clorofila é formada de carbono, anéis aromáticos e elementos como magnésio e cloro ligados a eles. Possuem atividade de antimutagenicidade e ação anticarcinogênica (LI et al., 2016; DA SILVA FERREIRA e SANT'ANNA, 2017). A principal classe associada a esse pigmento é *Chlorophyceae* e o gênero *Chlorella*, o qual vem sendo bastante comercializado (KHANRA et al., 2018).



**Tabela 3.1** Benéficos dos pigmentos microalgais.

Pigmento	Benefícios	Referência
Luteína	Previne a catarata relacionada à idade; degeneração macular; propriedade antioxidante anticâncer; previne doenças cardiovasculares.	Hu et al., 2018; Gong e Bassi, 2016; Zuluaga et al., 2017
Astaxantina	Forte propriedade antioxidante; efeitos anti-inflamatórios; anticâncer; auxilia na saúde cardiovascular.	Fasano et al. 2014; Zuluaga et al., 2017; Hu et al., 2018
$\beta$ -caroteno	Prevenir a cegueira noturna; propriedade antioxidante; previne fibrose hepática.	Amengual, 2019; D'alessandro e Antoniosi Filho, 2016; Zuluaga et al., 2017
Ficocianina	Atividades antioxidantes, anti-inflamatórias; anti-carcinogênicas; neuroprotetoras; hepatoprotetoras.	Fernández-Rojas, Hernández-Juárez e Pedraza-Chaverri, 2014; D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016; Hu et al., 2018; Sahni et al., 2019
Clorofilas	Atividade antioxidante, anti-inflamatória; antimutagênica; antimicrobiana.	Da Silva Ferreira e Sant'Anna, 2017

### 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS

Para que exista uma real eficiência na extração dos pigmentos, deve-se levar em consideração a polaridade dos mesmos, ou seja, pigmentos apolares são lipossolúveis, logo, o solvente utilizado deve ter uma afinidade nesse sentido. Já os pigmentos hidrossolúveis, são polares, logo, o solvente escolhido também deve apresentar essa característica.

#### 3.3.1 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis, conseqüentemente, os solventes escolhidos para a extração devem apresentar essa propriedade. Dessa forma, os solventes mais utilizados são: clorofórmio, metanol, etanol, isopropanol, entre outros (SICAIRE et al., 2014; SOARES et al., 2016; JAESCHKE et al., 2017). É comum após a extração a adição de agentes (KOH ou NaOH) que promovem a saponificação para a liberação dos pigmentos em suas formas originais (ZULUAGA et al., 2017; DI LENA et al., 2019).

#### 3.3.2 EXTRAÇÃO DAS FICOBILINAS

As ficocianinas são polares, conseqüentemente, são solúveis em água. Dessa forma, os principais solventes associados a extração dos

pigmentos são polares, geralmente as soluções aquosas, podendo ser feitas com uso de água destiladas ou tampões de fosfato. Sendo assim, como são encontradas na fase aquosa, é mais fácil diferenciá-la dos demais pigmentos (NAKAGAWA et al., 2016; D'ALESSANDRO E ANTONIOSI FILHO, 2016).

### **3.3.2.1 PURIFICAÇÃO DAS FICOCIANINAS**

A determinação da pureza das ficocianinas é baseada na taxa de absorvância A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>, estas absorvâncias correspondem ficocianina e a proteína total, respectivamente (FERNÁNDEZ-ROJAS, HERNÁNDEZ-JUÁREZ e PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). A purificação das ficocianinas pode ser realizada por diversas metodologias, tais como: precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, filtração usando membranas, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, entre outras (SØRENSEN, HANTKE e ERIKSEN, 2013; CHAIKLAHAN et al., 2014; FIGUEIRA, MORAES e KALIL, 2018; ZHENG et al., 2020).

### **3.3.3 EXTRAÇÃO DAS CLOROFILAS**

As clorofilas são pigmentos lipossolúveis, sendo assim, os solventes utilizados para a extração dos pigmentos são solventes que obedecem a polaridades dos pigmentos e conseqüentemente conseguem realizar a extração. Os principais solventes utilizados para a extração das clorofilas são: hexano, acetona, metanol, em sua maioria solventes orgânicos (CHEN e VAIDYANATHAN, 2013; SOARES et al., 2016).

## **3.4 MÉTODOS DE ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS**

Os métodos de análise, identificação e quantificação dos pigmentos são realizados utilizando metodologias baseadas em espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Tabela 3.2), ou ambas metodologias combinadas.

No caso, das metodologias baseadas em espectrofotometria, a análise ocorre por meio da absorvância, onde, por meio da absorvância é possível identificar pigmentos e por meio de modelos matemáticos previamente descritos é possível quantificar os pigmentos presentes na microalga a ser estudada. No entanto, não se tem uma identificação precisa, uma vez que um pigmento pode interferir na leitura de outro. Logo, muitas vezes é possível determinar alguns pigmentos, mas não a todos (MAADANE et al., 2015).

No trabalho realizado por Duarte et al. (2019), eles utilizaram os comprimentos de onda de 652,4 nm; para determinação da clorofila a, 665,2 nm para determinação da clorofila b e 470 nm para determinação dos carotenoides totais, por exemplo.

Os métodos que fazem uso de cromatográfica líquida de alta performance, por meio do uso de padrões, permitem que seja possível estabelecer uma curva de calibração e a mesma é utilizada como referência para identificar e fornecer o perfil dos pigmentos detectados, ou seja, são mais específicos. Os métodos também permitem realizar a quantificação dos pigmentos por meio do tempo de retenção (GAYATHRI et al., 2016; SOARES et al., 2016).

**Tabela 3.2** Pigmentos, métodos de extração, identificação, quantificação de diversas microalgas.

Microalga	Pigmento	Método de extração	Método de Identificação/Detecção	Método de quantificação	Referência
<i>C. closterium</i>	Clorofila a e fucoxantina	Extração assistida por microondas à pressão atmosférica (MAE) e Extração assistida por microondas a vácuo (VMAE), acetona foi o solvente utilizado.	RP-HPLC	RP-HPLC usando uma curva de calibração	Pasquet et al., 2011
<i>D. tertiolecta</i>	Clorofila a, clorofila b e $\beta$ -caroteno	Extração assistida por microondas à pressão atmosférica (MAE) e Extração assistida por microondas a vácuo (VMAE) acetona foi o solvente utilizado.	RP-HPLC	RP-HPLC usando uma curva de calibração	Pasquet et al., 2012
<i>N. salina</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Ruptura celular com esferas e extração utilizando acetona como solvente	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando a método descrito por Wellburn (1994)	Chen e Vaidyanathan, 2013
<i>Nannochloropsis spp.</i>	Clorofila a, clorofila b e clorofila total	Extração com solvente (água, etanol, DMSO) assistida por ultrassom	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Arnon (1949); Lichtenthaler and Wellburn (1983)	Parniakov et al., 2015.
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Clorofilas (subtipos) e carotenoides (subtipos)	Extração com acetona: metanol (70:30 v/v contendo Hidroxitolueno butilado), seguida de uma outra extração com cetona: metanol (50:50 v/v), utilizando vortex em ambos os casos	HPLC	Não determinado	Di Lena et al., 2019
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Clorofilas (subtipos) e carotenoides (subtipos)	Extração com acetona: metanol (70:30 v/v contendo Hidroxitolueno butilado), seguida de uma outra extração com cetona: metanol (50:50 v/v), utilizando vortex em ambos os casos	HPLC	Não determinado	Di Lena et al., 2019
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Isochrysis sp.</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015.
<i>Navicula sp.</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Chaetoceros sp.</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Tetraselmis suecica</i>	Clorofilas (subtipos) e carotenoides (subtipos)	Extração com acetona: metanol (70:30 v/v contendo Hidroxitolueno butilado), seguida de uma outra extração com cetona: metanol (50:50 v/v), utilizando vortex em ambos os casos	HPLC	Não determinado	Di Lena et al., 2019

<i>Tetraselmis sp.</i>	Clorofila a clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Eustigmatos cf. polyphem</i>	Clorofila a, $\beta$ -caroteno, violaxantina, vaucherixantina e zeaxantina	Extração assistida por sonicação utilizando solvente (metanol 0,1%)	HPLC	HPLC usando uma curva de calibração	Li, Li e Zhang 2012
<i>Parietochloris incisa</i>	Clorofila e carotenoides	Extração utilizando DMSO (sulfóxido de dimetilo)	HPLC	HPLC utilizando o método descrito por Merzlyak, Solovchenko e Pogosyan (2005)	Solovchenko et al., 2013
<i>Porphyridium cruentum</i>	Clorofilas (subtipos) e carotenoides (subtipos)	Extração com acetona: metanol (70:30 v/v contendo Hidroxitolueno butilado), seguida de uma outra extração com cetona: metanol (50:50 v/v), utilizando vortex em ambos os casos	HPLC	Não determinado	Di Lena et al., 2019
<i>Isochrysis galbana</i>	Clorofilas (subtipos) e carotenoides (subtipos)	Extração com acetona: metanol (70:30 v/v contendo Hidroxitolueno butilado), seguida de uma outra extração com cetona: metanol (50:50 v/v), utilizando vortex em ambos os casos	HPLC	Não determinado	Di Lena et al., 2019
<i>Nostoc sp.</i>	Ficocianina, aloficocianina e ficeritrina	Extração foi feita com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) na proporção 1:10 (p:p, biomassa: solvente). Para a extração as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento (-21 ° C a 4 ° C no escuro).	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Bennett and Bogobad (1973)	Arashiro et al., 2020
<i>Porphyridium purpureum</i>	Ficocianina, aloficocianina e ficeritrina	Extração foi feita com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) na proporção 1:10 (p:p, biomassa: solvente). Para a extração as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento (-21 ° C a 4 ° C no escuro).	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Bennett and Bogobad (1973)	Arashiro et al., 2020
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Carotenoides	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água) em diferentes concentrações	HPLC	a absorvidade molar de luteína em etanol ( $\epsilon = 2550$ ) foi usada para calcular concentração de carotenoides .	Jaeschke et al., 2017
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Carotenoides	Extração assistida por campo elétrico moderado utilizando como solvente uma solução de etanol.	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método Rodriguez-Amaya	Jaeschke et al., 2016
<i>Arthrospira platensis</i>	Ficocianina, aloficocianina e ficeritrina	Extração foi feita com tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) na proporção 1:10 (p:p, biomassa: solvente). Para a extração as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento (-21 ° C a 4 ° C no escuro).	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Bennett and Bogobad (1973)	Arashiro et al., 2020
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina	Extração realizada com a biomassa liofilizada e ressuspendida em tampão de fosfato a 0,15 M	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Patel et al. (2005).	Chen et al., 2016
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianina	Extração realizada com a biomassa liofilizada e ressuspendida em tampão de fosfato a 0,15 M	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando uma fórmula descrita no artigo	Ho et al., 2018
<i>Spirulina maxima</i>	Ficocianina	Extração por água destilada; Extração por metanol; Extração por água destilada e posteriormente por metanol; Extração por metanol e posteriormente por água destilada	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Bennett e Bogorad (1973)	Nakagawa et al., 2016

<i>Spirulina sp</i>	Ficocianina	A extração foi realizada misturando a biomassa seca em 100 mM de tampão de fosfato (pH 7,0) na proporção de 2: 100 (p / v).	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria com base no coeficiente a 620 nm igual a 7,3 mL mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Martelli et al., 2014
<i>Spirulina sp</i>	Ficocianina	A extração foi realizada utilizando tampão de fosfato de 20 mM (pH 6,8)	Espectrofotometria/	Não determinado	Zheng et al., 2020
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	Ficocianina	A extração foi realizada com a biomassa e foi suspensa em 10 mL de solução salina de fosfato de sódio 0,125 M contendo NaN <sub>3</sub> 4 mM, mercaptoetanol 2 mM e EDTA 2 mM, seguido por três congelamentos sucessivos e ciclos de descongelamento, a -20 ° C e 4 ° C, respectivamente, para romper as paredes celulares e extrair a ficocianina.	Espectrofotometria/	A concentração de ficocianina foi calculada usando as equações descritas por Bennett e Bogorad, 1973; Bryant et al. (1979)	Manirafasha et al., 2018
<i>Nostoc sp.</i>	Ficocianina	A extração foi realizada utilizando a metodologia adaptada descrita por Boussiba e Richmond (1979). A extração foi realizada com 0,1 g de biomassa seca com 1 mL de água destilada a 5 ° C por 24 h.	Espectrofotometria/	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Bennett e Bogorad (1973)	Lee et al., 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	Luteína	Ocorreu a extração e a saponificação simultânea. O solvente utilizado foi o etanol.	HPLC	HPLC usando uma curva de calibração	Gong, Wang e Bassi, 2017
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Luteína	A extração foi realizada por meio de um pré-tratamento com esferas de vidro e após a adição de solventes (etanol, hexano, acetona, tetra-hidrofurano (THF))	HPLC	A quantificação foi realizada a partir de dados obtidos pelo HPLC por meio dos padrões adquiridos com a Sigma. Consequentemente o teor de luteína foi calculado de acordo com a fórmula descrita no artigo.	Chen et al., 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração utilizando DMSO (sulfóxido de dimetila)	Espectrofotometria	A quantificação foi realizada a partir dos dados obtidos da espectrofotometria	Shin et al., 2016
<i>Chlorella sp.</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Dunaliella salina</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Ruptura celular com esferas e extração utilizando acetona como solvente	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Wellburn (1994)	Chen e Vaidyanathan, 2013b
<i>Dunaliella sp.</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Dunaliella salina</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	Extração assistida por ultra-som utilizando o solvente (água, etanol, etanol/água)	Espectrofotometria	Cálculo dos dados obtidos por espectrofotometria utilizando o método descrito por Lichtenthaler e Buschmann (2001); Miazek and Ledakowicz (2013)	Maadane et al., 2015
<i>Desmodesmus sp.</i>	Luteína e β-caroteno	Extração usando solventes em ultrassom: hexano; acetona; hexano: etanol:acetona (10:6:7, v/v/v); hexano:etanol em 1:1; 1:2; 1:3; 2:1; 3:1 e 4:1 (v/v) proporção; e etanol.	HPLC-DAD	HPLC usando uma curva de calibração de clorofila a trans-luteína e trans-β-caroteno métodos com seis diferentes concentrações (1, 5, 10, 15, 30 e 60 µg mL <sup>-1</sup> )	Soares et al., 2016
<i>Desmodesmus sp.</i>	Luteína	Carotenoides totais foram extraídos usando uma mistura de metanol / diclorometano (75:25, v / v)	HPLC	Não determinado	Chiu, Soong e Chen, 2016
<i>Coelastrrea sp.</i>	Luteína	Carotenoides totais foram extraídos usando uma mistura de metanol / diclorometano (75:25, v / v)	HPLC	Não determinado	Chiu, Soong e Chen, 2016

<i>Synechococcus sp.</i>	Ficocianina	A massa celular foi lavada e ressuspensa no tampão de extração (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0).	Espectrofotometria	Não determinado	Sonani et al., 2017
<i>Synechococcus nidulans</i>	Clorofila a, clorofila b e carotenoides	Não ocorreu extração	Espectrofotometria	Utilizou a metodologia descrita por Liechtenthaler (1987)	Duarte et al., 2019





### **3.5. VANTAGENS E DESVANTAGENS**

A determinação dos pigmentos pode ser realizada de duas maneiras, fazendo uso da espectrofotometria ou fazendo uso do HPLC. Nesse sentido, a vantagem da utilização da espectrofotometria é a baixa complexidade do método bem como do equipamento utilizado. No entanto, a desvantagem é que os resultados podem ser errôneos devido ao fato de que as bandas de absorção e emissão dos pigmentos podem se sobrepõem às de outros (KUCZYNSKA, JEMIOLA-RZEMINSKA e STRZALKA, 2015).

Os métodos que utilizam a Cromatografia Líquida de Alta Performance têm a vantagem de uma maior sensibilidade para a detecção, identificação e quantificação dos pigmentos. A desvantagem do método se concentra no custo (padrões para obter as curvas de calibração) e na necessidade de se ter um equipamento especializado, o qual demanda um operador detentor do conhecimento sobre o equipamento. Sendo assim, muitos estudos ainda são conduzidos fazendo uso de métodos espectrofotométricos, no entanto, não é identificado perfil de todos os pigmentos presentes e sim tem-se uma estimativa dos pigmentos como um todo, isso principalmente quando diz respeito aos carotenoides (CHEN e VAIDYANATHAN, 2013; MAADANE et al., 2015).

### **3.6 CONCLUSÃO**

Os pigmentos são compostos encontrados nas microalgas e desempenham função de danos oxidativos a célula. Além de proporcionar a síntese de metabólitos essenciais para o desenvolvimento e crescimento das mesmas. Devido a sua extensa aplicabilidade, percebe-se um interesse comercial muito grande no sentido de produção em larga escala para posterior comercialização, já que são produtos de alto valor agregado.

Sendo assim, conhecer as metodologias a cerca da identificação, quantificação dos mesmos é de suma importância. No entanto, é observado que os que utilizam cromatografia líquida de alta performance são mais sensíveis e mais específicos, porém são métodos mais caros. Logo, muitos estudos optam por fazer uso de métodos espectrofotométricos.

### 3.7 REFERÊNCIAS

- Amengual, J. (2019). Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health.
- Arashiro, L. T., Boto-Ordóñez, M., Van Hulle, S. W., Ferrer, I., Garfí, M., Rousseau, D. P. (2020). Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. *Bioresource technology*, 303, 122894.
- Blair, M. F., Kokabian, B., Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665-674.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource technology*, 102(14), 7159-7164.
- Chen, C. Y., Hsieh, C., Lee, D. J., Chang, C. H., Chang, J. S. (2016). Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresource technology*, 200, 500-505. b
- Chen, C. Y., Kao, P. C., Tan, C. H., Show, P. L., Cheah, W. Y., Lee, W. L., Chang, J. S. (2016). Using an innovative pH-stat CO<sub>2</sub> feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. *Biochemical engineering journal*, 112, 78-85.
- Chen, Y., Vaidyanathan, S. (2013). Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica chimica acta*, 776, 31-40.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource technology*, 229, 53-62.
- Chiu, P. H., Soong, K., Chen, C. N. N. (2016). Cultivation of two thermotolerant microalgae under tropical conditions: influences of carbon sources and light duration on biomass and lutein productivity in four seasons. *Bioresource technology*, 212, 190-198.
- D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832-841.
- Da Silva Ferreira, V., Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 20.
- Di Lena, G., Casini, I., Lucarini, M., Lombardi-Boccia, G. (2019). Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food research international*, 120, 810-818.
- Duarte, J. H., de Souza, C. O., Druzian, J. I., Costa, J. A. V. (2019). Light emitting diodes applied in *Synechococcus nidulans* cultures: Effect on growth, pigments production and lipid profiles. *Bioresource technology*, 280, 511-514.
- El-Baz, F. K., Hussein, R. A., Saleh, D. O., Abdel Jaleel, G. A. R. (2019). Zeaxanthin isolated from *Dunaliella salina* microalgae ameliorates age associated cardiac dysfunction in rats through stimulation of retinoid receptors. *Marine drugs*, 17(5), 290.
- Faé Neto, W. A., Borges Mendes, C. R., Abreu, P. C. (2018). Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. *Aquaculture research*, 49(7), 2527-2535.

- Fasano, E., Serini, S., Mondella, N., Trombino, S., Celleno, L., Lanza, P., Calviello, G. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory effects of selected two human immortalized keratinocyte lines. *Biomed. Res. Int*, 2014, 327452.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11, 375-392.
- Figueira, F. D. S., Moraes, C. C., Kalil, S. J. (2018). C-phycocyanin purification: multiple processes for different applications. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(3), 1117-1128.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., Riggio, V. A. (2013). Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, 92(6), 738-744.
- Gayathri, S., Rajasree, S. R., Kirubakaran, R., Aranganathan, L., Suman, T. Y. (2016). Spectral characterization of  $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotene-3, 3'-diol (lutein) from marine microalgae *Chlorella salina*. *Renewable Energy*, 98, 78-83.
- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Bhowmick, T. K., Gayen, K. (2017). Effect of macronutrient supplements on growth and biochemical compositions in photoautotrophic cultivation of isolated *Asterarcys* sp. (BTA9034). *Energy Conversion and Management*, 149, 39-51.
- Gong, M., Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396-1412.
- Gong, M., Wang, Y., Bassi, A. (2017). Process analysis and modeling of a single-step lutein extraction method for wet microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(22), 8089-8099.
- Gurev, A., Dragancea, V., Haritonov, S. (2020). Microalgae–non-traditional sources of nutrients and pigments for functional foods.
- Ho, S. H., Liao, J. F., Chen, C. Y., Chang, J. S. (2018). Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 247, 669-675.
- Hossain, A. K. M., Brennan, M. A., Mason, S. L., Guo, X., Zeng, X. A., Brennan, C. S. (2017). The effect of astaxanthin-rich microalgae “*Haematococcus pluvialis*” and wholemeal flours incorporation in improving the physical and functional properties of cookies. *Foods*, 6(8), 57.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, 36(1), 54-67.
- Huang, W., Lin, Y., He, M., Gong, Y., Huang, J. (2018). Induced high-yield production of zeaxanthin, lutein, and  $\beta$ -carotene by a mutant of *Chlorella zofingiensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(4), 891-897.
- Hultberg, M., Carlsson, A. S., Gustafsson, S. (2013). Treatment of drainage from hydroponic greenhouse production with microalgae. *Bioresource Technology*, 136, 401-406.
- Jaeschke, D. P., Menegol, T., Rech, R., Mercali, G. D., Marczak, L. D. F. (2016). Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis*

- using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*, 51(10), 1636-1643.
- Jaeschke, D. P., Rech, R., Marczak, L. D. F., Mercali, G. D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource technology*, 224, 753-757.
- Jian-Hao Lin, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang. (2015) Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 421–428
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and bioproducts processing*, 110, 60-84.
- Kim, D. Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J. I., Lee, K., Park, J. Y., Oh, Y. K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource technology*, 199, 300-310.
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine drugs*, 13(9), 5847-5881.
- Lee, N. K., Oh, H. M., Kim, H. S., Ahn, C. Y. (2017). Higher production of C-phycocyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. *Bioresource technology*, 227, 164-170.
- Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 107545.
- Li, T., Xu, J., Wu, H., Wang, G., Dai, S., Fan, J., Xiang, W. (2016). A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Marine drugs*, 14(9), 162.
- Li, Z., Ma, X., Li, A., Zhang, C. (2012). A novel potential source of  $\beta$ -carotene: *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae) and pilot  $\beta$ -carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. *Bioresource technology*, 117, 257-263.
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of biotechnology*, 215, 13-19.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Ahmed, N. R., Liu, J., Lu, Y., Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource technology*, 255, 293-301.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), 154-159.
- Merzlyak, M., Solovchenko, A., Pogosyan, S. (2005). Optical properties of rhodoxanthin accumulated in *Aloe arborescens* Mill. leaves under high-light stress with special reference to its photoprotective function. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(4), 333-340.
- Nakagawa, K., Ritcharoen, W., Sri-Uam, P., Pavasant, P., Adachi, S. (2016). Antioxidant properties of convective-air-dried *Spirulina maxima*: Evaluation

- of phycocyanin retention by a simple mathematical model of air-drying. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 292-302.
- Parniakov, O., Apicella, E., Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2015). Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. *Bioresource technology*, 198, 262-267.
- Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1), 59-67.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P. K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein expression and purification*, 40(2), 248-255.
- Raposo, M. F. D. J., De Morais, A. M. M. B., De Morais, R. M. S. C. (2015). Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine drugs*, 13(8), 5128-5155.
- Sahni, P., Aggarwal, P., Sharma, S., Singh, B. (2019). Nuances of microalgal technology in food and nutraceuticals: a review. *Nutrition & Food Science*.
- Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., Adani, F. (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, 230, 82-89.
- Shin, W. S., Lee, B., Jeong, B. R., Chang, Y. K., Kwon, J. H. (2016). Truncated light-harvesting chlorophyll antenna size in *Chlorella vulgaris* improves biomass productivity. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3193-3202.
- Sicaire, A. G., Vian, M. A., Filly, A., Li, Y., Bily, A., Chemat, F. (2014). 2-Methyltetrahydrofuran: Main properties, production processes, and application in extraction of natural products. In *Alternative Solvents for Natural Products Extraction* (pp. 253-268). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Soares, A. T., Marques Júnior, J. G., Lopes, R. G., Derner, R. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016). Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. microalgae. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6), 1083-1093.
- Solovchenko, A., Solovchenko, O., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Pal, D., Cohen, Z., Boussiba, S. (2013). Probing the effects of high-light stress on pigment and lipid metabolism in nitrogen-starving microalgae by measuring chlorophyll fluorescence transients: studies with a  $\Delta 5$  desaturase mutant of *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Algal Research*, 2(3), 175-182.
- Sonani, R. R., Patel, S., Bhastana, B., Jakharia, K., Chaubey, M. G., Singh, N. K., Madamwar, D. (2017). Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. *Bioresource technology*, 245, 325-331.
- Sørensen, L., Hantke, A., Eriksen, N. T. (2013). Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2933-2938.

- Wellburn, R. W. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Zhang, Y., Liu, Z., Sun, J., Xue, C., Mao, X. (2018). Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 225-234.
- Zheng, J. X., Yin, H., Shen, C. C., Zhang, L., Ren, D. F., Lu, J. (2020). Functional and structural properties of *Spirulina* phycocyanin modified by ultra-high-pressure composite glycation. *Food Chemistry*, 306, 125615.
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., Letourneur, D. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *BioImpacts: BI*, 7(1),

#### 4. ESTUDO DA FISIOLOGIA DE *CHLORELLA SOROKININANA* CTT 7727 EM ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS NUTRIENTES: NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO

**Resumo.** As microalgas são organismos procarióticos ou eucarióticos, encontrados em água doce e salgada, realizam atividade fotossintética e possuem a capacidade de acumular diferentes compostos de interesse biotecnológico como lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos graxos, entre outros, que podem ser destinados em diversas aplicações, tanto em indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosmético, ou no tratamento de efluentes ou ainda ser utilizada para produção de biocombustíveis. Diversos estudos são realizados visando otimizar as condições de cultivo e assim obter uma produção em massa. Assim, avaliam as condições de luminosidade, pH, meios de cultivos entre diversos outros parâmetros. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito das diferentes concentrações dos nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento e produtividade da microalga *Chlorella sorokiniana* em uma condição heterotrófica. O cultivo ocorreu em uma leitora de microplaca. Os ensaios foram feitos em duplicata usando a placa de 96 poços, o monitoramento do crescimento ocorreu a cada 30 min durante 96 h. As fontes dos nutrientes foram: o fertilizante NPK (20-5-20) e o NPK laboratorial, o qual foi desenvolvido utilizando reagentes analíticos. Logo, diversas combinações de um “NPK laboratorial” foram testadas e também foi associado uma concentração fixa de glicose. Dessa forma, utilizou os parâmetros cinéticos ( $\mu_{max}$ , tempo de duplicação, produtividade celular) para avaliar o crescimento e a concentração de biomassa encontrada na microalga *Chlorella sorokiniana*. Esta espécie demonstrou a capacidade facultativa no que diz respeito ao crescimento de maneira heterotrófica. Os cultivos que apresentavam a glicose em sua composição resultaram em uma maior densidade óptica para a maioria dos tratamentos, sendo que a densidade óptica máxima atingida foi de aproximadamente 0,5 para o tratamento k6 suplementado com glicose. Por outro lado, nos cultivos sem suplementação de glicose, a densidade óptica ficou próxima de 0,3. A utilização da glicose



resultou em maior produtividade celular e maior velocidade específica máxima de crescimento, para maioria dos cultivos.

**Palavras-chave:** Produtividade; NPK laboratorial; heterotrófico; *Chlorella*.

**Abstract.** Microalgae are prokaryotic or eukaryotic organisms, found in fresh and salt water, perform photosynthetic activity and have a capacity to accumulate different compounds of biotechnological interest such as lipids, carbohydrates, proteins, fatty acids, among others, which can be developed in various applications, either in the food, pharmaceutical, cosmetic, or no effluent treatment industries or be used for the production of biofuels. Several studies are carried out complicity as cultivation conditions and thus obtain mass production. Thus, evaluated as conditions of luminosity, pH, means of cultivation among several parameters. The present study aimed to investigate the effect of different options of nutrients nitrogen, phosphorus and potassium on the growth and productivity of the microalgae *Chlorella sorokiniana* in a heterotrophic condition. Cultivation takes place in a microplate reader. The tests were done in duplicate using a 96-well plate, growth monitoring occurred every 30 minutes for 96 h. The sources of nutrients were the NPK fertilizer (20-5-20) and the laboratory NPK, which was developed using analytical reagents. Therefore, several models of a “laboratory NPK” were tested and was associated with a fixed concentration of glucose. Thus, he used the kinetic parameters ( $\mu_{max}$ , doubling time, cell productivity) to evaluate the growth and biomass concentration found in the microalgae *Chlorella sorokiniana*. The specie *Chlorella sorokiniana*, uses in this study the optional ability with regard to growth in a heterotrophic manner. Cultures with glucose in their composition resulted in a higher optical density for most treatments, with the maximum optical density achieved being close to 0.5 for the k6 treatment supplemented with glucose. While in cultures without glucose supplementation, the optical density was close to 0.3. The use of glucose resulted in higher cell productivity and a higher specific maximum rate of growth for most treatments.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A terminologia microalga é utilizada para identificar um grupo de microrganismos eucariontes e procariontes, dulcícolas ou marinhos, que em sua maioria fazem uso da luz solar e do dióxido de carbono atmosférico para realizar a fotossíntese e dessa maneira realizar suas funções fisiológicas e promover seu desenvolvimento (MATA, 2010; TRAMOTIN et al., 2018).

As principais características que estimulam os estudos com microalgas são sua adaptabilidade a condições que não necessariamente são recomendadas para o seu crescimento e desenvolvimento. Como por exemplo ambientes salobros, com metais pesados, excesso de matéria orgânica (efluentes), além de suas infinitas aplicabilidades (FRANCHINO et al., 2013; HULTBERG, CARLSSON e GUSTAFSSON, 2013; GRESSLER et al., 2014 SALATI et al., 2017; TORRES et al., 2017).

Os meios de cultivo são uma variável importante, uma vez que estes também influenciarão na produtividade de biomassa, bem como do bioproduto. Dessa forma, é essencial que seja estabelecido uma estratégia visando o melhor meio de cultivo para a microalga avaliada. A escolha do meio de cultivo e da fonte de carbono podem influenciar diretamente no aumento da biomassa, síntese e bioacumulação de produtos de interesse biotecnológico (CHEIRSILP e TORPEE, 2012).

Algumas fontes de carbono são mais facilmente assimiladas pelas microalgas, como por exemplo a glicose e resultam em aumentos significativos de biomassa (GUPTA et al., 2016). Outras fontes de matéria orgânica (efluentes industriais, agro-industriais ou domésticos), podem ser um pouco mais complexas se comparadas a suplementação fazendo uso de monossacarídeos, porém, também podem resultar em um aumento da biomassa (SANTANA et al., 2017).

Os meios de cultivo podem ser quimicamente definidos como por exemplo o meio Bold Basal (Bischoff e Bold, 1963), ou podem ser formulações mais simples, como por exemplo o fertilizante NPK, o qual pode ser formulado de diferentes maneiras. O NPK é um fertilizante comercial composto basicamente de três elementos químicos: nitrogênio, fósforo e potássio. Elementos esses essenciais para o crescimento das microalgas, devido a

necessidade dos mesmos no sentido de manutenção celular, pois, são necessários no processo de divisão celular, na composição das membranas, na produção de proteínas, no transporte de energia, entre outros (BOUGARAN, BERNARD e SCIANDRA, 2010). A limitação do nitrogênio e suplementação de fósforo podem induzir um aumento na produção lipídica, como encontrado no estudo de (CHU et al., 2014)

As microalgas possuem a capacidade de sintetizar e acumular diversos bioprodutos de interesse biotecnológico/industrial. Sendo assim, quando se associa os parâmetros cinéticos somados a caracterização da biomassa, é possível que sejam feitas afirmações sobre as possíveis aplicações nas quais as biomassas das microalgas podem ser destinadas.

Partindo desses princípios, uma das maneiras de se compreender e interpretar os resultados em relação ao crescimento, produtividade de biomassa, consumo de substrato é fazendo uso de modelos matemáticos. Os modelos matemáticos utilizados para o entendimento dos aspectos fisiológicos e otimização das condições de cultivo são os parâmetros cinéticos (TRAMOTIN et al., 2018). Os mais utilizados em estudos com microalgas são a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e a produtividade celular ( $P_x$ ) (KRZEMIŃSKA et al., 2014; TURON et al., 2015; BAGLIERI et al., 2016; KHADIM et al., 2018; GUPTA e PAWAR, 2018; SILVA e FONSECA, 2018).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito das diferentes concentrações dos nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento e produtividade da microalga *Chlorella sorokiniana* expostas em meio fertilizante NPK (20-5-20e o NPK laboratorial suplementadas com glicose como forma de carbono em condições heterotróficas.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS –**

### **4.2.1 LOCAL**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioengenharia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados -MS.

### **4.2.2 MICRORGANISMO**

Utilizou-se microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 obtida da Fundação AndréTosselo.

### **4.2.3 MEIO E MODO DE CULTIVO**

Para o cultivo foram utilizados dois diferentes meios de cultura: o fertilizante NPK (20:5:20g<sup>L</sup><sup>-1</sup>) segundo Sipaubá-Tavares e Rocha (2001), em concentrações de 1, 3, 5, 8 e 12 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> e também foi utilizado o NPK laboratorial, o qual foi formulado por meio da utilização de reagentes laboratoriais, devido a sua pureza, tendo como base a concentração do fertilizante NPK (20:5:20g<sup>L</sup><sup>-1</sup>).

Sendo assim, a concentração de dois nutrientes foi fixada e variou-se a concentração do outro (tabela 4.1). O mesmo processo foi repetido para os três reagentes escolhidos como fonte de nitrogênio, fósforo e potássio. Os reagentes utilizados foram: Uréia (fonte de nitrogênio), Cloreto de Potássio (fonte de potássio) e Ácido Fosfórico (fonte de fósforo), todos disponíveis no laboratório de Bioengenharia.

Os reagentes foram escolhidos de acordo com a disponibilidade pré-existente no laboratório, bem como no sentido de que não houvesse compostos em comum, visando amenizar a interferência ou correlação de um reagente com o outro. A uréia foi definida como fonte de nitrogênio devido a sua disponibilidade comercial e por possuir uma maior quantidade de nitrogênio se comparada com outras fontes de nitrogênio (RIBEIRO et al., 2020). O ácido fosfórico foi utilizado como fonte de fósforo devido ao fato de que um de seus efeitos ambientais indesejados é ortofosfato de promover o crescimento de algas e microalgas, segundo a Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos (FISPQ). O cloreto de potássio foi

proposto como fonte de potássio devido ao fato de que os níveis de lipídeos e carotenóides acumulados em microalgas (filó das Clorofíceas) são influenciados e modulados por ele (JANCHOT et al., 2019).

Dessa maneira, foram testadas diferentes combinações com diferentes concentrações de cada nutriente, conforme descrito na Tabela 4.1. E posteriormente todos os tratamentos (NPK tradicional e o NPK “laboratorial”) foram testados também utilizando uma fonte de carbono, neste caso, a glicose ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ). Todos os reagentes foram pesados de maneira individual e posteriormente diluídas em água destilada e em seguida foram esterilizados ( $121^\circ\text{C}$  por 21 min).

Os pré-inóculos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com volume útil de 150 mL. Foram mantidos em uma BOD com agitador rotatório orbital (MA 415 Marconi) a  $25\pm 0,5^\circ\text{C}$  a 200 rpm e 8 klux, com um fotoperíodo de 24h, durante quinze dias. Após 15 dias, foram repassados  $34\pm 2 \mu\text{L}$  de inóculo (D.O inicial de  $0,1 \pm 0.05$ ) para os poços da microplaca, os quais continham  $216 \pm 2 \mu\text{L}$  de meio de cultivo no escuro.

**Tabela 4.1.** Formulação dos meios de cultivo “NPK laboratorial”, utilizando os reagentes Ureia (fonte de nitrogênio), Cloreto de Potássio (fonte de potássio) e Ácido Fosfórico (fonte de fósforo), partindo da formulação tradicional utilizada em laboratório NPK (20-5-20 g.L<sup>-1</sup>).

Nutriente	Identificação dos meios																						
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
N	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>140</b>	<b>180</b>	<b>220</b>	<b>260</b>	<b>300</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
P	5	5	5	5	5	5	5	<b>5</b>	<b>35</b>	<b>65</b>	<b>95</b>	<b>125</b>	<b>155</b>	<b>185</b>	<b>215</b>	<b>245</b>	5	5	5	5	5	5	5
K	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>140</b>	<b>180</b>	<b>220</b>	<b>260</b>	<b>300</b>

Legenda: A identificação dos meios foi feita a partir do nutriente em questão que foi variado, onde o “N” corresponde ao nutriente nitrogênio, o “P” ao nutriente fósforo e o “K” ao nutriente potássio, logo os valores descritos na tabela representam em qual nutriente ocorreu a variação e qual foi o valor da mesma.

Nesta etapa, os cultivos foram realizados em duplicata em microplaca de 96 poços mantida em leitora de microplaca (Biospectro sp-220) durante 96 h, caracterizando-se assim o cultivo como sendo heterotrófico. O crescimento foi monitorado a cada 30 min por espectrofotometria utilizando a leitora de microplaca (Biospectro sp-220). A densidade óptica utilizada para aferir o crescimento foi de 686 nm (comprimento de onda específico para esta espécie *Chlorella sorokiniana*) de acordo com estudos prévios realizados por colaboradores do grupo de pesquisa, Nunes et al., (2021).

#### 4.2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS

A fase de crescimento exponencial ( $\mu_{max}$ ) foi identificada por meio da região linear do  $\ln ABS_{686}$  pelo tempo de cultivo. E o tempo de duplicação (TD) foi obtido a partir da divisão do quociente  $\ln (2)$ , pelo divisor  $\mu_{max}$ . Os valores de produtividade de biomassa ( $P_x$ ) foram calculados para os maiores valores de absorvância. Os valores máximos de absorvância foram convertidos em valores de concentração celular ( $X$ ), utilizando o fator de conversão ( $531 \times 10^4$ ) descrito por Silva e Fonseca (2017).

A equação utilizada para realização do cálculo da produtividade máxima de biomassa foi demonstrada logo abaixo:

$$P_x = \frac{X_{max} - X_i}{t}$$

Onde o " $X_{max}$ " representa o valor da concentração máxima celular de acordo com a absorvância máxima, " $X_i$ " o valor inicial da concentração celular e o " $t$ " faz referência ao tempo em que se obteve essa máxima absorvância.

#### 4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise descritiva e análise de variância, foi utilizado o programa Microsoft Office Excel 2013. Os resultados foram submetidos à análise de

variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (significância de 5 %).

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos heterotróficos se caracterizam principalmente pelo uso de fontes orgânicas para o crescimento microbiano. Esta condição de cultivo é singular, pois, permite o crescimento microalgal sem necessariamente necessitar de uma fonte luminosa. Algumas microalgas são exclusivamente autotróficas (PEREZ-GARCIA et al., 2011). O gênero *Chlorella*, utilizado neste estudo apresenta essa flexibilidade. Tal fato, justifica e contribui com os resultados obtidos neste estudo, uma vez, que foi observado crescimento em ambos os tratamentos.

Para os ensaios com o fertilizante NPK os resultados de  $\mu_{max}$  (tabela 4.3) foram superiores nos cultivos que continham a glicose, sendo os maiores valores obtidos nas formulações NPK1 e NPK3 (0,0493 e 0,0424 h<sup>-1</sup>). Já nos ensaios sem glicose os maiores valores obtidos foram também para estas formulações (0,0156 e 0,0141 h<sup>-1</sup>). Os tempos de duplicação foram menores nestas formulações, sendo com glicose 14,11 e 16,32 h (NPK1 e NPK3) respectivamente. A absorvância máxima observada foi de 0,449 para a formulação NPK12 com glicose. E as produtividades celulares maiores alcançadas foram obtidas também nas formulações que continham glicose em sua composição.

Para os ensaios com o NPK laboratorial, com ênfase neste caso no nutriente nitrogênio proveniente da uréia, um dos melhores valores encontrado de  $\mu_{max}$  foi de 0,0503 h<sup>-1</sup> para a formulação NPK laboratorial N2 (100-5-20) com glicose e sem glicose, os maiores valores de  $\mu_{max}$  obtidos foram para a formulação NPK laboratorial N2 e NPK laboratorial N6 (0,0207 e 0,0272 h<sup>-1</sup>, respectivamente), tais valores foram superiores aos obtidos nos ensaios com o fertilizante NPK (NPK1 e NPK 3). Isso pode ter acontecido devido ao fato de que a microalga utiliza do nitrogênio para síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, quando esse nutriente é limitado ocorre um déficit nessa produção e conseqüentemente o metabolismo microalgal é estimulado à síntese de triacilglicerídeos (YAP et al., 2016).



Nos ensaios com ênfase no nutriente fósforo, os resultados de  $\mu_{max}$  obtidos foram menores (Tabela 4.3). O maior valor de  $\mu_{max}$  obtido foi de 0,0419 (NPK laboratorial N1) para a formulação que continha glicose e 0,0129 e 0,0132  $h^{-1}$ , para as formulações sem glicose (NPK laboratorial N1e N2, respectivamente). O fósforo é encontrado nos grupos fosfatados, é responsável pela transferência de energia nas células (no processo de geração de ATP) e na formação da membrana celular na síntese dos ácidos nucleicos (CHEN e CHEN, 2006).

No entanto, neste caso a fonte de fósforo utilizada foi o ácido fosfórico, cujo pH está em torno de 1,5. Dessa forma, o pH ácido pode ter influenciado de maneira negativa o crescimento e desenvolvimento celular, pois o mesmo pode afetar a disponibilidade dos elementos químicos no meio, podendo diminuído a disponibilidade dos nutrientes presentes no meio (DE MELO et al., 2018). Resultando assim em crescimento não tão acentuado.

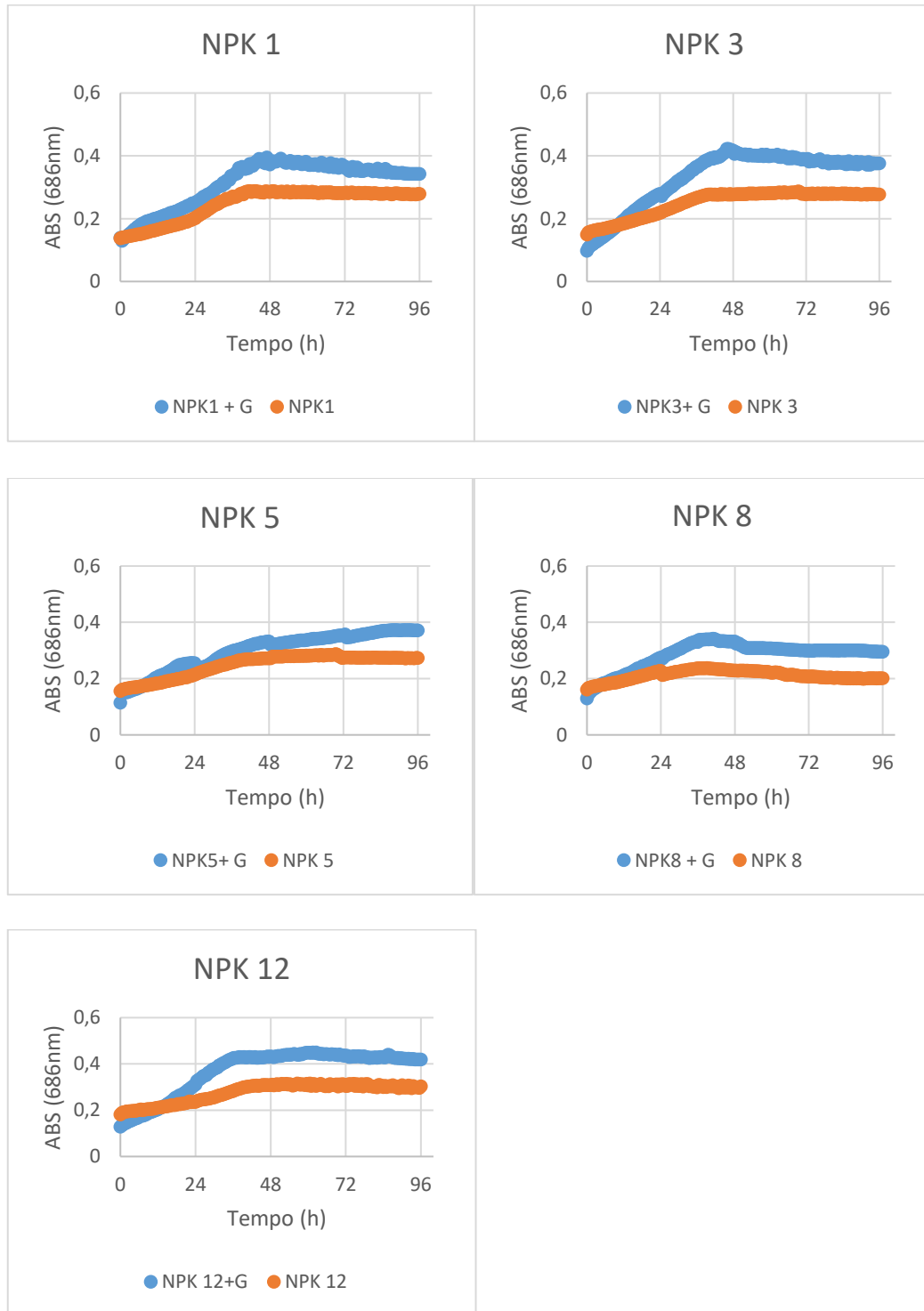
Outra hipótese é que uso de fósforo em grandes quantidades e havendo a limitação de nitrogênio pode contribuir com a produtividade de lipídeos. Tal fato foi observado em um estudo realizado por Chu et al. (2019), onde eles cultivaram a microalga *Chlorella* PY-ZU1, com excesso de fósforo e limitação de nitrogênio e com isso, conseguiram obter 2,2 vezes mais lipídeos do que em condições normais de cultivo. Partindo desse princípio, pode ter acontecido que a microalga *Chlorella sorokiniana*, alvo deste estudo, utilizou as enzimas envolvidas na fixação de carbono e no metabolismo de glicerolipídios para regular positivamente e facilitar o acúmulo de lipídios nas células e não a proliferação celular.

Em síntese, pode-se observar que os cultivos que apresentavam a glicose em sua composição resultaram em uma maior densidade óptica para a maioria dos tratamentos, sendo a densidade óptica máxima atingida próxima de 0,5 (Figura 4.4), para o tratamento k6 suplementado com glicose. Enquanto nos cultivos sem suplementação de glicose, a densidade óptica ficou próxima de 0,3 (Figura 4.1; 4.2; 4.3; 4.4).

Os ensaios que continham glicose podem ter sido favorecidos em termos de produtividade celular e maior velocidade máxima específica de crescimento, pois a glicose é degradada diretamente em glicose-6-fosfato, o

que explica seu consumo rápido e conseqüentemente uma maior proliferação celular. Estudos realizados por Salati et al. (2017), Morowvat e Ghasemi (2016), com *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina*, respectivamente, demonstraram que sua produtividade final no cultivo envolvendo uma fonte de carbono orgânica foi superior, aos cultivos que não apresentavam a mesma.

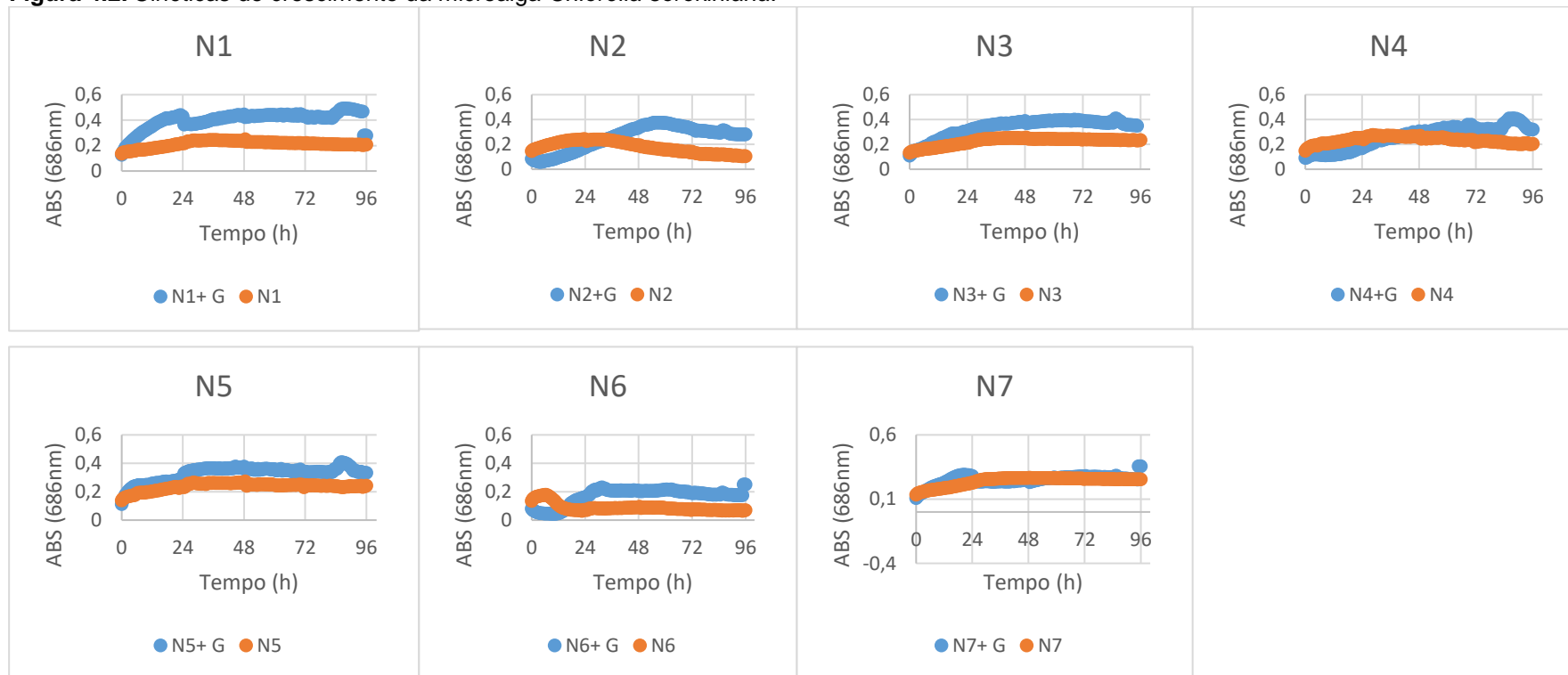
**Figura 4.1.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*.



Fonte: A autora

Legenda: Cinéticas do crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes concentrações do fertilizante NPK 20-5-20 (1, 3, 5, 8 e 12 g L<sup>-1</sup>), com (+G = presença de glicose) e sem glicose.

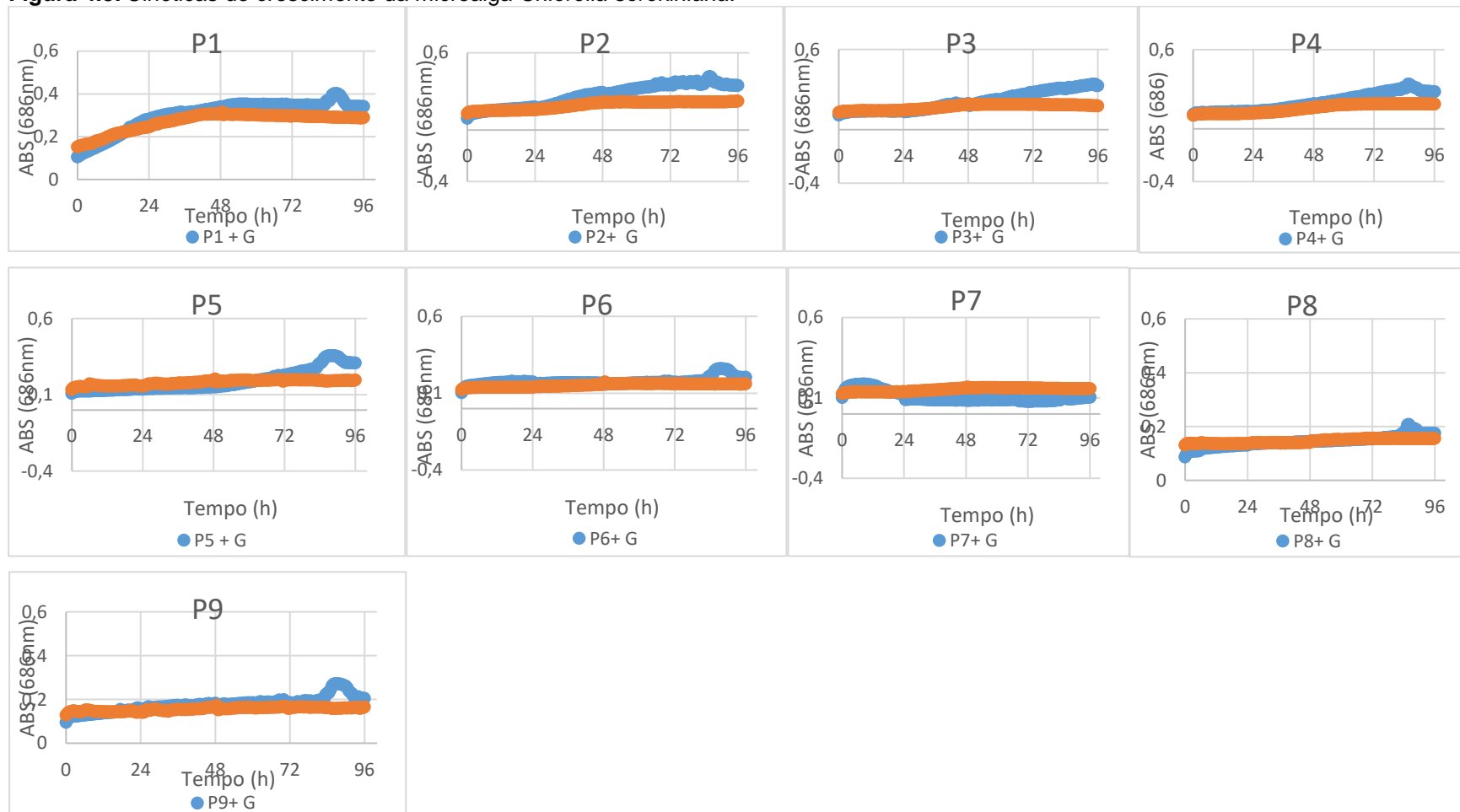
**Figura 4.2.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*.



Fonte: A autora.

Legenda: Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. em diferentes concentrações do “NPK laboratorial”, variando as concentrações de nitrogênio, de acordo com a Tabela (4.1), com (+G = presença de glicose) e sem glicose.

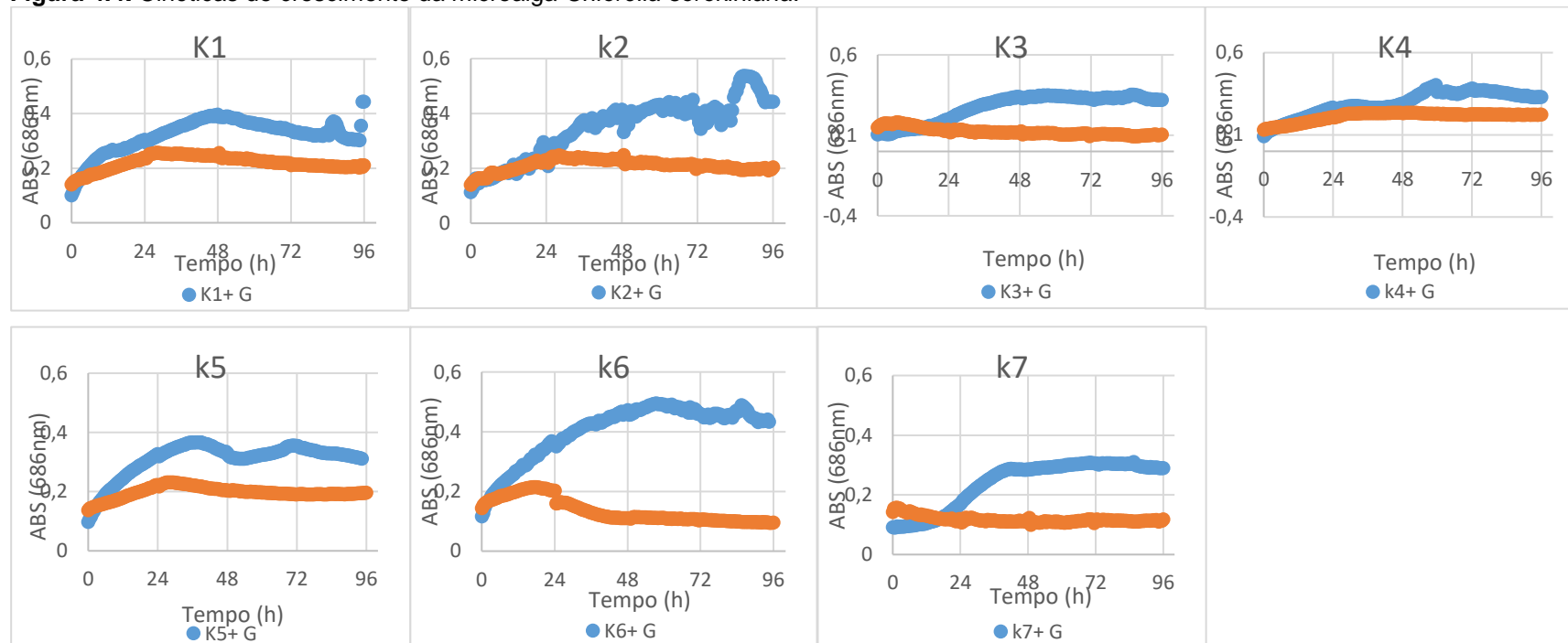
**Figura 4.3.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*.



Fonte: A autora.

Legenda: Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. em diferentes concentrações do “NPK laboratorial”, variando as concentrações de fósforo, de acordo com a Tabela (4.1), com (+G = presença de glicose) e sem glicose.

**Figura 4.4.** Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*.



Fonte: A autora.

Legenda: Cinéticas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. em diferentes concentrações do “NPK laboratorial”, variando as concentrações de fósforo, de acordo com a Tabela (4.1), com (+G = presença de glicose) e sem glicose.

**Tabela 4.2.** Parâmetros Cinéticos da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada no fertilizante NPK e no “NPK laboratorial”, com e sem a suplementação de glicose.

Meios	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )		TD (h)		ABS <sub>Max</sub>		T ABS <sub>Max</sub> (h)		X (x 10 <sup>6</sup> cell mL <sup>-1</sup> )		Px (x 10 <sup>4</sup> cell L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	Glicose	-	Glicose	-	Glicose	-	Glicose	-	Glicose	-	Glicose	-
NPK 1	0,0493±0,003 <sup>abA</sup>	0,0156±0,000 <sup>abB</sup>	14,11	44,39	0,391	0,288	51,5	49	2,07	1,52	2,59	1,63
NPK 3	0,0424±0,000 <sup>abA</sup>	0,0141±0,000 <sup>abB</sup>	16,32	49,31	0,421	0,286	46	70	2,23	1,51	3,27	1,30
NPK 5	0,031±0,003 <sup>bcA</sup>	0,0118±0,000 <sup>abB</sup>	22,7	58,51	0,328	0,286	46	69,5	1,74	1,51	2,47	0,99
NPK 8	0,0202±0,000 <sup>ca</sup>	0,0131±0,000 <sup>abB</sup>	34,25	52,92	0,341	0,236	41	36	1,81	1,25	2,40	1,11
NPK 12	0,0339±0,001 <sup>ba</sup>	0,0112±0,001 <sup>bb</sup>	20,47	62,49	0,449	0,315	59,5	56,5	2,38	1,67	2,57	1,25
N1	0,0411±0,002 <sup>cdA</sup>	0,0171±0,000 <sup>abB</sup>	16,9	40,53	0,491	0,244	87,5	36	2,60	1,29	1,87	1,59
N2	0,0503±0,003 <sup>cdA</sup>	0,0207±0,002 <sup>abA</sup>	13,78	33,4	0,376	0,243	57	23,5	1,99	1,29	2,23	2,21
N3	0,0462±0,001 <sup>da</sup>	0,0159±0,001 <sup>abcA</sup>	15,1	43,59	0,4	0,256	68,5	48,5	2,12	1,35	1,97	1,34
N4	0,0435±0,001 <sup>cdA</sup>	0,0181±0,000 <sup>bcA</sup>	15,98	38,39	0,41	0,276	86	28,5	2,17	1,46	1,71	2,40
N5	0,0063±0,003 <sup>bcA</sup>	0,0153±0,001 <sup>bcA</sup>	109,21	45,89	0,378	0,263	44,5	28,5	2,00	1,39	2,75	2,30
N6	0,144±0,002 <sup>da</sup>	0,0272±0,000 <sup>ca</sup>	4,82	25,51	0,224	0,179	30,5	6	1,18	0,95	1,47	4,33
N7	0,0368±0,000 <sup>cdA</sup>	0,0164±0,000 <sup>cb</sup>	18,9	43,83	0,291	0,266	20,5	40,5	1,54	1,41	4,17	1,70
P1	0,0419±0,002 <sup>ba</sup>	0,0129±0,000 <sup>bb</sup>	16,52	54,05	0,353	0,315	54,5	48,5	1,87	1,67	2,11	1,78
P2	0,0306±0,001 <sup>ba</sup>	0,0132±0,000 <sup>abB</sup>	22,62	52,51	0,416	0,22	86	55	2,20	1,16	1,63	0,88
P3	0,0169±0,003 <sup>ba</sup>	0,0105±0,000 <sup>bb</sup>	42,08	66,01	0,342	0,19	94	54	1,81	1,00	1,20	0,58
P4	0,0135±0,002 <sup>ba</sup>	0,0129±0,000 <sup>bb</sup>	54,2	54,2	0,339	0,19	85,5	72,5	1,80	1,00	1,29	0,64
P5	0,0059±0,000 <sup>cb</sup>	0,007±0,001 <sup>ba</sup>	132,66	106,89	0,357	0,197	87,5	48	1,89	1,04	1,55	0,66
P6	0,0132±0,008 <sup>abA</sup>	0,0042±0,001 <sup>ab</sup>	53,19	165,12	0,26	0,174	88	48,5	1,38	0,92	0,74	0,55
P7	0,0199±0,002 <sup>ba</sup>	0,0065±0,003 <sup>bb</sup>	35,57	110,4	0,187	0,168	8	48	0,99	0,89	4,21	0,45
P8	0,0057±0,000 <sup>abA</sup>	0,0016±0,001 <sup>ab</sup>	156,78	449	0,208	0,157	86	72,5	1,10	0,83	0,50	0,19
P9	0,0111±0,000 <sup>abA</sup>	0,0041±0,000 <sup>ab</sup>	62,17	175,75	0,272	0,168	86,5	70	1,44	0,89	0,86	0,29
K1	0,0637±0,001 <sup>abA</sup>	0,0185±0,000 <sup>bb</sup>	10,88	37,47	0,394	0,256	47	27,5	2,09	1,35	2,99	2,22
K2	0,0309±0,001 <sup>abA</sup>	0,0196±0,000 <sup>bb</sup>	22,42	35,36	0,537	0,244	86,5	26	2,85	1,29	2,43	2,11
K3	0,0384±0,006 <sup>abA</sup>	0,0593±0,0248 <sup>abB</sup>	18,61	14,16	0,348	0,179	54,5	7,5	1,84	0,95	2,02	2,12
K4	0,031±0,000 <sup>abA</sup>	0,0182±0,000 <sup>bb</sup>	22,36	38,15	0,38	0,234	72,5	44,5	2,01	1,24	1,69	1,22
K5	0,0277±0,002 <sup>ba</sup>	0,0186±0,000 <sup>bb</sup>	25,21	37,16	0,355	0,229	70	30,5	1,88	1,21	1,69	1,60
K6	0,0295±0,002 <sup>ba</sup>	0,018±0,000 <sup>bb</sup>	23,61	38,45	0,493	0,215	58,5	15	2,61	1,14	3,2	0,25
k7	0,0441±0,013 <sup>abA</sup>	0,0958±0,015 <sup>abA</sup>	17,33	7,41	0,306	0,155	68,5	2	1,62	0,823	1,25	3,45

Legenda:  $\mu_{max}$ - velocidade máxima específica de crescimento; TD- tempo de duplicação; ABS<sub>Max</sub>- Absorbância máxima observada; TABS<sub>Max</sub>- tempo em que a absorbância máxima foi observada; X- concentração celular usando o o fator de conversão (531 x 10<sup>4</sup>) descrito por da Silva e Fonseca (2018); Px- produtividade de biomassa. Valores seguidos da mesma letra representam que não há diferença significativa dentro de uma mesma coluna a 95% de confiança (p<0,05). Valores seguidos de letras diferentes representam que há uma diferença significativa dentro de uma mesma coluna a 95% de confiança (p<0,05). Valores seguidos da mesma letra representam que não há diferença significativa dentro de uma mesma linha a 95% de confiança (p<0,05). Valores seguidos de letras diferentes representam que há uma diferença significativa dentro de uma mesma linha a 95% de confiança (p<0,05).

Segundo o estudo realizado por Da Silva e Fonseca (2018) o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, em condições heterotróficas, também foi superior em cultivos onde a fonte de carbono estava presente. Eles testaram diferentes fontes de carbono, porém as que mais se destacaram com o fertilizante NPK, foram: glicose e a sacarose, obtendo  $\mu_{max}$  de 0,41 ( $\text{dia}^{-1}$ ), para ambos os açúcares. Isto está de acordo, pois as microalgas heterotróficas facultativas possuem a capacidade de metabolizar o carbono orgânico e converter o mesmo em energia. Dessa maneira, no modo heterotrófico a glicose vai para rota dos carboidratos, seja pela via da glicólise ou pentose fosfato, produzindo então NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e ATP (adenosina trifosfato) (HU et al., 2018).

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Chlorella sorokiniana* demonstrou a capacidade de crescimento heterotrófico e heterotrófico facultativo. Os cultivos que apresentavam a glicose em sua composição resultaram em uma maior densidade óptica para a maioria dos tratamentos, sendo que a densidade óptica máxima atingida de aproximadamente 0,5 para o tratamento k6 suplementado com glicose. Por outro lado, nos cultivos sem suplementação de glicose, a densidade óptica ficou próxima de 0,3. A utilização da glicose resultou em maior produtividade celular e maior velocidade específica máxima de crescimento, para a maioria dos cultivos.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

- Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963). Phycological Studies: 4-Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. *Texas University Publication*, 6318, 32–6.
- Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of Theoretical Biology*, 265(3), 443-454.
- Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516.



- Chen, G. Q., & Chen, F. (2006). Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters*, 28(9), 607-616.
- Chu, F. F., Chu, P. N., Shen, X. F., Lam, P. K., Zeng, R. J. (2014). Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, 152, 241-246.
- Chu, F., Cheng, J., Zhang, X., Ye, Q., Zhou, J. (2019). Enhancing lipid production in microalgae *Chlorella* PY-ZU1 with phosphorus excess and nitrogen starvation under 15% CO<sub>2</sub> in a continuous two-step cultivation process. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121912.
- Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223.
- Da Silva, A. A., Fonseca, G. G. (2018). Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using a microplate assay. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 40, 1-6.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., Riggio, V. A. (2013). Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, 92(6), 738-744.
- Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C. M. (2014). The effect of light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*, 85, 530-536.
- Gressler, P., Bjerk, T., Schneider, R., Souza, M., Lobo, E., Zappe, A., Moraes, M. (2014). Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. *Environmental Technology*, 35(2), 209-219.
- Gupta, P. L., Choi, H. J., Pawar, R. R., Jung, S. P., Lee, S. M. (2016). Enhanced biomass production through optimization of carbon source and utilization of wastewater as a nutrient source. *Journal of Environmental Management*, 184, 585-595.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology advances*, 36(1), 54-67.
- Hultberg, M., Carlsson, A. S., Gustafsson, S. (2013). Treatment of drainage from hydroponic greenhouse production with microalgae. *Bioresource Technology*, 136, 401-406.
- Janchot, K., Rauytanapanit, M., Honda, M., Hibino, T., Sirisattha, S., Praneenarat, T., Waditee-Sirisattha, R. (2019). Effects of potassium chloride-induced stress on the carotenoids canthaxanthin, astaxanthin, and lipid accumulations in the green *Chlorococcal* microalga strain TISTR 9500. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(5), 778-787.
- Kings, A. J., Raj, R. E., Miriam, L. M., Visvanathan, M. A. (2017). Growth studies on microalgae *Euglena sanguinea* in various natural eco-friendly composite media to optimize the lipid productivity. *Bioresource Technology*, 244, 1349-1357.

- León-Vaz, A., León, R., Díaz-Santos, E., Vígara, J., Raposo, S. (2019). Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. *New Biotechnology*, 51, 31-38.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Morowat, M. H., Ghasemi, Y. (2016). Ansilago, M., Ottonelli, F., Carvalho, E. M. D. (2016). Cultivation of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* in bench scale using medium contaminated with heavy metals. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 21(3), 603-608.
- Nunes, N. S. P., Oliveira, I. G. S., Ansilago, M., de Carvalho, E. M. (2021). Analysis of functional relationships between the cell quantification variables in the microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(1).
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
- Pleissner, D., Lam, W. C., Sun, Z., Lin, C. S. K. (2013). Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*, 137, 139-146.
- Ribeiro, D. M., Roncaratti, L. F., Possa, G. C., Garcia, L. C., Cançado, L. J., Williams, T. C. R., Brasil, B. D. S. A. F. (2020). A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. *Bioresource Technology Reports*, 9, 100354.
- Salati, S., D'Imporzano, G., Menin, B., Veronesi, D., Scaglia, B., Abbruscato, P., Adani, F. (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, 230, 82-89.
- Santana, H., Cereijo, C. R., Teles, V. C., Nascimento, R. C., Fernandes, M. S., Brunale, P., Siqueira, F. G. (2017). Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. *Bioresource Technology*, 228, 133-140.
- Torres, E. M., Hess, D., McNeil, B. T., Guy, T., Quinn, J. C. (2017). Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and bioremediation potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 367-376.
- Tramontin, D. P., Gressler, P. D., Rörig, L. R., Derner, R. B., Pereira-Filho, J., Radetski, C. M., Quadri, M. B. (2018). Growth modeling of the green microalga *Scenedesmus obliquus* in a hybrid photobioreactor as a practical tool to understand both physical and biochemical phenomena in play during algae cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(4), 965-977.
- Yap, B. H., Crawford, S. A., Dagastine, R. R., Scales, P. J., Martin, G. J. (2016). Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(12), 1671-1680.

- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135, 166-174.
- Zhu, B., Chen, G., Cao, X., Wei, D. (2017). Molecular characterization of CO<sub>2</sub> sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. *Bioresource Technology*. 244, 1207-1215.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS**

Determinou-se a importância dos parâmetros cinéticos através de revisão da literatura e dos resultados experimentais obtidos. Estas ferramentas matemáticas permitiram a avaliação do crescimento, da produtividade, bem como possibilitaram uma melhor compreensão da fisiologia da microalga *Chlorella sorokiniana*.

Concluiu-se a *Chlorella sorokiniana* possui a capacidade de crescer e se desenvolver em condições heterotróficas e heterotróficas facultativas, uma vez que neste estudo foi observado seu crescimento na ausência de luz e independente da presença de glicose. Contudo, foi possível observar que a glicose na maioria dos casos teve uma influência positiva no aumento da biomassa, uma vez que a maior parte dos resultados referentes a produtividade celular foi superior nos cultivos que continham o açúcar em questão na formulação dos meios.

Em relação aos nutrientes testados, o que apresentou as maiores velocidades máximas específicas de crescimento, na maioria das formulações, foi o nutriente nitrogênio nas formulações dos NPK laboratorial, isso tanto para os tratamentos com e sem adição de glicose.

De acordo com uma das hipóteses levantadas, o nutriente fósforo não se sobressaiu tão bem em relação as demais formulações, talvez isso tenha acontecido em virtude da fonte de fósforo escolhida ser o ácido fosfórico, logo, nos próximos estudos pode-se avaliar a possibilidade de verificar o pH, ou alterar a fonte de fósforo.

A otimização dos nutrientes para a condição de cultivo heterotrófico é de suma importância, pois o crescimento microalgal nesta condição facilitaria o uso de biorreatores sem luz, utilizados em diversas indústrias, tais como de medicamentos, alimentos, cosméticos, entre outros, possibilitando assim uma redução nos custos com energia. Sendo assim, para experimentos futuros, sugere-se que os melhores tratamentos, tanto do fertilizante NPK, como do NPK laboratorial, sejam avaliados nas melhores concentrações pré-estabelecidas de

cada nutriente. Além disso, sugere-se experimentos em escala maior, objetivando a obtenção e caracterização celular em termos de lipídios, proteínas e pigmentos.