



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

**PRODUÇÃO DE PHB POR *Chlorella fusca* CULTIVADA COM PENTOSSES COMO
FONTE DE CARBONO**

ANA PAULA AGUIAR CASSURIAGA

Engenheira Bioquímica

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

DR^a. BÁRBARA CATARINA BASTOS DE FREITAS
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2018

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

**PRODUÇÃO DE PHB POR *Chlorella fusca* CULTIVADA COM PENTOSSES COMO
FONTE DE CARBONO**

ANA PAULA AGUIAR CASSURIAGA
Engenheira Bioquímica

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

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador
DR^a. BÁRBARA CATARINA BASTOS DE FREITAS
Co-orientadora

Rio Grande, RS
2018

Ficha catalográfica

C319p Cassuriaga, Ana Paula Aguiar.
Produção de PHB por *Chlorella fusca* cultivada com pentoses como fonte de carbono / Ana Paula Aguiar Cassuriaga. – 2018.
106 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Coorientadora: Dr^a. Bárbara Catarina Bastos de Freitas

1. Microalgas 2. Biocompostos 3. Processo fotossintético 4. *Chlorella fusca* LEB 111 I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Freitas, Bárbara Catarina Bastos de III. Título.

CDU 664:639.64

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Ana Paula Aguiar Cassuriaga e aprovada em 05 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa - FURG



Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes - UFSC



Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa - FURG

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pelo dom da vida, por ter sido meu amparo para concluir esta etapa sendo meu confidente diário em minhas orações ao chegar e sair deste local que tenho tanto amor o Laboratório de Engenharia Bioquímica.

A minha Avó Emilia de Moura Paes que partiu durante o desenvolvimento deste trabalho, mas lá de cima ao lado do criador me deu forças para chegar até aqui.

A meus Pais que são as pessoas mais importantes da minha vida, os quais sempre me apoiaram em todas minhas decisões.

A meu Pai Roberto Bonneau Cassuriaga, que é meu herói e o homem mais competente que conheço me ensinando sempre o melhor desde que nasci. A minha Mãe Blantida Aguiar que é meu exemplo de postura, decência, caráter e incansável em ser meu ombro materno nos melhores e piores momentos, esta conquista e outras serão sempre dedicadas a vocês.

A Alice Ianoski Cassuriaga que é meu grande amor, minha prima adorada, todos os dias tento ser melhor por ti, para um dia ser teu exemplo.

A minha família que sempre se orgulhou da minha jornada, sendo meus grandes incentivadores a ser quem eu sou e estar onde estou.

A minha amiga Gianna Carlos Nazareth que mesmo estudando em outra cidade, em todos os momentos que necessitei foi meu ombro amigo e minha incentivadora.

A meu namorado Lucas Nogueira Lemos que durante toda esta jornada fez de tudo para me ajudar, sendo de uma paciência diária incansável, eu te amo e desejo para tua vida o dobro de todo amor, incentivo e carinho que me deste este ano. A meu sogro e sogra os quais me apoiaram em todas minhas decisões e são como pais para mim.

A Etiele Moraes, amiga que me acolhe no seu abraço todos os dias estando sempre ao meu lado, obrigada por tudo desde minha graduação quando eu fui tua IC, foste tu que me ensinou a amar com todas as forças o LEB e nossas microalgas.

Ao meu Orientador Jorge Alberto Vieira Costa que é meu grande incentivador até aqui, és um exemplo de profissional, obrigada por todas as oportunidades que me destes até hoje. Obrigada por me deixar fazer parte deste grupo que é o LEB, eu jamais terei palavras pra descrever minha gratidão por fazer parte deste grupo.

A professora Michele Greque de Moraes, que tenho um carinho e respeito imenso sendo meu exemplo de mulher, mãe e profissional. Só gratidão por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, nas inúmeras correções, contribuições e pela maior contribuição que poderias me dar que foi confiar na profissional que estou me tornando.

A minha Co-orientadora e amiga Bárbara Freitas, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelas incansáveis correções e contribuições.

A querida iniciante científica Thainá Dell Bello pelo empenho e dedicação, sem sua ajuda o trabalho teria sido muito mais cansativo, tu me ensinou muito do que é ser responsável por alguém, obrigada por ter ajudado a me tornar mais madura e profissional.

Aos meus colegas do LEB em especial a Thaisa Santos, Cristiane Lisboa, Gabriel Martins e Luiza Moraes por sempre me auxiliarem, seja em uma palavra de consolo para me acalmar como as necessidades técnicas as quais estavam sempre prontos a me ajudar.

A minha amiga e sempre fiel, Bruna Cardias que foi incansável nesta jornada, sempre mais que amiga, se tornando uma irmã.

Ao melhor técnico que eu poderia ter para desenvolvimento deste trabalho o Sr. Roque Lourenço Zilio, por toda ajuda e companhia nos cafés da manhã.

A minhas amigas e colegas de trabalho, Bruna Barcellos, Jéssica Silveira, Kricielle, Camila Miss, Priscila Oxi, Suellen e Bruna Vaz. A vocês dedico este trabalho e acima de tudo, agradeço pela paciência, pois sei que não foi fácil, mas vocês não desistiram de mim.

“O sonho é realizado no processo e não no final! Ou seja, agora você pode estar vivendo seu sonho enquanto pensa que ele ainda vai acontecer”

Autor desconhecido

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO I - Produção de poli-hidroxibutirato (PHB) e biomoléculas por *Chlorella fusca* suplementada com pentoses em conjunto com variações de intensidade luminosa e fotoperíodo.

Tabela 1- Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g L⁻¹), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹), produção de PHB (% m m⁻¹) (média \pm desvio padrão) para *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada em diferentes fotoperíodos, intensidades luminosas (I, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fontes de carbono..... 59

Tabela 2 - Conteúdo de carboidratos (% m m⁻¹), proteínas (% m m⁻¹) e lipídios (% m m⁻¹) (media \pm desvio padrão) para a biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, submetida à modificação no fotoperíodo, intensidade luminosa (I, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fontes de carbono. ..64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1- Microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111.....	31
Figura 2 - Descrição do metabolismo de micro-organismos unicelulares fotoautótrofos. ...	32
Figura 3 - Proposta metabólica de assimilação de D-xilose através da membrana de <i>C. sorokiniana</i>	36
Figura 4 - Produção de poli-hidroxibutirato microalgal.	41

CAPÍTULO III

Artigo 1 - Produção de poli-hidroxibutirato (PHB) e biomoléculas por *Chlorella fusca* suplementada com pentoses em conjunto com variações de intensidade luminosa e fotoperíodo

Figura 1 - Perfil de crescimento de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 para os ensaios: (■) Controle, (▲) Xilose (●) e Arabinose, 50% de nitrogênio no fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa (a) 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (c) 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (■) Controle, (▲) Xilose e (●) Arabinose; fotoperíodo 12 h de luz com intensidade luminosa (d) 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (e) 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (f) 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (■) Controle, (▲) Xilose e (●) Arabinose e fotoperíodo 6 h de luz submetidos à (g) 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (h) 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (i) 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	57
Figura 2 - Análise de SDS-PAGE dos experimentos com <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, submetida à: fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) Controle, (b) Xilose e (c) Arabinose; fotoperíodo 12 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (d) Controle, (e) Xilose e (f) Arabinose; intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (g) Controle, (h) Xilose e (i) Arabinose; fotoperíodo 6 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (j) Controle, (k) Xilose e (l) Arabinose.	69

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão da microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111.....	93
APÊNDICE 2 - Curva padrão de poli (ácido 3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) 88 mol% HB e 12 mol% HV (Sigma Aldrich).	93
APÊNDICE 3 - Conteúdo de clorofila em culturas de <i>Chlorella fusca</i> LEB 11, sob variação da intensidade luminosa (58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e adição de xilose, arabinose e controle nos cultivos (a) com fotoperíodo 18 h de luz (b) 12 h de luz e (c) 6 h de luz.	94
APÊNDICE 4 - Análise de SDS-PAGE dos experimentos com <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, que não apresentaram aparecimento significativo da enzima Rubisco, submetida à: fotoperíodo 12 h de luz e intensidade luminosa 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) Controle, (b) Xilose e (c) Arabinose; fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (d) Controle, (e) Xilose e (f) Arabinose; intensidade luminosa 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (g) Controle, (h) Xilose e (i) Arabinose; fotoperíodo 6 h de luz e intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (j) Controle, (k) Xilose e (l) Arabinose; intensidade luminosa 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (m) Controle, (n) Xilose e (o) Arabinose.	95
APÊNDICE 5 - Cromatograma do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) (a), da biomassa de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) (b) e sobreposição dos cromatogramas (c).	97
APÊNDICE 6 - Cromatogramas do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) do PHB contido na biomassa de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, submetida à variação de fotoperíodo e intensidade luminosa.	98

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
RESUMO GERAL	19
ABSTRACT.....	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVO GERAL	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO II.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA.....	29
3.2 MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES.....	29
3.2.1 Microalgas do gênero <i>Chlorella</i>	30
3.3 FOTOSÍNTESE.....	31
3.4 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DE CRESCIMENTO MICROALGAL.....	33
3.4.1 Luminosidade	33
3.4.2 Fotoperíodo.....	34
3.4.3 Fonte de carbono	35
3.4.4 Pentoses	35
3.4.4.1 Metabolismo das pentoses	36
3.4.5 Nitrogênio.....	37
3.5 POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS.....	37
3.5.1 Fatores físico-químicos para síntese de PHB por microalgas.....	38
3.5.1.1 Síntese de polímero microalgal.....	40
CAPÍTULO III.....	43
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	45
ARTIGO 1	47
PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) E BIOMOLÉCULAS POR <i>Chlorella fusca</i> SUPLEMENTADA COM PENTOSSES EM CONJUNTO COM VARIAÇÕES DE INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO	47
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	51
2.2 ADIÇÃO DE PENTOSSES, VARIAÇÃO DE INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO.....	51
2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	52
2.3.1 Concentração de biomassa.....	52
2.4 RESPOSTAS AVALIADAS	52
2.4.1 Produtividade volumétrica de biomassa.....	52
2.4.2 Velocidade específica máxima de crescimento.....	53
2.5 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO POLI-HIDROXIBUTIRATO... 53	
2.6 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	53
2.6.1 Concentração de proteínas e carboidratos	54
2.6.1.1 Preparo da amostra.....	54
2.6.1.2 Concentração de carboidratos	54

2.6.1.3	Concentração de proteínas.....	54
2.6.2	Concentração de lipídios totais	54
2.7	DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA	54
2.8	PERFIL PROTEICO	55
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROALGAL	55
3.2	PRODUÇÃO DE PHB.....	60
3.3	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA	63
3.4	COMPOSIÇÃO DE CLOROFILAS.....	66
3.5	PERFIL PROTEICO	68
4	CONCLUSÃO	70
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	CAPÍTULO IV	77
	CONCLUSÃO GERAL	78
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
	CAPÍTULO V	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	APÊNDICES	93

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

As microalgas têm ganhado atenção devido a sua capacidade de acúmulo de biocompostos como carboidratos, lipídios e proteínas, tornando possível a utilização destes em diversos setores. A manipulação das formas de cultivo é uma estratégia para o acúmulo de biocompostos de interesse, que podem contribuir com o aumento do desempenho do processo fotossintético e com a otimização das condições de cultivo. A modificação de fotoperíodos e intensidades luminosas são fatores cruciais para a modulação dos mecanismos vinculados a fotossíntese. Em conjunto com estes fatores a variação das fontes nutricionais são parâmetros que podem ser ajustados, contribuindo com a redução dos custos do processo e com o crescimento das microalgas. Desta forma este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de macromoléculas com potencial biotecnológico em células de *Chlorella fusca* LEB 111 com adição de pentoses, cultivadas com diferentes fotoperíodos e intensidades luminosas. Para o cultivo desta cepa foram realizadas modificações no fornecimento de períodos de luz com 18 h, 12 h e 6 h luz, os quais foram submetidos a variações de intensidades luminosas com 58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em cada uma das condições de fornecimento de luz e intensidades luminosas estudados foram realizados ensaios controle com meio BG-11 (1,5 g L⁻¹ NaNO₃; 0,02 g L⁻¹ Na₂CO₃) e com substituição da fonte de carbono por D-xilose e L-arabinose (20 mg L⁻¹) e redução do composto nitrogenado em 50% (0,75 g L⁻¹). Os experimentos foram conduzidos em estufa termostatizada em fotobiorreatores do tipo erlenmeyer com volume útil de 1,8 L, mantidos a 30 °C e agitação realizada com injeção de ar estéril. A adição de xilose em conjunto com fornecimento de 18 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promoveu crescimento celular máximo de 0,80 g L⁻¹ e produtividade máxima 0,06 g L⁻¹ d⁻¹. Os experimentos com adição de pentoses promoveram o maior acúmulo de poli-hidroxibutirato (PHB), com o fornecimento de 6 h de luz e intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ desencadeou resposta superior na produção de poli-hidroxibutirato (PHB), chegando à concentração máxima de 17,4% (m m⁻¹) do polímero. Com a adição de xilose, fornecimento de 18 h de luz e intensidade luminosa 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi obtido o maior incremento na produção de lipídios (24,7% m m⁻¹), o maior teor protéico foi obtido com 6 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (53,2% m m⁻¹). Este trabalho demonstrou que menores intensidades luminosas para os três fotoperíodos estudados desencadearam maiores concentrações de clorofilas. A adição de 20 mg L⁻¹ de pentoses nos cultivos, redução do composto nitrogenado (50%) e fornecimento de menores intensidades luminosas podem ter desencadeado efeito positivo na atividade da enzima Rubisco no presente estudo. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial biotecnológico da cepa de *Chlorella fusca* LEB 111 quando submetida a variações de períodos de luz, intensidades luminosas e adição de pentoses para produção de PHB. Desta forma este estudo é o precursor do desenvolvimento de tecnologias envolvendo a maximização da produção de PHB por *Chlorella* indicando a potencialidade da biotecnologia microalgal como alternativa no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Arabinose. *Chlorella*. Lipídios. Poli-hidroxibutirato. Proteínas. Xilose.

Production of PHB by *Chlorella fusca* cultivated with pentoses as source of carbon

ABSTRACT

Microalgae have gained attention due to their ability to accumulate biocomposites such as carbohydrates, lipids and proteins, making it possible to use them in several sectors. The manipulation of the forms of cultivation is a strategy for the accumulation of biocomposites of interest, which can contribute with the increase of the performance of the photosynthetic process and with the optimization of the culture conditions. The modification of photoperiods and light intensities are important factors for the modulation of mechanisms linked to photosynthesis. Together with these factors nutritional sources impairment are parameters that can be fit, contributing to the reduction of process costs and the growth of microalgae. The objective of this work was to evaluate the production of macromolecules with biotechnological potential in *Chlorella fusca* LEB 111 cells with addition of pentoses, cultivated with different photoperiods and light intensities. For the cultivation of this strain, changes were made in the supply of light periods with 18 h, 12 h and 6 h light, which were submitted to variations of light intensities with 58, 28 and 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In each of the light-delivery conditions and light intensities studied, control experiments were performed with BG-11 medium (1.5 g L⁻¹ NaNO₃, 0.02 g L⁻¹ Na₂CO₃) and with replacement of the carbon source by D-xylose and L-arabinose (20 mg L⁻¹) and reduction of the nitrogen compound by 50% (0.75 g L⁻¹). The experiments were conducted in a thermostatic oven in Erlenmeyer type photobioreactors with a useful volume of 1.8 L, maintained at 30 ° C and shaking performed with sterile air injection. The addition of xylose together with 18 h of light and light intensity 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promoted maximum cell growth of 0.80 g L⁻¹ and maximum yield 0.06 g L⁻¹ d⁻¹. The experiments with addition of pentoses promoted the highest accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB), with a 6 h light and light intensity of 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, reaching the maximum concentration of 17.4% (w w⁻¹) of the polymer. With the addition of xylose, 18 h light and light intensity 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the highest increase in lipid production (24.7% w w⁻¹) was obtained, the highest protein content was obtained with 6 h light and light intensity 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (43.5% w w⁻¹). This work demonstrated that lower light intensities for the three photoperiods studied triggered higher chlorophyll concentrations. The addition of 20 mg L⁻¹ of pentoses in the cultures, reduction of the nitrogen compound (50%) and supply of lower light intensities may have triggered a positive effect on the activity of the Rubisco enzyme in the present study. The results obtained in the present work demonstrated the biotechnological potential of the strain of *Chlorella fusca* LEB 111 when subjected to variations of light periods, light intensities and addition of pentoses for PHB production. In this way, this study is the precursor of the development of technologies involving the maximization of PHB production by *Chlorella* indicating the potential of microalgal biotechnology as an alternative in the development of biodegradable polymers.

KEYWORDS: Arabinose. *Chlorella*. Lipids. Poly-hydroxybutyrate. Proteins. Xylose.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia microalgal explora diferentes aplicações destes micro-organismos desde o tratamento de águas-residuais, utilização como indicadores biológicos, produção de biocombustíveis e aplicação em alimentos (MORAIS et al., 2017). Devido à capacidade das microalgas de utilizar o processo fotossintético como mecanismo de produção de moléculas de potencial biotecnológico, que estudos sobre a produção de biomoléculas específicas como biopolímeros têm sido desenvolvidos desde 1992. Estas moléculas poliméricas são produzidas intracelularmente por diversas cepas de microalgas, sendo recentemente determinadas rotas metabólicas que comprovam a produção destes compostos por Chlorofitas (KAVITHA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016).

A produção de biomoléculas a partir de microalgas tem sido foco de diversos estudos, pois suas rotas de transformação de substratos em produtos contribuem para que os processos se tornem economicamente viáveis. Os cultivos microalgais possuem vantagens na sua produção como a não concorrência com culturas alimentares por não necessitarem de terras agriculturáveis para seu cultivo, em conjunto com a possibilidade de modulação de suas formas de cultivo (LI et al., 2011).

As modificações de parâmetros físicos como variação da intensidade luminosa e fotoperíodo são fatores importantes que influenciam o crescimento microalgal. No ambiente natural, as microalgas estão expostas a ciclos diários de flutuações de fases claro/escuro, intensidades luminosas e oscilações sazonais. A quantidade de luz disponível determina a quantidade necessária para que o processo fotossintético microalgal ocorra de forma adequada (LIU et al., 2014). O uso de períodos apropriados de exposição à luz pode reduzir a demanda de energia luminosa, estimulando a maximização na produção de biomassa e o acúmulo de biomoléculas (WIJFFELS, 2013; YAN; ZHU; WANG, 2016). No entanto o excesso de energia luminosa que não é convertido em energia química induz a foto-inibição do aparelho fotossintético (XU; IBRAHIM; HARVEY, 2016; WAHIDIN; IDRIS; SHALEH, 2013). O crescimento de microalgas relaciona fatores como temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de carbono e luz. As microalgas do gênero *Chlorella* têm a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono como o dióxido de carbono (CO₂) e resíduos industriais, modificando assim suas rotas metabólicas para o acúmulo de biocompostos (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016).

As fontes de carbono são essenciais no cultivo microalgal, devido à sua importância nutricional, pois contribuem com a preservação da biomassa e ativação do

crescimento celular durante a fase química da fotossíntese (FRASER et al., 2016; FREITAS, 2016; HO et al., 2013; MENEZES, 2015). A modificação dos parâmetros nutricionais como substratos orgânicos contribui para a redução da perda noturna de biomassa (MAGRO et al., 2016). Neste contexto, o estudo de fontes alternativas de carbono surgem os materiais lignocelulósicos, sendo estes os mais abundantes na superfície terrestre, onde a fração hemicelulósica é rica em arabinose e xilose que não são diretamente fermentescíveis no processo de produção de etanol de primeira geração (SOCCOL; CARDOSO; MIQUELLUTI, 2010). A utilização de pentoses por microalgas é recente, sendo relatados apenas a partir de 2014 os primeiros estudos metabólicos sobre a utilização de xilose por *Chlorella sorokiniana* (ZHENG et al., 2014). A adição destes compostos em cultivos microalgais têm demonstrado modificações nas rotas metabólicas envolvidas na fotossíntese, desencadeando o acúmulo de compostos como carboidratos (FREITAS et al., 2016), lipídios (LEITE; PARANJAPE; HALLENBECK, 2016) e proteínas (FREITAS et al., 2017).

Este estudo visou obter respostas à respeito do uso de pentoses e bioacumulação de compostos de elevado valor agregado em cultivos microalgais, com o desenvolvimento de tecnologias inovadoras com potencial para produção de biomoléculas de elevado valor biotecnológico como poli-hidroxibutirato (PHB) e macromoléculas. Em conjunto com a união de fatores físicos e nutricionais ainda inexplorados para a produção de PHB em microalgas do gênero Chlorofita. Espera-se estabelecer condições de cultivos microalgais com intuito de promover sistemas de produção de microalgas economicamente viáveis e sustentáveis para produção de polímero de origem microalgal.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de macromoléculas com elevado valor biotecnológico em células de *Chlorella fusca* LEB 111 com adição de pentoses, cultivadas com diferentes fotoperíodos e intensidades luminosas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o acúmulo de PHB para a cepa de *Chlorella fusca* LEB 111, suplementada com pentoses e modificação de fotoperíodo e intensidades luminosas;
- Avaliar as respostas cinéticas dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 adicionados de pentoses com variação dos fotoperíodos e intensidades luminosas;
- Caracterizar a biomassa obtida quanto a lipídios, carboidratos e proteínas, para avaliação do potencial biotecnológico de *Chlorella fusca* LEB 111;
- Avaliar a produção de clorofila a e b e variações no perfil protéico para as diferentes condições de cultivo estudadas.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA

Pesquisas na área de biotecnologia microalgal são realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) desde 1996. O LEB desde então, desenvolve estudos sobre configurações de fotobiorreatores (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006), modelagem e aquisição de dados do crescimento microalgal (COSTA et al., 2002), isolamento e seleção de microalgas (MORAIS; COSTA 2007), biofixação de CO₂ (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016), diferentes substratos para cultivos microalgais (MORAIS, 2015), mais especificamente com relação ao uso de pentoses desde 2012 (FREITAS, 2012) e estudos metabólicos a partir de 2016 (FREITAS, 2016; FREITAS et al., 2016; FREITAS et al., 2017). Além disso, trabalhos na área de produção de biocompostos como ácidos graxos (MORAIS; COSTA, 2008), produção de poli-hidroxitirato (MORAIS, 2008), inserção do conceito de biorrefinarias microalgais utilizando resíduos para produção de polímeros (MOREIRA, 2014; SILVA, 2016), nanofibras orindas de polímeros biodegradáveis (MORAIS, 2008; SCHMATZ et al., 2016), nutricosméticos (MORO, 2013), biossurfactantes (RADMANN, 2011), produção de biodiesel (MORAIS, 2015) e tintas à base de PHB microalgal (CASSURIAGA et al., 2015), também já foram desenvolvidos.

O presente estudo envolve aspectos ainda inexplorados no grupo de pesquisa com a modificação de fatores físicos como o fotoperíodo e intensidades luminosas em conjunto com adição de pentoses para produção de polímero de origem microalgal, uma vez que estudos sobre a produção e identificação de PHB em Chlorofitas ainda são recentes e pouco explorados.

3.2 MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES

As microalgas são organismos fotossintetizantes que podem ser encontrados em água doce e ambientes marinhos, com características que os tornam altamente atrativos para a biotecnologia verde. Estes micro-organismos podem ser divididos em classes conforme suas características estruturais, sendo classificadas como eucarióticos e procarióticos. As microalgas se dividem nas classes *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (diatomáceas), *Chrysophyceae* (algas amareladas), *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Rhodophyceae* (algas vermelhas) e *Phaeophyceae* (algas marrons) (BHARATHIRAJA et al., 2015; HOEK; MANN; JHAHNS, 1995).

A produção de metabólitos como, proteínas, carboidratos e lipídios são resultado do processo de remoção de dióxido de carbono realizado durante a fotossíntese pelas microalgas. A eficiência microalgal na conversão de energia solar em biomassa é elevada quando comparada com plantas terrestres (KAZAMIA; SMITH, 2014).

A biotecnologia microalgal engloba aspectos que objetivam a otimização dos parâmetros, sejam estes de cultivo ou de produção específica de bioprodutos (WOBBE; REMACLE, 2015). Tecnologias de crescimento microalgal voltadas para a produção de biocombustíveis e mitigação dos gases do efeito estufa iniciaram na década de 70 e a partir destes estudos o interesse na conversão de biomassa em produtos de elevado valor agregado evoluíram com objetivo de auxiliar a integração dos processos (FRASER et al., 2016; FREITAS et al., 2016).

3.2.1 Microalgas do gênero *Chlorella*

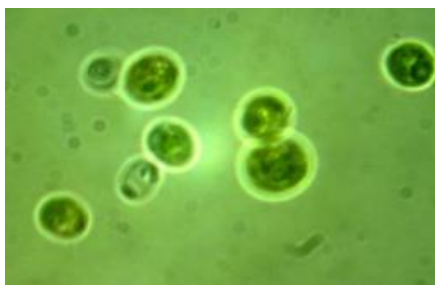
A divisão *Chlorophyta* compreende as algas verdes ou Chlorofitas, unicelulares e espécies dotadas de talos multicelulares. As Chlorofitas constituem o grupo mais semelhante às plantas terrestres, sendo que diversos estudos moleculares propõem dois táxons para esta divisão *Chlorophyta* e *Embryophyta* (LOURENÇO, 2006). As microalgas do gênero *Chlorella* são eucarióticas, unicelulares com diâmetros variando de 5-10 μ m, de formato esférico, podendo ser encontradas em diversos habitats (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000).

O uso comercial da *Chlorella* vai desde alimentação humana e animal à biocombustíveis. Estes micro-organismos possuem como característica a resistência as condições extremas de cultivo, seja por modificação nutricional ou por parâmetros físicos, o que torna interessante o estudo das potenciais respostas metabólicas que envolvem a produção de diferentes bioprodutos (DEAMICI et al., 2016; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; FREITAS et al., 2016). Diversos estudos relatam a produção de carboidratos (FREITAS et al., 2016), perfil protéico (FREITAS et al., 2017) e pigmentos como ficocianina (DEAMICI et al., 2016) em cepas de *Chlorella*.

A Figura 1 mostra a cepa de *Chlorella fusca* LEB 111 pertencente à coleção de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, que foi utilizada neste trabalho. A microalga *Chlorella fusca* LEB 111, foi isolada da lagoa de decantação de cinzas da Usina Termoelétrica Presidente Médici, situada na cidade de Candiota - RS (DUARTE; MORAIS, 2012). Esta microalga apresenta potencial para biofixação de CO₂ (DUARTE; FANKA;

COSTA, 2016; DUARTE et al., 2017) e de outros resíduos como cinzas, SO_x e NO_x, (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016). Estudos revelaram que entre os vários grupos de microalgas, o grupo Chlorofita é um dos mais utilizados para o tratamento de águas residuais. A produtividade de biomassa de várias espécies deste grupo quando submetidos a diferentes sistemas de cultivo apresentam resultados positivos (FRANCO et al., 2013).

Figura 1- Microalga *Chlorella fusca* LEB 111.



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG.

Diversas microalgas acumulam (PHB), porém somente Kavitha, Kurinjimalar e Sivakumar (2016) relatam o acúmulo de polímeros em células de Chlorofitas. Sendo identificadas possíveis rotas metabólicas de acúmulo de PHB em cepas de *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorococcum humicola*, em concentrações de 0,5 à 16,7%.

A cepa de *Chlorella vulgaris* quando submetida à modificação gênica, via luz ultravioleta (UV), incrementou os teores lipídicos na biomassa de 42 à 45%. Sendo característico também diversos ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (SARAYLO et al., 2017). Apesar desses estudos e melhorias promissoras alcançadas no conteúdo lipídico e na biomassa das microalgas, ainda é pequena a compreensão do metabolismo lipídico em seu nível genômico. Em alguns países, os extratos de *Chlorella* são consumidos como suplemento dietético devido as suas propriedades imunomoduladoras e anticancerígenas (SARKAR; SHIMIZU, 2017).

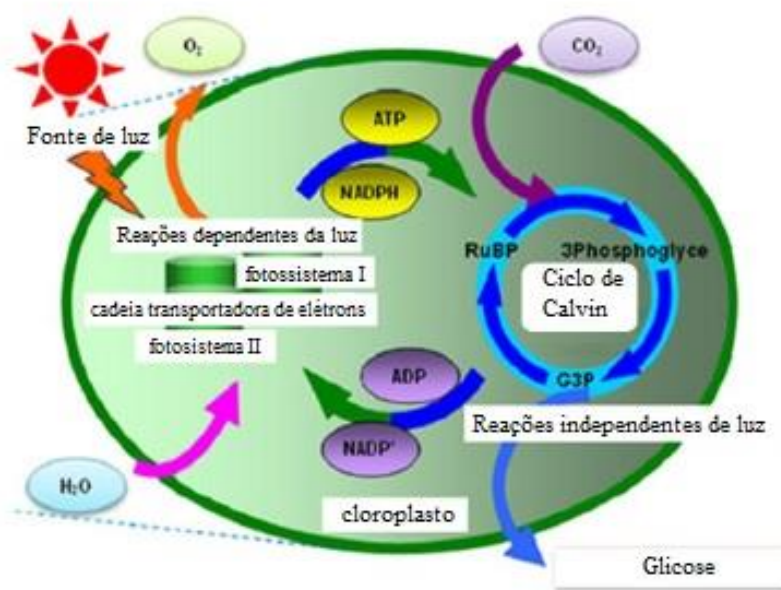
3.3 FOTOSSÍNTESE

A fotossíntese pode ser dividida em duas fases: a fase fotoquímica e a fase química, podendo ser expressa como uma reação redox, iniciada pela incidência de luz e interação com os pigmentos fotossintéticos presentes do fotossistema II. A luz utilizada na fotossíntese é absorvida por uma série de pigmentos, sendo que cada pigmento absorve em

comprimentos de onda específicos. Em Chlorofitasos pigmentos presentes são clorofila a e b e em menores quantidades a' e b' (GIMPEL; HENRÍQUEZ; MAYFIELD, 2015).

Uma vez iniciada a incidência luminosa, uma rede metabólica via fosforilação oxidativa, composta por dois fotossistemas e um conjunto de proteínas de membrana produzem uma razão ATP/NADPH 1,28. Porém a principal via do processo fotossintético é o ciclo de Calvin-Benson que exige uma proporção ATP/NADPH de 1,5. Por esta razão, micro-organismos fotoautotróficos desenvolveram vias de fluxos alternativos, os quais restauram o balanço ATP/NADPH e acredita-se que atuem como válvulas de controle em condições de excesso e flutuações de luz (ciclos claro:escuro) (BAROUKH et al., 2016; LANDER et al., 2012). Na fase escura, o dióxido de carbono é reduzido para carboidratos no ciclo de Calvin-Benson, utilizando a energia derivada do NADPH e ATP que será utilizada para a produção de moléculas de glicose (Figura 2) (ALBERTS et al., 1997).

Figura 2 - Descrição do metabolismo de micro-organismos unicelulares fotoautotróficos.



Fonte: Adaptado de Iverson (2006) e Zhao e Su (2014).

Uma das enzimas mais importantes do metabolismo fotossintético é a ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (Rubisco), que é responsável pela assimilação de CO₂ atmosférico e situa-se nos cloroplastos de células fotossintéticas. Diversos estudos identificaram que a atividade da Rubisco é o principal gargalo para o fluxo de carbono quando em condições de excesso de ATP e NADPH. Também são necessárias quantidades significativas de ATP e NADPH para que a fotossíntese ocorra, moléculas estas que são

produzidas à partir da incidência luminosa dirigida aos fotossistemas I e II (KNOOP et al., 2013).

3.4 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DE CRESCIMENTO MICROALGAL

Existem diversos fatores que afetam o crescimento e a composição bioquímica das microalgas, como por exemplo, intensidade luminosa, fases claro:escuro, concentração de CO₂, salinidade, temperatura, pH, concentração do oxigênio dissolvido e fontes de carbono (KUMAR et al., 2010). O crescimento microalgal é favorecido quando nutrientes são disponibilizados adequadamente nos meios de cultivo, devendo estar presentes macronutrientes, elementos traços e vitaminas (MAGRO et al., 2016).

3.4.1 Luminosidade

A iluminação dos sistemas de cultivos microalgais é realizada por meio de luz artificial ou natural. A luz artificial possui vantagens, uma vez que esta pode ser controlada, demonstrando-se como fator importante para o acúmulo de biomoléculas (SCHULZE et al., 2014). A intensidade luminosa pode ser disponibilizada de diversas formas ao cultivo microalgal, desde quantidades de energia disponível (intensidade luminosa) (FREITAS et al., 2017), periodicidade (fotoperíodos) (CHAUTON et al., 2013) e também diferentes espectros de radiação (DUARTE; COSTA, 2018). Estudos com microalgas sugerem que pigmentos, ácidos graxos insaturados, carboidratos e teor de proteínas variam em resposta à intensidade luminosa, quando esta é aumentada ou diminuída (BROWN; HOHMANN, 2002; MOOIJ et al., 2016; RENAUD et al., 1991).

Como a fotossíntese consiste em duas fases: fase clara e escura, estas duas vias fotossintéticas permitem a modulação de regimes de luz, com intuito de desenvolver processos menos onerosos e mais eficientes. Níveis muito elevados de intensidade luminosa podem causar foto-inibição, fenômeno no qual a absorção de fótons pode desencadear uma sobrecarga de elétrons no Ciclo de Calvin-Benson. Estes elétrons em excesso reagem com água e formam peróxido de hidrogênio que é um composto tóxico às células. Em contrapartida a pequena incidência de fótons aos cultivos microalgais, pode não fornecer condições suficientes para que ocorra o crescimento celular (CHAUTON et al., 2013; RICHMOND; HU, 2013).

O aumento da concentração de biomassa microalgal é diretamente proporcional a absorção de luz. Portanto, a concentração de biomassa máxima é limitada pela quantidade de fótons incidentes no micro-organismo, mas este limite não é simples de ser estimado, uma vez que as células adaptam seus pigmentos fotossintéticos à taxa de incidência de luz (ANNING et al., 2000; BERNARD, 2011). Estudos envolvendo a variação da intensidade luminosa indicam que baixas intensidades luminosas ($8,44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fornecidas a cultivos de cepas de *Chlorella minutissima*, desencadeiam alterações no perfil protéico e elevação na produção de biomoléculas como carboidratos (FREITAS et al., 2017).

3.4.2 Fotoperíodo

A luz é um dos fatores-chave que controlam o curso dos processos fisiológicos microalgais. A eficiência fotossintética de cultivos microalgais depende de fatores biológicos como a duração do fotoperíodo, temperatura, disponibilidade dos nutrientes e densidade celular. No ambiente natural, a intensidade da luz sofre mudanças contínuas, e o regime de luz não é constante. O aumento das frequências dos ciclos claro:escuro pode aumentar consideravelmente a produtividade e a eficiência fotossintéticas das microalgas (KHOEYI; SEYFABADI; RAMEZAMPOUR, 2012).

Modificações no fotoperíodo de cultivos microalgais induzem alterações no teor total de proteínas, pigmentos e carboidratos em *Chlorella vulgaris*, *Phyridium cruentum*, *B. braunii* (KHOEYI; SEYFABADI; RAMEZAMPOUR, 2012). Estudos relatam que microalgas do gênero *Chlorella* quando submetidos a cultivos com suplementação da fonte de carbono com glicerina, desencadearam acúmulo lipídico em específico de triacilgliceróis (MORAIS, 2015), podendo ser estimulado tais compostos quando submetidos a variações de fotoperíodo (CARVALHO; MALCATA, 2005).

Cepas de *Neochloris conjuncta*, *Neochloris terrestris*, *Neochloris texensis*, *Botryococcus braunii* e *Scenedesmus obliquus* foram submetidas a diferentes regimes de luz, de 12 h e 24 h. A iluminação contínua estimulou o crescimento de *B. braunii* e *S. obliquus* mais efetivamente do que para as espécies de microalgas do gênero *Neochloris terrestris* (KRZEMINSKA et al., 2014). Gammanpila, Rupasinghe e Subasingue (2015) cultivaram cepas de *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis sp.* em meio de cultivo Guillar e Ryther's modificado com fotoperíodo de ciclos de 8 h, 16 h e 24 h de luz, para avaliar a produção de biodiesel em microalgas. As células apresentaram crescimento máximo de $0,63 \text{ g L}^{-1}$ em 16 h de luz, com maior percentual lipídico (13,9%) na condição de 8 h luz. Indicando que a

variação da periodicidade deve ser considerada uma alternativa potencial para estimular o acúmulo de biomoléculas como lipídios.

3.4.3 Fonte de carbono

O crescimento e a composição da biomassa de microalgas podem ser manipulados à partir das condições de cultivo e das fontes de carbono. Geralmente, as microalgas são cultivadas sob diferentes modos para a produção de biomassa: fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico. O crescimento fotoautotrófico de microalgas requer CO₂, meio contendo nutrientes como, nitrogênio, fósforo e fonte de luz. Sob condições heterotróficas e mixotróficas, muitas espécies de microalgas são capazes de usar material orgânico como fonte de carbono (SCHULZE et al., 2014).

O carbono é considerado o macronutriente de grande importância, uma vez que este composto constitui cerca de 50% da biomassa microalgal, sendo este elemento o responsável pela preservação da perda de biomassa em condições de estresse, além de ativação do crescimento durante os períodos de escuro (BILAD; ARAFAT; VANKELECOM, 2014).

A partir disto, a produção microalgal pode ser ajustada para incrementar o crescimento e acúmulo de biomoléculas em conjunto com a redução dos custos de cultivo inserindo diferentes resíduos nos cultivos, tornando os sistemas economicamente viáveis (KUMAR et al., 2010). Uma vez que as microalgas têm demonstrado capacidade de utilizar resíduos industriais como: glicerol (MORAIS, 2015), resíduo da indústria sucro-alcooleira (FREITAS et al., 2016; FREITAS et al., 2017), soro de leite (SALLA et al., 2016; WOBBE; REMANCLE, 2015) e CO₂ (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; DUARTE et al., 2017).

3.4.4 Pentoses

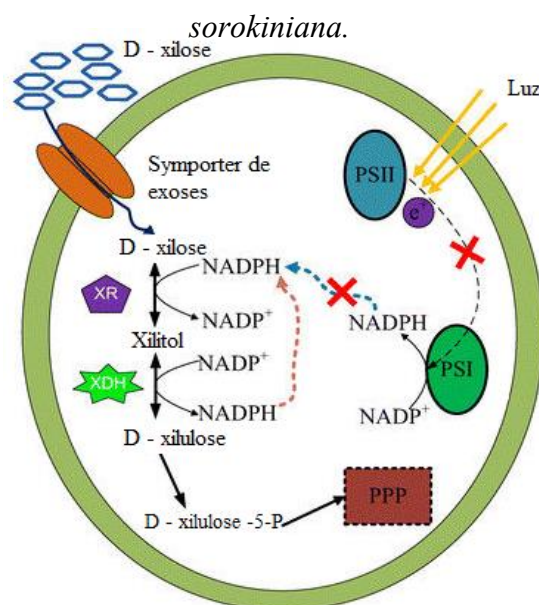
Pentoses são monossacarídeos compostos por cinco carbonos, dentre os quais pode-se citar a xilose, ribulose e arabinose. São compostas por esqueleto simples e não ramificado, onde cada átomo de carbono, exceto um, possui um grupo hidroxílico, e no carbono remanescente, existe um oxigênio carbonílico (frequentemente combinado em ligação acetal ou cetal). Se o grupo carbonílico está no final da cadeia, o monossacarídeo é um aldeído derivado, denominado aldose. A xilose e arabinose pertencem à família das aldoses. As pentoses representam cerca de 20-35% da biomassa lignocelulósica sendo um

importante resíduo disponível, presente em elevadas concentrações na superfície terrestre, apresentando potencial como substrato para diversos fins (SUN; LIU, 2012), entre eles o uso como fonte de carbono para microalgas.

3.4.4.1 Metabolismo das pentoses

O primeiro estudo do metabolismo de pentoses por microalgas foi realizado em células de *Chlorella sorokiniana* por Zheng et al. (2014), cujo modelo proposto é apresentado na Figura 3. Para micro-organismos nativos com capacidade de absorção de xilose, são conhecidos dois mecanismos de transporte de D-xilose, o sistema de alta afinidade (específico para D-xilose) e o sistema de baixa afinidade (compartilhado com D-glicose). Para espécies não nativas a D-xilose pode ser absorvida por transportadores de D-glicose. Estes transportadores (*symporter*) de D-glicose são proteínas presentes na membrana das microalgas, que possibilitam a entrada compartilhada de D-xilose em células de microalgas, como *C. sorokiniana*. A absorção não específica de xilose então pode ser realizada por meio de transportadores de hexoses (JEFFRIES; JIN, 2004; ZHENG et al., 2014).

Figura 3 - Proposta metabólica de assimilação de D-xilose através da membrana de *C.*



Fonte: Zheng et al, 2014.

Conforme a Figura 3, uma molécula de xilose redutase converte D-xilose em xilitol com a oxidação concomitante de NADPH para NADP^+ . A enzima xilitol desidrogenase transforma esta molécula de xilitol em D-xilulose, desencadeando a redução de NAD^+ a

NADH. A seguir D-xilulose fosforilada é convertida em D-xilulose-5-P, podendo entrar na via das pentoses fosfato e ser então consumida pelo micro-organismo (LEDESMA-AMARO et al., 2016; ZHENG et al., 2014).

3.4.5 Nitrogênio

O nitrogênio é o segundo elemento com maior concentração na composição microalgal. Este componente é fundamental para três classes de substâncias estruturais das células como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintéticos (clorofilas e ficobilinas), mostrando-se como nutriente de grande importância para o cultivo de microalgas (LOURENÇO, 2006). O metabolismo do nitrogênio em microalgas é modificado quando estes organismos são submetidos a fontes de compostos nitrogenados como nitrato, nitrito e amônio, onde o amônio é a forma química do nitrogênio, sendo mais facilmente assimilado pelas microalgas, o nitrato não requer redução, sendo assimilado como aminoácidos.

Desde a década de 80, estudos tem demonstrado a influência da concentração de nitrogênio sobre a biomassa microalgal. Se o suprimento de nitrogênio é abundante nos cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteínas e clorofilas nas células. Quando é limitada a concentração de nitrogênio no cultivo de cepas de *Chlorella*, este apresenta elevação nas taxas de produção lipídica (ROSENBERG et al., 2008) e de carboidratos (FREITAS et al., 2016). A privação ou redução do fornecimento de nitrogênio para células microalgais leva à divisão celular reduzida, a qual desloca as vias de biossíntese para síntese de lipídios neutros (LOURENÇO, 2006). Zhu et al. (2017) realizaram a retirada do composto nitrogenado em duas etapas do meio BG-11 (RIPKA et al., 1979), nos dias 3 e 7 de cultivo, resultando em rápida síntese de lipídios conjunto com rápido desenvolvimento celular nestes períodos. Estudos com *Chlorella regularis* submetido à redução em 75% no composto nitrogenado em conjunto com adição de glicose ($0,55 \text{ mg L}^{-1}$) como fonte de carbono e privação de nitrogênio gerou elevada produtividade ($4,53 \text{ g L}^{-1}$) e incremento na produção lipídica de 42,3% e em específico a produção de ácidos graxos, poli-insaturados com potencial para produção de biodiesel (FU et al., 2017).

3.5 POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS

A versatilidade e os baixos custos de produção dos plásticos derivados do petróleo ainda não permitem substituir estes materiais por outros, como papel, madeira e vidro. A

importância dos plásticos é evidente, devido a sua necessidade em diferentes setores industriais (NIELSEN et al., 2017). A demanda industrial por polímeros petroquímicos para a fabricação de plásticos é geralmente de polietileno (PE), polipropileno (PP), cloreto de polivinil (PVC) e o poliestireno (PS). Estes representam os principais polímeros encontrados sob a forma de resíduos em aterros, desencadeando à partir disto a grande problemática envolvida em sua degradação (SILVA, 2016).

Durante à última década, os polímeros naturais têm sido amplamente estudados, sendo realizada a caracterização quanto a propriedades físico-químicas, bem como a busca por novas espécies capazes de produzir estes compostos. Estes polímeros geralmente são atóxicos e altamente estáveis o que torna possível a aplicabilidade em diversos setores, como o desenvolvimento de vetores de medicamentos encapsulados (PANITH et al., 2016), tintas (COSTA et al., 2016) e nanotecnologia (MORAIS et al., 2015; SADEGHI et al., 2016).

Dentre os polímeros atualmente estudados o PHB é o representante mais comum dentre os poli-hidroxicarboxilatos (PHAs), sendo o principal composto de armazenamento de diferentes grupos taxonômicos de micro-organismos procarióticos. Diversos gêneros de microalgas podem produzir naturalmente PHA's, dentre eles *Aphanothece* sp. (CAPON et al., 1983), *Oscillatoria limosa* (STAL; HEYER; JACOBS, 1990), *Spirulina* (MARTINS et al., 2014) e *Synechococcus* sp. MA19 (MIYAKE; ERATA; ASADA, 1996).

O PHB é um biopolímero apolar e pouco permeável a O_2 , H_2O e CO_2 , opticamente ativo e com centro quiral apresentando os grupos R localizados no mesmo lado da cadeia polimérica (COSTA et al., 2016). As propriedades mecânicas do PHB são similares a polímeros sintéticos e suas propriedades físicas foram estudadas através de técnicas como, difração de raios-x, espectroscopia com transformada de fourrier (FTIR) e cromatografia gasosa (CG) (SILVA, 2016). Estes fatores são importantes com relação à degradação do polímero, podendo esta degradação variar de acordo com o ambiente o qual for exposto. A degradação total pela ação de micro-organismos resulta em CO_2 e H_2O por via aeróbia e CH_4 por via anaeróbia (MORAIS, 2008), sendo esta uma das vantagens perante os polímeros petroquímicos, podendo ser uma alternativa para produção de plásticos sustentáveis.

3.5.1 Fatores físico-químicos para síntese de PHB por microalgas

A produção de polímero por microalgas é favorecida pela adição adequada de nutrientes nos sistemas de cultivo, sejam este macro ou micro nutrientes. A produção de

biomassa voltada para a produção de biopolímero envolve rotas metabólicas que podem ser ativadas ou inativadas durante o processo de crescimento microalgal (LOURENÇO, 2006).

As microalgas acumulam biopolímeros como compostos de reserva, quando submetidos a excesso de carbono ou privação de nitrogênio e/ou fósforo (ZHUANG et al., 2016). Quando submetidos a diferentes condições de crescimento com modificações os polímeros podem ser excretados ou produzidos intracelularmente. Estes quando produzidos intracelularmente, devem ser extraídos por diferentes métodos como, extração química, física, ou métodos associados (QUINES et al., 2015).

Estudos indicam que a fonte de carbono pode ser um fator limitante na produção de PHB em microalgas. Compostos como acetato de sódio (carbono inorgânico) e bicarbonato de sódio (carbono orgânico) foram utilizados em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 produzindo rendimentos de 44% de polímero em base seca (MARTINS et al., 2014), quando submetida a biomassa a extração via digestão com hipoclorito. A concentração de polímero pode se elevar à medida que as concentrações de carbono adicionadas aos meios de cultivo são aumentadas e absorvidas como resposta metabólica microalgal. Além disso, estudos indicam que a relação carbono/nitrogênio (C/N), desempenha um papel fundamental para obtenção de maiores concentrações de PHB (SILVA, 2016).

As microalgas quando submetidas à redução do composto nitrogenado em diferentes concentrações, desencadeiam reduções das concentrações da biomassa e reduzem a taxa de divisão celular elevando assim a produção de compostos de reserva no microorganismo como, o PHB (MORAIS et al., 2017). Estudos com a redução do composto nitrogenado em 10% (COELHO et al., 2015), 30% e 90% (MARTINS et al., 2014), desencadearam elevação da produção de polímero. De acordo com Coelho et al. (2015) cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em meio Zarrouk com redução do composto nitrogenado ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) resultaram em crescimento celular reduzido ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) e concentração de PHB inversamente proporcional (13,4%).

A modificação de fatores físicos como intensidade luminosa e periodicidade de luz fornecida aos cultivos microalgais voltada para a produção de PHB, ainda é pouco explorada. Porém sabe-se que o fornecimento de luz pode levar as culturas microalgais a sintetizar biomoléculas como lipídios, que são os precursores do poli-hidroxi-butanato. Demirbas e Demirbas (2010) indicam que condições de menores fornecimentos de luz, beneficiam o aumento das concentrações lipídicas na biomassa microalgal. A microalga *Nostoc moscorun*, quando submetida a diferentes ciclos claro/escuro, demonstrou impacto positivo quanto ao acúmulo de PHB em conjunto com a suplementação da fonte de carbono e deficiência de

fosfato, resultando em acúmulo máximo de PHB para 8,9% em pH 8,5 seguido de 7,8% para pH 9,5 e 7,2% para pH 10,5 no 21º dia de cultivo (SHARMA; MALLICK, 2005).

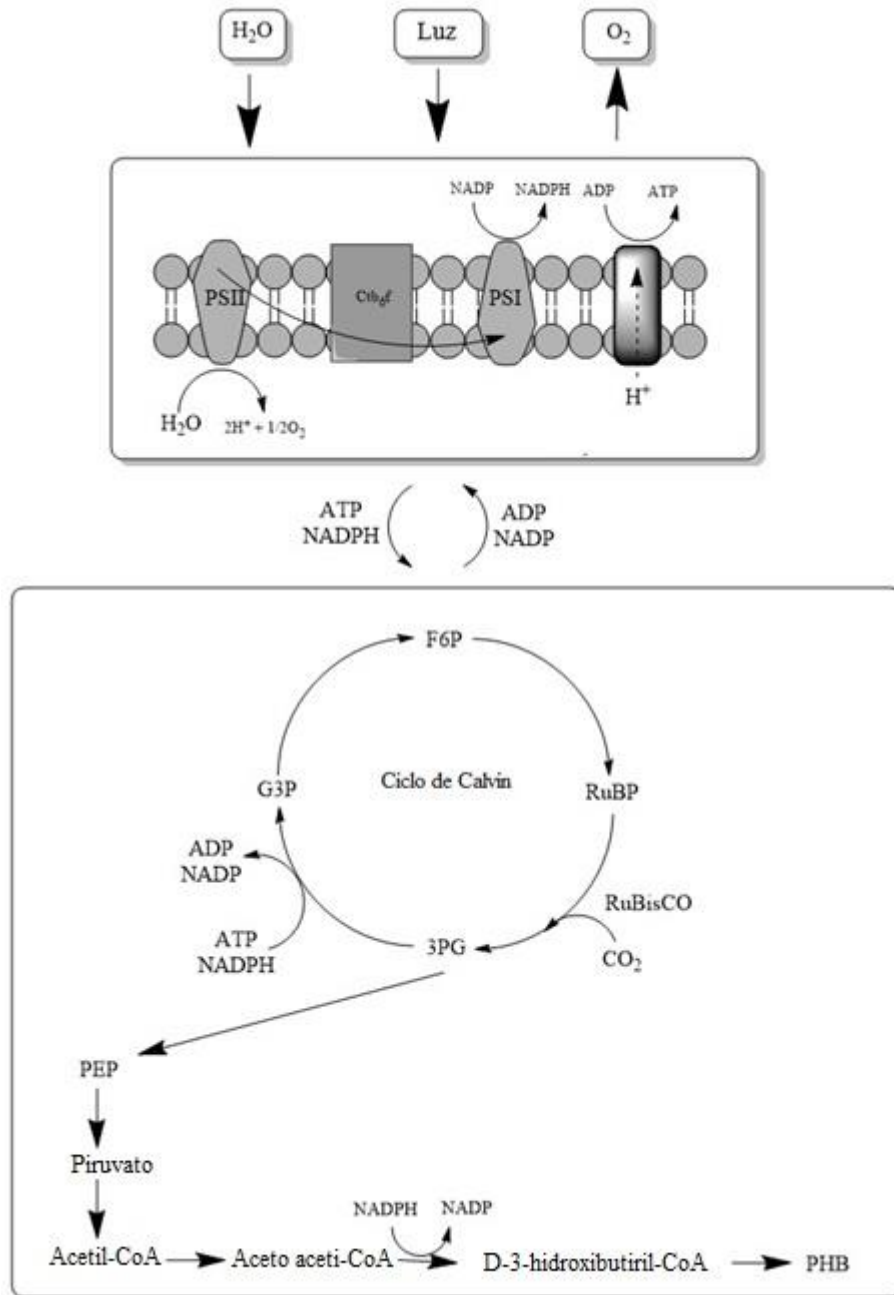
Estudos ainda recentes indicam que pequenas quantidades de PHB podem ser produzidas por cepas de Chlorofitas como, *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Chlorococcum humicola*, quando submetidas a meio de cultivo suplementado com água residual de esgoto. Sendo encontrado valores máximos de 247 mg L⁻¹ da cepa de *Botryococcus braunii* (KAVITHA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016).

3.5.1.1 Síntese de polímero microalgal

O PHB é sintetizado como produto da assimilação de carbono quando submetido à condições de estresse. A síntese do PHB inicia-se com a produção de metabólitos intermediários, sendo necessárias grandes quantidades de piruvato, acetil-Coa e frutose-6-fosfato em menores quantidades. A biossíntese microalgal de PHB (Figura 4) inicia com o fornecimento de excesso de fontes de carbono e redução de compostos nitrogenados, desencadeando uma série de reações metabólicas que produz como biomolécula final o PHB (FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014; WANG et al., 2013). Primeiramente ocorre a condensação catalisada por β -cetiólase de duas moléculas de acetil-Coa, liberando Coenzima-a, promovendo a conversão destas moléculas para Acetoacetil-Coa, sendo catalisada pela Acetoacetil-Coa redutase, por meio um gradiente de moléculas de NADPH, reduzindo o Aceto acetil-Coa em D-3-hidroxi-butiril-CoA, que é catalisada pela PHA sintase que atua como agente polimerizador, formando o poli-hidroxi-butirato (PHB) (SHARMA; DHINGRA, 2016).

A compreensão das respostas dos micro-organismos quando submetidos a diferentes fontes de carbono, intensidades luminosas e fotoperíodos são de grande importância. Sabendo-se que mecanismos adjacentes as rotas tradicionais existem, estudos que vão de encontro a auxiliar a identificação destas rotas são cada vez mais explorados. As modificações de parâmetros de cultivo em conjunto com a modificação da fonte de carbono podem ser consideradas alternativas na redução de resíduos, por estes serem utilizados como substrato nos cultivos. A modificação dos parâmetros de cultivo em cepas de *Chorella* ainda é pouco relatada devendo haver estudos para proporcionar a identificação de novos modos de condução que potencializem a produção desta biomolécula de elevado valor biotecnológico como o PHB.

Figura 4 - Produção de poli-hidroxi-butilato microalgal.



Fonte: Adaptado de Wang et al., 2013.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas, em que, primeiramente foi realizado o cultivo da cepa de *Chlorella fusca* LEB 111 com modificação da fonte de carbono com adição de D-xilose e L-arabinose em conjunto com alteração do fotoperíodo, sendo fornecido 18 h, 12 h e 6 h de luz e nestes períodos de luz foram modificadas as intensidades luminosas em 58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os ensaios foram avaliados diariamente quanto ao crescimento celular e composição de pigmentos fotossintetizantes e a cada 48 h foram retiradas alíquotas dos experimentos para determinação do perfil protéico. Ao final dos experimentos foram realizadas determinações de carboidratos, proteínas, lipídios e poli-hidroxitirato, demonstrando a viabilidade da aplicação da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, para produção de PHB e macromoléculas. O presente trabalho originou um artigo para posterior submissão em periódicos de alto fator de impacto.

ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) E BIOMOLÉCULAS POR *Chlorella fusca* SUPLEMENTADA COM PENTOSSES E VARIAÇÕES DE INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO.

ARTIGO 1

**PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) E BIOMOLÉCULAS POR
Chlorella fusca SUPLEMENTADA COM PENTOSSES EM CONJUNTO COM
VARIAÇÕES DE INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO**

Produção de poli-hidroxibutirato (PHB) e biomoléculas por *Chlorella fusca* suplementada com pentoses em conjunto com variações de intensidade luminosa e fotoperíodo

RESUMO

A demanda por polímeros com propriedades similares aos de origem petroquímica tem resultado em diversas pesquisas por fontes alternativas, onde os biopolímeros de origem microalgal são de particular interesse. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a adição de xilose e arabinose em conjunto com a variação do fotoperíodo e intensidade luminosa, pode estimular a síntese de PHB e biomoléculas por *Chlorella fusca* LEB 111. O estudo foi realizado com modificação da fonte de carbono por pentoses (xilose e arabinose), fotoperíodos de 18 h, 12 h e 6 h de luz e variação da intensidade luminosa em 58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O maior acúmulo de PHB foi 17,4% (m m^{-1}) para os ensaios com adição de xilose e fotoperíodo de 6 h de fornecimento de luz e intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A maior concentração lipídica (24,7% m m^{-1}), foi obtida para os ensaios com fotoperíodo de 18 h de luz e intensidade luminosa 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para o fotoperíodo de 6 h de luz, intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e adição de xilose foi obtido o maior conteúdo de proteínas (53,2% m m^{-1}). Os resultados demonstram que a cepa de *Chlorella* possui potencial superior de produção de PHB e proteínas, quando comparada as cepas atualmente existentes.

Palavras-Chave: Chlorofita. Pentoses. Polímero. Sustentabilidade.

Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biomolecules by *Chlorella fusca* supplemented with pentoses together with variations of light intensity and photoperiod

ABSTRACT

The demand for polymers with properties similar to those of petrochemical origin has resulted in several studies by alternative sources, where biopolymers of microalgal origin are of particular interest. The objective of the present study was to evaluate if the addition of xylose and arabinose together with the photoperiod variation and light intensity can stimulate the synthesis of PHB and biomolecules by *Chlorella fusca* LEB 111. The study was performed with carbon source modification by pentoses (xylose and arabinose), photoperiods of 18 h, 12 h and 6 h light and variation of light intensity in 58, 28 and 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The highest accumulation of PHB was 17.4% (w w^{-1}) for xylose addition and photoperiod 6 h light-delivery and light intensity 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The highest lipid concentration (24.7% w w^{-1}) was obtained for the photoperiod tests of 18 h light and 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity. For the photoperiod of 6 h of light, light intensity 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and addition of xylose the highest protein content (53.2% w w^{-1}) was obtained. The results demonstrate that the *Chlorella* strain has a higher PHB and protein production potential when compared to the existing strains.

Keywords: Chlorophyta. Pentoses. Polymer. Sustainability.

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que resíduos de plásticos de origem petroquímica sejam responsáveis pela morte de cerca de 1 milhão de animais por ano desde aves á mamíferos, em todo o planeta. O acúmulo de plásticos não biodegradáveis no ambiente é de 25×10^6 tonelada ano⁻¹, representando ameaças ao ecossistema (KAVITHA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016). A demanda contínua por utilização de polímeros biodegradáveis desencadeia a busca por espécies e/ou variedades de micro-organismos capazes de sintetizar elevadas quantidades destes compostos (MORAIS et al., 2017).

Os poli-hidroxicanoatos (PHA's) produzidos a partir de fontes microbianas possuem papel significativo, apresentando-se como materiais com compatibilidade em diversos setores, como ambiental, médico e alimentício, devido as suas propriedades semelhantes aos polímeros de origem petroquímica (MARTINS et al., 2014). Os PHA's podem ser classificados de acordo com o comprimento da sua cadeia, onde o poli-hidroxi-butirato (PHB) é um polímero de cadeia curta com 3-5 monómeros de carbono. Cerca de 100 cepas de microalgas e cianobactérias foram rastreadas até o momento, possuindo concentrações de (PHB) que variam de 0,04% a 6% em sua biomassa seca (KAVITHA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016). As vias de produção de PHB relatadas são encontradas para cianobactérias, dentre estas *Spirulina* sp. (MARTINS, 2014), *Synechococcus* (MIYAKE et al., 2000) e *Synechocystis* (KHETKIRN et al., 2016). Estudos sobre a produção e identificação de PHB em Chlorofitas ainda são recentes, Kavita, Kurinjumalar e Sivakumar (2016) identificaram baixas quantidades deste polímero em espécies de *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Chlorococcum humicola*.

Microalgas do gênero *Chlorella* são utilizadas desde a década de 60, sendo a primeira microalga a ser cultivada em grande escala para utilização como suplemento alimentar (LOURENÇO, 2006), apresentando também elevado potencial para produção de bicompostíveis (RASOUL-AMINI et al., 2014). Sendo recente e inovador a utilização destas para a produção de polímeros de origem microalgal, podendo esta cepa ser cultivada com diversas fontes de carbono, dentre estes as pentoses.

A grande disponibilidade de resíduos lignocelulósicos contendo elevadas quantidades de xilose e arabinose vem desencadeando uma vertente de utilização biológica destes açúcares para o acúmulo de diversas biomoléculas em cultivos microalgais (FREITAS et al., 2016; FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017; LEITE; PARANJAPE; HALLENBECK, 2016). As microalgas utilizam a luz como fonte de energia durante a fotossíntese para

produção de diversos compostos. Os mecanismos envolvidos na fotossíntese como a ativação ou inativação dos fotossistemas, podem ser modulados com a modificação da periodicidade de fornecimento de luz juntamente com a variação dos espectros é uma estratégia para estimular o crescimento microalgal e o acúmulo de biomoléculas específicas (KRZEMINSKA; PAWLIK-SKOWRONSKA; TRZCINSKA, 2014). Estas modificações causam um efeito sinérgico desencadeando o acúmulo de compostos de reserva, como os biopolímeros.

Neste contexto a utilização de microalgas para produção de biomoléculas específicas, tem atraído grande atenção devido à suas elevadas taxas de crescimento e da capacidade de utilização de diversos resíduos para seu crescimento. A fim de fornecer resultados para auxiliar na compreensão da produção de PHB e biomoléculas por *Chlorella fusca*, o presente estudo avaliou se a adição de pentoses em conjunto com a variação dos ciclos de luz e de intensidade luminosa contribuiu para estimular a síntese de PHB e macromoléculas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi utilizada a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, pertencente à coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, com concentração inicial do inóculo $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

A microalga foi cultivada em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979) composto de (g L^{-1}): NaNO_3 (1,5); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ (0,006); Na_2CO_3 (0,02); $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,006) e 1 mL de solução A_5+Co (g L^{-1}): H_3BO_3 (2,86), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222), NaMoO_4 (0,015), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079) e $\text{Co}(\text{NO}_3) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0494). Os cultivos foram expostos a diferentes intensidades luminosas e fotoperíodos, redução do componente nitrogenado e substituição da fonte de carbono por D-xilose e L-arabinose (Vetec Química, Sigma, Aldrich Corporation). Os experimentos foram conduzidos em fotobiorreatores do tipo erlenmeyer de 2 L (volume útil 1,8 L), durante 10 dias e realizados em duplicata (com triplicata das análises).

2.2 ADIÇÃO DE PENTOSSES, VARIAÇÃO DE INTENSIDADE LUMINOSA E FOTOPERÍODO

Os ensaios com a microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foram expostos a iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W em estufa termostatzada à 30°C e realizados em duplicata. Os experimentos foram submetidos à adição de pentoses, variação de intensidade luminosa (58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e periodicidade de luz (12 h:12 h, 18 h:6 h, 6 h:18 h em ciclos claro:escuro).

Para os cultivos com adição das pentoses D-xilose e L-arabinose (Vetec Quimica, Sigma, Aldrich Corporation), o componente nitrogenado (NaNO_3) foi reduzido em 50% (0,75 g L^{-1}), com retirada da fonte de carbono tradicional (Na_2CO_3) do meio BG-11. A adição de xilose e arabinose foi realizada por meio de caldo sintético, contendo 20 mg L^{-1} de pentoses, considerando as concentrações utilizadas por Freitas et al. (2016) e (2017). Foram realizados experimentos controle em todas as condições estudadas sem modificação do meio BG-11 e sem adição de pentoses. A Tabela 1 mostra as condições experimentais às quais a microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi exposta.

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.3.1 Concentração de biomassa

A concentração celular foi realizada por monitoramento diário via espectrofotometria (QUIMIS Q798DRM, Diadema- SP -Brasil) à 670 nm, correlacionada com curva padrão previamente determinada de *Chlorella fusca* LEB 111, relacionando o peso seco e a densidade ótica correspondente (COSTA et al., 2002).

2.4 RESPOSTAS AVALIADAS

2.4.1 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade máxima de biomassa foi determinada conforme Equação 1 onde X_t é a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (g L^{-1}) no tempo t_0 (d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$P_{\max} = \frac{(X_t - X_0)}{t - t_0} \quad (1)$$

2.4.2 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima foi determinada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento.

2.5 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO POLI-HIDROXIBUTIRATO

Para a caracterização do biopolímero, foram retiradas amostras no 10º dia de cultivos e submetidas à metanólise. Para o método de metanólise, foram utilizados 15 mg de biomassa submetida à extração dos pigmentos com álcool metílico 99,8% (v v⁻¹), de acordo com método de extração de pigmentos proposto por Lichtenthaler (1987). Após a retirada dos pigmentos a biomassa foi submetida à secagem (105 °C/ 24h) e realizado o processo de metanólise com 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol; 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988).

Após a metanólise os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (2014 Shimadzu, Japão), equipado com coluna capilar de sílica Restek-Rtx (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID). O gás hidrogênio foi usado como gás de arraste, com volume de injeção ajustado para 1 µL, com gradiente de temperatura da coluna de 60 °C por 2 min e taxa de incremento de 25 °C/min até 180 °C/8 min. A concentração de polímero foi calculada com curva padrão construída utilizando correlação de solução padrão de poli(ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol% HB e 12 mol% HV (Sigma Aldrich) (ZHANG et al., 2015).

2.6 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI, himac CR-GIII, Japão) a 9690 g, 20 °C e 20 min, ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada por 10 min nas mesmas condições de temperatura e centrifugação para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada em ultra freezer (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) por 48 h a -80 °C e posteriormente liofilizada (LAB CONCO, EUA). As amostras liofilizadas foram mantidas em freezer a -20 °C para posterior caracterização quanto ao teor de proteínas, lipídios e carboidratos.

2.6.1 Concentração de proteínas e carboidratos

2.6.1.1 Preparo da amostra

A análise de proteínas e carboidratos foi realizada a partir de extratos preparados com 5 mg de biomassa da microalga e 10 mL de água destilada, sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA), com 10 ciclos de funcionamento, sendo 1 min ligado e 1 min desligado. Este procedimento foi utilizado para liberar o material intracelular da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 no meio líquido.

2.6.1.2 Concentração de carboidratos

A concentração total de carboidratos na biomassa foi determinada pelo método fenol-sulfúrico utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956).

2.6.1.3 Concentração de proteínas

A concentração de proteína total da biomassa foi determinada no final dos ensaios, através do método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino.

2.6.2 Concentração de lipídios totais

A concentração de lipídios na biomassa foi determinada pelo método de Folch (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957), utilizando como solventes clorofórmio e metanol.

2.7 DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA

A extração de clorofila foi realizada de acordo com metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). O teor de clorofila foi determinado em 1 mL de cultivo líquido, centrifugado a 2000 g durante 5 min e os pelets foram ressuspensos em álcool metílico 99,8% ($v v^{-1}$), para quantificação da clorofila foram utilizadas as Equações 2, 3 e 4.

$$C_a = 16,72A_{665,2} - 9,16A_{652,4}$$

(2)

$$C_b = 34,09A_{652,4} - 15,28A_{665,2} \quad (3)$$

$$C_{a+b} = 1,44A_{665,2} + 24,93A_{652,4} \quad (4)$$

onde:

C_a : Clorofila a

C_b : Clorofila b

C_{a+b} : Clorofila a + Clorofila b

2.8 PERFIL PROTEICO

As proteínas foram extraídas a cada 48 h por adição de tampão de amostra (80 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mol L⁻¹ de 2-mercaptoetanol, 2% (v v⁻¹) de dodecilsulfato de sódio-SDS, 15% (v v⁻¹) glicerol e 0,006% (v v⁻¹) de roxo cresol e aquecidos durante 5 minutos a 100°C, seguido de centrifugação a 10 000 g durante 1 min. As amostras foram então submetidas a eletroforese descontínua (SDS – PAGE) em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada de acordo com Laemmli (1970), usando um gel de concentração de acrilamina a 5% e 12,5% de gel de separação de acrilamida.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas foram avaliadas por meio de análise de variância, seguida por teste de Tukey, com nível de 99% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROALGAL

A cepa de *C. fusca* quando submetida a variações de intensidade luminosa, em um mesmo fotoperíodo (12 h de luz), apresentou diferentes perfis de crescimento (Figura 1). Leite et al. (2015) avaliaram a adição de pentoses em cultivos de *Chlorella*, com adição de xilose, e observaram que a microalga é capaz de atingir crescimento máximo de 0,33 g L⁻¹ e 0,19 g L⁻¹, em cultivos mixotrófico e heterotrófico respectivamente, estas condições contribuindo para a não ocorrência da fase *lag* para *Chlorella*. Tal comportamento também ficou evidente no presente estudo, em que *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou crescimento exponencial sem fase de adaptação quando submetida à complementação com pentoses, variação de intensidades luminosas (58 e 28 μmol m⁻² s⁻¹) e 18 h de luz, até o 10º dia de cultivo sem apresentar morte celular (Figura 1 a,b). No mesmo fotoperíodo e menor intensidade luminosa

($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a cepa apresentou fase de adaptação, para os ensaios controle e com adição de xilose e arabinose (Figura 1 c). Acredita-se que a cepa *C. fusca* adaptou-se a periodicidade de luz (18 h) sendo suficiente para que ocorresse a renovação das taxas de crescimento vinculadas aos fotossistemas microalgais.

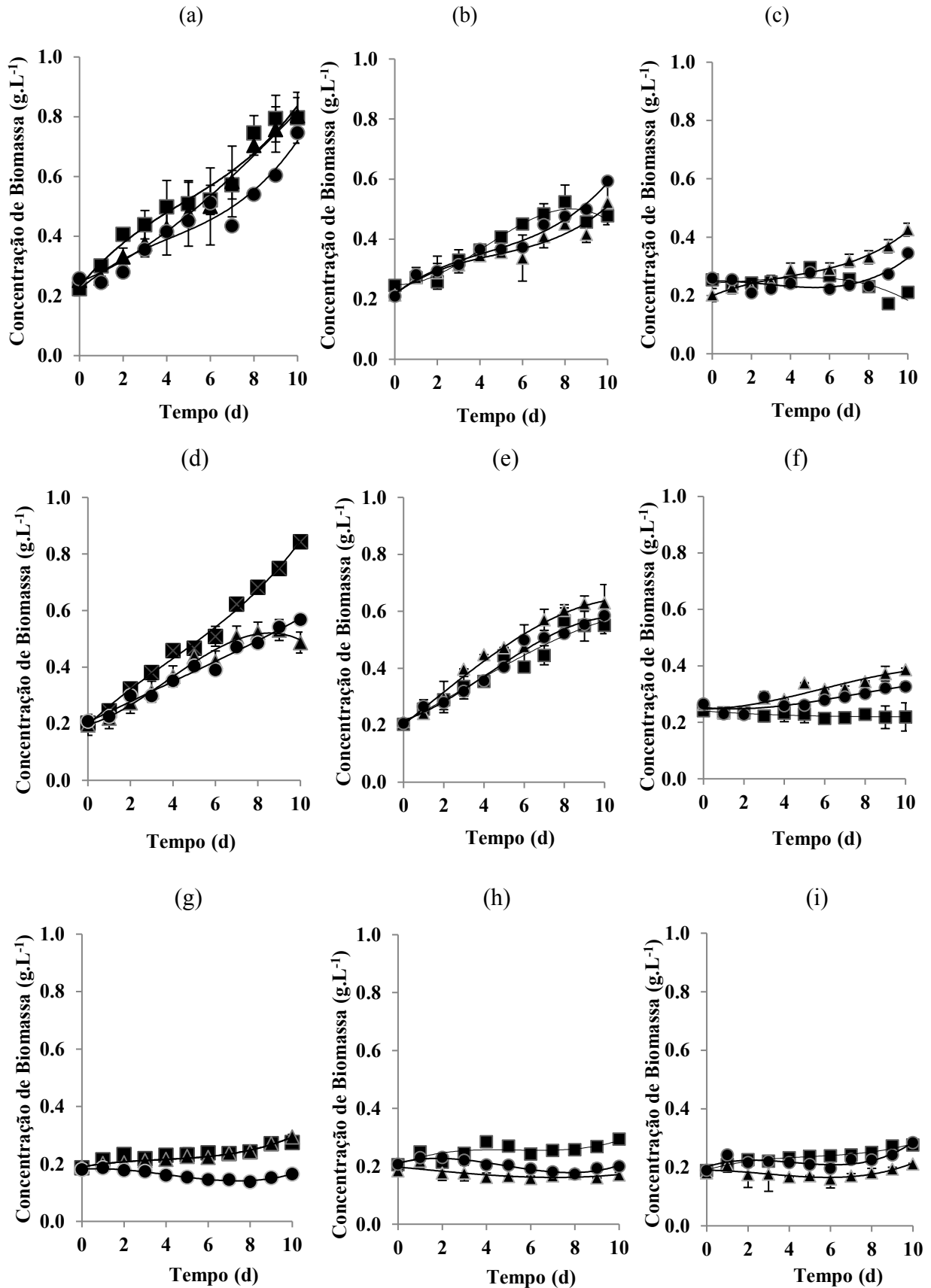
O uso de xilose em cultivos de *Chlorella* contribuí para a relação C/N, como indicado em estudos realizados por Freitas et al. (2016), em que as maiores densidades celulares foram obtidas com a redução de 50% do composto nitrogenado e adição de pentoses. Igualmente no presente estudo onde a adição de xilose e 18 h de luz favoreceram o crescimento celular ($0,80 \text{ g L}^{-1}$), seguido de cultivo com arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1}$) para o mesmo fotoperíodo, ambos com redução do composto nitrogenado (Tabela 1).

O uso da menor intensidade luminosa ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com fornecimento de período de luz de 18 h, atingiu crescimento celular máximo de $0,44 \text{ g L}^{-1}$. Xu, Ibrahim e Harvey (2016) atribuíram que a intensidade luminosa pode ser o único responsável pela modificação do crescimento celular em culturas mixotróficas, devido aos metabolitos envolvidos nas taxas de renovação celular. As mudanças nos períodos de fornecimento de luz produzem diferenças bioquímicas com ativação dos fotossistemas por maiores períodos, desencadeando resultados quanto à cinética de crescimento (ZHENG et al., 2014), como foi observado no presente trabalho e por Khoeyi, Seyfabadi, Ramezanpour (2012). Khoeyi, Seyfabadi, Ramezanpour (2012) em estudo com período de luz 16 h e intensidade luminosa $37,5$ e $62,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtiveram aumento da biomassa de *C. vulgaris* ($0,6$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente).

A concentração celular máxima para *Chlorella fusca* para o fotoperíodo 12 h de luz foi $0,63 \text{ g L}^{-1}$ com adição de xilose e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este resultado demonstra que é atribuída a cultivos mixotróficos a ocorrência de diferentes respostas de crescimento, devido a esta forma de cultivo desencadear modificações nas formas de absorção das fontes de carbono (LEITE et al., 2015; ZHENG et al., 2014).

Diante do exposto, pode-se observar que o meio BG-11 sem suplementação da fonte de carbono por pentoses não se mostrou capaz de suprir a demanda nutricional de carbono orgânico em conjunto com baixas intensidades luminosas para o crescimento de *Chlorella fusca* (Figura 1).

Figura 1 - Perfil de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 para os ensaios: (■) Controle, (▲) Xilose (●) e Arabinose, 50% de nitrogênio no fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa (a) $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b) $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (c) $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (■) Controle, (▲) Xilose e (●) Arabinose; fotoperíodo 12 h de luz com intensidade luminosa (d) $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (e) $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (f) $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (■) Controle, (▲) Xilose e (●) Arabinose e fotoperíodo 6 h de luz submetidos à (g) $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (h) $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e (i) $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Estudos relatam que a eficiência de rendimento do fotossistema II podendo ser medido pela proporção entre a eficiência quântica potencial do PSII relacionado com os centros de reação (FV/FM). Indicando que esta proporção reduz com o aumento da intensidade luminosa, atingindo limite de ação fotossintética com irradiação de fótons de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz (FU et al., 2017), o que pode justificar a não ocorrência de morte celular nas condições de menor intensidade luminosa ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) do presente estudo.

O componente nitrogenado é constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário microalgal (LOURENÇO, 2006), ao realizar a redução do composto nitrogenado em 50% (NaNO_3 $0,75 \text{ g L}^{-1}$) juntamente com o fornecimento de 6 h de luz ao cultivo, pareceu não suprir a demanda necessária para que ocorresse crescimento celular de *Chlorella fusca* quando submetida as menores intensidades luminosas (Figura 1 g, h, i).

A produtividade de biomassa no fotoperíodo 18 h de luz e $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para xilose, sendo este valor superior as condições controle de Krzeminska et al. (2014), com Chlorofita do gênero *Botriococcus braunii* ($0,034 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) quando fornecido variação de intensidade luminosa semelhante ao do presente estudo.

A maior velocidade específica de crescimento foi atingida com a condição de intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h de luz em conjunto com a adição de xilose ($0,23 \text{ d}^{-1}$), esta diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) das demais, com exceção dos experimentos com adição de arabinose ($0,20 \text{ d}^{-1}$) fotoperíodo 18 h de luz e menor intensidade luminosa e xilose ($0,16 \text{ d}^{-1}$) com fornecimento de 12 h de luz e $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Freitas et al. (2017), com *Chlorella minutíssima* cultivada em fotobiorreator tipo raceway, com adição de xilose e intensidades luminosas semelhantes obteve resultado de velocidade de crescimento celular de $0,17 \text{ d}^{-1}$. Tais resultados indicam que a geometria do biorreator em conjunto com as diferenças no aparelho fotossintético de cada espécie de *Chlorella* (ZHENG et al., 2014) resultam em diferenças quanto à velocidade de crescimento e produtividade microalgal.

A modificação na periodicidade do fornecimento de luz pode vir a desencadear alterações no metabolismo fotossintético, que auxiliam na compreensão de fenômenos vinculados ao acúmulo de biomoléculas e na cinética de crescimento (HELENA; ZAINURI; SUPRIJANTO, 2016). Os resultados de crescimento (Tabela 1) demonstram efeito positivo em *C. fusca* LEB 111 e fotoperíodo 18 h luz para os cultivos com adição de pentoses e variação de intensidade luminosa.

Tabela 1- Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g L⁻¹), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹), produção de PHB (%), m m⁻¹) (média±desvio padrão) para *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada em diferentes fotoperíodos, intensidades luminosas (I, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fontes de carbono.

Fotoperíodo 18 h luz					
Fonte de carbono	I	$X_{\text{máx}}$	$P_{\text{máx}}$	$\mu_{\text{máx}}$	PHB (%)
Controle	58	0,80±0,08 ^{ij}	0,09≤0,01 ^g	0,11≤0,01 ^{a,b,c,d}	0,5±0,1 ^a
Xilose	58	0,80±0,06 ^j	0,06≤0,01 ^{e,f}	0,12≤0,01 ^{b,c,d}	3,4±0,3 ^a
Arabinose	58	0,75≤0,01 ^{h,i,j}	0,05≤0,01 ^{d,e,f}	0,13≤0,01 ^{c,d}	1,6±0,5 ^a
Controle	28	0,48±0,03 ^{d,e,f,g}	0,03≤0,01 ^{b,c,d,e}	0,15±0,01 ^{a,b,c,d}	0,7±0,3 ^a
Xilose	28	0,52≤0,01 ^{d,e,f,g}	0,03≤0,01 ^{a,b,c}	0,08±0,01 ^{a,b,c}	3,5±1,0 ^a
Arabinose	28	0,60≤0,01 ^{f,g,h,i}	0,03≤0,01 ^{a,b,c}	0,11±0,01 ^{a,b,c,d}	14,0±1,4 ^{c,d}
Controle	9	-	-	-	0,5±0,1 ^a
Xilose	9	0,44≤0,01 ^{b,c,d,e,f,g}	0,02≤0,01 ^{a,b}	0,13±0,03 ^{b,c,d}	16,2±0,8 ^d
Arabinose	9	0,35≤0,01 ^{a,b,c,d,e}	0,04≤0,01 ^{a,b}	0,20±0,03 ^f	4,9±0,5 ^a
Fotoperíodo 12 h luz					
Controle	58	0,84±0,02 ^j	0,06≤0,01 ^{f,g}	0,13≤0,01 ^{c,d,e}	5,5±0,2 ^a
Xilose	58	0,53±0,06 ^{d,e,f,g,h}	0,05≤0,01 ^{d,e,f}	0,16≤0,01 ^{d,e,f}	5,5±1,4 ^{a,b}
Arabinose	58	0,57±0,02 ^{f,g,h}	0,05≤0,01 ^{c,d,e,f}	0,10≤0,01 ^{a,b,c,d}	10,7±1,1 ^c
Controle	28	0,57±0,05 ^{f,g,h}	0,06±0,03 ^f	0,10≤0,01 ^{a,b,c,d}	2,1±0,3 ^a
Xilose	28	0,63±0,02 ^{g,h,i,j}	0,06≤0,01 ^{d,e,f}	0,23±0,01 ^{e,f}	2,7±0,5 ^a
Arabinose	28	0,59±0,01 ^{c,d,e,f,g}	0,05≤0,01 ^{e,f}	0,11≤0,01 ^{a,b,c,d}	1,6±0,1 ^a
Controle	9	-	-	-	2,9±0,8 ^a
Xilose	9	0,39±0,01 ^{a,b,c,d,e,f}	0,01±0,02 ^{a,b,c}	0,06±0,01 ^{a,b}	10,2±1,5 ^{b,c}
Arabinose	9	0,33±0,01 ^{a,b,c,d}	0,02±0,01 ^{a,b}	0,05±0,01 ^a	4,6±0,4 ^a
Fotoperíodo 6 h luz					
Controle	58	0,60±0,01 ^{e,f,g,h}	0,04±0,01 ^{b,c,d,e}	0,10±0,01 ^{a,b,c,d}	5,3±1,0 ^{a,b}
Xilose	58	0,30±0,01 ^{a,b,c}	0,01±0,01 ^{a,b}	0,10±0,01 ^{a,b,c,d}	5,3±0,4 ^{a,b}
Arabinose	58	0,18±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	-	5,3±1,1 ^{a,b}
Controle	28	0,29±0,01 ^{a,b,c}	0,04±0,01 ^{a,b}	0,07±0,01 ^{a,b,c}	1,6±0,6 ^a
Xilose	28	0,21±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	-	17,4±1,5 ^d
Arabinose	28	0,28±0,01 ^{a,b}	0,06±0,01 ^{d,e,f}	0,12±0,01 ^{c,d}	3,1±0,6 ^a
Controle	9	0,28±0,01 ^{a,b}	0,02±0,01 ^{a,b,c}	-	5,7±0,8 ^a
Xilose	9	0,26±0,02 ^a	0,01±0,01 ^{a,b}	0,10±0,01 ^{a,b,c,d}	5,3±0,01 ^{a,b}
Arabinose	9	0,23±0,01 ^a	0,01±0,01 ^{a,b}	0,07±0,01 ^{a,b,c}	1,9±0,3 ^a

Controle: 0,02 g L⁻¹ Na₂CO₃; Xilose: 20 mg L⁻¹ D-xilose; Arabinose: 20 mg L⁻¹ L-arabinose. *Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna correspondem à diferença significativa (p ≤ 0,01). **Linhas com o símbolo -, representam morte celular, sem ser possível a quantificação dos mesmos.

Zheng et al. (2014) descreveram o metabolismo de absorção de pentoses em *Chlorella sorokiniana*, onde transportadores específicos realizam a absorção inter-membranas de D-xilose e L-arabinose. O que facilita a manutenção de condições mixotróficas, utilizando pentoses como fonte nutricional para o crescimento microalgal (FREITAS et al., 2016). Justificando o fator de conversão de pentoses em biomassa observada ($Y_{S/B}=0,04 \text{ mg mg}^{-1}$), esta não diferindo estatisticamente das demais ($p \leq 0,05$).

3.2 PRODUÇÃO DE PHB

Acredita-se que seja essencial que aja uma elevada concentração de lipídios na biomassa microalgal para que ocorra maior acúmulo de PHB (MORAIS et al., 2017; MARTINS et al., 2014). Deve se considerar que para o metabolismo fotossintético a luz solar é a principal fonte de energia microalgal, sendo a fonte de energia necessária para a absorção de carbono inorgânico, para que ocorra o acúmulo de corpos lipídicos (KNOOP et al., 2013). Com o fornecimento ao cultivo de *C. fusca* de 6 h luz e suplementação de xilose, ocorreu maior acúmulo do polímero 17,4% (m m^{-1}). Em condições de cultivo sem modificação do meio nutricional utilizando meio Bold Basal Medium (BBM) a Chlorofita *Botriococcus braunii* acumulou 16,4% (m m^{-1}) de PHB, sendo este o estudo precursor da identificação deste componente em Chlorofitas (KAVITA; KURINJIMALAR; SIVAKUMAR, 2016).

Pode-se observar o fornecimento de 12 h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com adição de arabinose (20 mg L^{-1}) a microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou concentração de PHB de 10,7% (m m^{-1}). Para o mesmo fotoperíodo (12 h de luz) e menor intensidade luminosa ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) com adição de xilose, a concentração do polímero manteve-se elevada, em 10,2% (m m^{-1}), ambas com concentrações superiores as identificadas nos cultivos controle que apresentaram 5% e 2,9 % (m m^{-1}) (Tabela 1).

Coelho et al. (2015) realizando cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 em meio Zarrouk com redução do composto nitrogenado obteve crescimento celular reduzido ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) e concentração de PHB 13,4%, porém com extração via digestão diferencial, resultando em valor semelhante aos encontrados neste estudo. Os valores de concentração de PHB alcançados no presente estudo indicam respostas superiores aos obtidos por Kavita, Kurinjimalar e Silvakumar (2016), estes autores obtiveram até 16,4% de PHB, com quantificação via cromatografia, para *Botriococcus braunii* em ensaios com 60% de água residual de esgoto como meio de crescimento.

As variações na concentração do biopolímero são diretamente afetadas pelo crescimento celular do micro-organismo, pois quanto menor o crescimento celular, maior será a tendência de acúmulo do polímero, visto que a microalga não estará utilizando a fonte de carbono para seu crescimento (MARKOU; NERANTZIS, 2013). Acredita-se que o armazenamento de energia em forma de compostos carbônicos durante a fase de luz indica que menores tempos de luz, seja uma estratégia necessária para atender aos requisitos de manutenção durante o ciclo escuro (BAROUK et al., 2016). A redução dos tempos de exposição à luz resultou em acúmulo de PHB, indicando a potencialidade quanto à redução de custos vinculados a fatores físicos.

De acordo com Zheng et al. (2014) para ocorrer assimilação de pentoses por Chlorofitas é necessário mecanismos de transporte de D-xilose e sistemas de elevada afinidade em conjunto com transportadores de D-glicose, para espécies não nativas. Estes mecanismos liberam moléculas de NADH, deixando esta molécula reduzida disponível para uma possível metabolização para síntese de PHB. Para que ocorra a síntese de PHB deve ocorrer à conversão de acetoacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase sendo necessário um gradiente de moléculas reduzidas para produção do composto D-3-hidroxi-butarato precursor da molécula de poli-hidroxi-butarato (SUDESH; ABE; DOI, 2000; BAROUK et al., 2016). Com isso, a liberação das moléculas de NADH, resultantes do metabolismo das pentoses pode resultar no estímulo da produção de polímero, ainda pouco explorado em Chlorofitas, onde estas rotas metabólicas descritas são predições das reações que podem estar ocorrendo intracelularmente.

O metabolismo de micro-organismos fotossintéticos quando submetidos à variação de fotoperíodo em conjunto com a redução do composto nitrogenado pode convergir para o acúmulo de lipídios de reserva, como o PHB (MORAIS et al., 2017). Quando os cultivos são submetidos à modificação de fotoperíodo com ciclos em 18 h luz e 6 h escuro, e intensidades luminosas 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, *C. fusca* LEB 111 mostrou capacidade de acumular em maiores concentrações, 14 e 16,2% (m m^{-1}) o polímero PHB com adição de arabinose e xilose respectivamente. Estudos revelam que cultivos utilizando glicose e acetato de sódio como fonte de carbono orgânico, e bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico em diferentes concentrações, influenciaram positivamente o acúmulo de PHA's (MARTINS et al., 2014). Os cultivos com adição de xilose, quando submetidos à fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa 58 e 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente, atingiram concentração em torno de 3,5% (m m^{-1}), não diferindo estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) (Tabela 1). Indicando que um dos fatores atuantes neste estudo, além da adição de pentoses

foi à limitação de nitrogênio nas células de Chlorofitas, que desencadeou conversão do metabolismo microalgal para a redução da produção de proteínas ocorrendo acúmulo de ATP. Este que em excesso provoca a redução da fosforilação oxidativa, levando ao acúmulo de coenzimas precursoras da produção de PHB como NADH (WU; WU; SHEN, 2006; HONDO et al., 2015). Assim como para os resultados obtidos para *Chlorella fusca* a quantidade de nitrogênio disponível em cultivo de microalgas da espécie *Spirulina* sp. foi fator determinante para a elevar o rendimento de PHB, elevando a concentração de 10,2% para 40%, quando reduzido o composto nitrogenado em 10% (0,25 g L⁻¹) com extração via digestão diferencial, não quantificando somente compostos pertencentes a classe dos PHA's (MARTINS et al., 2014).

A modificação do fotoperíodo, com menores períodos de luz, atua no metabolismo microalgal, desencadeando flutuações no balanço ATP/NADPH, auxiliando na produção de hidróxidos de carbono, pois esta relação atua como válvula de controle em conjunto com a molécula de acetil-CoA da produção de PHB (BAROUK et al., 2016). Com o fotoperíodo 6 h de luz pode-se observar que as condições controle com intensidade luminosa 58 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sem redução do composto nitrogenado (NaNO₃ 1,5 g L⁻¹) apresentaram valores de 5,3 e 5,7% (m m⁻¹), não diferindo estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Acredita-se durante a fotossíntese as fases desta são direcionadas de acordo com o fornecimento de luz, sendo a fase fotoquímica dependente da luz e uma fase escura bioquímica independente de luz. Os compostos que são produzidos na fase dependente da luz, são utilizados na fase escura para síntese de moléculas essenciais ao crescimento permitindo o crescimento celular mesmo em condições de *stress* (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2006; UGWU; AOYAGI, 2012), o que foi evidenciado nos ensaios com adição de xilose e arabinose nas três intensidades luminosas estudadas, onde mesmo com baixos períodos de luz ocorreu a formação de PHB.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de PHB por Chlorofitas deve ser mais explorada uma vez que, as vias de produção são consolidadas somente em cianobactérias. As modificações físicas de periodicidade de luz e intensidade luminosa, aliados a adição de pentoses e redução do nitrogênio, indicam que os processos desenvolvidos no presente estudo auxiliam a demonstrar que a produção de PHB por Chlorofitas é possível. Indicando mecanismos intracelulares e possibilitando a futura identificação de rotas para complementar a produção direcionada de biomoléculas específicas no campo da biotecnologia microalgal.

3.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que no presente estudo ocorreu incremento no teor de carboidratos (38,7% $m\ m^{-1}$) para a condição controle com intensidade luminosa intermediária (28 $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$) e 6 h de fornecimento de luz. A periodicidade de 18 h de luz e intensidade luminosa 58 e 28 $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$ forneceu resultados positivos quanto à produção de carboidratos, resultando em 26,5 e 24,5% ($m\ m^{-1}$) nos ensaios com adição de xilose (Tabela 2). Tais respostas indicam que o ciclo de Calvin o qual é responsável por produzir açúcares que serão acumulados nos plastídeos, foi desviado para a produção de outros compostos, não sendo os compostos de reserva (carboidratos) ou componentes de parede (TRIVEDI et al., 2015).

Deamici et al. (2016) determinaram em células de *Chlorella fusca* 25,2% de carboidratos, quando esta foi submetida à condição igual ao controle deste estudo BG-11 (RIPKA, 1979) em reator tubular. Sendo estes resultados semelhantes aos resultados obtidos para a condição controle no presente estudo (21,8% $m\ m^{-1}$) com intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$ e 12 h de período de luz. A síntese de carboidratos pode ser resultado de estímulos dos sistemas envolvidos nas reações de Calvin-Benson, uma vez que os produtos das reações de luz deste metabolismo são a produção de ATP e NADPH, estes que são utilizados para fixar carbono em açúcares (ZHANG et al., 2015).

A maior concentração de proteínas foi obtida com adição de xilose e 6 h de fornecimento de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol}\ m^{-2}\ s^{-1}$, apresentando diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) das demais condições com 53,2% ($m\ m^{-1}$) (Tabela 2). Por sua vez a concentração proteica é estimulada, por vias metabólicas que reduzem a fixação de carbono para produção de carboidratos, resultando em maiores teores de proteínas. A oscilação na composição bioquímica da *Chlorella* pode ser resultado da modificação do fornecimento de períodos de luz, onde menores fotoperíodos possuem características de modificar a permeabilidade das membranas celulares, ajustando assim a forma e quantidade de absorção e assimilação de nutrientes do meio de cultivo (MAEDA; THOMPSON, 1986).

Tabela 1 - Conteúdo de carboidratos (% m m⁻¹), proteínas (% m m⁻¹) e lipídios (% m m⁻¹) (media ± desvio padrão) para a biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, submetida à modificação no fotoperíodo, intensidade luminosa (I, μmol m⁻² s⁻¹) e fontes de carbono.

Fotoperíodo 18 h luz				
Fonte de carbono	I	Carboidratos	Proteínas	Lipídios
Controle	58	22,6±1,1 ^{g,h}	34,0±0,3 ^{b,c,d,e,f,g}	20,5±2,9 ^{c,d,e,f,g}
Xilose	58	26,5±0,6 ⁱ	47,9±0,2 ^m	22,3±0,2 ^{e,f,g,h}
Arabinose	58	21,2±0,3 ^{f,g,h}	27,1±0,6 ^a	17,2±0,2 ^{a,b,c,d}
Controle	28	20,3±0,01 ^{e,f,g}	29,7±0,4 ^{a,b}	25,5±0,7 ^h
Xilose	28	24,5±0,01 ^{h,i}	33,3±1,0 ^{b,c,d,e,f}	18,8±1,1 ^{b,c,d,e,f}
Arabinose	28	19,2±0,7 ^{d,e,f,g}	29,4±0,7 ^{a,b}	16,0±0,2 ^{a,b,c}
Controle	9	20,6±1,6 ^{e,f,g}	31,5±0,2 ^{a,b,c,d}	16,4±0,6 ^{a,b,c,d}
Xilose	9	18,6±0,1 ^{c,d,e,f}	29,5±0,7 ^{a,b}	24,7±0,2 ^{g,h}
Arabinose	9	17,0±0,1 ^{c,d,e}	33,9±0,2 ^{b,c,d,e,f,g}	17,9±0,3 ^{a,b,c,d,e}
Fotoperíodo 12 h luz				
Controle	58	21,8±0,3 ^{f,g,h}	42,6±0,9 ^{j,k,l}	19,4±0,4 ^{b,c,d,e,f}
Xilose	58	19,5±0,4 ^{d,e,f,g}	35,5±0,9 ^{c,d,e,f,g,h}	19,5±0,01 ^{b,c,d,e,f}
Arabinose	58	21,9±0,1 ^{f,g,h}	38,5±0,2 ^{g,h,i,j}	19,4±0,4 ^{b,c,d,e,f}
Controle	28	11,5±0,01 ^a	41,9±0,3 ^{i,j,k,l}	16,2±0,9 ^{a,b,c,d}
Xilose	28	20,6±0,1 ^{e,f,g}	37,1±1,2 ^{e,f,g,h,i}	19,2±0,01 ^{b,c,d,e,f}
Arabinose	28	16,4±0,01 ^{b,c,d}	37,6±1,8 ^{f,g,h,i}	18,4±0,01 ^{b,c,d,e,f}
Controle	9	17,0±0,9 ^{c,d,e}	40,0±0,01 ^{h,i,j,k}	16,0±0,3 ^{a,b,c}
Xilose	9	15,0±1,4 ^{a,b,c}	32,8±0,01 ^{b,c,d,e}	22,1±2,8 ^{e,f,g,h}
Arabinose	9	19,4±0,3 ^{d,e,f,g}	38,0±0,3 ^{f,g,h,i,j}	18,2±0,9 ^{a,b,c,d}
Fotoperíodo 6 h luz				
Controle	58	18,6±0,1 ^{c,d,e,f}	46,4±1,9 ^{l,m}	22,9±0,01 ^{f,g,h}
Xilose	58	13,1±0,3 ^{a,b}	53,2±0,3 ⁿ	18,3±0,9 ^{b,c,d,e}
Arabinose	58	16,8±0,6 ^{b,c,d,e}	35,1±1,3 ^{c,d,e,f,g}	14,9±0,6 ^{a,b}
Controle	28	38,7±0,4 ^j	40,9±0,3 ^{i,j,k}	17,0±0,3 ^{a,b,c,d}
Xilose	28	16,2±0,4 ^{b,c,d}	31,0±1,3 ^{a,b,c}	20,7±0,9 ^{d,e,f,g}
Arabinose	28	21,9±0,1 ^{f,g,h}	32,1±0,01 ^{b,c,d}	18,6±0,8 ^{b,c,d,e,f}
Controle	9	21,6±1,7 ^{f,g,h}	43,6±0,5 ^{k,l,m}	15,3±0,7 ^{a,b}
Xilose	9	19,3±0,01 ^{d,e,f,g}	36,0±0,4 ^{d,e,f,g,h}	15,0±0,8 ^{a,b}
Arabinose	9	21,4±2,0 ^{f,g,h}	45,9±2,9 ^{l,m}	13,5±0,1 ^a

Controle: 0,02 g L⁻¹ Na₂CO₃; Xilose: 20 mg L⁻¹ D-xilose; Arabinose: 20 mg L⁻¹ L-arabinose.

*Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna correspondem à diferença significativa (p ≤ 0,01).

O tipo de reator, forma de condução de cultivo em conjunto com fatores como intensidade luminosa e fotoperíodo, são essenciais para determinar qual mecanismo de absorção o micro-organismo irá adotar para a produção das biomoléculas de interesse (XU; IBRAHIM; HARVEY, 2016). Como demonstrado nos resultados obtidos, e por Freitas et al. (2017) que com variação de intensidade luminosa semelhante ($33,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), porém com cepa de *C. minutissima* e fotobiorreator do tipo raceway, alcançou incremento protéico inferior ao encontrado no presente estudo com adição de pentoses.

No presente estudo observa-se valores superiores de lipídios aos encontrados por Deamici et al. (2016) (13%) com cepa de *C. fusca* em meio de cultivo BG-11 ocorreu incremento na concentração de lipídios para os três fotoperíodos estudados, sendo que para adição de xilose, fotoperíodo de 18 h de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a maior concentração lipídica foi 24,7% (m m^{-1}). Este incremento no teor lipídico é consequência da deficiência de nitrogênio, redução da luminosidade e adição de pentoses. O estudo realizado por Xu, Ibrahim e Harvey (2016), determinou que o estresse causado pela redução do composto nitrogenado ou por exposição ao excesso de luz está relacionado com o aumento do teor lipídico em específico os triacilgliceróis.

Quando os cultivos microalgais são expostos à condições de estresse, pode ocorrer o acúmulo lipídico, e sob condições ótimas de cultivo, as microalgas tendem a utilizar a energia disponível para multiplicação celular (SHIVANI et al., 2015). Tal modificação do metabolismo foi identificado no presente estudo e por Duarte e Costa (2018), para estes autores a variação da intensidade luminosa com diodos azuis nos cultivos de *Chlorella fusca*, levou ao incremento na produção de lipídios para 23% e 22,7% com intensidade luminosa 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

A redução da concentração celular aumenta a quantidade de luz disponível às culturas dos cultivos, podendo favorecer o acúmulo lipídico (SEOANE; MANFREDI; CYRAS, 2015). A tendência de incremento nos teores lipídicos em células microalgais em conjunto com a menor produção de biomassa foi identificada no presente estudo. Com adição de xilose, fotoperíodo de 6 h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorreu baixo crescimento celular, com aumento de lipídios (20,6% m m^{-1}), assim como para intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de mesmo fotoperíodo, obteve-se 15% (m m^{-1}) de lipídios. Acredita-se que a disponibilidade de carbono fornecido a microalga *Chlorella fusca* em conjunto com a variação de intensidade luminosa e periodicidade de luz, proporcionou acúmulo de biomoléculas como carboidratos, proteínas e lipídios em elevadas concentrações na biomassa final.

3.4 COMPOSIÇÃO DE CLOROFILAS

Durante as primeiras 48 h de análise pode-se observar que os níveis de clorofila aumentaram para as intensidades luminosas 58 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Apêndice 3), com exceção para os ensaios com fornecimento de 6 h de luz. Após este primeiro período ocorreu oscilação no acúmulo de pigmentos em conjunto com a variação das condições de fornecimento de intensidade luminosa (58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e adição de pentoses. A redução de nitrogênio desencadeia diversas respostas metabólicas em microalgas, como a degradação dos compostos e a alterações nos pigmentos fotossintéticos (FREITAS et al., 2016). Além disso, o consumo de nitrogênio fornecido aos cultivos resultou na oscilação dos pigmentos Chl-a e Chl-b, promovendo redução na quantidade destes e com isso no teor de clorofila total.

A exposição prolongada à luz é conhecida por induzir a fotoinibição, resultando em fotossistemas menos funcionais e por consequência diminuição do rendimento fotossintético (BAROLI; MELIS, 1988). O que não foi observado no presente estudo para os ensaios com 18h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Apêndice 3 Figura 1 a), uma vez, que nessas condições ocorreu incremento ao longo do período de cultivo para todas as condições nutricionais estudadas. Exceto para o comportamento observado para o 4º dia onde a redução na concentração de pigmentos totais.

Com o fornecimento de 12 h de luz e intensidade luminosa 58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi obtido o maior conteúdo de pigmentos 6,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na condição controle (Apêndice 3 Figura b). No decorrer do experimento ocorreu redução dos pigmentos fotossintetizantes para esta mesma condição. Demonstrando que o meio BG-11, sob condições controle não foi suficiente para manter estáveis as concentrações de pigmentos e funcionamento adequado do aparato fotossintetizante. Para as condições com adição de xilose e arabinose, o conteúdo de pigmentos foi 8,2 e 7,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para a condição de intensidade luminosa 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e período de 12 h de luz no 10º dia de cultivo. À partir do 6º dia de experimento pode-se observar (Apêndice 3 Figura 1 a) que ocorreu a degradação dos pigmentos nas condições submetidas à adição de pentoses.

Chokshi et al. (2015) mencionam que o estímulo da produção de clorofila, é indicador indireto quanto ao crescimento celular, pois a absorção celular pode estar sendo afetada pela variação de fótons emitidos aos cultivos. Acredita-se que esta relação foi obtidos nos experimentos com fornecimento de 18 h de luz e maior intensidade luminosa, nas condições controle, xilose e arabinose (Apêndice 3 Figura b).

O conteúdo de pigmentos na menor intensidade luminosa com fotoperíodo de 6 h de luz demonstra que as células de *Chlorella fusca*, podem ter utilizado as pentoses para suprir a respiração celular, levando oscilação nas concentrações de pigmentos (Apêndice Figura c).

Pode-se observar que a menor intensidade luminosa ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 2º dia de cultivo, para os três fotoperíodos estudados (18 h, 12 h e 6 h de luz) em conjunto com a adição de pentoses (xilose arabinose), foram as condições as quais demonstraram maiores concentrações de clorofila total com $2,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para xilose, $2,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ para arabinose e $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para xilose. A redução dos espectros de luz fornecidos ao micro-organismo em conjunto com a adição de pentoses forneceram condições para manter a concentração de pigmentos fotossintetizantes. Indicando que a adição de pentoses pode contribuir para maior eficiência fotossintética (FREITAS et al., 2016), mesmo em menores intensidades luminosas, uma vez que as variações nos teores de clorofila podem ocorrer como resposta às modificações de fatores físicos como aeração e/ou disponibilidade de nutrientes (DEAMICI et al., 2016).

Com 6 h de fornecimento de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi possível quantificar a produção de pigmentos para os dias 2 e 4. Enquanto que para os ensaios utilizando pentoses e controle com intensidade luminosa 58 e $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proporcionou pequeno ou nenhuma produção de pigmentos. Os dados obtidos sugerem que as células de *Chlorella fusca* ajustaram seus fotossistemas para alcançar melhores taxas fotossintéticas mesmo quando expostas a baixa intensidade luminosa (XU; IBRAHIM; HARVEY, 2016). Em condições de pouca luz, as microalgas realizam adaptações internas, como o aumento no conteúdo de clorofila para que ocorra maior eficiência na captura de luz (CARVALHO et al., 2011; DEAMICI; SANTOS; COSTA., 2018), fenômeno que pode ser observado no presente estudo. Freitas et al. (2016) determinaram que a limitação de nitrogênio em conjunto com a utilização de pentoses não desencadeia menores teores de pigmentos fotossintetizantes, sendo esta degradação o primeiro sintoma da ausência de nutrientes para a microalga.

Com a adição de pentoses, ocorreu incremento nos teores de clorofila total para a menor intensidade luminosa estudada nos três fotoperíodos estudados (18 h, 12 h e 6 h de luz). Pode-se identificar que para menores intensidades luminosas ocorreu elevação dos teores de pigmentos como mecanismo de defesa para que não ocorra morte celular da cepa de *Chlorella fusca* LEB 111, uma vez que um dos principais fatores que afetam a biossíntese de clorofila é a intensidade luminosa.

3.5 PERFIL PROTEICO

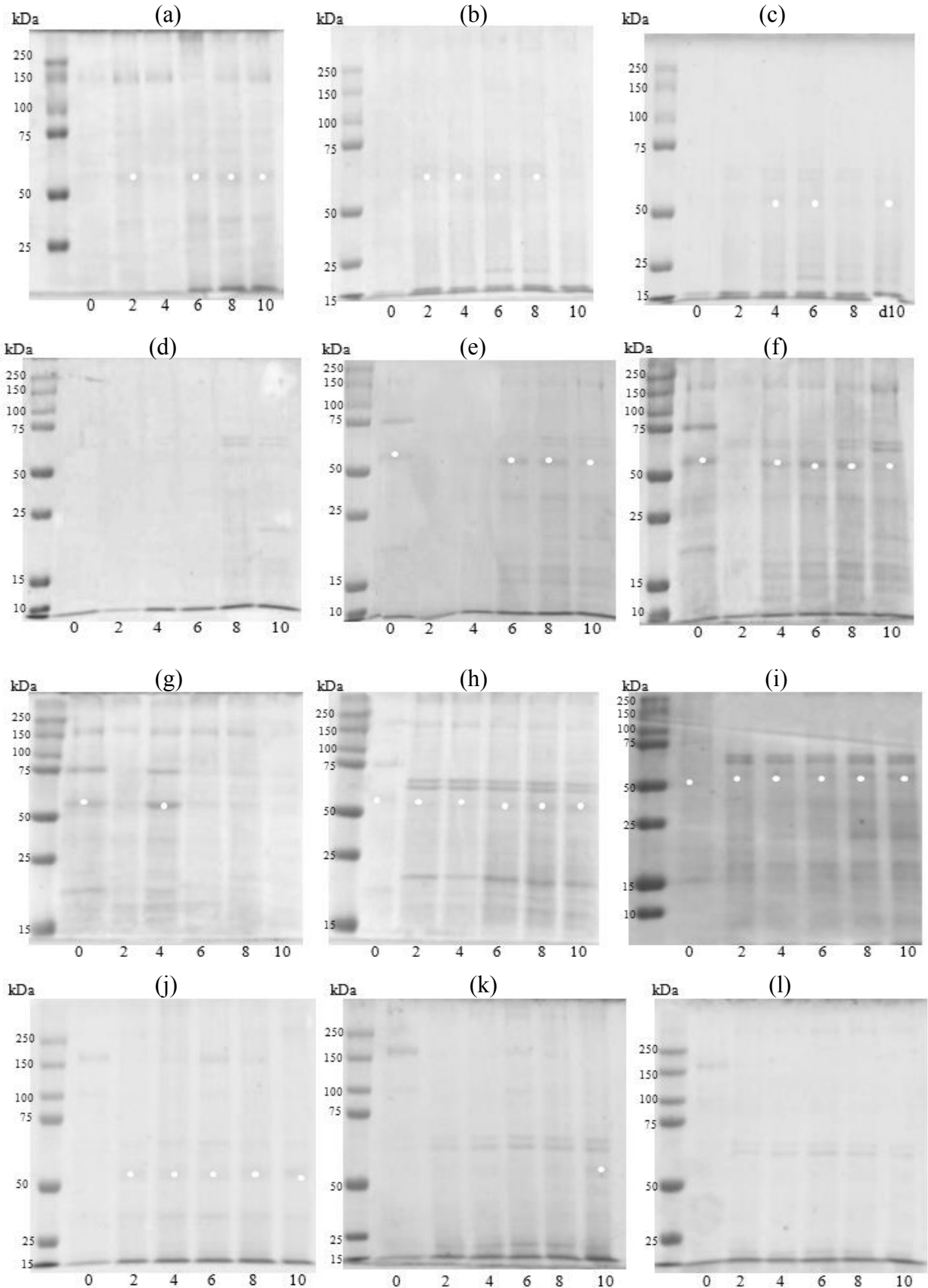
Os perfis de proteínas observados por análise de SDS-PAGE, revelaram diferentes conteúdos protéicos nos experimentos com adição de pentoses, redução do composto nitrogenado, variação de intensidade luminosa e periodicidade de luz ao longo dos 10 dias de cultivo para *Chlorella fusca* (Figura 2). Os experimentos os quais não apresentaram modificação no perfil protéico estão apresentados nos Apêndices.

A periodicidade de luz de 18 h desencadeou modificação no perfil de proteínas, sendo caracterizada pelo incremento detectado nas bandas da Rubisco de *Chlorella fusca* LEB 111, para a intensidade luminosa intermediária $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para a condição controle (Figura 2 a) pode ser observado degradação nos poços correspondentes aos dias 0 e 4 seguido de incremento nos ensaios com xilose (Figura 2 b) nos poços 2, 4, 6 e 8 e para arabinose nos dias 4, 6 e 10 de experimento (Figura 2 c). Os níveis de proteínas entre os dias 4 e 6 de cultivo com adição de pentoses e intensidade luminosa intermediária fornecida, apresentaram maior incremento da enzima Rubisco, indicando que para estes períodos podem ter ocorrido maiores taxas fotossintéticas e por consequência menores degradações desta enzima nos ensaios com pentoses.

A modificação da fonte de carbono no presente estudo, em conjunto com a redução da periodicidade de luz (12 h) e $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ desencadeou um possível incremento no perfil da enzima Rubisco (aproximadamente 56 KDa) (Figura 2 e,f). Esta enzima catalisa a fixação de dióxido de carbono à ribulose-1,5-bifosfato no ciclo de Calvin, produzindo 3-fosfoglicerato, sendo essencial para ocorrência da fotossíntese (ESQUÍVEL et al., 2006). De acordo com a Figura 2 foi observado que as maiores modificações nos perfis protéicos foram alcançadas nas condições com adição de 20 mg L^{-1} xilose e de arabinose, associadas a redução de 50% do composto nitrogenado.

As células expostas à intensidade luminosa intermediária em conjunto com adição de pentoses, desencadeou uma possível elevação na atividade fotossintética de *Chlorella fusca* LEB 111, podendo ser identificada pela maior visibilidade das bandas da enzima Rubisco. Quando reduzida a intensidade luminosa de 58 para $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fornecimento de 12 h de luz, foi possível a visualização mais acentuada da enzima Rubisco, desde o início dos cultivos para os ensaios com adição de xilose (poços 0 á 10, Figura 2 h) e arabinose (poços 0 á 10; Figura 2 i). Foi observado incremento nas bandas para a condição controle (Figura 2 g) nos tempos de cultivo 0 e 4 dia.

Figura 2 - Análise de SDS-PAGE dos experimentos com *Chlorella fusca* LEB 111, submetida à: fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) Controle, (b) Xilose e (c) Arabinose; fotoperíodo 12 h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (d) Controle, (e) Xilose e (f) Arabinose; intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (g) Controle, (h) Xilose e (i) Arabinose; fotoperíodo 6 h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, (j) Controle, (k) Xilose e (l) Arabinose.



Freitas et al. (2017) com culturas expostas à intensidade luminosa $8,44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com *Chlorella minutissima*, também observaram maiores intensidades de banda para Rubisco. Acredita-se que a enzima Rubisco por possuir papel fundamental na ação fotossintética e ser caracterizada por possuir atividade estável em condições normais, ao ser submetida a condições de estresse pode intensificar sua atividade para manutenção celular, tornando possível sua detecção em maiores níveis (ESQUÍVEL; FERREIRA; TEIXEIRA, 1998; FREITAS et al., 2017).

Com a periodicidade de 6 h luz pode-se observar uma tendência de modificação mais acentuada no perfil protéico, com intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As bandas correspondentes a enzima Rubisco, intensificaram seus níveis para condição controle, como observado nos poços 2, 4, 6, 8 e 10 (Figura 2 j). Com adição de xilose (poço 10) (Figura 2 k), pode-se perceber uma maior degradação dos níveis da Rubisco. O incremento na intensidade das bandas é diretamente afetado pela concentração da biomassa que esta sendo analisada nos cultivos. Menores períodos de luz induziram a menores crescimentos microalgais, não ocorrendo produção significativa de Rubisco. Estas respostas indicam que menores tempos de exposição à luz (6 h) em conjunto com adição de pentoses, podem não suprir a demanda fotossintética necessária para produção da enzima.

4 CONCLUSÃO

Com a periodicidade de 18 h de luz e suplementação de xilose (20 mg L^{-1}) foi obtida a melhor resposta quanto ao crescimento celular máximo ($0,80 \text{ g L}^{-1}$). Quanto à produção de PHB o menor tempo de fornecimento de luz de 6 h e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induziu os sistemas microalgais para produção de 17,4% (m m^{-1}) de PHB quando suplementado com xilose. A redução do composto nitrogenado juntamente com adição de pentoses e fornecimento de 6 h de luz e intensidades luminosas $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aos experimentos, desencadeou um maior conteúdo de proteínas 53,2% (m m^{-1}) com o fornecimento de maiores tempos de exposição à luz (18 h) e menor intensidade proporcionou condições para elevar a concentração lipídica (24,7% m m^{-1}). A redução em 50% do composto nitrogenado e adição de pentoses desencadearam a possível produção mais elevada de Rubisco nos fotoperíodos de fornecimento de 12 h e 18 h de luz nas menores intensidades luminosas estudadas (28 e $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os resultados obtidos demonstram a capacidade da cepa de *Chlorella fusca* acumular PHB e proteínas, através da metabolização de pentoses e modificações da periodicidade de luz em conjunto com diferentes intensidades luminosas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Singapura: Mcgraw-hill, 1986.

BAROLI, I.; MELIS, A. Photoinhibitory damage is modulated by rate of photosynthesis and by the photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size. **Plantae**, v. 205, p. 288-196, 1988.

BAROUKH, C.; STEYER, J. P.; BERNARD, O.; CHACHUAT, B. Dynamic flux balance analysis of the metabolism of microalgae under a diurnal light cycle. **IFAC-Papers Online**, v. 49, n.7, p. 791-796, 2016.

BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rates of three fresh water Green algae isolated from a eutrophic lake. **Limnetica**, v.25, p. 647-656, 2006.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-82, 1988.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 822-828, 2011.

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

COELHO, V. C.; SILVA, C. K.; TERRA, A. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentration. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 24, p. 1586-1594, 2015.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n. 7, p. 603-607, 2002.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 912-916, 2016.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic Field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ESQUÍVEL, M. G.; FERREIRA, R. B.; TEIXEIRA, A. R. Protein degradation in C3 and C4 plants with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase and glycolate oxidase. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 322, p. 807-816, 1998.

ESQUÍVEL, M. G.; PINTO, T. S.; MARÍN-NAVARRO, J.; MORENO, J. Substitution of tyrosine residues at the aromatic cluster around the a-b loop of Rubisco small subunit affects the structural stability of the enzyme and the in vivo degradation under stress conditions. **Biochemistry**, v. 45, p. 5745-5753, 2006.

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

FREITAS, B. C. B.; ESQUIVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129-133, 2016.

FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses: Effects on kinetic and nutritional parameters. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 338-344, 2017.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

FU, L.; CUI, X.; LI, Y.; XU, L.; ZHANG, C.; XIONG, R.; ZHOU, D.; CRITTENDEN, J. C. Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, p. 566-572, 2017.

HELENA, S.; ZAINURI, M.; SUPRIJANTO, J. Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) Growth using the LED Light (Light Limiting Diode) and Different Media. **Aquatic Procedia**, v. 7, p. 226-230, 2016.

HONDO, S.; TAKAHASHI, M.; OSANAI, T.; MATSUDA, M.; HASUNUMA, T.; TAZUKE, A.; NAKAHIRA, Y.; CHOHNAN, S.; HASEGAWA, M.; ASAYAMA, M. Genetic engineering and metabolite profiling for over production of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 510-517, 2015.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 89, p. 700-706, 2016.

KHETKIRN, W.; INCHAROENSAKDI, A.; LINDBLAD, P.; JANTARO, S. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by over expression of its native biosynthetic genes. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 761-768, 2016.

KHOEYI, Z. A.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. **Aquaculture International**, v. 20, p.41-49, 2012.

KNOOP, H.; GRUNDEL, M.; ZILLIEGES, Y.; LEHMANN, R.; HOFFMANN, S.; LOCKAU, W.; STEUER, R. Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **PLOS Computational Biology**, v.9, n. 6, 2013.

KRZEMINSKA, I.; PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; TRZCINSKA, M.; TYS, J. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, p. 735-741, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEITE, G. B.; PARANJANE, K.; ABDELAZIZ, A. E. M.; HALLENBECK, P. C. Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 123-130, 2015.

LEITE, G. B.; PARANJANE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, v. 16, p. 338-348, 2016.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, v.148, p. 350-382, 1987.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAEDA, M.; THOMPSON, G. A. On the mechanism of rapid plasma membrane and chloroplast envelope expansion in *Dunaliella salina* exposed to hypo-osmotic shock. **Journal of Cell Biology**, v. 102, p. 289-297, 1986.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1532-1542, 2013.

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

MIYAKE, M.; TAKASE, K.; NARATO, M.; KHATIPPOV, E.; SCHNACKENBERG, J.; SHIRAI, M.; KURANE, R.; ASADA Y. Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 991, p. 84-86, 2000.

MORAIS, M. G.; SILVA, C. K.; CASSURIAGA, A. P. A.; ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A.V. Microalgal engineering of biopolymers. In: MISHRA, A. K. (Ed.) **Biopolymers: Structure, Performance and Applications**. Nova Iorque EUA: Nova Science publishers, Hauppauge, 2017.

RASOUL-AMINI, S.; MOUSAVI, P.; MONTAZERI-NAJAFABADY, N.; MOBASHER, M. A.; MOUSAVI, S. B.; VOSOUGH, F.; DABBAGH, F.; GHASEMI, Y. Biodiesel properties of native Strain of *Dunaliella Salina*. **International Journal of Renewable Energy Research**, v. 4, n. 1, 2014.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria*. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

SEOANE, I. T.; MANFREDI, L. B.; CYRAS, V. P. Properties and processing relationship of polyhydroxybutyrate and cellulose biocomposites. **Procedia Materials Science**, v. 8, p. 807-813, 2015.

SHIVANI, Y.; SUBHASH, P.; DAVE. B.; SASIKALA, C. H. *Bacillus crescens* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 2531-2536, 2015.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalcanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TRIVEDI, J.; AILA, M.; BANGWAL, D. P.; KAUL, S.; GARG, M. O. Algae based Biorefinery - How to make sense?. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295-307, 2015.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H. Microalgal culture systems: An insight into their designs, operation and applications. **Biotechnology**, v. 11, p.127-132, 2012.

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

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 85-90, 2006.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of biotechnology**, v. 195, p. 82-8, 2015.

ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P) H-linked xylose reductase and NADP⁺ linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p.125, 2014.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

O estudo identificou que a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, quando submetida a maiores períodos de luz (18 h e 12 h), resultaram em perfis de crescimento superior. O maior crescimento celular ($0,80 \text{ g L}^{-1}$) foi obtido com fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com adição de xilose.

O fornecimento de pentoses auxiliou no aumento da produtividade de biomassa da cepa em estudo. A maior produtividade de biomassa foi obtida no fotoperíodo 18 h de luz e $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ atingindo $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para xilose, seguida de 12 h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ também com adição de xilose ($0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O fornecimento de 12 h de luz e maior intensidade luminosa levou ao maior velocidade específica de crescimento ($0,16 \text{ d}^{-1}$) para os ensaios com xilose. Para os três fotoperíodos estudados a intensidade luminosa atuou como potencializador do crescimento celular, onde quanto maior a intensidade luminosa fornecida, maior o crescimento celular e velocidade específica máxima de crescimento.

Não foi observada morte celular com fornecimento de 6 h de luz para as três intensidades luminosas estudadas ($58, 28$ e $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A adição de pentoses (xilose e arabinose) proporcionou maiores crescimentos celulares que as condições controle, indicando que as pentoses contribuíram positivamente com a razão C/N para a manutenção e crescimento celular mesmo com menores tempos de fornecimento de luz para *Chlorella fusca* LEB 111.

Menores intensidades luminosas promoveram maiores concentrações de pigmentos (clorofila a e b), indicando maiores taxas fotossintéticas no micro-organismo para suprir a condição de baixos fornecimentos de luz, em todos os fotoperíodos estudados. A adição de xilose e arabinose em conjunto com a redução do composto nitrogenado, estimulou o acúmulo de macromoléculas na microalga. A maior concentração lipídica foi obtida para os ensaios com 18 h de luz e menor intensidade luminosa ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) atingindo $24,7\%$ (m m^{-1}). A adição de pentoses em conjunto com modificações no período de luz para 6 h de luz desencadeou aumento do conteúdo protéico ($53,2\%$ m m^{-1}) e redução da concentração de carboidratos. O perfil protéico demonstrou que adição de pentoses em conjunto com a redução do composto nitrogenado em 50% e redução das intensidades luminosas, afetaram positivamente quanto à atividade da enzima Rubisco (56 kDa).

A produção de poli-hidroxibutirato por *Chlorella fusca* LEB 111, foi obtido neste trabalho,sendoeste o primeiro estudo vinculando cepas de Chlorofitas á modificações físicas e

nutricionais, desencadeando a produção de polímeros biodegradáveis de origem microalgal. A modificação dos períodos de luz e intensidades luminosas em conjunto com a redução de nitrogênio em 50% e adição de 20 mg L⁻¹ de D-xilose e L-arabinose, promoveram aumento da concentração de PHB, produzindo um teor máximo de 17,4% (m m⁻¹) do polímero.

Foi evidenciado que modificações de períodos de luz em conjunto com a substituição de pentoses pela fonte tradicional de carbono promoveu crescimento celular e acúmulo de biomoléculas como proteínas e lipídios, em conjunto com a identificação de elevadas concentrações de poli-hidroxibutirato. O presente estudo colabora com a compreensão dos mecanismos adaptativos da cepa de *Chlorella fusca* LEB 111, indicando sua potencialidade na produção de moléculas com características biotecnológicas a partir de processos menos onerosos devido à redução de energia para sua produção em conjunto com a potencialidade do uso de resíduos lignocelulósicos em cultivos microalgais.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes tempos de exposição à luz, para avaliar a composição da biomassa e perfil protéico de *Chlorella fusca* e outras microalgas da coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica.
- Estudar o uso de diferentes fotobiorreatores submetidos à modificação nutricional com adição de pentoses e variação de períodos de luz e intensidades luminosas.
- Estudar a diferentes concentrações de nitrogênio disponibilizados aos cultivos de *Chlorella fusca* com adição de pentoses.
- Estudar o uso de diferentes concentrações das fontes de nitrogênio e fósforo durante os cultivos microalgais, para estimular a produção de PHB.
- Estudar diferentes formas de extração do polímero obtido e realizar sua caracterização quanto a propriedades físicas e mecânicas.
- Estudar possíveis aplicações para as proteínas obtidas.
- Estudar a aplicação de resíduo lignocelulósico bruto nos cultivos.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B.; BRAY D.; HOPKIN, K.; LEWIS, J.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Essential Cell Biology**. London: Garland Publishing, 1997.
- ANNING, T.; MACINTYRE, H.; PRATT, S.; SAMMES, P.; GIBB, S.; GEIDER, R. Photo acclimation in the marine *diatoms keletonema costatum*. **Limnology Oceanographic**, v. 45, n. 8, p. 1807-1817, 2000.
- BAROUKH, C.; STEYER, J. P.; BERNARD, O.; CHACHUAT, B. Dynamic flux balance analysis of the metabolism of microalgae under a diurnal light cycle. **IFAC-Papers Online**, v. 49, n.7, p. 791-796, 2016.
- BERNARD, O. Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. **Journal of Process Control**, v. 21, p. 1378-1389, 2011.
- BHARATHIRAJA, B.; CHAKRAVARTHY, M.; RANJITHKUMAR, R.; YOGENDRAN, D.; YUVARAJ, D.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R.; PALANI, S. Analysis of reaction parameters for the transesterification of algal oil from *Enteromorpha compressa* using purified lipase and whole cell biocatalyst. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 395-410, 2015.
- BILAD, M. R.; ARAFAT, H. A.; VANKELECOM, I. F. J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1283-1300, 2014.
- BROWN M. R.; HOHMANN S. Effects of irradiance and growth phase on the ascorbic acid content of *Isochrysis* sp. T.ISO (Prymnesiophyta). **Journal Applied Phycology**, v. 14, p. 211-214, 2002.
- CAPON, R. J.; DUNLOP, R. W.; GHUSALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R. Poly-3 hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1181-1184, 1983.
- CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Optimization of α -3 fatty acid production by microalgae: crossover effect of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. **Marine Biotechnology**, v. 7, p.1-8, 2005.
- CASSURIAGA, A. P. A.; HOLZ, J. C. P.; LIMA, T. S.; BRAGA, V. S. **Bioengenharia para produção de tintas**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- CHAUTON, M. S.; WINGE, P.; BREMBU, T.; VADSTEIN, O. BONES, A. M. Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* acclimated to light/dark cycles. **American Society of Plant Biologists**, v. 161, n. 2, p. 1034-1048, 2013.
- COELHO, V. C.; SILVA, C. K.; TERRA, A. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentration. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 24, p. 1586-1594, 2015.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n. 7, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; CASSURIAGA, A. P. A.; HOLZ, J. C.; BRAGA, V. S. **Desenvolvimento de tinta com resina à base de microalga(s) e/ou cianobactéria**, 2016. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201602307. Depositante/Titular: Universidade Federal do Rio Grande.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 912-916, 2016.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. **Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel**. Green Energy and Technology, London: Springer, 2010.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G. **Isolamento de microalgas para biofixação de CO₂ proveniente de geração termelétrica**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

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

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472-475, 2017.

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

FRADINHO, J. C.; OEHMEN A.; REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 19-27, 2014.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; NETO, J. A. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

FRASER, E.; LEGWEGOH, A.; KRISHNA, K. C.; CODYRE, M.; DIAS, G.; HAZEN, S.; JOHNSON, R.; MARTIN, R.; OHBERG, L.; SETHURATNAM, S.; SNEYD, L.; SMITHERS, J.; ACKER, R. V.; VANSTEENKISTE, J.; WITTMAN, H.; YADA, R. Biotechnology or organic? Extensive or intensive? Global or local? A critical review of potential pathways to resolve the global food crisis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 78-87, 2016.

FREITAS, B. C. B. **Cultivo de microalgas utilizando pentoses como fonte de carbono.** 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

FREITAS, B. C. B. **Potencial metabólico de *Chlorella minutissima* e *Chlamydomonas reinhardtii* para o uso em biorrefinarias microalgais.** 2016. 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

FREITAS, B. C. B.; ESQUIVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129-133, 2016.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

FU, L.; CUI, X.; LI, Y.; XU, L.; ZHANG, C.; XIONG, R.; ZHOU, D.; CRITTENDEN, J. C. Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, p. 566-572, 2017.

GAMMANPILA, A. M.; RUPASINGHE, C. P.; SUBASINGUE, S. Light intensity and photo period effect on growth and lipid accumulation of microalgae *Chlorella vulgaris* and *nannochloropsis* sp. for biodiesel production. **Proceedings of 12th ISERD International Conference**, Tokyo, Japan, 26th Sept. 2015, ISBN: 978-93-85832-00-0.

GIMPEL, J. A.; HENRÍQUEZ, V.; MAYFIELD, S. P. In metabolis engineering of eukariotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. **Front Microbiology**, v. 6, p. 1376, 2015.

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

HOEK, V.D.; MANN, D.G.; JHAHNS, H.M. **Algae: introduction to phycology.** London: Cambridge University, 1995.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.

IVERSON, T. M. Evolution and unique bioenergetics mechanisms in oxygenic hotosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 91-100, 2006.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-450, 2004.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 89, p. 700-706, 2016.

KAZAMIA, E.; SMITH, A. G. Assessing the environmental sustainability of biofuels. **Trends in Plant Science**, v. 10, p.19-618, 2014.

KHOEYI, Z. A.; SEYFABADI, J.; RAMEZAMPOUR, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. **Aquaculture International**, v. 20, p. 41-49, 2012.

KNOOP, H.; GRUDEL, M.; ZILIGES, Y.; LEHMANN, R.; HOFFMAN, S.; LOCKAU, W.; STEUER, R. Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: The metabolic network of *synechocystis* sp. PCC 6803. **Plos Computational Biology**, v. 9, n. 6, 2013.

KRZEMINSKA, I.; PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; TRZCINSKA, M.; TYS, J. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 37, p. 735-741, 2014.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F.X. & LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

LANDER, G.C.; ESTRIN, E.; MATYSKIELA, M.E.; BASHORE, C.; NOGALES, E.; MARTIN, A. Complete sub unit architecture of the proteasome regulatory particle. **Nature**, v. 482, p. 186-91, 2012.

LEDESMA-AMARO, R.; SERRANO-AMATRIAIN, C.; JIMÉNEZ, A.; REVUELTA, J. L. Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbyagossypi* through pathway optimization. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 163, 2016.

LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, v. 16, p. 338-348, 2016.

LI, Z.; YUAN, H.; YANG, J.; LI, B. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9128-9134, 2011.

LIU, G.; QIAO, L.; ZHANG, H.; ZHAO, D.; SU, X. The effects of illumination factors on the growth and HCO₃ fixation of microalgae in an experiment culture system. **Energy**, v. 78, p. 40-47, 2014.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Bioethanol production using microalgae: A review. **Ciências exatas e Tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 159-174, 2016.

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

MENEZES, R. S. **Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel**. 2015. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MORAIS, M. G.; SILVA, C. K.; CASSURIAGA, A. P. A.; ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A.V. Microalgal engineering of biopolymers. In: MISHRA, A. K. (Ed.) **Biopolymers: Structure, Performance and Applications**. Nova Iorque EUA: Nova Science publishers, Hauppauge, 2017.

MIYAKE, M.; ERATA, M.; ASADA, Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate. **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 82, p. 512-514, 1996.

MOOIJ, T.; VRIES, G.; LATSOS, C.; WIJFFELS, R.; JANSSEN, M. Impact of light color on photobioreactor productivity. **Algal Research**, v. 15, p. 32-42, 2016.

MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

MORAIS, E. G. **Cultivo de microalgas utilizando efluente da indústria bioenergética e avaliação da conversão em biodiesel**. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermo electric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1245-1251, 2008.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Biofunctionalized Nanofibers Using *Arthrospira* (*Spirulina*) Biomass and Biopolymer. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2015.

MOREIRA, J. B. **Engenharia de microalgas para concepção de uma biorrefinaria utilizando CO₂ como fonte de carbono**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MORO, G. M. B. **Potencial nutricosmético da microalga *Spirulina* em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo***. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

NIELSEN, C.; RAHMAN, A.; REHMAN, A. U.; WALSH, M. K.; MILLER, C. D. Food waste conversion to microbial polyhydroxyalkanoates. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1338-1352, 2017.

PANITH, N.; ASSAVANIG, A.; LERTSIRI, S.; BERGKVIST, M.; RURARIT, R.; NIAMSIRI, N. Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 42, p. 1-12, 2016.

QUINES, L. K. M.; LENCZAK, J. L.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; RODRIGUES, M. I.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 214-220, 2015.

RADMANN, E. M. **Cultivos de microalgas para produção de biosurfactantes**. 2011. 152 f. Tese (Doutorado Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semi-continuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

RENAUD, S.M.; PARRY, D.L.; THINH, L.V.; KUO, C.; PADOVAN, A.; SAMMY, N. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. **Journal Applied Phycology**, v. 3, p. 43-53, 1991.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. London: Wiley Blackwell, 2013.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria*. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; WILKINSON, L.; BETENBAUGH, M. J. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 430-436, 2008.

SADEGHI, D.; KARBASI, S.; RAZAVI, S.; MOHAMMADI, S.; SHOKRGOZAR, M. A.; BONAKDAR, S. Electrospun poly(hydroxybutyrate)/chitosan blend fibrous scaffolds for cartilage tissue engineering. **Applied Polymer Science**, v. 133, n. 47, p. 1-11, 2016.

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

SARAYLOO, E.; TARDU, M.; UNDLU, Y. S.; SIMSEK, S.; CEVAHIR, G.; ERKEY, C.; KAVAKLI, I. H. Understanding lipid metabolism in high-lipid-producing *Chlorella vulgaris* mutants at the genome-wide level. **Algal Research**, v. 28, p. 244-252, 2017.

SARKAR, D.; SHIMIZU, K. An overview on biofuel and biochemical production by photosynthetic microorganisms with understanding of the metabolism and by metabolic engineering together with efficient cultivation and downstream processing. **Bioresource Bioprocess**, v. 2, p. 17, 2017.

SCHMATZ, D. A.; UEBEL, L. S.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Scaffolds containing *Spirulina* sp. LEB 18 biomass: development, characterization and evaluation of *in vitro* biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, p. 1050-1059, 2016.

SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A. Light emitting diodes (leds) applied to microalgal production. **Trends Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422-430, 2014.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

SHARMA, M.; DHINGRA, H. K. Poly- β -hydroxybutyrate: A Biodegradable Polyester, Biosynthesis and Biodegradation. **British Microbiology Research Journal**, v. 14, n. 3, p. 1-11, 2016.

SILVA, C. K. **Produção biotecnológica de biopolímeros aplicando processo cíclico de reutilização de resíduo da extração de poli hidroxibutirato (PHB)**. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

SOCCOL, O. J.; CARDOSO, C. O.; MIQUELLUTI, D. J. Análise da precipitação mensal provável para o município de Lages, SC. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.569-574, 2010.

STAL, L.J.; HEYER, H.; JACOBS, G. Occurrence and role of poly-hydroxy-alkanoate in the cyanobacterium *Oscillatoria limosa*. **Novel Biodegradable Microbial Polymers**, v. 1, p. 435-438, 1990.

SUN, Z.; LIU, S. Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824. **Biomass Bioenergy**, v. 39, p. 39-47, 2012.

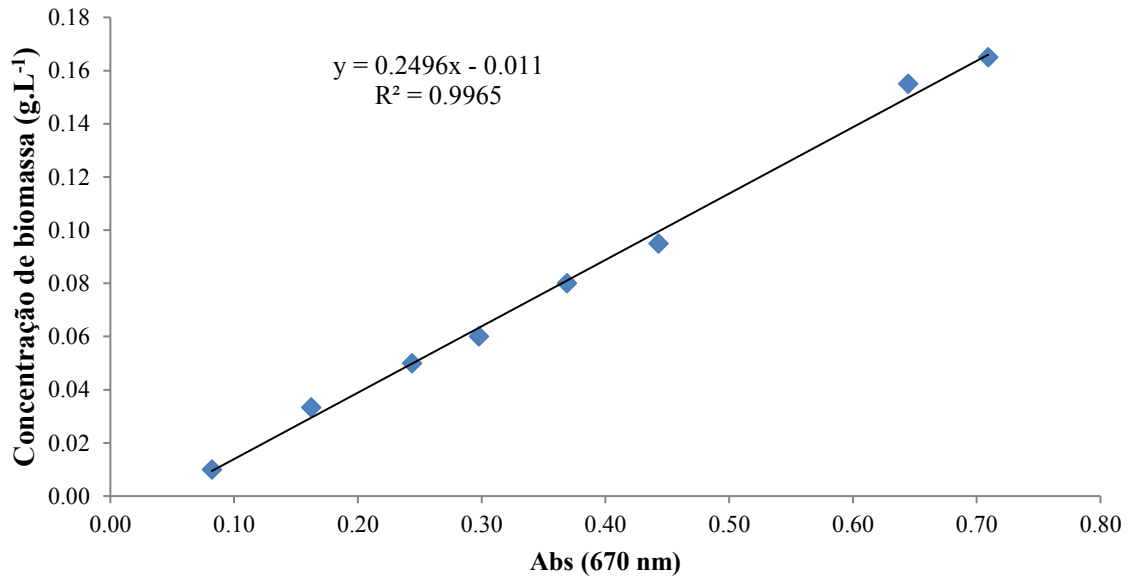
VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green alga *Chlorella fusca* LEB 111 grown using gas effluents and solid residues of thermoelectric origin. **Applied Biotechnology**, v. 178, p. 418-429, 2016.

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

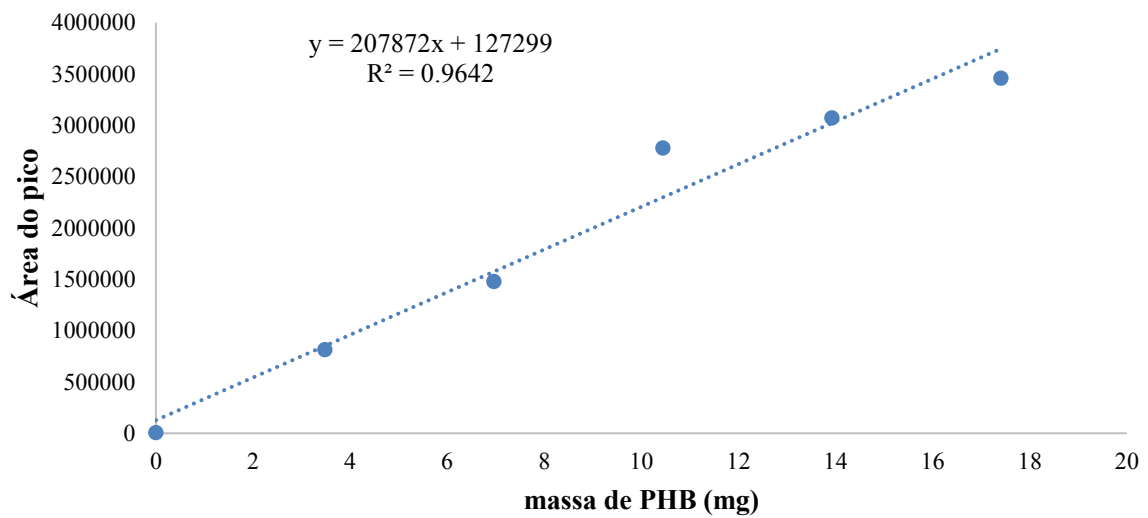
- WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7-11, 2013.
- WANG, B.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; OLSON, J. W.; KHAN, S. A. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligeneslatus* using sugarbeet juice. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 802-811, 2013.
- WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular Green microalga. **Journal Biotechnology**, v. 162, p. 21-27, 2013.
- WOBBE, L.; REMACLE, C. Improving the sunlight-to-biomass conversion efficiency in microalgalbiofactories. **Journal of Biotechnology**, v. 201, n. 10, p. 28-42, 2015.
- YAN, C.; ZHU, L.; WANG, Y. Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods. **Applied Energy**, v. 178, n. 15, p. 9-18, 2016.
- ZHU, S.; FENG, P.; FENG, J.; XU, J.; WANG, Z.; XU, J.; YAN, Z. The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 58-65, 2017.
- ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121-132, 2014.
- ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 125, 2014.
- ZHUANG, L.; WU, Y.; ESPINOSA, V. M. D.; ZHANG, T.; DAO, G.; HU, H. Soluble algal products (SAPs) in large scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 141-148, 2016.

APÊNDICES

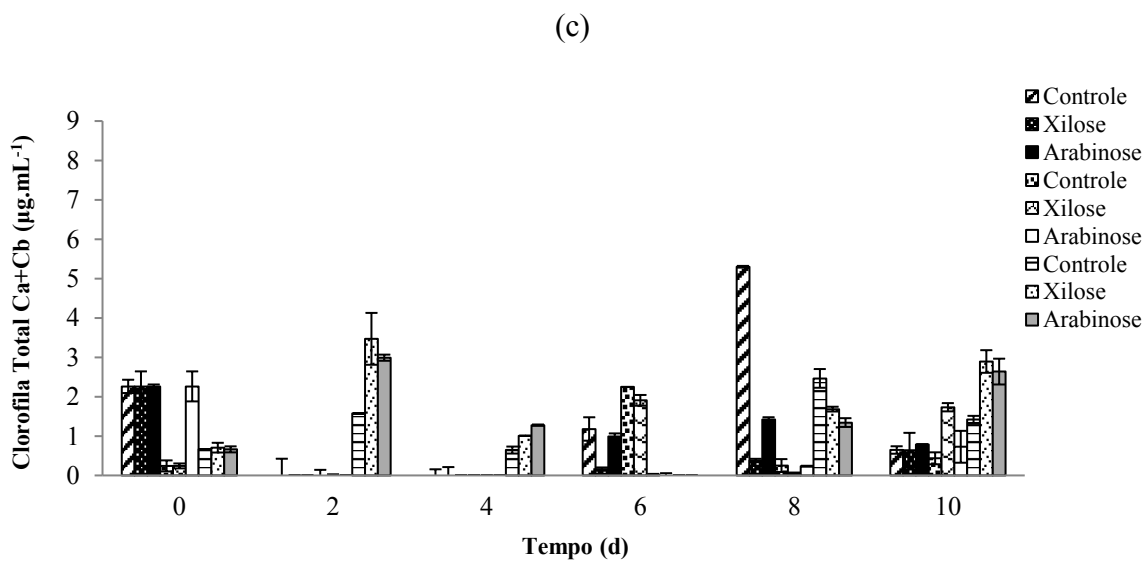
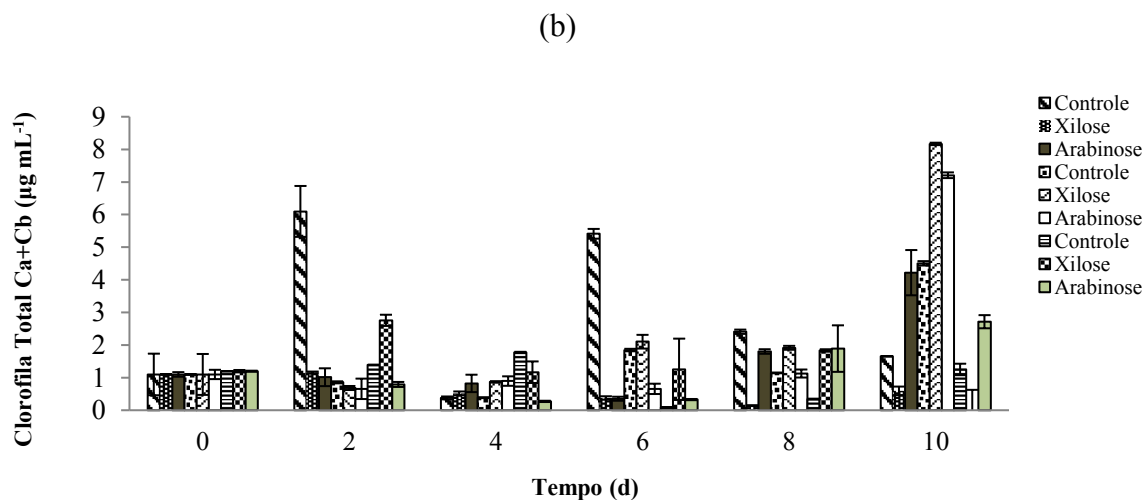
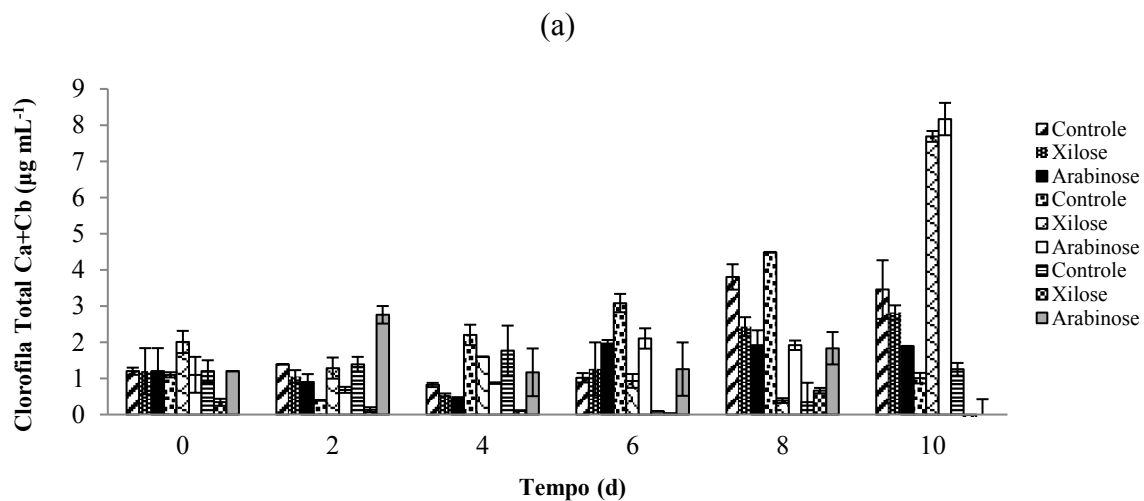
APÊNDICE 1 - Curva padrão da microalga *Chlorella fusca* LEB 111.



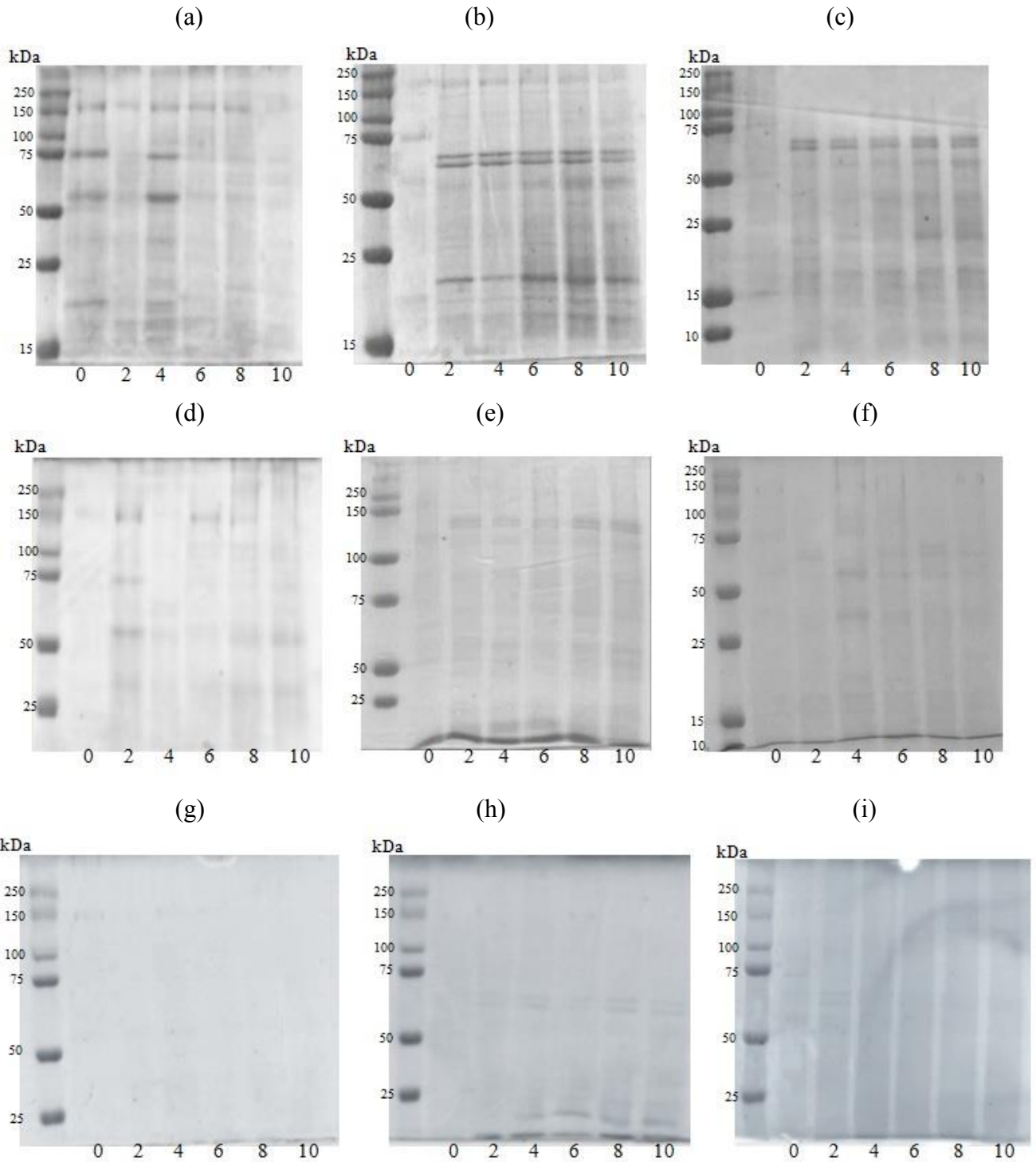
APÊNDICE 2 - Curva padrão de poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol% HB e 12 mol% HV (Sigma Aldrich).



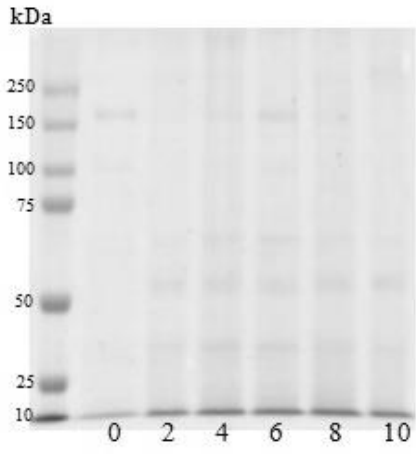
APÊNDICE 3 - Conteúdo de clorofila em culturas de *Chlorella fusca* LEB 11, sob variação da intensidade luminosa (58, 28 e 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e adição de xilose, arabinose e controle nos cultivos (a) com fotoperíodo 18 h de luz (b) 12 h de luz e (c) 6 h de luz.



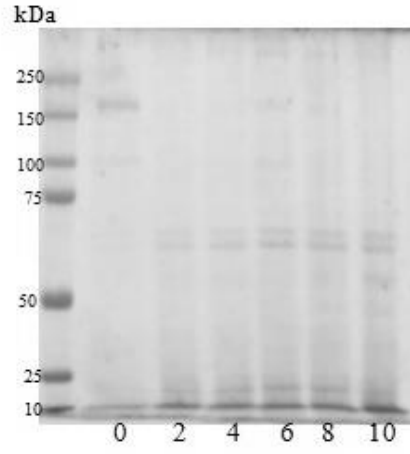
APÊNDICE 4 - Análise de SDS-PAGE dos experimentos com *Chlorella fusca* LEB 111, que não apresentaram aparecimento significativo da enzima Rubisco, submetida à: fotoperíodo 12 h de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) Controle, (b) Xilose e (c) Arabinose; fotoperíodo 18 h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (d) Controle, (e) Xilose e (f) Arabinose; intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (g) Controle, (h) Xilose e (i) Arabinose; fotoperíodo 6 h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (j) Controle, (k) Xilose e (l) Arabinose; intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (m) Controle, (n) Xilose e (o) Arabinose.



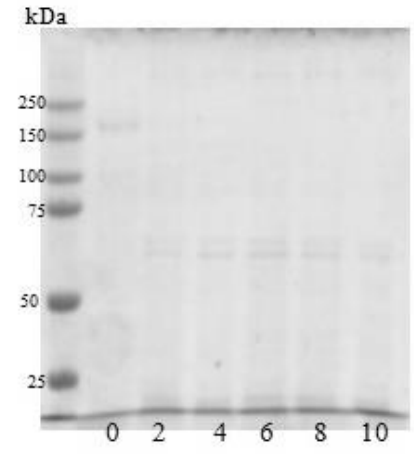
(j)



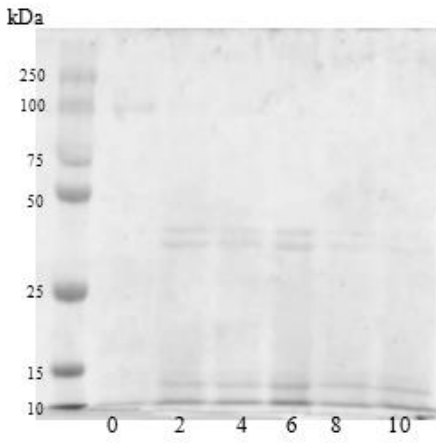
(k)



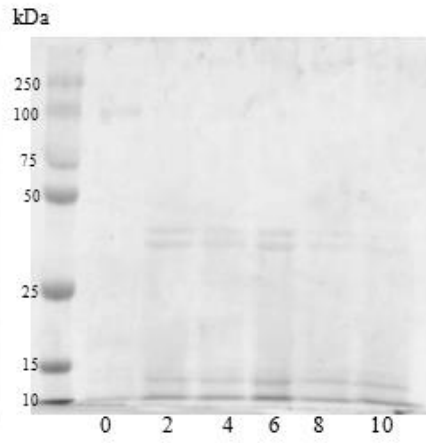
(l)



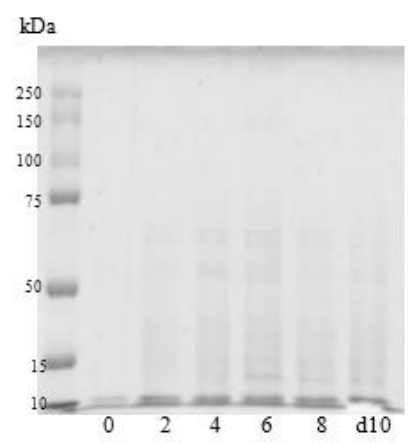
(m)



(n)

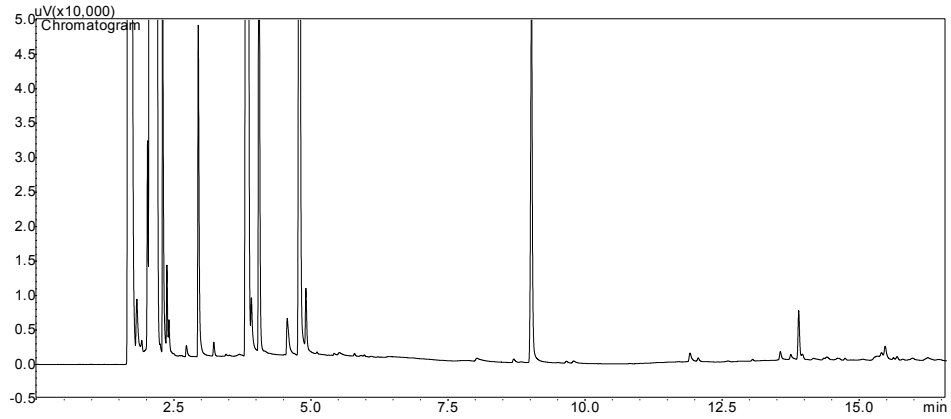


(o)

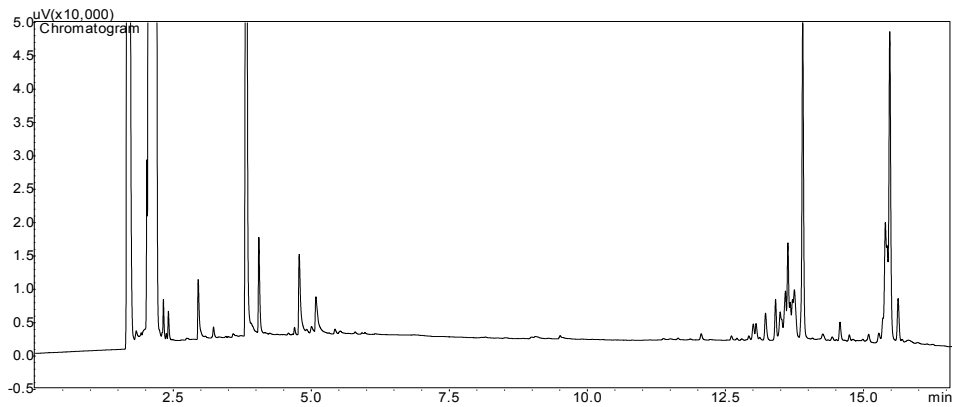


APÊNDICE 5 - Cromatograma do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) (a), da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) (b) e sobreposição dos cromatogramas (c).

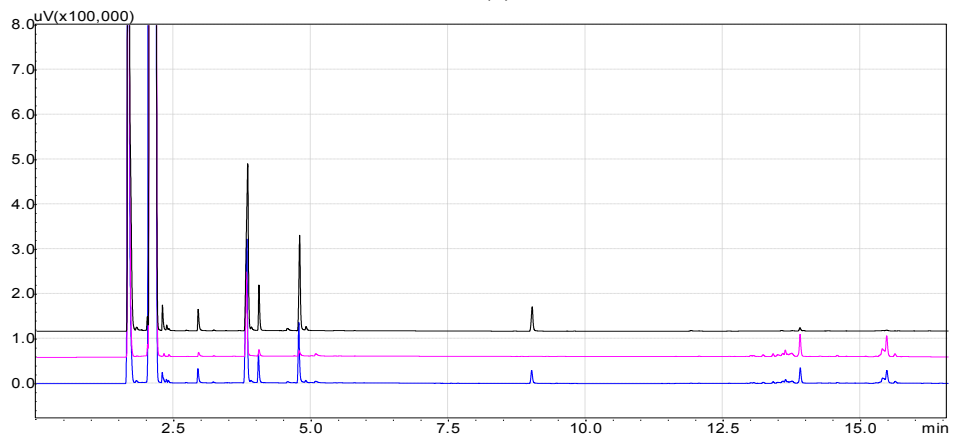
(a)



(b)



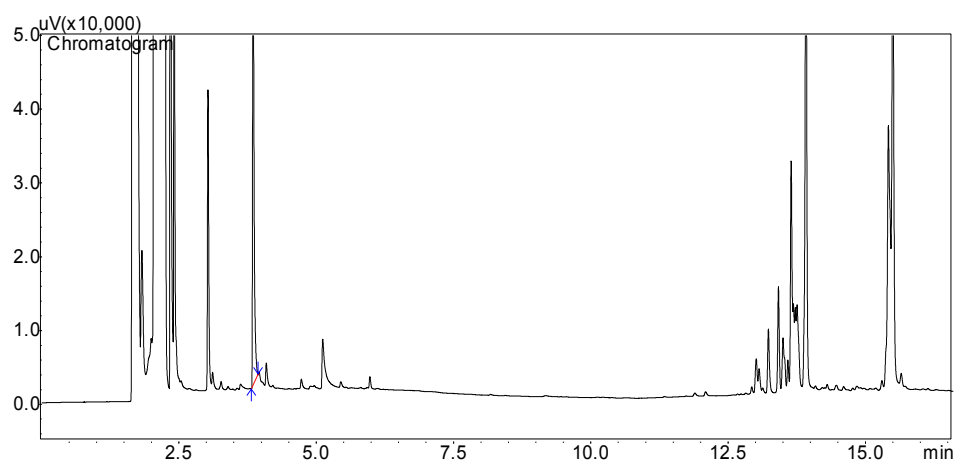
(c)



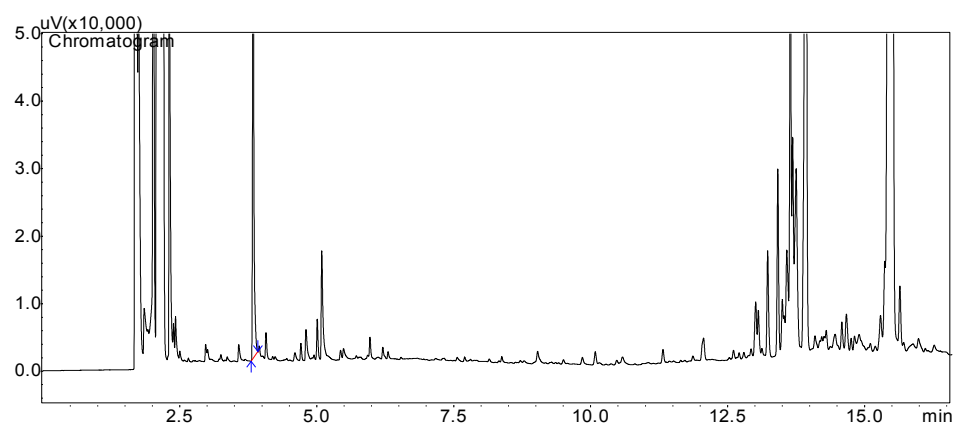
APÊNDICE 6 - Cromatogramas do padrão externo nos tempos de retenção 3,9 (3HB) e 4,8 (3HV) do PHB contido na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, submetida à variação de fotoperíodo e intensidade luminosa.

Fotoperíodo 12h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

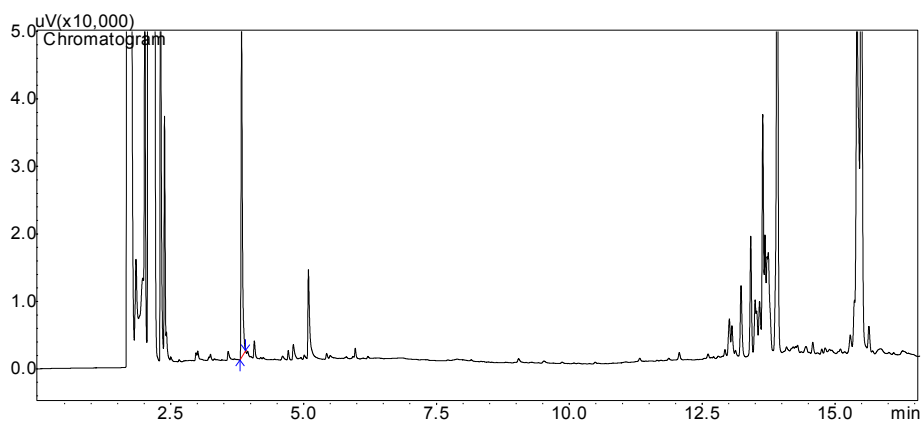
(a) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)

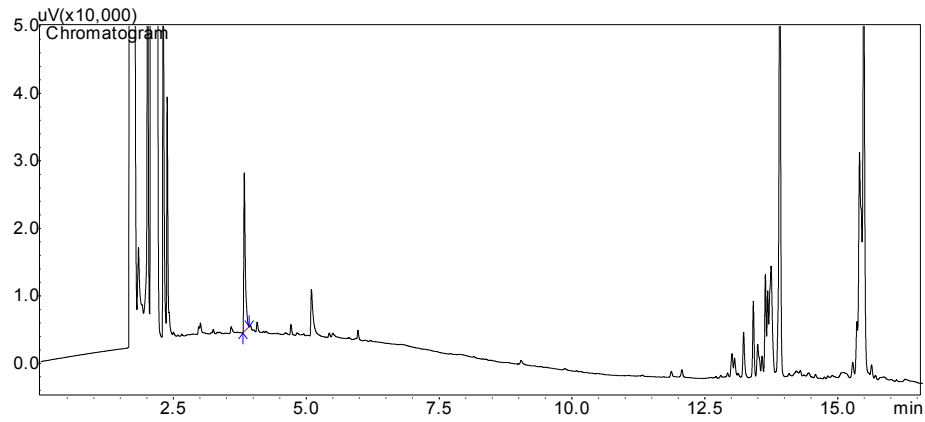
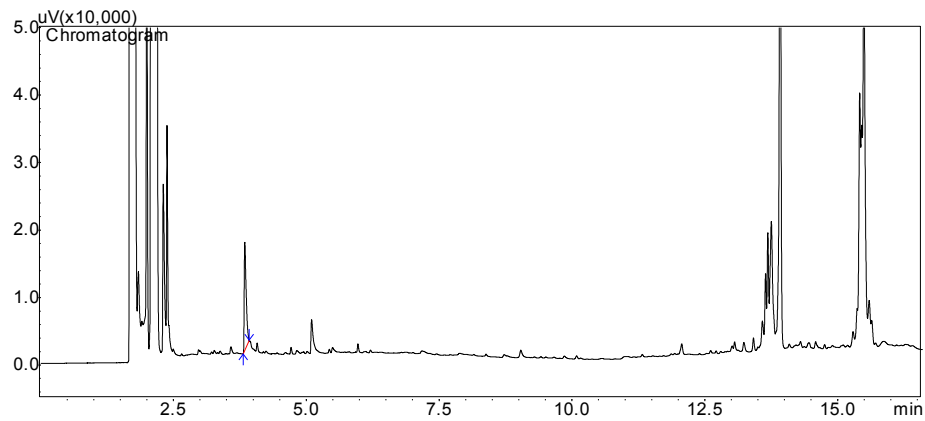
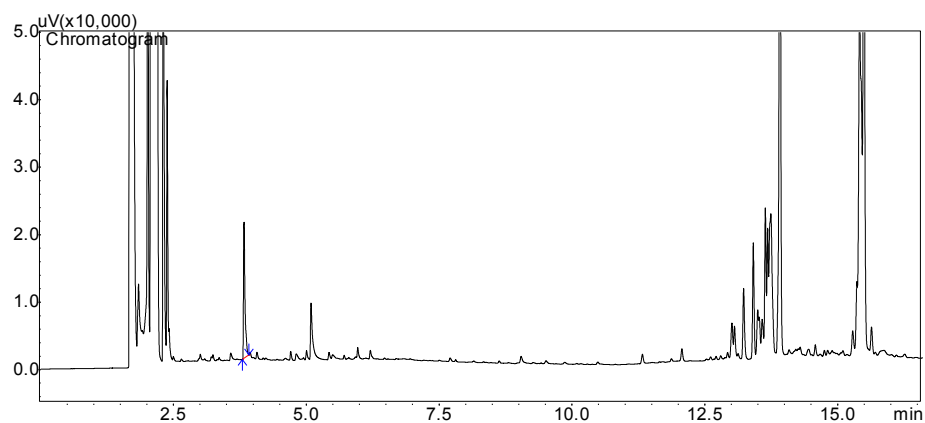


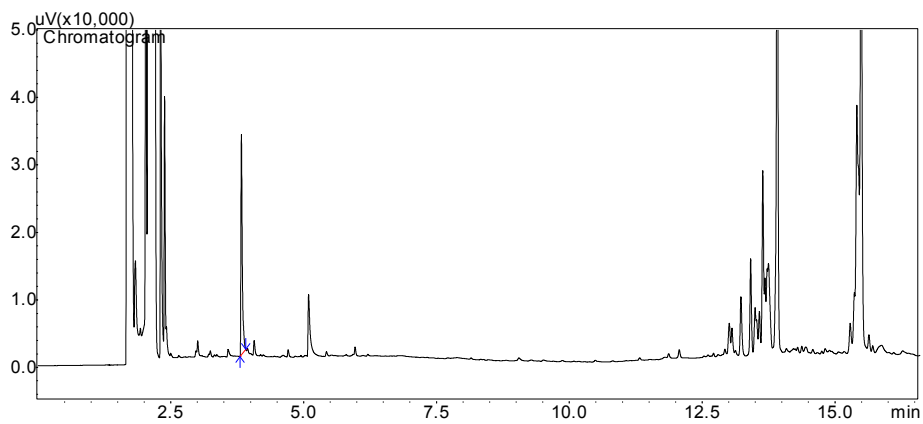
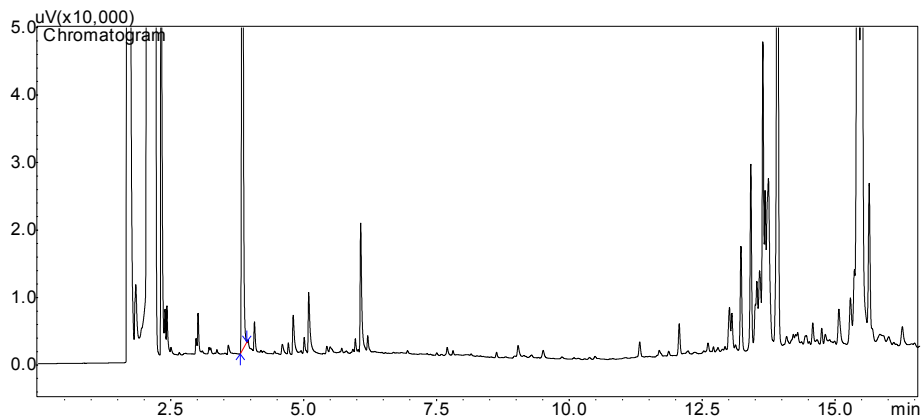
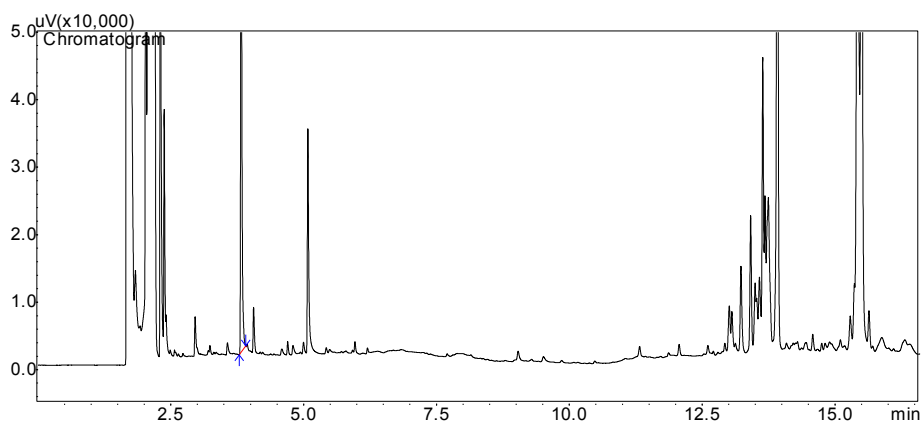
(b) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-xilose}$)



(c) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-arabinose}$)

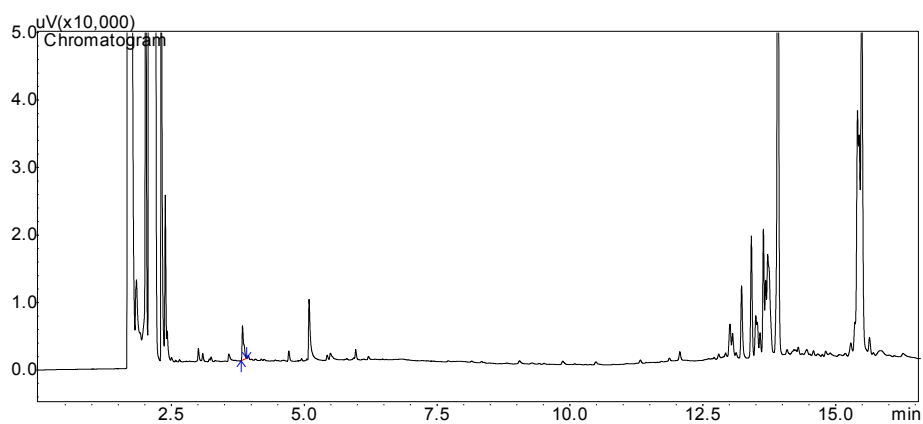


Fotoperíodo 12h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **(d) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)****(e) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)****(f) Experimento com adição de arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)**

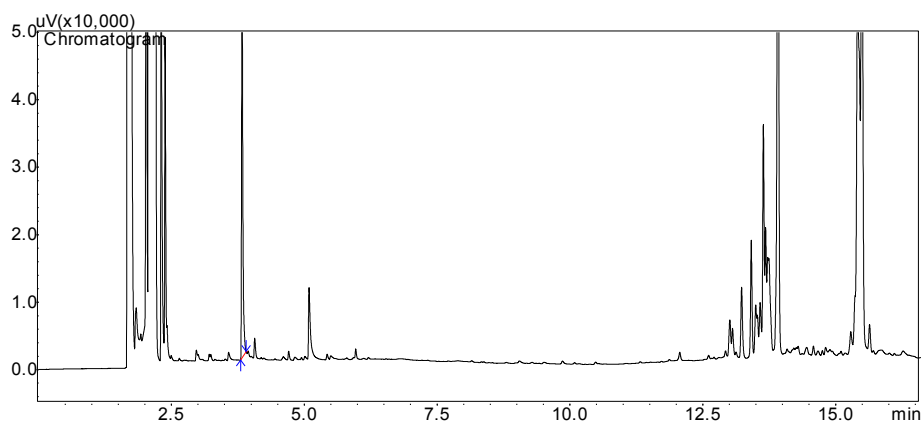
Fotoperíodo 12h de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **(g) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)****(h) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)****(i) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Arabinose}$)**

Fotoperíodo 18h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

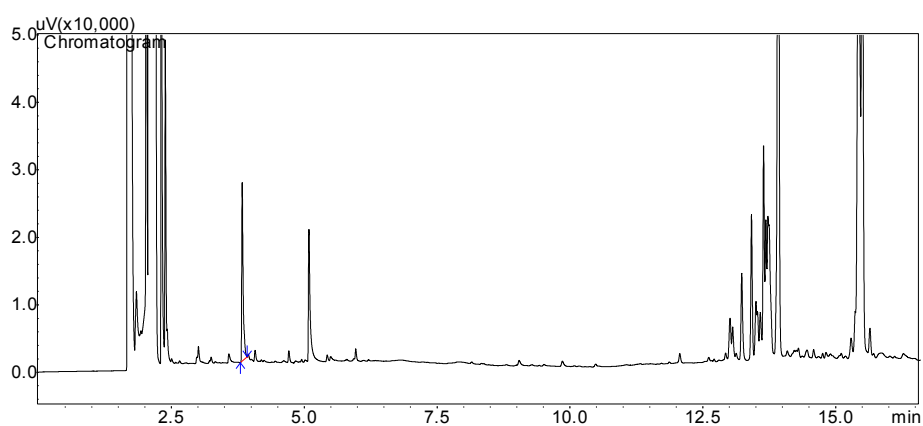
(j) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)

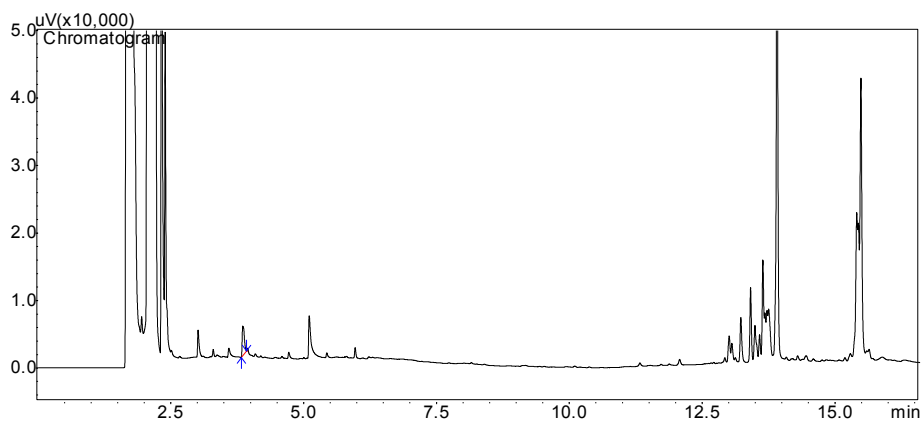
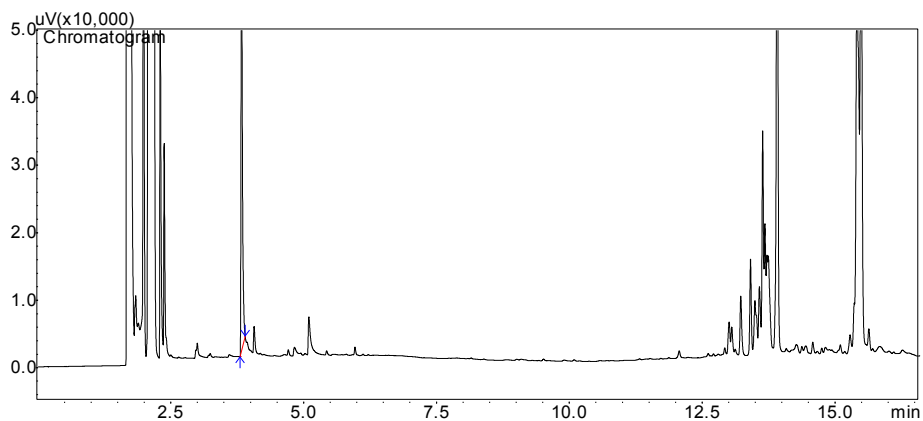
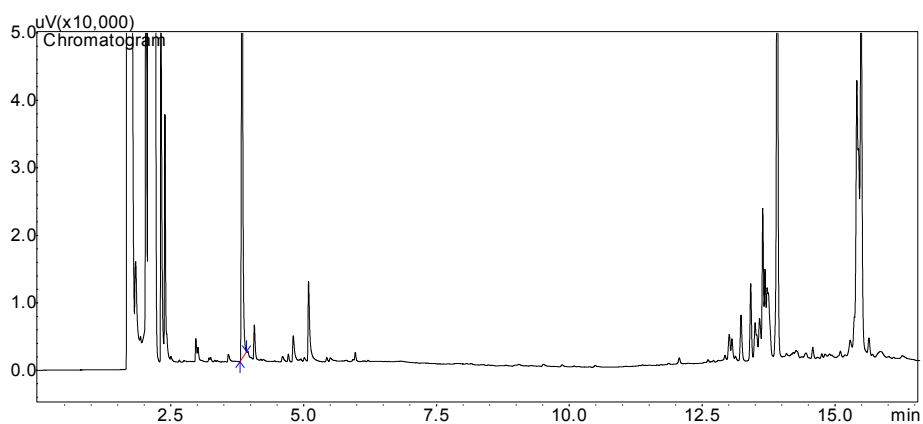


(k) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)



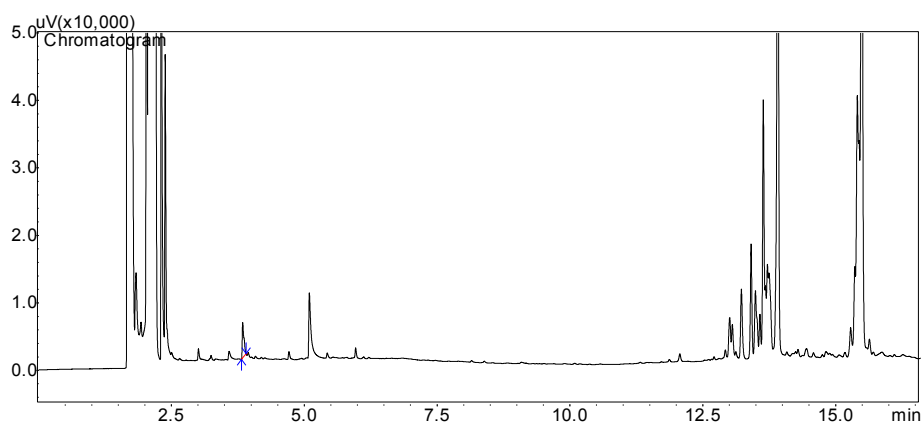
(l) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)



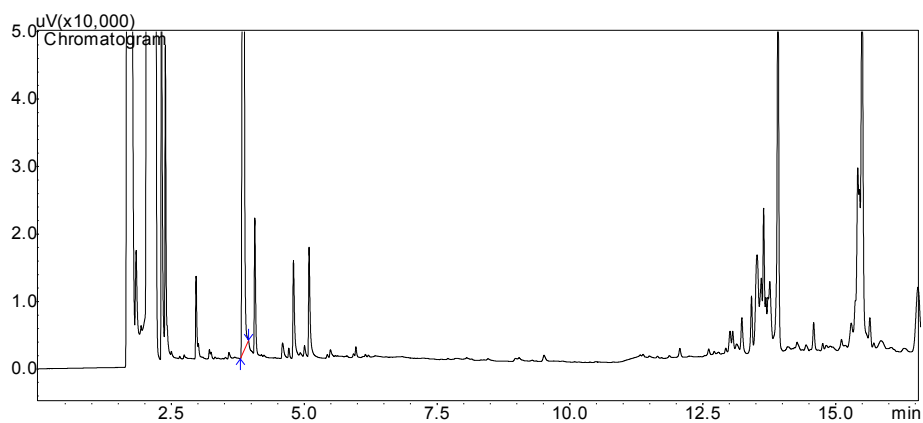
Fotoperíodo 12h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **(m) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)****(n) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)****(o) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-arabinose}$)**

Fotoperíodo 12h de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

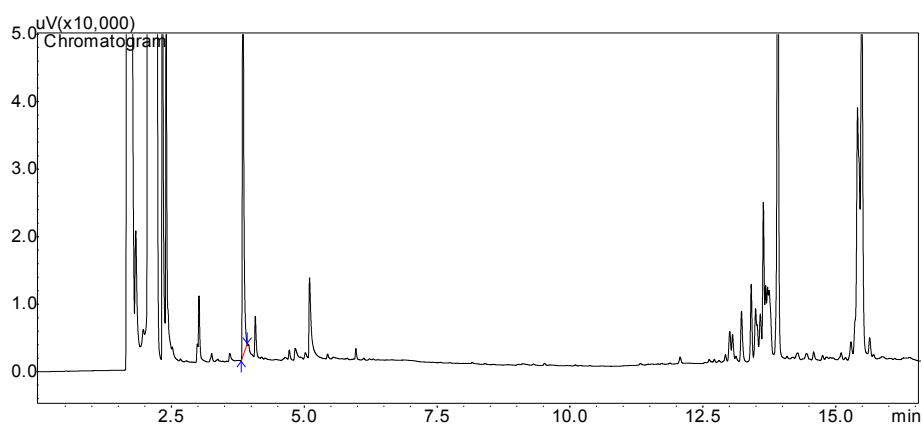
(p) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)

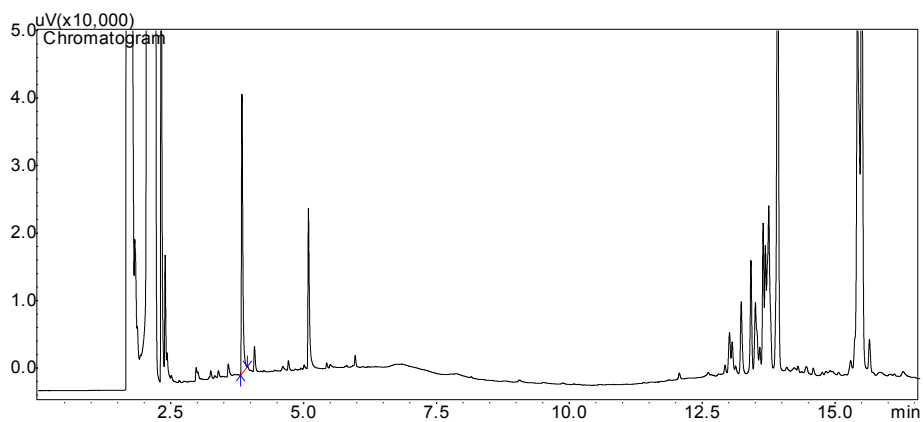
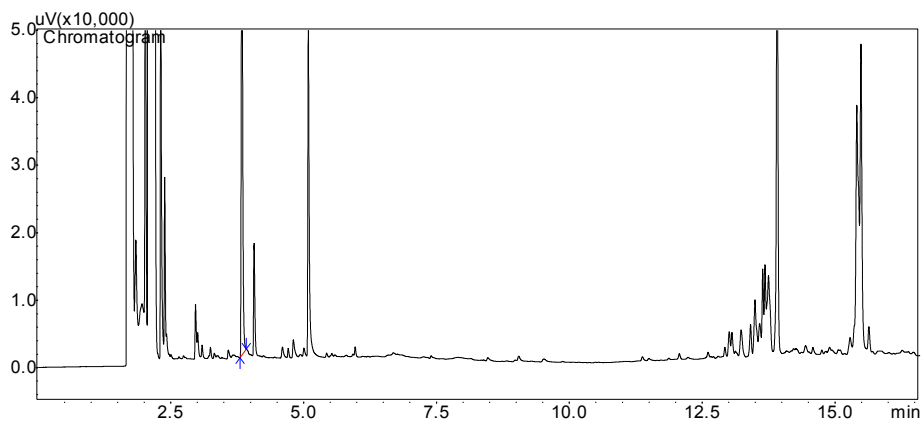
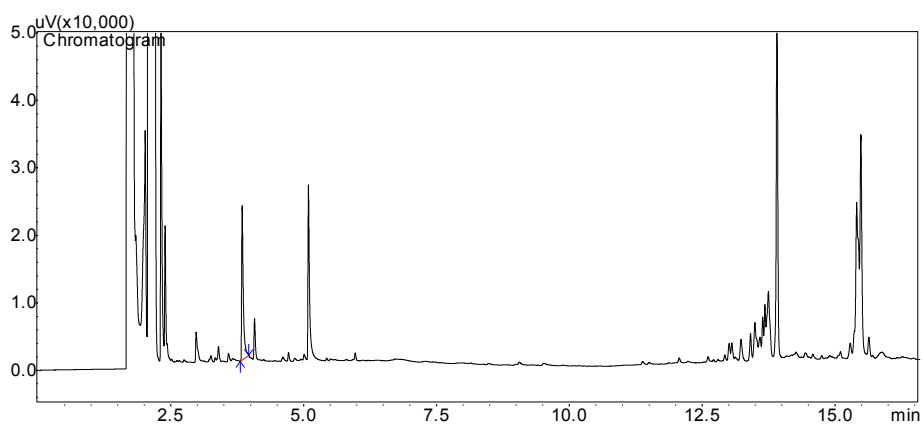


(q) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)



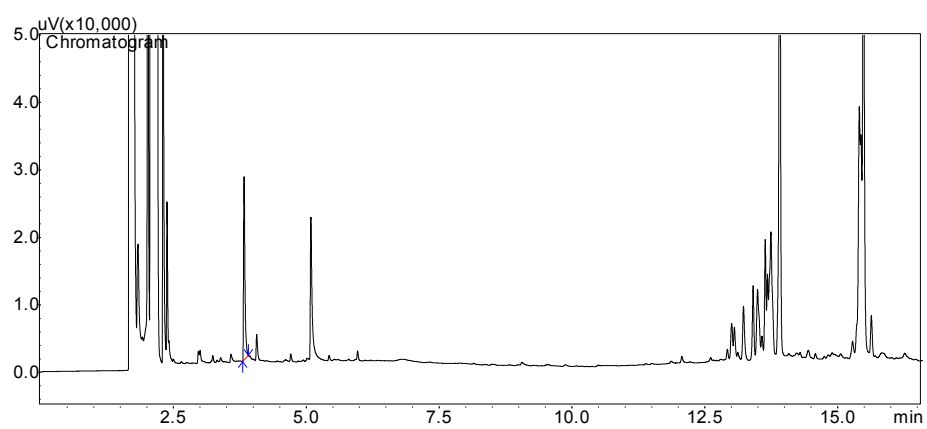
(r) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)



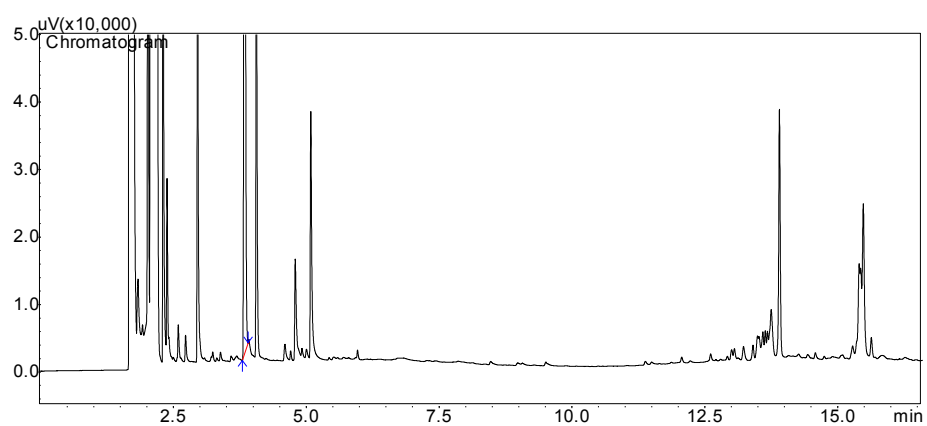
Fotoperíodo 6h de luz e intensidade luminosa $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **(s) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)****(t) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)****(u) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)**

Fotoperíodo 6h de luz e intensidade luminosa $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

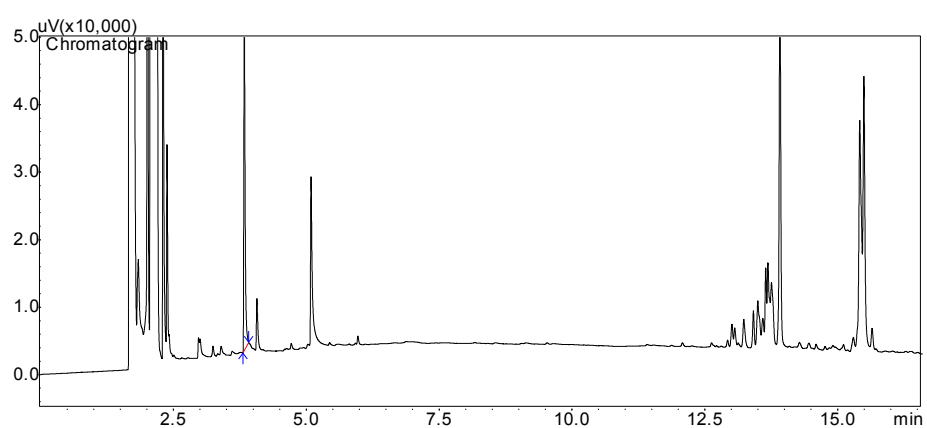
(v) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)

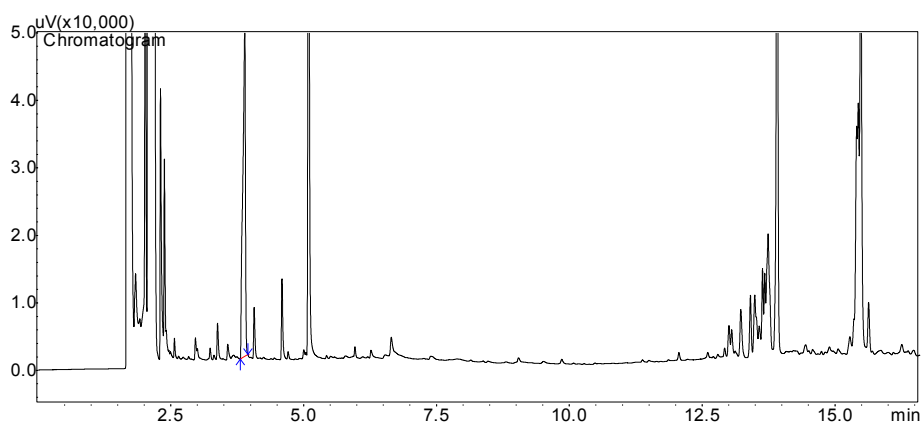
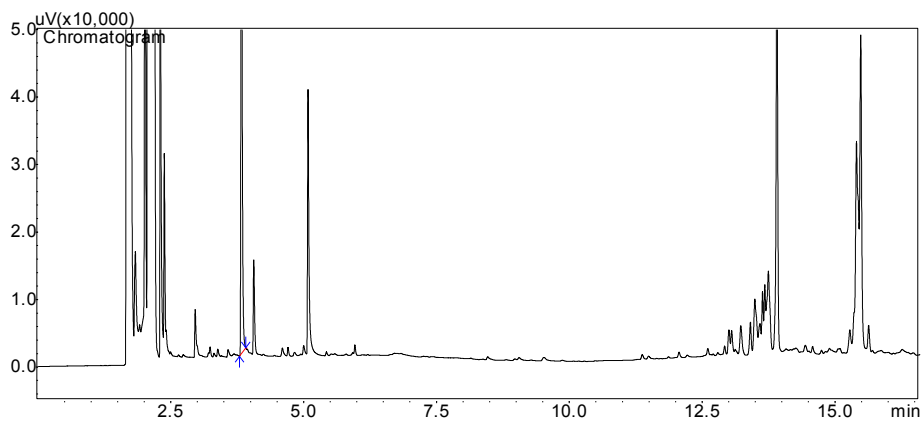


(w) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)



(x) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)



Fotoperíodo 6h de luz e intensidade luminosa $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **(y) Experimento controle ($1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$)****(z) Experimento com adição de Xilose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ D-Xilose}$)****(a) Experimento com adição de Arabinose ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ L-Arabinose}$)**