



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E PLANTAS

Romina Melissa González de Dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EM *TETRADESMUS WISCONSINENSIS*  
COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CORES DE LUZ TIPO LED RGB**

Florianópolis, Santa Catarina – Brasil

2021

Romina Melissa González de Dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EM *TETRADESMUS WISCONSINENSIS*  
COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CORES DE LUZ TIPO LED RGB**

Dissertação submetida ao Programa de Biologia de Pós-graduação de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.  
Orientador: Prof. Dr. José Bonomi Barufi  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Rörig

Florianópolis, Santa Catarina – Brasil

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dos Santos, Romina Melissa González  
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EM TETRADESMUS  
WISCONSINENSIS COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CORES DE LUZ  
TIPO LED / Romina Melissa González Dos Santos ;  
orientador, José Bonomi Barufi, coorientador, Leonardo  
Rubi Rörig, 2021.  
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas,  
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Tetrademus  
wisconsinensis TWI. 3. Luzes Coloridas LED RGB. 4. Cultivo  
Algas. 5. Avaliação bioprodutos. I. Bonomi Barufi, José.  
II. Rubi Rörig, Leonardo. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de  
Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Romina Melissa González de Dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS EM *TETRADESMUS WISCONSINENSIS*  
COM UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CORES DE LUZ TIPO LED RGB**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Paulo Tamaso Miotto, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Melina Guimarães, Dra.  
Universidade Católica de Brasília

Prof. Paulo Antunes Horta Jr., Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Ana Claudia Rodrigues, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas

---

Prof. Mayara Caddah, Dra.  
Coordenadora do Programa

---

Prof. José Bonomi Barufi, Dr.  
Orientador  
Florianópolis, 22 fevereiro de 2021.

Cada uma das fases das nossas vidas envolve fatores que põem nossas capacidades em avaliação constante. Este trabalho é dedicado a meus colegas estrangeiros, que estão estudando no Brasil, afrontando mais um fator nesta fase.

## AGRADECIMENTOS

A todos meus colegas do LAFIC: Tanise Ramos, Rafaela Gordo, Thais Massocato, Bruna Rodrigues, Carolina Herrera, Ariane Paulutti, Luana de Azevedo, Karina Albuquerque, Danielle de Oliveira, Gabriela Itokazu, Geniane Schneider, Carlos López, Carla Leite, Carlos Eduardo (Cadu) Cardozo, Eduardo Bastos (Dudu), Kely Salvi, Graziela Persich, ao professor Paulo Horta sempre tão atencioso e com dicas super oportunas, e a todos que tiveram a paciência com esta estrangeira que chegou sem falar quase nada de português e ainda assim me fizeram sentir em casa e me fizeram sentir útil e parte da “equipe LAFIC”. Obrigada pela ajuda em este processo, que querendo ou não, todos acabamos gratamente envolvidos. Aprendi muito de vocês e muito de mim com as experiências vivenciadas.

Agradeço a os professores Dr. José Carlos Simonassi (Simão) e Dr. Roberto Derner, por estarem sempre me apoiando desde que cheguei à universidade. A pesar de não estarem envolvidos na minha pesquisa, eles sempre me deram apoio moral e confiaram na minha capacidade. Sempre atenciosos, predispostos e excelentes professores.

Minha gratidão a meus colegas do PPGFAP, quem tem me colocado o desafio de falar bem o português, graças a essa peculiar forma de exigir uma melhor performance, hoje posso me desenvolver com mais tranquilidade numa língua que acabei amando e ainda continuo aprendendo.

“Obrigada” é uma palavra que fica não abraçando minha inteira gratidão ao meu orientador Prof. Dr. José Bonomi quem, pacientemente me guiou neste processo. Aprendi muito dele, um profissional que primeiro é uma pessoa excelente! Levo comigo muito aprendizado em muitos aspectos. Admiro e agradeço você.

Também, quero agradecer ao Prof. Dr. Leonardo Rörig, quem foi como um pai no mundo da ciência para mim, muito mais do que um co-orientador, um grande colega uma pessoa muito considerada e compreensiva, um grande amigo.

Um agradecimento mais pessoal a minha família: meu esposo Dario, meus filhos Christopher (13), Melanie (11) e Danna (10). Eles têm sido um suporte importante. Agradeço que tenham adotado responsavelmente o desafio que implica levar uma vida fora do conforto do nosso país. Por dois anos (escola, trabalho, amigos), novos costumes e uma língua que não era a deles. Hoje acabam comigo este processo. Obrigada família por serem parte de mim.

## RESUMO

Na busca de novas alternativas para produção de biocompostos de interesse comercial como proteínas, carotenoides, carboidratos e pigmentos, principalmente, este trabalho tem por objetivo avaliar a síntese desses compostos utilizando como fator de estresse os diferentes espectros de radiação monocromática emitida por luzes do tipo LED RGB em cultivos de *Tetrademus wisconsinensis* Smith. Foram avaliados a produção de proteínas, carotenoides totais, clorofila *a* e *b*, carboidratos, carbono, nitrogênio e enxofre de cultivos de *T. wisconsinensis* que foram submetidas a tratamentos de luzes LEDs RGB vermelho, amarelo, azul, verde e branco com uma irradiância efetiva de  $12 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e comparadas em períodos de tempo de 12 e 24 horas. Pelos resultados obtidos, os compostos de maior importância foram as proteínas que compõe entre 43 e 45 % do peso seco da biomassa obtida de *T. wisconsinensis*. Os efeitos dos tratamentos sobre as variáveis não foram significativos, considerando os tratamentos de luzes coloridas ou ao tempo de tratamento. Porém, a alga se mostra promissora para produção de proteína considerando condições de cultivo com luz azul LED com um tempo de tratamento maior às 24 horas e com adição de nitrogênio no meio de cultura.

**Palavras-chave:** Biocompostos. *Tetrademus wisconsinensis*. Luz LED RGB.

## ABSTRACT

In the search of new alternatives to produce biocompounds of commercial interest such as proteins, carotenoids, carbohydrates and pigments, the aim of this work was to evaluate the synthesis of these compounds using different monochromatic radiations spectra emitted by LED light as stress factors in *Tetradesmus wisconsinensis* Smith cultures. Proteins, total carotenoids, chlorophyll *a* and *b*, carbohydrates, carbon, nitrogen and sulphur were evaluated in *T. wisconsinensis* cultures submitted to red, yellow, blue, green and white LED light treatments with an effective irradiance of  $12 \mu\text{mol}\cdot\text{fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and compared for 12 and 24 hour periods. The most relevant compound were the proteins totalling between of 43 and 45 % of dry weight of the biomass obtained. The data were not significant in relation to the light colour, neither the time treatment. Hence, the alga was shown promised for proteins production considering the blue LED light with a time of 24 hours and with nitrogen addition in the medium culture.

**Keywords:** Biocompounds. *Tetradesmus wisconsinensis*. LED light RGB.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Montagem experimento Curva PI.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2 – Montagem do experimento de Luzes.....	28
Figura 3 – Morfologia <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	32
Figura 4 – Curva PI.....	34
Figura 5 – Análise de crescimento de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	36
Figura 6 – Condutividade e pH.....	38
Figura 7 - A) Dados de densidade ótica, B) peso seco e C) contagem de célula.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de luz utilizada .....	27
Tabela 2 – Resultado de variância de ANOVAs: Parâmetro de crescimento de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	37
Tabela 3 – Resultado de variância de ANOVAs: Parâmetro bioquímicos de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	43
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos medidos após exposição.....	46
Tabela 4 – Correlação de Pearson.....	47

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos .....	21
2.2.1	Cultivar <i>T. wisconsinensis</i> em escala de laboratório. ....	21
2.2.2	Avaliar a fotossíntese de <i>T. wisconsinensis</i> por meio da produção bruta de oxigênio sob diferentes intensidades de luz. ....	21
2.2.3	Avaliar o conteúdo pigmentar, o teor de proteínas totais e dos carboidratos de <i>T. wisconsinensis</i> cultivado com tratamento de luzes coloridas a partir de LEDs RGB. 21	
3	MATERIAIS & MÉTODOS.....	22
3.1	Obtenção da cepa de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	22
3.2	Análise da morfologia de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith .....	22
3.3	Teste de quantidade de luz apropriada para a aclimação .....	22
3.4	Crescimento e obtenção de biomassa de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith	25
3.5	Exposição a luzes de diferentes cores .....	26
3.6	Análise da biomassa.....	29
3.6.1	Clorofilas e carotenoides .....	29
3.6.2	Densidade de células, fluorescência de clorofila-a <i>in vivo</i> , e densidade óptica. 29	
3.6.3	Massa seca (MS).....	30
3.6.4	CHNS (Carbono – Hidrogênio – Nitrogênio - Enxofre) .....	30
3.6.5	Proteínas Totais e Carboidratos .....	30
3.6.6	Análises estatísticas .....	31
4	RESULTADOS .....	32
4.1	Análises morfológicas de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith .....	32

4.2	Teste de quantidade de luz apropriada para o cultivo de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith (curva P <sub>x</sub> I).....	34
4.3	Crescimento e aclimação de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith.....	35
4.4	Exposição a diferentes cores de luzes LED coloridas. ....	37
5	DISCUSSÃO .....	48
5.1	Morfologia de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith. ....	48
5.2	Quantidade de luz apropriada para a aclimação. ....	49
5.3	Exposição a diferentes cores luzes LED. ....	50
5.4	Análise da Biomassa de <i>Tetrademus wisconsinensis</i> Smith .....	55
6	CONCLUSÃO .....	56
7	REFERÊNCIAS .....	57
8	ANEXO A.....	63
8.1	Caraterização das luzes LED .....	63
8.2	Espectro de ação da fotossíntese.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Cerca de 65 % da superfície terrestre está coberta de água, na qual se encontram diversos organismos fotossintetizantes conhecidos como algas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Estima-se a existência de 5000 espécies de algas planctônicas marinhas (EVANGELISTA *et al.*, 2007) e, segundo uma base de dados global, o registro de algas totaliza 159.658 espécies no momento, tanto de água doce como marinhas (GUIRY & GUIRY 2020). Estes organismos, como as plantas, aproveitam a luz solar e produzem sua própria energia para subsistir, por meio da fotossíntese.

Tal diversidade de algas chama a atenção para sua potencial aplicação em soluções de problemas no nosso dia-a-dia. As microalgas têm sido o foco de estudos para aproveitamento biotecnológico e aplicações econômicas como, por exemplo, a obtenção de pigmentos (XIE *et al.*, 2013; ABURAI; SUMIDA; ABE, 2015, NASCIMENTO *et al.*, 2016; SHAH *et al.*, 2016; ABURAI *et al.*, 2018; CORZO *et al.*, 2019), lipídeos (CORZO *et al.*, 2019), proteínas e outros compostos de importância no mercado mundial (ABOMOHRÁ; JIN; EL-SHEEKH, 2016, PATEL *et al.*, 2016; CASTILLO *et al.*, 2017). Em comparação com as plantas, as algas têm uma vantagem, já que o seu cultivo tem maior rendimento em menor tempo. Além disso, as algas demandam menos áreas de cultivo do que as plantas (CHISTI, 2007).

As algas apresentam uma ampla variedade de substâncias metabólicas que podem ser utilizadas com benefícios para a alimentação de animais e do ser humano (NOVOVESKÁ *et al.*, 2019). Entre os principais compostos de interesse decorrentes das algas estão as proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos, antioxidantes e outros (GONZÁLEZ-BALDERAS; VELÁSQUEZ-ORTA; ORTA LEDESMA 2020; NOVOVESKÁ *et al.*, 2019). Todos esses compostos são de alto valor industrial e comercial em nível global (NOVOVESKÁ *et al.*, 2019). Na atualidade, a produção de biomassa de algas busca potencializar a síntese desses compostos. Existem várias estratégias que são utilizadas para a regulação de produção de biocompostos através da geração de estresse na alga.

Muitas espécies de algas produzem altas quantidades de todos esses compostos mencionados anteriormente. Algumas das espécies de algas que estão sendo majoritariamente estudadas para obtenção de biocompostos são: *Anabaena*

*variabilis* Kützing ex Bornet & Flahault, *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs, *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dangeard, *Chlamydomonas* sp. Ehrenberg, *Chlorella sorokiniana* Shihira et R. W. Krauss, *Chlorella sorokiniana* Shihira et R. W. Krauss, *Chlorella minutissima* Fott et Nováková (UTEX2341), *Chlorella pyrenoidosa* H. Chick, *Auxenochlorella protothecoides* (Krüger) Kalina et Puncochárová (= *Chlorella protothecoides* Krüger), *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], *Chromochloris zofingiensis* (Dönz) Fucíková et L. A. Lewis (= *Chlorella zofingiensis* Dönz), *Desmodesmus abundans* (Kirchner) E. Hegewald, *Dunaliella tertiolecta* Butcher (CASTILLO *et al.*, 2017), *Haematococcus pluvialis* Flotow (SHAH *et al.*, 2016), *Nannochloropsis oculata* (Droop) D. J. Hibberd, *Neochloris oleoabundans* S. Chantanachat et Bold, e finalmente *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M. J. Wynne (= *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing) e *Tetraselmis* sp. F. Stein (CASTILLO *et al.*, 2017).

Estresse é a alteração sobre um conjunto de fenômenos de autorregulação celular, promovidos por um ou mais fatores, e que gera uma resposta celular a esse estresse. O estresse gera mudanças sobre o metabolismo celular, pois a célula busca aclimatar-se e reestabelecer sua condição normal. No estresse celular se reconhecem 4 etapas importantes: alerta, regulação, aclimatação e adaptação (BOROWITZKA, 2018).

Para a finalidade de uma regulação positiva da produção de biocompostos, é necessário desviar a homeostase das algas a fim de que o metabolismo possa ser redirecionado. Nesse contexto, é importante considerar a definição do que se considera estresse. O trabalho de Borowitzka (2018) sumariza essa questão, atentando para o fato de que um estresse não necessariamente traz um componente negativo, e sim uma saída de um estado de equilíbrio, para o qual pode haver um processo de aclimatação, de regulação rápida ou lenta, ou até mesmo uma adaptação (que envolve a ocorrência de mutações genéticas) (BOROWITZKA, 2018). O processo de estresse num cultivo de algas microscópicas pode ser resultado da alteração de uma ou mais condições ambientais (BOROWITZKA, 2018). O estresse por alteração na entrada de CO<sub>2</sub> no sistema de cultivo, por exemplo, beneficiou a produção de ácidos graxos saturados nas espécies *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa* (TANG *et al.*, 2011). A manipulação dessa variável também pode ajudar a melhorar no processo de extração de carotenoides e vitaminas, conforme verificado em *Tetradesmus obliquus*

(*Scenedesmus obliquus*) (CHRONOPOULOU *et al.*, 2019). A modificação de nutrientes no meio de cultivo das algas é outra estratégia muito praticada pelos pesquisadores que procuram melhorar o rendimento de produção de compostos por fração de cultivo. Num cultivo “outdoor” de *Desmodesmus* sp. (Chodat) S.S.An, T. Friedl & E. Hegewald, (da família Scenedesmaceae), a alteração dos níveis de amônio e nitratos, combinada com um aumento de 20% de CO<sub>2</sub> resultou no crescimento rápido da biomassa (HUANG *et al.*, 2012). A alteração dos níveis de temperatura e salinidade afetam a composição e acumulação de carotenoides em cultivos de *Scenedesmus* sp. Meyen (ABURAI; SUMIDA; ABE, 2015). Outro exemplo consiste na exposição de algas ao ultrassom, que incrementou a eficiência dos cultivos de *Anabaena variabilis* Kützing ex Bornet & Flahault, promovendo também a acumulação de lipídios (HAN *et al.*, 2016).

Uma alternativa interessante considerada como fator de estresse na melhora da produção de biomassa é a luz (XIE *et al.*, 2013), ainda que os custos de montagem de um projeto com luz artificial possam ser muito altos (TREDICI; ZLTTELLI, 1998). A luz é a principal fonte de obtenção de energia das algas, e considerando que elas não a utilizam em sua totalidade, torna-se relevante sua manipulação a fim de otimizar seu aproveitamento para obtenção de biomassa de algas de alto rendimento. Existem estudos que mostram que a variação no fotoperíodo de luz (GEORGE *et al.*, 2014) e a alteração da irradiância de radiação UV-A, UV-B, UV-C e cores diferentes do espectro visível, trazem vantagem no cultivo de plantas (URBAN *et al.*, 2016).

As algas utilizam só uma fração muito pequena dos comprimentos de ondas de luz do espectro de energia do sol. Um passo importante para melhorar a eficiência da fotossíntese, onde a produção de biomassa pode ser maior e de melhor qualidade, tudo mediante a manipulação do espectro de luz que chega aos cultivos de microalgas (RAMANNA *et al.*, 2016). A manipulação de radiação incidente pode ser viável para aumentar o rendimento da coleta de algas. Um exemplo sobre o efeito positivo do incremento da intensidade de luz (de 60 a 150  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) sobre o aumento de produção de proteínas foi observado em cultivos de *Ankistrodesmus falcatus* (GEORGE *et al.*, 2014). Uma revisão feita por Gong; Bassi (2016) ressalta que a mudança nas intensidades de luz branca afeta a produção de pigmentos carotenoides em *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis* e *Chlorella pyrenoidosa*. A maior intensidade de luz

favoreceu a produção de carotenoides nestas algas. Os mesmos autores observaram uma maior tolerância à intensidade de luz de  $1625 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  em *Scenedesmus almeriensis*, e uma maior produção de luteína (GONG & BASSI, 2016).

Uma interessante maneira de combinar a quantidade de luz necessária para as microalgas e uma oportunidade de economizar energia é o uso de fontes de luz do tipo LED para cultivos em grande escala (ONUMA; MATSUMOTO; ARIMURA, 2020). LED ou Light-Emitting Diodes são diodos emissores de luz que se caracterizam por terem uma emissão de fótons não-térmicos de maior longevidade e de um consumo elétrico muito mais baixo (SCHULZE *et al.*, 2014). As LEDs permitem uma iluminação mais adequada sem alterar a temperatura do meio de experimento com o uso por longos períodos de tempo. Além disso, essas lâmpadas têm sido usadas como ferramentas para a indução da produção de compostos bioativos (HASAN *et al.*, 2017).

O efeito de maior rendimento de produção de biocompostos pode ser melhorado com o uso de luzes LED monocromáticas. Assim, as cores vermelha, verde e azul de LED induzem a resistência de plantas contra fungos por exemplo, o que poderia ser uma característica bem aproveitada para meios de cultivos de algas (HASAN *et al.*, 2017). Neste mesmo trabalho, foi referido principalmente os benefícios do uso de luzes monocromáticas para diferentes aplicações, citando alguns exemplos para a luz vermelha LED, como melhoramento na produção de sacarose, antocianina, amido (todas com intensidade de  $50 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), lignina ( $500 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $\beta$ -caroteno ( $128 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e outros em plantas de algodão, uva, oleíferas, maçã, trigo, ervilha. A luz azul LED beneficia a síntese de vitamina C em *Brassica campestris* com uma intensidade de  $80 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , tocofenol e carotenoides em *Lactuca sativa* com uma intensidade de  $100 - 200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , e outros benefícios. A luz verde LED, favorece a produção de compostos fenólicos,  $\alpha$ -tocoferol, antocianina e vitamina C em alface, trigo e outras plantas de uso comercial com uma intensidade aproximada de  $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Já a luz amarela LED ajuda a produção de  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C, luteína em *Raphanus sativus*, *Malus sp.*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, com uma intensidade de  $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

No cenário das algas, o cultivo de *Tetradismus sp.* mostrou que a combinação entre a cor de luz azul e intensidade de  $25 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de luz

branca, afeta de forma significativa a produção de biomassa incrementando a quantidade de carotenoides e clorofila *a* e *b*. No mesmo trabalho, é destacada a ação da luz verde com uma intensidade de  $95 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  favorecendo uma alta concentração da biomassa ao final do cultivo (GONÇALVES *et al.*, 2019).

A família de algas Scenedesmaceae (Filo Chlorophyta, Reino Plantae) possui várias espécies que estão sendo avaliadas atualmente para a produção de biocombustíveis e suplementos alimentícios. *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) (Turpin) Kützing é uma espécie com alto índice de crescimento, sendo uma das mais conhecidas mundialmente na produção de biodiesel, suplementos farmacêuticos, suplementos nutricionais e outros compostos de interesse industrial (MANDAL & MALLICK, 2009; NASCIMENTO, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2014; HO *et al.*, 2014; AMARO *et al.*, 2017; MASSA *et al.*, 2017; DE FARIAS SILVA; SFORZA; BERTUCCO, 2018; LEÓN-SAIKI *et al.*, 2018). Uma espécie aparentada, *Scenedesmus quadricauda* Chodat, também tem um antecedente muito atrativo na produção de lipídios. SONG E PEI (2018), por exemplo, obtiveram uma acumulação de lipídios a partir de cultivos mixotróficos – heterotróficos desta espécie e REN *et al.* (2014) também conseguiram uma acumulação muito alta de lipídios em cultivos da mesma espécie, desta vez com adição de EDTA e íons metálicos como fator de estresse. *Desmodesmus* sp. (Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald, outra espécie da mesma família, é uma alga termotolerante ( $35^{\circ}\text{C} - 46^{\circ}\text{C}$ ) e resistente às altas intensidades de luz como  $2600 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  (HUANG, 2012). Essa espécie tem sido apontada como viável para a produção de luteína (XIE *et al.*, 2013). *Scenedesmus bijuga* Kützing é outro exemplo de microalga que é utilizada para testes de produção de biomassa em alta densidade. Um experimento muito interessante demonstrou que a radiação monocromática verde tipo LED é muito melhor absorvida (enquanto que o aproveitamento das cores azul e vermelho diminui) quando a densidade do cultivo é alta, o que permite otimizar a produção de alta densidade de biomassa em fotobiorreatores (MATTOS *et al.*, 2015).

*Tetradismus wisconsinensis* Smith é uma espécie que pertence à família Scenedesmaceae, uma alga microscópica de ambientes de água doce (mesotrófica ou eutrófica). Essa espécie é muito característica dos sistemas aquáticos lênticos mais do que em ambientes lóticos. A espécie se caracteriza como um cenóbio livre de até 4 células, às vezes com 1 ou 2 células. Na análise desde um plano superior,

se observam 4 células com um apêndice exterior em cada uma delas. Na vista lateral, se observam 2 células ovoides unidas ao longo eixo interior com extremidade pontiaguda. A clorofila está presente num único cloroplasto alongado com um pirenoide central, que está envolvido por uma região hialina relacionada a produção de grãos de amido que ficam ao redor do pirenoide. O comprimento das células oscila entre 12 – 14,5  $\mu\text{m}$  e de largura entre 4 – 5,8  $\mu\text{m}$ . A reprodução por autocolônias acontece dentro da parede celular da célula velha e a liberação delas ocorre com a ruptura da parede celular dessa célula mãe. As células ficam unidas também mediante um composto gelatinoso. Não tem um vacúolo central. A reprodução da célula ocorre em primeiro lugar, seguida pela divisão do citoplasma para depois dar passo à formação da membrana celular e por último a ruptura da parede celular da célula mãe. O ciclo de vida da *T. wisconsinensis* começa com a formação de células não móveis, conhecidas como autósporos, que permitem a reprodução por divisões sucessivas nucleares, a este processo segue a maturação das novas células dentro da célula mãe e uma vez acontecido isso esta nova autocolônia é liberada por ruptura da membrana e parede celular da célula mãe. Este ciclo de reprodução chega ao final quando estas autocolônias amadurecem e começam a formar novamente os autósporos que darão origem a novas colônias (SMITH, 1913; KOMÁREK; FOTT, 1983).

Uma vez que *T. wisconsinensis* apresenta características morfológicas semelhante às espécies anteriormente mencionadas, e conhecendo a composição química muito atrativa para o seu aproveitamento biotecnológico (carotenoides de alto valor comercial principalmente e lipídios), esta espécie constitui uma nova opção para avaliar a produção de compostos oleaginosos, proteicos, de carboidratos, antioxidantes e vitaminas. Análises prévias do comportamento do cultivo de *T. wisconsinensis* Smith mostraram que os indivíduos dessa espécie são muito flexíveis às mudanças de temperaturas bruscas, como foi observado também com *Desmodesmus* sp. (Chodat) S. S. An, T. Friedl & E. Hegewald (XIE *et al.*, 2013; GIMÉNEZ, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2016). Com base nestes aspectos, a análise de respostas decorrentes de outras potenciais fontes de estresse nas algas torna-se necessária e pertinente.

Todos estes trabalhos têm demonstrado a importância de continuar pesquisando sobre produção de biocompostos a partir de algas usando como fator de estresse a luz LED. Porém, nem todos estes trabalhos têm considerado o teste

de eficiência de produção fotossintética das algas e o fator de correção de eficiência da fotossíntese (HASAN *et al.*, 2017; GIMÉNEZ, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2016). A produção de biocompostos a partir de algas com estes métodos ainda precisa muitos ajustes olhando dessa perspectiva. Outro aspecto a considerar é que, uma vez que as microalgas estão adaptadas a ambientes onde elas ocorrem, precisam ser aclimatadas a condições ótimas de cultivo, direcionadas para a finalidade de interesse (GEORGE *et al.*, 2014). Assim, cepas de espécies que são isoladas e utilizadas em outros continentes ou lugares de características ambientais diferentes aos endêmicos (e mais ainda para cultivos a grande escala) são pouco estáveis. Isso faz que a procura por cepas de microalgas para produção industrial de biocompostos continue. Além disso, as cepas mais apropriadas acabam sendo específicas para cada região. Neste cenário, *T. wisconsinensis* se mostra como um importante candidata para produção de biomassa, já que esta espécie sendo cosmopolita, se mostra muito flexível a temperatura o que favoreceria a produção de biomassa a grandes escalas em ambientes abertos.

Tudo isso nos permite destacar o potencial da *T. wisconsinensis* para o estudo da produção de biocompostos de interesse comercial, utilizando como fator de manipulação as luzes monocromáticas tipo LED RGB.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Neste trabalho o objetivo consistiu em avaliar os efeitos de diferentes espectros de radiação monocromática provida por LED RGB (vermelho, azul, amarelo, verde e branco) na fisiologia e na produção de metabólitos em cultivos de *Tetrademus wisconsinensis* Smith em laboratório.

### 2.2 Objetivos Específicos

**2.2.1** Cultivar *T. wisconsinensis* em escala de laboratório.

**2.2.2** Avaliar a fotossíntese de *T. wisconsinensis* por meio da produção bruta de oxigênio sob diferentes intensidades de luz.

**2.2.3** Avaliar o conteúdo pigmentar, o teor de proteínas totais e dos carboidratos de *T. wisconsinensis* cultivado com tratamento de luzes coloridas a partir de LEDs RGB.

### 3 MATERIAIS & MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da cepa de *Tetrademus wisconsinensis* Smith

A cepa pura de *T. wisconsinensis* foi isolada de uma amostra de água da Lagoa de Ypacaraí – Paraguai, de coordenadas 25°18'38.89"S; 57°18'10.33"O (LÓPEZ et al., 2016), utilizando a metodologia de cultivo sólido com a técnica de semeadura por estrias em placa com ágar-ágar e meio de cultivo Bristol também conhecido como BBM (STARR; ZEIKUS, 1993). Uma vez isolada, a cepa foi levada a cultivo na fase líquida com o mesmo meio de cultura. A cepa foi mantida em frascos tampados tipo erlenmeyer de 125 mL e repicada cada 15 – 20 dias. As condições de manutenção foram temperatura entre 18°C e 20°C, irradiância de 80 - 100  $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  (luz branca fluorescente) e fotoperíodo de 12h:12h (claro - escuro).

#### 3.2 Análise da morfologia de *Tetrademus wisconsinensis* Smith

Para a caracterização da espécie, utilizou-se o cultivo da espécie, em duas situações: aclimatada ao repique periódico (1% da amostra é re-diluída em meio de cultura) e outra na falta de repique (depois de 38 dias do último repique habitual). Estas observações se realizaram durante todas as fases com ajuda do microscópio Karl Zeiss BK, com lâminas de microscópio montadas utilizando-se de uma gota do cultivo de *T. wisconsinensis*. Registraram-se fotomicrografias com ajuda de uma câmera digital ANSCOPE 5.0, acoplada ao microscópio em aumentos totais de 400X e 1000X e se descreveram as características morfológicas da espécie. A espécie foi identificada e caracterizada com a chave de identificação de Scenedesmeaceae dos autores Komárek; Fott (1983).

#### 3.3 Teste de quantidade de luz apropriada para a aclimação

Um dos desafios para trabalhar com cultivo de microalga é conhecer a quantidade de luz apropriada para o crescimento celular e obtenção de biomassa em quantidade adequada para posteriormente realizar os experimentos. A metodologia efetiva para avaliar a quantidade de luz é o teste com a curva  $P \times I$  (ou "Photosynthesis vs. Irradiance, i.e., fotossíntese vs. irradiância). Para a obtenção da curva  $P \times I$  de *T. wisconsinensis* a cultura foi submetida a diferentes intensidades de luz arbitrariamente pré-escolhidas: 0  $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  (para medida da

respiração); 14,164; 24,918; 39,266; 64,408; 88,01; 131,4; 215,62; 295,76; 382,76; 662  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Figura 1). As intensidades luminosas foram provenientes de lâmpadas tipo LED brancas. Assim, as amostras de cultivo, com uma concentração aproximada de 2.500.000 cél.  $\text{mL}^{-1}$  (em fase de crescimento log - exponencial), foram inseridas em um recipiente transparente de metacrilato contendo 173 mL. Durante o período de exposição em cada irradiância, foi feita a avaliação da produção de oxigênio. Os dados foram obtidos a partir de 5 réplicas de cultivos de *T. wisconsinensis*.

A quantidade de oxigênio produzido pela alga foi medida com um oxímetro com sensor ótico PyroScience de software Profix. O oxímetro permite a medição da quantidade de oxigênio na amostra a cada 10 s. A partir do momento no qual havia a formação de uma produção constante, considerou-se que as amostras estavam aclimatadas e estabeleceu-se o tempo de 15 minutos para a incubação em cada uma das intensidades. Para cada incubação em cada uma das intensidades, o cultivo de algas foi renovado.

Após a obtenção dos valores de produção primária líquida de oxigênio (1), taxa de respiração (2), produção primária bruta de oxigênio (3) e a curva PI (Fotossíntese - Irradiância) foi elaborada de acordo com a equação (4):

$$O_{PL} = O_f - O_i \quad (1)$$

$$R = O_i - O_f \quad (2)$$

$$P_B = O_j = O_{PL} + R \quad (3)$$

$$PI = P_{\text{máx.}} \cdot I / L \cdot e^1 \quad (4)$$

**Onde:**

$O_{PL}$ : Produção primária líquida de oxigênio

$O_f$ : Concentração de oxigênio final

$O_i$ : Concentração de oxigênio inicial

R: Taxa de respiração

I: Irradiância

L: Produção líquida de Oxigênio nessa irradiância

$P_B$ : Produção primária bruta de oxigênio

PI: Photosynthesis- Irradiance (Fotossíntese - Irradiância)

Os dados da curva PI foram submetidos ao ajuste a partir da fórmula de WEBB *et al.*, (1974):

$$P = P_{\text{máx.}} \cdot [1 - e^{(-\alpha \cdot I / P_{\text{máx.}})}] \quad (5)$$

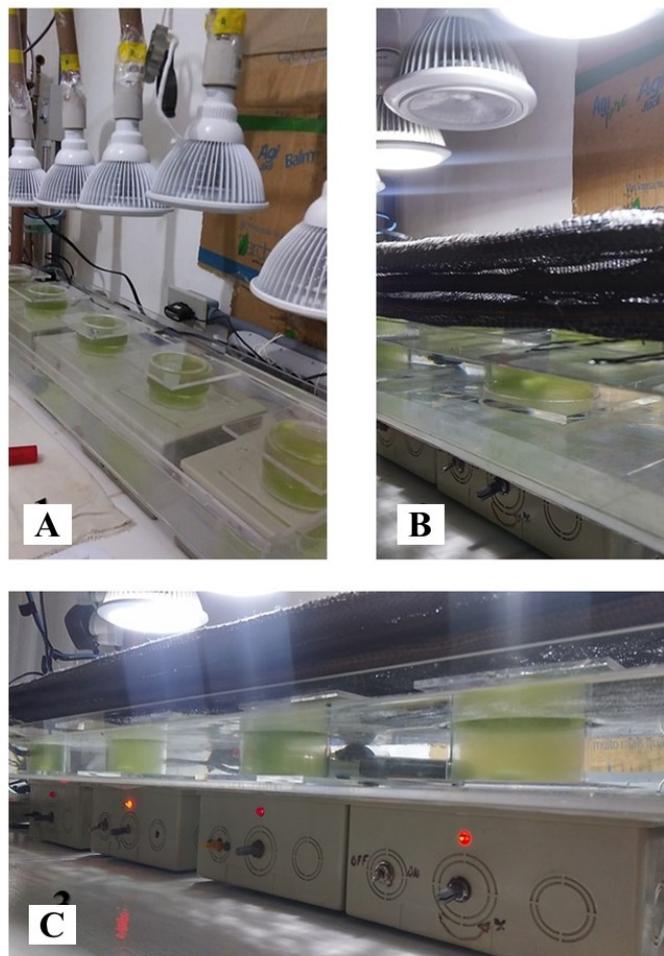
**Onde:**

P: Fotossíntese

$P_{\max}$ : Taxa de fotossíntese máxima

$\alpha$ : estimação de eficiência fotossintética

Com o ajuste das curvas utilizando o software Kaleida Graphs, foi possível calcular os valores de  $P_{\max}$  (Fotossíntese máxima),  $\alpha$  (eficiência da fotossíntese) e  $E_k$  (irradiância de saturação, sendo  $E_k = P_{\max}/\alpha$ ). A irradiância ótima de saturação foi o menor valor de irradiância na qual o cultivo atingiu o valor de  $P_{\max}$ .



**Figura 1:** Montagem de instalação para a análise para curva PI, utilizando lâmpadas tipo LED brancas, câmaras de incubação de metacrilato, agitadores magnéticos e diferentes formas de bloquear a quantidade de luz, a fim de obter diferentes quantidades de luz em diferentes incubações. **A)** recipientes de incubação do cultivo de *T. wisconsinensis* colocados sobre agitadores e cada um com uma lâmpada independente. **B)** Uso de malha de sombrites para gerar a graduação das diferentes intensidades de luz e **C)** Processo de incubação em funcionamento com as lâmpadas acesas. As seguintes intensidades de luz foram utilizadas: 0  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (escuro, para obter a taxa de respiração); 14,164; 24,918; 39,266; 64,408; 88,01; 131,4; 215,62; 295,76; 382,76 e 662  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

### 3.4 Crescimento e obtenção de biomassa de *Tetradismus wisconsinensis*

#### Smith

Nesta etapa, os cultivos foram repicados e escalonados para frascos erlenmeyer de 500 mL. Para este procedimento se coletaram 5 mL da cepa mãe (aquela cultura mantida no cepário) e se colocou no erlenmeyer contendo o mesmo meio de cultura, BBM. Com esta diluição se obteve uma concentração final de 10.000 – 20.000 cel/mL<sup>-1</sup>. Foram preparadas 3 réplicas nas mesmas condições. Todas elas se mantiveram durante todo o processo de avaliação de curva de crescimento no cepário LAFIC (Laboratório de Ficologia) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A temperatura ambiental do cepário se manteve em 20°C ± 2, os cultivos receberam areação constante e uma intensidade de luz igual a 70 ± 5 μmol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O tipo de luz utilizada foi luz fluorescente. A curva de crescimento se avaliou durante 38 dias e foram identificaram as diferentes fases de crescimento, sem renovação do meio de cultura ao longo desse período. Foram realizadas contagens diárias de células com uso de câmara de Neubauer. A fluorescência de clorofila-a *in vivo* e a turbidez foram medidos com ajuda do fluorômetro TRILOGY (Turner Designs) e a condutividade com o condutímetro ATC HI 9835.

Para a caracterização da biomassa, foi calculada a taxa de crescimento (6) da alga e tempo de duplicação (7). Para esses cálculos se empregaram as seguintes equações:

$$\mu = (\ln X_f / X_i) / (t_f - t_i) \quad (6)$$

$$T_d = \ln 2 / \mu \quad (7)$$

**Onde:**

μ: Taxa de crescimento

X<sub>f</sub>: Número de células final após o tempo t<sub>f</sub>

X<sub>i</sub>: Número de células inicial no instante do tempo t<sub>i</sub>.

T<sub>d</sub>: Tempo de duplicação

t<sub>f</sub>: Tempo final

t<sub>i</sub>: Tempo inicial

Uma vez caracterizados os cultivos de *T. wisconsinensis*, foi realizado um escalonamento do cultivo para o volume de 5 L, utilizando as 3 réplicas anteriores e completando com o meio de cultura BBM até 5 L. Nestes recipientes, as algas foram

cultivadas por mais 8 dias, seguindo as mesmas condições de cultivo anteriormente descritas.

Para o experimento, os volumes dos cultivos de 5 L após 8 dias foram diluídos com 12,5 L de meio de cultura e redistribuídos em frascos de erlenmeyer de 500 mL previamente autoclavados.

### 3.5 Exposição a luzes de diferentes cores

O experimento foi composto por duas etapas principais: a de aclimação e o tratamento com luzes coloridas a partir de LEDs RGB. As amostras de algas foram misturadas e homogeneizadas ao final da aclimação justo antes de sua exposição aos tratamentos com radiação colorida (Figura 2).

A aclimação foi de 8 dias em luz branca tipo LED com cultivos de *T. wisconsinensis* em meio de cultura BBM e com um fotoperíodo de 12 horas. As amostras foram distribuídas em quantidades iguais de 500 mL em 35 erlenmeyer estritamente autoclavados, com tampas de plástico transparente. Uma vez medida a quantidade de luz branca de  $80 - 100 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ , as amostras foram colocadas de forma que não houvesse autossombreamento. O ambiente do experimento foi mantido na temperatura constante de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Todos os cultivos receberam aeração constante. Antes da segunda etapa, realizou-se uma homogeneização das amostras e reposição de meio de cultura (6%) no final da etapa de aclimação, obtendo-se uma densidade celular de  $5,06 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$  e densidade óptica de 0,241. Os cultivos encontraram-se na fase exponencial de crescimento.

Antes do tratamento de luzes, realizou-se também a caracterização das mesmas com o uso do espectrorradiômetro "Ocean Optics SpectraSuite" (Apêndice A).

Para a exposição às luzes coloridas tipo LED, as 35 amostras foram avaliadas no tempo zero (imediatamente antes da exposição), após 12 horas de experimento e finalmente após 24 horas. Nesses períodos, foram monitorados o pH (pHmetro de bancada ORION STAR A211), fluorescência de clorofila-a *in vivo* e turbidez (fluorômetro Turner Trilogy), temperatura e condutividade (condutivímetro ATC HI 9835) e densidade óptica (espectrofotômetro BIOSPECTRO). Amostras foram coletadas para posterior contagem celular, determinação da massa seca, e

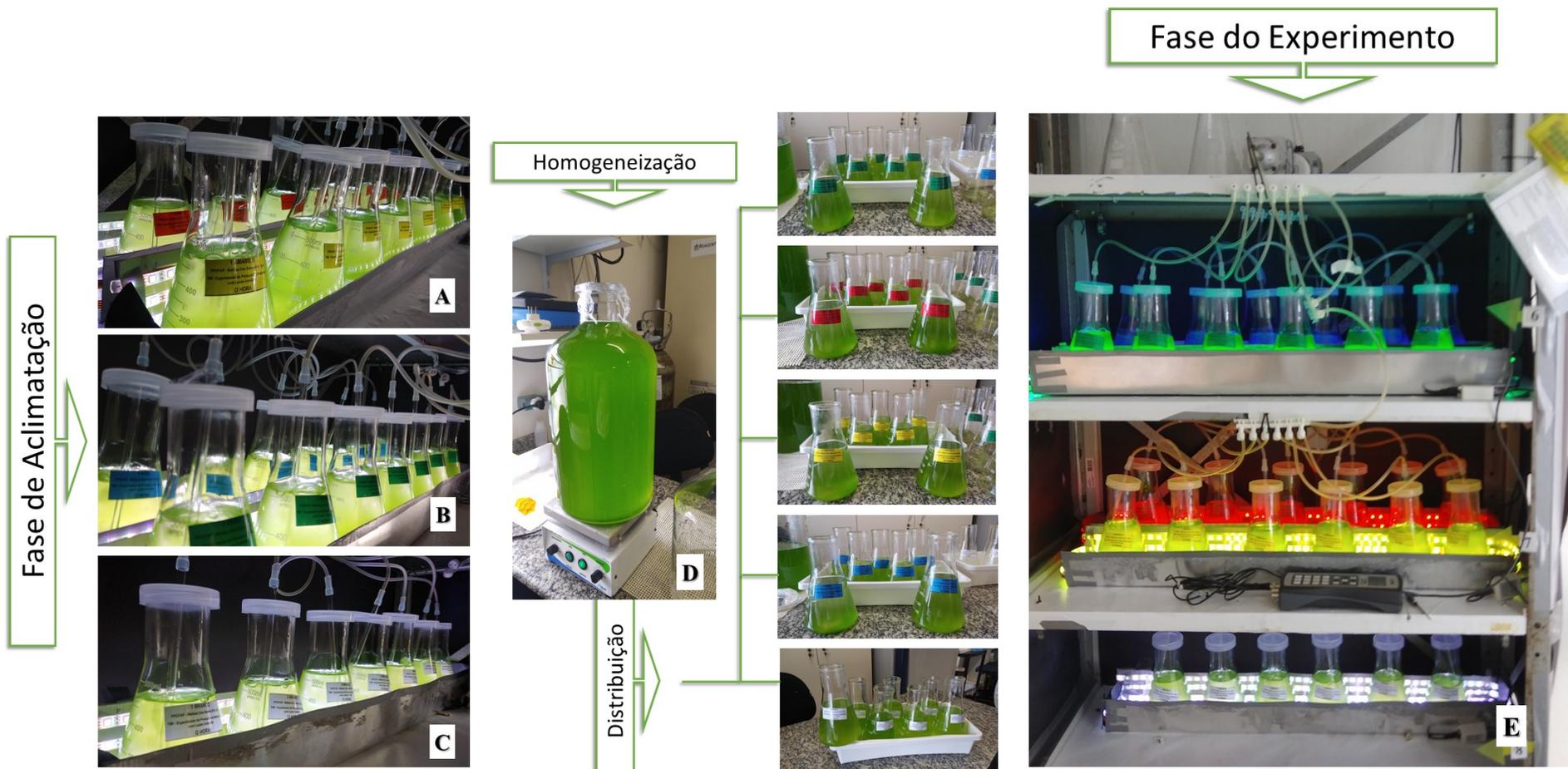
análise de parâmetros bioquímicos como o teor de clorofilas e carotenóides extraídos, carboidratos, proteínas totais e CHNS.

Foram necessárias 5 prateleiras para distribuir 7 réplicas para cada tratamento de luz (branca LED, vermelha LED, amarela LED, azul LED e verde LED), conforme ilustrado na figura 2. Foram usadas 3 pseudo-réplicas (de uma amostra) de cada tratamento para a análise no tempo inicial ( $t_0$ ), ou seja, no começo do experimento. Depois de 12 horas de tratamento com as luzes coloridas se obtiveram 3 réplicas de cada tratamento e finalmente depois de 24 horas de tratamento obtiveram também outras 3 réplicas de cada tratamento.

As quantidades (medidas em  $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) de cada uma das luzes coloridas foram ajustadas proporcionalmente para atender ao espectro de ação da fotossíntese de uma alga verde (no caso, *Ulva taeniata*, Anexo B, HAXO; BLINKS (1950). Assim, foram obtidos fatores de correção às intensidades luminosas em cada cor a partir do espectro de ação da fotossíntese, de modo a se calcular proporcionalmente a porção de irradiância efetiva para a fotossíntese em cada uma das cores, conforme a Tabela 1. Assim, o total de luz branca LED se manteve em  $62 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ , a vermelha LED foi ajustada para a intensidade de  $21 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ , a luz amarela LED foi regulada para  $40 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ , a azul LED para  $18 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  e a luz verde LED em  $60 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Ao se aplicar os fatores de correção oriundos do espectro de ação, foi obtido o mesmo valor de irradiância efetiva para fazer fotossíntese de  $12 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$  em cada uma das quatro cores (azul, amarelo, verde e vermelho). As medições realizaram-se com um irradiômetro LI-COR LI1400.

**Tabela 1:** Quantidade de luz utilizada em cada um dos tratamentos de luzes coloridas aplicadas em *T. wisconsinensis* por 12 e 24 h. Apresenta-se o fator de correção da irradiância calculado a partir do espectro de ação de Haxo; Blinks (1950), permitindo a estimativa do total de irradiância efetiva para a fotossíntese das algas decorrente dos tratamentos com luzes LED amarela, vermelha, verde e azul.

Tratamento	Fator de Correção	Valor no Quantômetro $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$	Irradiância efetiva para fotossíntese $\mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$
Branco LED	sem f. c.	60	60
Amarelo LED	0,3	40	12
Vermelho LED	0,6	21	12,6
Verde LED	0,2	60	12
Azul LED	0,7	18	12,6



**Figura 2:** Montagem do experimento de exposição de *T. wisconsinensis* às luzes coloridas. **A-C)** Frascos erlenmeyers contendo cultivo de *T. wisconsinensis*, posicionados na fase de aclimação das algas ao ambiente de experimentação, **D)** fase de homogeneização dos cultivos (prévia ao experimento). **E)** Experimento com exposição das algas às luzes coloridas por 12 e 24 h.

### **3.6 Análise da biomassa**

As biomassas obtidas nos tratamentos de luzes coloridas LED (inicial, antes da exposição, após 12 horas e após 24 horas) foram imediatamente coletadas em ambiente escuro, em tubos Falcon de 50 mL, concentradas por centrifugação, e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar a alteração dos compostos produzidos durante o tratamento. No caso da análise da massa seca e da clorofila-a extraída, os procedimentos abaixo detalhados foram realizados imediatamente após a coleta. Antes das demais análises propostas para *screening* da cepa de *T. wisconsinensis*, as amostras foram liofilizadas e conservadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os seguintes parâmetros foram analisados nas amostras: pigmentos (Clorofila "a" e "b", carotenóides totais), contagem celular, densidade óptica, turbidez, massa seca, CHNS, proteínas totais e carboidratos.

#### **3.6.1 Clorofilas e carotenoides**

Para a análise dos pigmentos, as amostras liofilizadas foram extraídas em dimetilformamida (DMF) durante 24h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após, os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm (centrífuga SIGMA E-15) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e lido no espectrofotômetro SHIMADZU UV-2550 UV-visível, com cubetas de quartzo com varredura entre 280 a 750 nm e registros a cada 1nm. Os teores de clorofilas a e b e de carotenoides totais foram obtidos a partir das equações de Welburn (1994).

#### **3.6.2 Densidade de células, fluorescência de clorofila-a *in vivo*, e densidade óptica.**

As contagens celulares foram feitas usando a câmara de Neubauer.

A fluorescência de clorofila-a *in vivo* foi lida no fluorômetro AQUAFLUOR usando cubetas de quartzo. As amostras foram previamente homogeneizadas usando vórtex BIOMIXER.

Para os parâmetros condutividade e temperatura, as leituras foram das feitas com o condutímetro ATC HI 9835, colocando os sensores de condutividade e temperatura diretamente nas amostras.

A densidade óptica foi registrada a 685 nm no espectrofotômetro BIOSPECTRO, utilizando cubetas de quartzo para as amostras analisadas. Pela condição de concentração das amostras, elas foram diluídas em fração 0,5 / 2,5 mL (amostra / meio de cultura). Todos os dados foram registrados e convertidos ao valor final.

O pH, condutividade e temperatura foram medidas como variáveis para controle de condições físico-químicas. Utilizou-se pHmetro THERMOSCIENTIFIC, colocando-se os sensores diretamente nas amostras.

### **3.6.3 Massa seca (MS)**

Para o cálculo da massa seca foram utilizados 50 mL de amostra de cada frasco de cultivo em cada um dos tempos e tratamentos considerados. A amostra foi filtrada com ajuda de um kit de filtração com filtro de fibra de vidro de porosidade 0,7 µm, previamente pesados. Uma vez filtradas, as amostras foram secadas na estufa numa temperatura de 75°C por 24 horas. Uma vez secos, os filtros contendo a amostra foram pesados em balança analítica. Desta forma se obtiveram os valores de massa seca mediante a diferença entre a massa do papel filtro com a amostra seca e o filtro seco sem amostra.

### **3.6.4 CHNS (Carbono – Hidrogênio – Nitrogênio - Enxofre)**

Para a avaliação deste parâmetro foi usado o analisador elementar LECO, dos Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) da Universidade de Málaga. Quantidades de biomassa de cerca de 2 mg de amostra liofilizados foram enviados para a análise. A amostra passa por um processo de combustão interna no equipamento, e por processo de comparação com padrões de cada um dos tipos de elementos, é possível quantificar a presença de cada um deles na amostra.

### **3.6.5 Proteínas Totais e Carboidratos**

O cálculo de proteínas totais foi feito utilizando o teor de nitrogênio total de cada uma das amostras, multiplicado pelo fator de conversão de 5,02, calculado para *Scenedesmus* sp., segundo Templeton; Laurens, (2015).

Para a quantificação de carboidratos totais, foi usado o extrato liofilizado, obtido por filtração de 50 mL de amostra experimental, conforme o método de

Dubois *et al.* (1956). Foram necessários 5 mg de amostra (biomassa da cultura), à qual foi agregado 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A amostra foi homogeneizada mediante agitador eletrônico. Uma vez homogeneizada, foram adicionados 4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M nas amostras, que foram inseridas em banho-maria a 100°C durante 1 hora. Posteriormente, foram retirados os tubos do banho-maria e deixou-se esfriar à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos com as amostras foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos a 15°C. No passo posterior, foi separado o sobrenadante com ajuda de uma pipeta Pasteur de vidro, cuidando de não agitar o pellet. Do sobrenadante, foi colhido 1 mL e passou-se a outro tubo onde foi agregado 1 mL de Fenol ao 5% e deixou-se em repouso por 40 minutos. Passado esse tempo, agregou-se lentamente o total de 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e deixou-se em repouso à temperatura ambiente. Finalmente, foi medida a absorbância a 485 nm. O espectrofotômetro BIOSPECTRO foi calibrado com um branco que foi preparado da mesma maneira que as amostras, mas ao invés de amostra foi colocado 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Para a reta padrão preparou-se glicose a diferentes concentrações partindo de uma solução estoque de 10 mg de glicose em 100 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura. E as concentrações das soluções de glicose formam de: 0 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 60 µg/L, 80 µg/L e 100 µg/L.

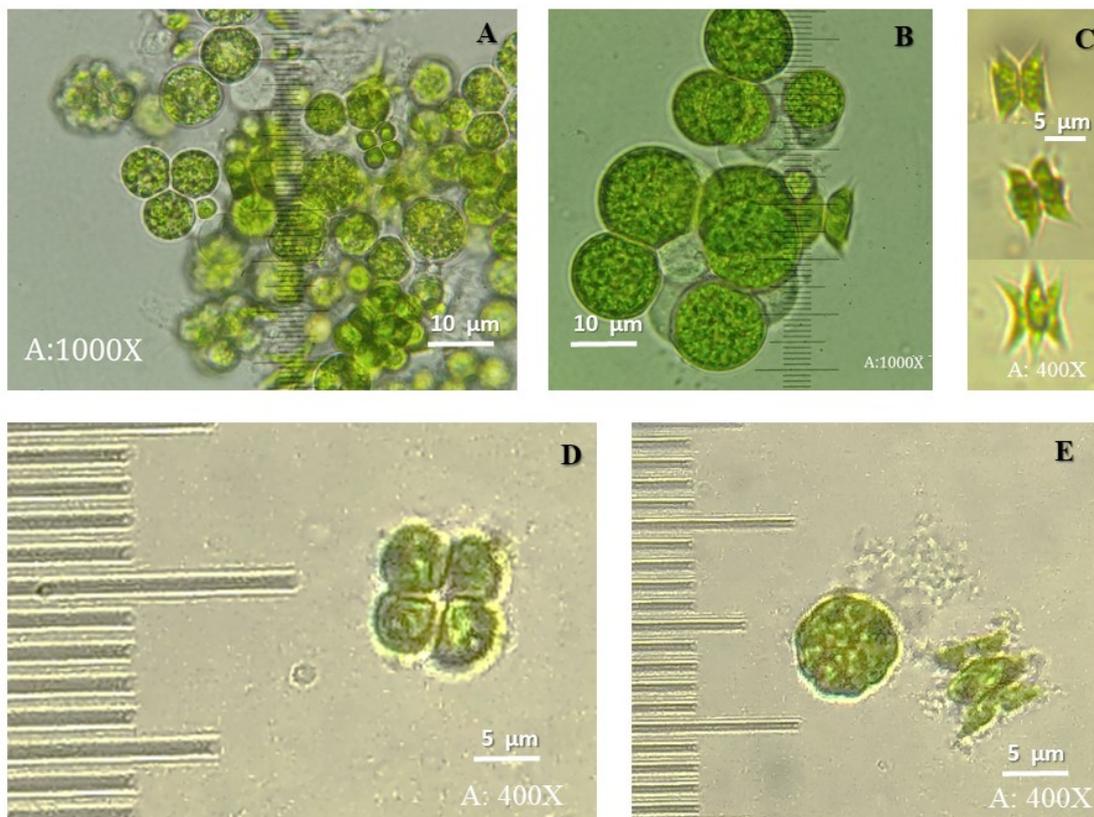
### 3.6.6 Análises estatísticas

Para a análise estatística, os dados inicialmente foram avaliados quanto aos pressupostos das análises de variância, considerando a independência das réplicas, a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias. Neste último caso, o teste aplicado foi o de Cochran. Em seguida, os dados foram submetidos a uma análise de variância bifatorial, com os fatores tempo (2 níveis: 12 e 24h) e tratamentos de radiação (5 níveis: branco, azul, amarelo, verde e vermelho). Foi selecionado o grau de significância de  $\alpha < 0,05$ . Após, quando foram encontrados efeitos significativos dos fatores de análise, os dados foram comparados com o teste a posteriori de Student-Newman Keuls, sendo que as amostras foram consideradas diferentes sempre que o  $p < 0,05$ . Além disso, foram feitas análises de correlação de Pearson entre as diferentes variáveis avaliadas no experimento com *T. wisconsinensis*. As análises estatísticas foram executadas com o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc.).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análises morfológicas de *Tetrademus wisconsinensis* Smith

As características morfológicas da cepa de *T. wisconsinensis* estudada foram compatíveis com a descrição da espécie. O comportamento em cultivo mostrou a coexistência de diferentes tipos morfológicos simultaneamente: cenóbios com 2 ou 4 células em formato de lua, autósporos ovoides de diversos tamanhos, livres ou agrupados em material mucilaginoso e prováveis formas encistadas (Figura 3). Os cenóbios com 4 células com frequência se mostraram unidos entre si pela parte convexa de cada célula, onde numa vista superior do cenóbio percebeu-se uma aparência de cruz. O tamanho das células variou de 4 a 5,2  $\mu\text{m}$  de largura por 12 a 14,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. A formação de autósporos com 8 a 12 células foi intensa em algumas ocasiões, indicando carência de nutrientes, inadequação do meio de cultura, alteração prolongada na temperatura e possível efeito aleopático pela presença de espécies contaminantes. Na etapa de crescimento inicial (durante o início do cultivo) não foram encontrados morfotipos autosporados que foram mais frequentes e abundantes na etapa de final de aclimação e também durante o experimento com o tratamento de diferentes luzes.



**Figura 3:** Estrutura morfológica de *Tetrademus wisconsinensis* Smith. **A)** Autósporos de *T. wisconsinensis*, **B)** Autósporos de maior tamanho e cenóbio elíptico com ápices atenuados. **C)** Cenóbio de *T. wisconsinensis*, vista lateral das 4 células associadas do cenóbio, cada uma com aparência de lua e uma vista superior inclinada que evidencia a conformação das células do cenóbio, **D)** Vista superior de *T. wisconsinensis* e **E)** Uma comparação do cenóbio com um cisto de *T. wisconsinensis*. Se nota claramente o aspecto granuloso de um cisto pequeno (mesmo tamanho do cenóbio).

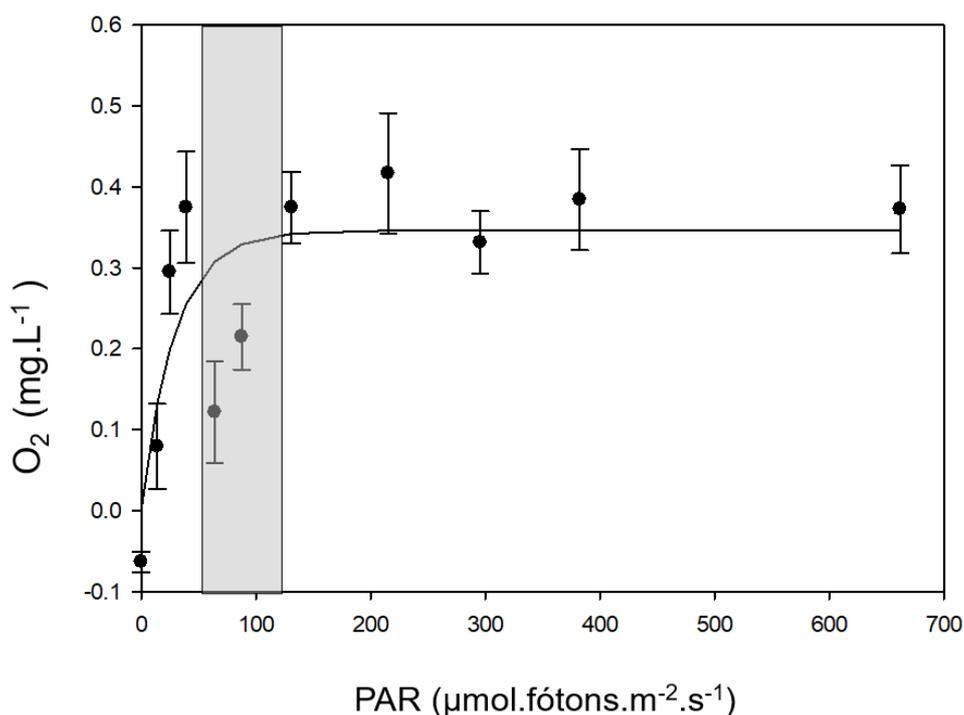
A condição mais comum de *T. wisconsinensis* nos cultivos consiste no cenóbio tetracelular ou colônias livres como visto na Figura 3-C. Como as 4 células frequentemente se conectam pela parte convexa, na vista lateral, aparentam ser compostas por apenas duas células. Porém, a espécie pode se apresentar configurada por uma ou duas células apenas, embora isto não seja muito comum. As associações de células arredondadas observada na Figura 3-D se referem a cenóbios maduros em vista superior, que se encontram num estágio avançado do desenvolvimento. Quando o cenóbio é ainda jovem, as partes externas das células (por onde as células não estão aderidas ou parte onde as células têm contato com o ambiente) tornam-se mais pontiagudas (Figura 3-C, imagem central).

Autocolônia é o termo que se utiliza para denominar o tipo de reprodução de *T. wisconsinensis* (é que é comum na família Scenedesmaceae), no qual as células mais velhas, mencionadas anteriormente, que apresentam um maior volume, geram duas novas células. Isso acontece numa primeira fase. Assim que as essas duas células se acondicionam, elas dão origem às outras duas células do cenóbio jovem, que se liberam ao ambiente externo por ruptura da parede celular da célula mãe.

Na Figura 3 (A, B e E), podem ser observadas outras características morfológicas que apareceram durante o desenvolvimento do trabalho. Em situações nas quais o cultivo esteve denso (acima de uma densidade óptica 0,240<sub>680nm</sub>), foram detectados cistos de diversos tamanhos celulares, principalmente no formato elíptico. Estas formas celulares podem aparecer como elipses homogêneo e alguns como elipses com conteúdo interno granuloso, possivelmente associados com a formação de novos cenóbios (Figura 3E). Os tamanhos destes cistos podem variar entre 10 µm até 24 µm. É possível que seja necessário um tamanho concreto para a liberação de novos cenóbios, embora isso não tenha sido determinado neste trabalho.

#### **4.2 Teste de quantidade de luz apropriada para o cultivo de *Tetradismus wisconsinensis* Smith (curva P<sub>x</sub>I)**

Foram testados diversos aspectos durante a execução das curvas P<sub>x</sub>I, incluindo os tempos de incubação, a densidade dos cultivos, o volume de cultivo, bem como a necessidade de trocar ou não os cultivos a cada intensidade de luz a ser medida. A figura 4 mostra os resultados de produção de oxigênio segundo a quantidade de luz recebida. A produção ótima de oxigênio ocorreu com uma Irradiância de 70 e 130 µmol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A produção de oxigênio no ponto máximo de irradiância ou P<sub>máx</sub> encontrado para *T. wisconsinensis* foi de 0,34615 ± 0,0422 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. A eficiência da fotossíntese da espécie foi de α=0,677 e a irradiância de saturação medida foi em torno de E<sub>k</sub>= 30 µmol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.



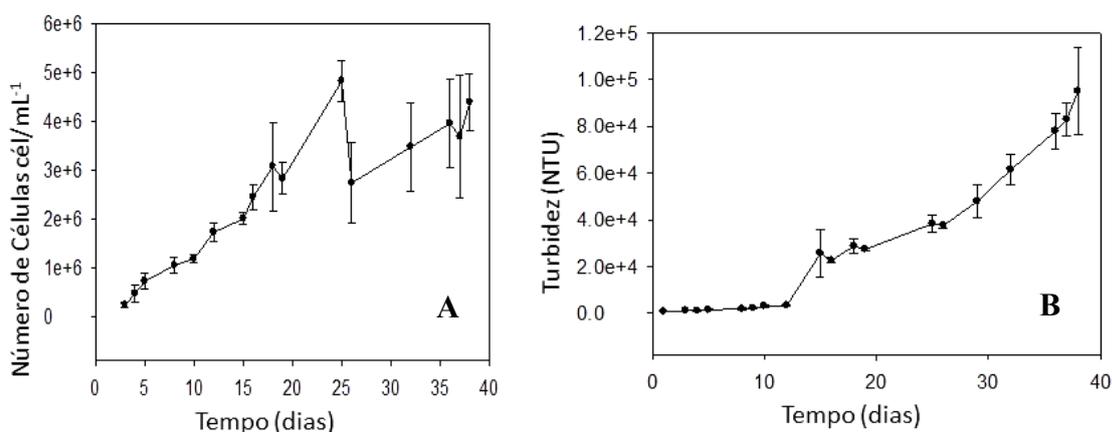
**Figura 4:** Curva P x I (Photosynthesis vs. Irradiance ou Fotossíntese vs. Irradiância) medidas em cultivos de *T. wisconsinensis*. A área hachurada indica o intervalo ótimo de produção de oxigênio entre 70 e 130  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### 4.3 Crescimento e aclimação de *Tetradismus wisconsinensis* Smith

A curva de crescimento de *T. wisconsinensis* se apresenta na Figura 5, sendo analisada sob duas estratégias: por contagem celular (Figura 5A) e por turbidez (Figura 5B). Considerando as análises de contagem, a taxa de crescimento da alga em cultivo foi de  $\mu = 0,665 \text{ d}^{-1}$  e o tempo de duplicação foi de  $T_d = 1,04 \text{ d}^{-1}$ . A curva de contagem de células (Figura 5A) mostra uma fase lag (ou fase de indução ao crescimento das algas) entre o dia 1 e o dia 10 com um crescimento que vai de 241.250 cél./mL a 1.189.166,67 cél. mL<sup>-1</sup>. Em seguida, se detecta a fase log (ou fase de crescimento exponencial), entre os dias 11 e 25, com um crescimento muito alto, de 1.733.333,33 cél. mL<sup>-1</sup> a 4.830.000 cél. mL<sup>-1</sup>. A fase posterior à fase log, de diminuição do crescimento, foi aquela na qual os valores de conteúdo celular de *T. wisconsinensis* vão de 5.000.000 cél. mL<sup>-1</sup> até os 2.744.166,67 cél. mL<sup>-1</sup>. Na

fase estacionária, o cultivo se comportou positivamente, mostrando um crescimento desde 3.476.666 cél. mL<sup>-1</sup> a uns 3.963.333 cél. mL<sup>-1</sup>. Destaca-se que a fase de diminuição de crescimento da alga foi observada apenas entre os dias 36 e 37 dando um valor de contagem de 3.690.000 cél. mL<sup>-1</sup>. Não foi possível detectar a fase de morte das algas do cultivo neste trabalho. O crescimento da alga foi conduzido até atingir um total de 4.400.000 cél. mL<sup>-1</sup>, aproximadamente, segundo se mostra na figura 5A.

Quanto à turbidez, foi possível observar que na fase lag (do dia 1 a 10) os valores medidos em vão desde 601,3 UNT até 2.145 UNT. Na fase log, os dados medidos estiveram entre 3.358 e 5.129 UNT, entre os dias 12 e 15. Para a fase posterior, a de diminuição do crescimento o valor foi 4.522 UNT, na fase estacionaria (dias 18 - 19) os valores foram de 5.749 a 5.461 UNT. Com a medição deste parâmetro é possível notar que não teve uma diminuição do crescimento, que era o esperado depois da fase estacionária e que leva a morte do cultivo.



**Figura 5:** Análise do crescimento de *T. wisconsinensis* antes do experimento com exposição a diferentes cores de luz provenientes de LEDs coloridas. **A)** Contagem de número de células por mL durante 38 dias. **B)** Turbidez medida durante 38 dias.

O pH medido ao longo da curva de crescimento partiu de 7,1 (ao início de avaliação da curva) até 8,23 ao final do crescimento, com uma média de 7,56 e um desvio padrão de 0,43. A condutividade foi acompanhada, e os valores se mantiveram em 659,7 – 671  $\mu\text{S cm}^{-1}$  durante os primeiros cinco dias. Para o período entre os dias 6 e 38, os valores mínimos e máximos de condutividade foram de: 791,37 – 900,13  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

#### 4.4 Exposição a diferentes cores de luzes LED coloridas.

As análises de variância dos parâmetros associados ao crescimento da biomassa estão apresentadas na tabela 2.

**Tabela 2** Resultados das análises de variância (ANOVAs) para os parâmetros de crescimento e monitoramento do cultivo de *T. wisconsinensis* durante exposição a diferentes cores de luz (branco, amarelo, verde, vermelho e azul) por 12 e 24h. Em negrito, os dados que apresentam efeito significativo para causar variações nas respostas das algas.

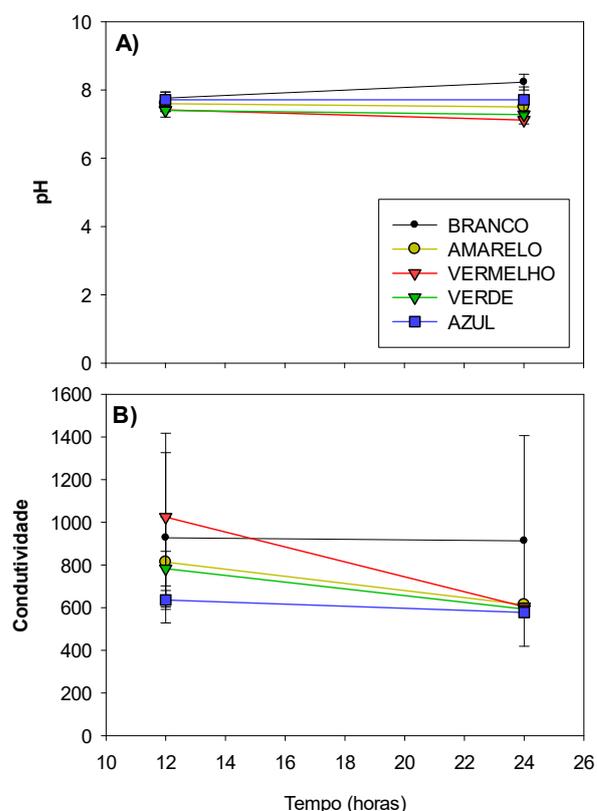
Variável	Fatores de variação	df	SS	MS	F	p
<b>Masa Seca</b>	cor	4	4,585	1,146	2,267	0,098
	<b>tempo</b>	<b>1</b>	<b>10,325</b>	<b>10,325</b>	<b>20,419</b>	<b>0,000</b>
	cor*tempo	4	1,151	0,288	0,569	0,688
	Resíduos	20	10,113	0,506		
<b>Total de Células</b>	cor	4	1,24722E+12	3,11805E+11	0,353	0,839
	<b>tempo</b>	<b>1</b>	<b>1,88972E+13</b>	<b>1,88972E+13</b>	<b>21,385</b>	<b>0,000</b>
	cor*tempo	4	8,3898E+11	2,09745E+11	0,237	0,914
	Resíduos	20	1,76729E+13	8,83647E+11		
<b>Condutividade</b>	cor	4	352488,3153	88122,07883	1,444	0,256
	<b>tempo</b>	<b>1</b>	<b>233783,0963</b>	<b>233783,0963</b>	<b>3,831</b>	<b>0,064</b>
	cor*tempo	4	149993,682	37498,4205	0,614	0,657
	Resíduos	20	1220518,64	61025,932		
<b>Fluorescência da Clorofila a</b>	cor	<b>4</b>	<b>321040492,4</b>	<b>80260123,09</b>	<b>9,697</b>	<b>0,000</b>
	<b>tempo</b>	<b>1</b>	<b>1175745765</b>	<b>1175745765</b>	<b>142,049</b>	<b>0,000</b>
	cor*tempo	4	43501300,93	10875325,23	1,314	0,299
	Resíduos	20	165540602,6	8277030,132		
<b>DO<sub>680nm</sub></b>	cor	<b>4</b>	<b>0,010</b>	<b>0,002</b>	<b>7,152</b>	<b>0,001</b>
	<b>tempo</b>	<b>1</b>	<b>0,024</b>	<b>0,024</b>	<b>72,314</b>	<b>0,000</b>
	cor*tempo	4	0,002	0,000	1,443	0,257
	Resíduos	20	0,007	0,000		

Na tabela 2 de Resultados das análises de variância (ANOVAs), mostram-se os resultados das análises estatísticas dos dados entre as variáveis de massa seca (MS), contagem de células (total de células), condutividade, fluorescência *in vivo* de clorofila a (Cla *in vivo*) e densidade ótica (DO), comparadas com as variáveis: cor de luz, tempo de tratamento e tempo – tratamento.

Os valores que são representativos de acordo com esta tabela são o de massa seca (MS) com o tempo, os valores de contagem celular em relação ao

tempo, o conteúdo de clorofila in vivo (Cla a) e sua variação em relação ao tempo e da cor de luz LED utilizada e finalmente os valores de densidade óptica em relação ao tempo e cor de luz LED.

Na figura 6, se observam os resultados de pH (A) e condutividade (B). No início do período de exposição às luzes coloridas, o pH teve um valor médio de  $6,962 \pm 0,05$ , considerando o inicial de todas as amostras de todos os tratamentos. Após 12 horas de exposição, obteve-se os valores de  $7,76 \pm 0,18$  para o controle em branco,  $7,6 \pm 0,23$  para o tratamento com LEDs amarelos;  $7,42 \pm 0,05$  para as amostras em vermelho,  $7,4 \pm 0,2$  para as que receberam luz verde LED e  $7,71 \pm 0,22$  nas algas que receberam luz azul. Entre as amostras, independente do tratamento o pH médio nas 12 horas foi de  $7,57 \pm 0,22$ . Após 24 horas de exposição, nas amostras do controle foi observada uma medida acima de 8, enquanto as demais se mantiveram entre 7 e 8.:  $8,23 \pm 0,23$  para o branco,  $7,50 \pm 0,11$  para o amarelo,  $7,12 \pm 0,11$  para vermelho,  $7,28 \pm 0,05$  nas amostras que receberam o verde e  $7,71 \pm 0,37$  para as amostras sob luz azul (Figura 6A)..



**Figura 6:** Dados de pH (A) e condutividade (B) obtidos no tratamento de *T. wisconsinensis* com luzes LED coloridas em 12 e 24 horas.

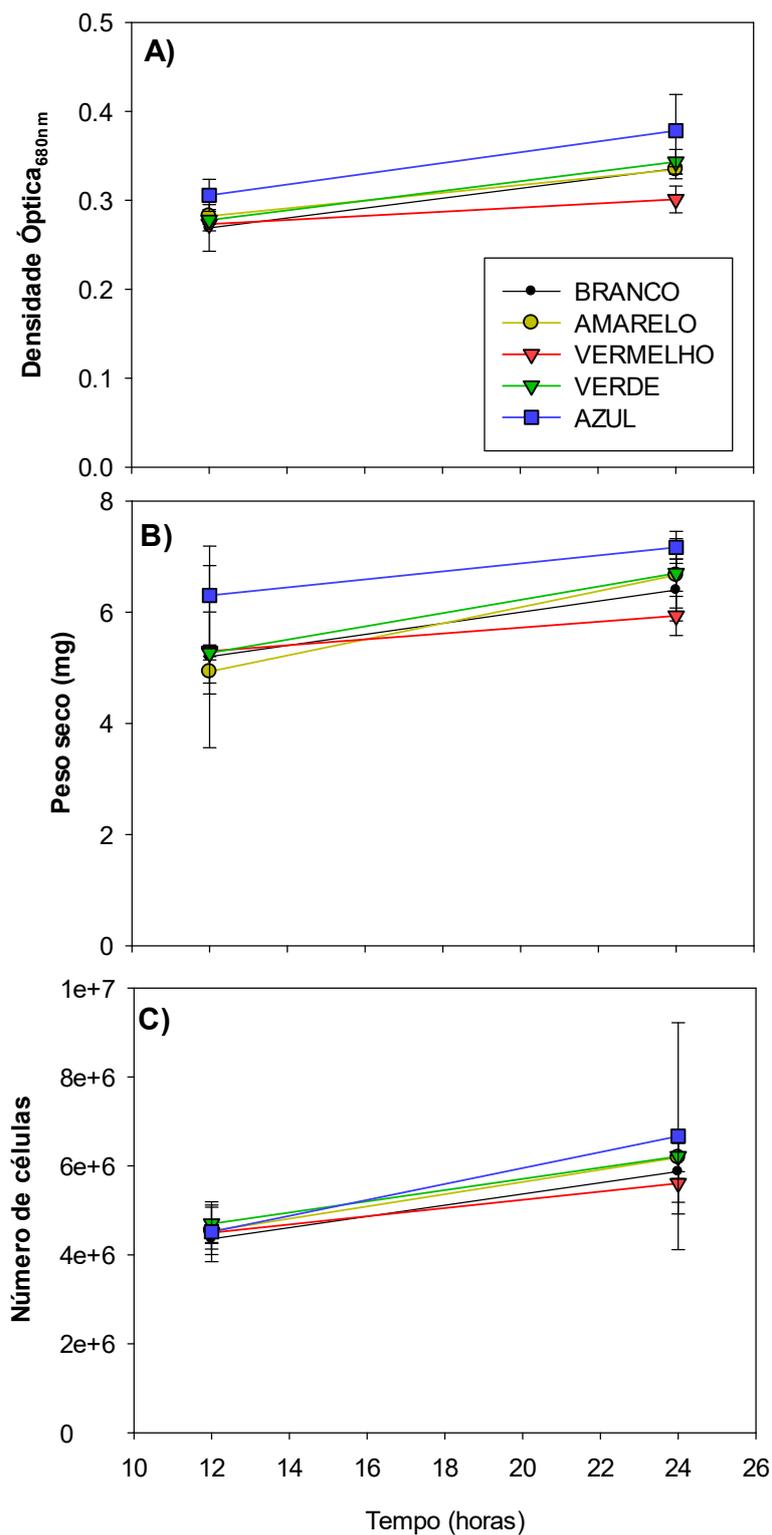
A condutividade do meio de cultivo das algas não teve variação significativa causada nem pelos tratamentos de diferentes cores de luz, tampouco pelo tempo ou pela interação entre esses fatores (Tabela 2). No início do período de exposição, a condutividade registrada foi de  $608,54 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 12,48$ . Após 12h, observou-se um incremento desse parâmetro em tratamentos com luz branca ( $927,53 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 398,81$ ),  $813,47 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 210,05$  em algas submetidas ao amarelo,  $1024,23 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 393,06$  nas amostras sob luz vermelha, e valores bastante similares ao inicial de  $782,9 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 81,06$  em verde e  $636,13 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 44,46$  para algas sob azul. O valor médio de todas amostras as 12h, independentemente do tratamento de cores, foi de  $836,85 \pm 266,41$ . Para os tratamentos após exposição de 24 horas, os valores da condutividade foram os seguintes:  $912,80 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 493,82$  para o branco,  $613,43 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 8,56$  para o amarelo,  $604,40 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 6,49$  para amostras expostas ao vermelho,  $593,37 \pm 8,71$  para as algas sob luz verde LED e  $577,50 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 1,15$  para as sob luz azul (Figura 6B).

No caso dos dados de crescimento, a densidade óptica sofreu influência significativa do fator tempo e do fator tratamento de cores (efeito isolado, sem interação entre os fatores, Tabela 2). Assim, antes da exposição, os valores médios de densidade óptica do cultivo foi de  $0,241 \pm 0,0005$ . Depois, foi observado um aumento significativo dos valores médios de DO independentemente do tratamento, com o tempo, de um valor médio de  $0,2809 \pm 0,018$  obtido após 12h de exposição, para o total de  $0,338 \pm 0,031$  (Figura 7A). Para o efeito da radiação, notou-se um aumento significativo dos valores de densidade óptica medidos em luz azul. Enquanto nas demais cores o valor médio de DO foi de  $0,302 \pm 0,01$ , em azul reportou-se  $0,342 \pm 0,048$  unidades de absorbância (Figura 7A).

Para os dados de massa seca de *T. wisconsinensis*, foi verificado um efeito significativo apenas do fator tempo (Tabela 2). Antes de iniciar a exposição às luzes coloridas, mediu-se o valor médio de  $4,66 \pm 0,54 \text{ mg.L}^{-1}$  para os cultivos. Um incremento de biomassa seca significativo foi observado desde as 12 até as 24h de exposição, saindo dos valores de  $5,4 \pm 0,9$  para  $6,57 \pm 0,56 \text{ mg}$  (Figura 7B).

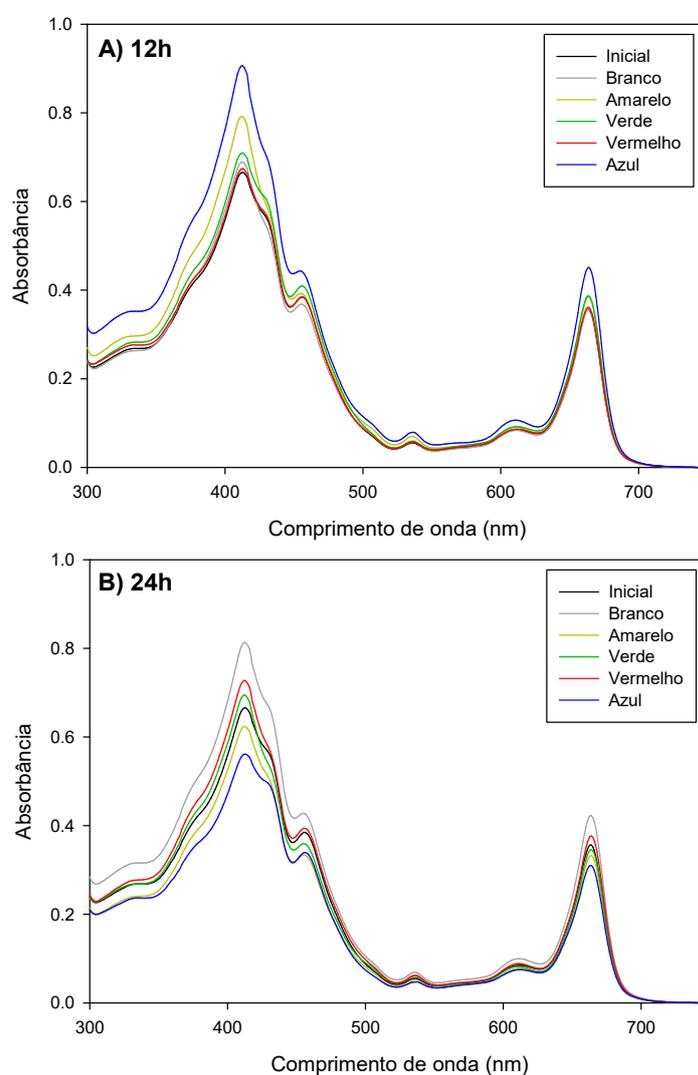
Considerando o total de células contadas nos cultivos de *T. wisconsinensis*, também foi detectado apenas o efeito significativo do fator tempo, como fora verificado para a biomassa seca (Tabela 2). Assim sendo, o cultivo partiu no tempo 0

de cerca de 5 milhões de células. Às 12h de exposição, o valor médio observado foi de 4.524.000 cél. mL<sup>-1</sup>. Esse valor aumentou significativamente então para 6.111.333 cél. mL<sup>-1</sup> após 24h de exposição (Figura 7C). Não houve efeitos significativos dos tratamentos de cores de radiação sobre o peso seco ou o total de células (Tabela 2).



**Figura 7:** Parâmetros de crescimento de *T. wisconsinensis* antes, durante e depois da exposição a diferentes qualidades espectrais de luzes coloridas por 12 e 24h. **A)** Dados de densidade ótica, **B)** peso seco e **C)** contagem de célula obtidos no tratamento de luzes LED coloridas nas 12 horas e 24 horas. Os dados representados são a média de 3 valores e as barras são o desvio padrão.

A figura 8 apresenta os espectros de absorção dos extratos de *T. wisconsinensis* em DMF após 12 e 24 horas de exposição às luzes coloridas, em comparação com a curva do extrato de algas antes de sua exposição. O que se observa claramente é a semelhança entre os perfis das curvas. Tanto após 12h (Figura 8A) quanto depois de 24h (Figura 8B), os picos detectados foram os mesmos, com prominência a 412 - 413nm. Outro pico muito evidente foi detectado em todas as amostras em 455 nm e também em 536 nm, sendo este bem pequeno. O pico a 664 nm também foi observado para todas as amostras (Figura 8A e B).



**Figura 8:** Espectros de absorção de extratos de *T. wisconsinensis* em dimetilformamida (DMF) antes, durante e depois da exposição a diferentes qualidades espectrais de luzes coloridas por 12 e 24h. **A)** 12h, **B)** 24h. Os dados representados são a média de 3 valores.

A tabela 3 apresenta os resultados das análises de variância dos parâmetros bioquímicos analisados em *T. wisconsinensis*. Observa-se que os teores de carboidratos, proteínas totais e de pigmentos fotossintetizantes não tiveram alterações significativas por causa dos tratamentos ou ao longo do tempo de exposição, e nem à interação entre eles. Já o total de elementos internos das células de *T. wisconsinensis* apresentaram alguma variação decorrente dos tratamentos. Isso se verificou apenas para o total de C e S das amostras. O total de C foi influenciado pelos tratamentos, enquanto que o teor de S teve variações decorrentes do tempo de exposição e também dos tratamentos, porém sem o efeito interativo entre eles (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados das análises de variância (ANOVAs) para os parâmetros de bioquímicos (total de carboidratos, proteínas, pigmentos da fotossíntese – clorofilas a e b, carotenoides totais, e elementos internos) do cultivo de *T. wisconsinensis* durante exposição a diferentes cores de luz (branco, amarelo, verde, vermelho e azul) por 12 e 24h. Em negrito, os dados que apresentam efeito significativo para causar variações nas respostas das algas.

Variável	Fatores de variação	<i>d</i>	SS	MS	<i>f</i>	<i>p</i>
<b>Carboidratos</b>	Cor	4	65.490	16.372	100	.384
	Tempo	1	0.161	0.161	.011	.918
	Cor*Tempo	4	42.700	10.675	.717	.590
	Resíduos	2	297.625	14.881		
		0				
<b>Cla a</b>	Cor	4	20.742	5.186	.815	.053
	Tempo	1	0.991	0.991	.538	.472
	Cor*Tempo	4	4.774	1.193	.648	.635
	Resíduos	2	36.839	1.842		
		0				
<b>Cla b</b>	Cor	4	3.845	0.961	.851	.510
	Tempo	1	0.010	0.010	.009	.926
	Cor*Tempo	4	2.045	0.511	.453	.769
	Resíduos	2	22.586	1.129		
		0				
<b>Carotenoides</b>	Cor	4	0.236	0.059	.869	.155
	Tempo	1	0.003	0.003	.085	.774
	Cor*Tempo	4	0.103	0.026	.814	.531
	Resíduos	2	0.631	0.032		
		0				
<b>C</b>	<b>Cor</b>	<b>4</b>	<b>4890.420</b>	<b>1222.605</b>	<b>.470</b>	<b>.026</b>
	Tempo	1	1256.215	1256.215	.566	.074
	Cor*Tempo	4	851.041	212.760	.604	.664
	Resíduos	2	7046.077	352.304		
		0				

N	Cor	4	51.480	12.870	.784	.549
	Tempo	1	7.410	7.410	.451	.509
	Cor*Tempo	4	127.711	31.928	.945	.142
	Resíduos	2	328.316	16.416		
		0				
S	<b>Cor</b>	<b>4</b>	<b>4.930</b>	<b>1.232</b>	<b>.884</b>	<b>.049</b>
	<b>Tempo</b>	<b>1</b>	<b>3.264</b>	<b>3.264</b>	<b>.636</b>	<b>.012</b>
	Cor*Tempo	4	0.781	0.195	.457	.766
	Resíduos	2	8.548	0.427		
		0				
C:N	Cor	4	0.442	0.111	.729	.583
	Tempo	1	0.082	0.082	.544	.469
	Cor*Tempo	4	0.268	0.067	.442	.777
	Resíduos	2	3.032	0.152		
		0				
<b>Total Proteínas</b>	Cor	4	1297.307	324.327	.784	.549
	Tempo	1	186.742	186.742	.451	.509
	Cor*Tempo	4	3218.362	804.590	.945	.142
	Resíduos	2	8273.689	413.684		
		0				

Os resultados mostrados na Tabela 4, referem-se aos parâmetros bioquímicos de *T. wisconsinensis*. Esses valores são relacionados em mg g<sup>-1</sup> MS. Assim, visto que não houve variações significativas ao longo do experimento de exposição a diferentes cores de luz (Tabela 3), pode-se dizer que *T. wisconsinensis* apresentou em média o teor de 13,75 ±3,70 mg g<sup>-1</sup> MS de carboidratos totais. O teor de proteínas medido foi de 405,67 ±21,08 mg g<sup>-1</sup> MS de massa seca. Já para os pigmentos, as algas apresentaram o total médio de 14,64 ±1,41 mg g<sup>-1</sup> MS de clorofila a e 6,98 ±0,96 mg g<sup>-1</sup> MS de clorofila b por grama de massa seca. Já o teor de carotenoides médio foi de 1,19 ±0,17 mg g<sup>-1</sup> MS. Embora não tenham sido detectados efeitos significativos, na Tabela 4 se apontam em negrito as condições nas quais os números absolutos foram maiores, mesmo sem ser significativos. Para o caso do teor de C interno da biomassa de *T. wisconsinensis*, observou-se um valor de redução desse teor interno em amarelo e vermelho (média por volta de 432 mg g<sup>-1</sup> MS de carbono) em comparação com as amostras em azul (467,45 ±15,03 mg g<sup>-1</sup> MS de carbono por g de biomassa), visto que as amostras do azul se mantiveram com teores parecidos ao observado para o tratamento controle (branco, Tabela 5). Para o caso do teor de enxofre, observou-se claramente o efeito do tempo e dos tratamentos no acúmulo deste elemento (Tabela 3). Houve um aumento do teor de

enxofre de  $2,05 \pm 0,81$  mg g<sup>-1</sup> MS medidos após 12h para  $2,71 \pm 0,61$  mg g<sup>-1</sup> MS de enxofre por g de massa seca de alga.

Dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos, obtidos com os tratamentos, podemos assinalar que a síntese de Carbono (C) e de enxofre (S) foram positivamente beneficiadas em relação ao tempo. Nas 12 horas de tratamento a luz azul LED foi a variável que teve o valor máximo para esses compostos, enquanto que nas 24 horas só o carbono continuou com síntese positiva com a luz azul já que o enxofre às 24 horas teve um valor maior de síntese com a luz branca LED. Para a síntese do nitrogênio (N) às 12 horas a luz branca LED foi a variável com maior influência enquanto que nas 24 horas o valor máximo foi beneficiado com a luz azul LED.

A tabela 5 apresenta os dados de correlações de Pearson entre as variáveis dependentes medidas em *T. wisconsinensis* no decorrer do experimento de exposição às luzes coloridas oriundas de lâmpadas LED: Foi observada uma correlação positiva entre o pH, a condutividade e a densidade óptica e uma correlação negativa entre a condutividade e a fluorescência de clorofila *a in vivo*. Por outra parte, a fluorescência de clorofila *a in vivo* se correlaciona positivamente com a densidade óptica, densidade de células e massa seca. Por sua vez, a densidade óptica tem correlação positiva com o número de células no cultivo e os valores de massa seca, que é o esperado. E assim também, a densidade de células mostrou correlação positiva com a massa seca do cultivo. Os valores de clorofila *a* extraída se correlacionam positivamente com o conteúdo de clorofila *b* extraída, e assim também com o conteúdo de carotenoides. Em tanto que a clorofila *b* se correlaciona unicamente com valores pigmentos carotenoides (Tabela 5).

**Tabela 4:** Parâmetros bioquímicos medidos em *T. wisconsinensis* após exposição durante 12 e 24 h a diferentes qualidades espectrais de luzes coloridas (branca BR, amarela AM, verde VR, vermelha VRM e azul AZ). Todos dados estão apresentados em mg g<sup>-1</sup> MS e são apresentadas as médias e desvios padrões de n=3. Em negrito, se aponta o valor mais alto observado em cada variável, embora não tenha sido significativamente diferente dos demais conforme a tabela 3.

Tempo	Color	Carboidratos	Cla <i>a</i>	Cla <i>b</i>	Carotenoides	C	N	S	Total proteínas
<b>0</b>	<b>BR</b>	10.83 ± 1.65	14.55 ± 1.12	7.34 ± 0.82	1.19 ± 0.11	407.07 ± 29.99	81.89 ± 4.42	3.17 ± 1.33	411.08 ± 22.19
<b>12</b>	<b>BR</b>	13.22 ± 5.49	15.79 ± 0.66	7.23 ± 0.97	1.30 ± 0.14	453.22 ± 3.94	82.75 ± 2.47	1.86 ± 0.58	415.42 ± 12.40
	<b>AM</b>	18.93 ± 6.78	14.63 ± 0.70	6.55 ± 0.80	1.20 ± 0.13	437.96 ± 38.12	82.29 ± 4.64	2.34 ± 0.72	413.10 ± 23.28
	<b>VRM</b>	14.72 ± 0.41	14.09 ± 1.51	7.03 ± 0.78	1.34 ± 0.19	457.10 ± 8.50	80.68 ± 2.60	1.88 ± 0.19	405.00 ± 13.05
	<b>VR</b>	10.95 ± 1.93	15.81 ± 1.32	7.69 ± 0.43	1.13 ± 0.25	439.58 ± 7.23	80.44 ± 1.33	1.31 ± 0.96	403.83 ± 6.66
	<b>AZ</b>	13.74 ± 5.79	13.91 ± 1.25	6.24 ± 1.03	1.05 ± 0.24	<b>464.57 ± 17.63</b>	79.48 ± 6.91	2.87 ± 0.79	398.99 ± 34.67
<b>24</b>	<b>BR</b>	13.59 ± 1.61	16.25 ± 2.90	7.58 ± 2.19	1.28 ± 0.25	429.52 ± 29.94	79.60 ± 2.48	2.53 ± 0.13	399.58 ± 12.44
	<b>AM</b>	14.35 ± 3.77	14.06 ± 1.02	6.48 ± 1.57	1.13 ± 0.11	427.89 ± 8.78	77.45 ± 2.28	<b>3.03 ± 0.14</b>	388.82 ± 11.45
	<b>VRM</b>	15.18 ± 2.40	14.68 ± 0.65	6.72 ± 0.21	1.17 ± 0.11	434.56 ± 18.57	77.31 ± 0.35	2.90 ± 0.77	388.11 ± 1.76
	<b>VER</b>	13.62 ± 1.87	14.28 ± 0.28	6.86 ± 0.42	1.31 ± 0.06	425.42 ± 8.44	80.10 ± 1.02	2.16 ± 1.03	402.10 ± 5.14
	<b>AZ</b>	14.09 ± 3.03	13.14 ± 1.39	6.92 ± 0.62	1.03 ± 0.20	470.33 ± 15.15	86.21 ± 8.24	2.94 ± 0.38	432.77 ± 41.34

**Tabela 5:** Correlações de Pearson entre as variáveis de resposta medidas em *T. wisconsinensis* após exposição durante 12 e 24 h a diferentes qualidades espectrais de luzes coloridas (branca, amarela, verde, vermelha e azul). Em negrito, se apontam as condições nas quais os valores de correlação foram significativos entre o par de variáveis analisados. As correlações variaram entre -1 e 1.

	Condutividade	Chl <i>a in vivo</i>	DO <sub>680nm</sub>	N. Células	MS	Carboidratos	Cla <i>a</i>	Cla <i>b</i>	Carotenoides	C	N	S	Proteínas
<b>pH</b>	<b>0.348</b> <b>p=0.041</b>	0.042 p=0.809	<b>0.362</b> <b>p=0.033</b>	-0.108 p=0.535	0.308 p=0.072	-0.003 p=0.987	0.287 p=0.095	0.081 p=0.643	0.011 p=0.950	<b>0.337</b> <b>p=0.047</b>	0.182 p=0.294	-0.117 p=0.502	0.182 p=0.294
<b>Condutividade</b>		<b>-0.351</b> <b>p=0.039</b>	-0.121 p=0.490	-0.317 p=0.064	-0.036 p=0.835	0.024 p=0.890	0.269 p=0.118	0.268 p=0.120	0.216 p=0.212	-0.052 p=0.769	0.004 p=0.981	-0.291 p=0.089	0.004 p=0.981
<b>Cla <i>a in vivo</i></b>			<b>0.838</b> <b>p=0.000</b>	<b>0.695</b> <b>p=0.000</b>	<b>0.725</b> <b>p=0.000</b>	0.144 p=0.408	-0.239 p=0.166	-0.138 p=0.428	-0.170 p=0.329	0.045 p=0.796	-0.047 p=0.787	0.218 p=0.208	-0.047 p=0.787
<b>DO<sub>680nm</sub></b>				<b>0.714</b> <b>p=0.000</b>	<b>0.835</b> <b>p=0.000</b>	0.259 p=0.134	-0.278 p=0.105	-0.168 p=0.334	-0.227 p=0.190	0.235 p=0.174	-0.075 p=0.668	0.055 p=0.755	-0.075 p=0.668
<b>N. Células</b>					<b>0.561</b> <b>p=0.000</b>	0.179 p=0.304	-0.327 p=0.055	-0.180 p=0.300	-0.250 p=0.148	-0.150 p=0.391	-0.258 p=0.135	0.301 p=0.079	-0.258 p=0.135
<b>MS</b>						0.154 p=0.376	-0.248 p=0.151	-0.213 p=0.220	-0.181 p=0.299	0.159 p=0.361	-0.045 p=0.796	0.091 p=0.605	-0.045 p=0.796
<b>Carboidratos</b>							-0.193 p=0.267	-0.247 p=0.153	0.050 p=0.777	0.187 p=0.281	-0.150 p=0.390	-0.056 p=0.748	-0.150 p=0.390
<b>Cla <i>a</i></b>								<b>0.712</b> <b>p=0.000</b>	<b>0.676</b> <b>p=0.000</b>	-0.234 p=0.176	-0.074 p=0.673	-0.143 p=0.413	-0.074 p=0.673
<b>Cla <i>b</i></b>									<b>0.463</b> <b>p=0.005</b>	-0.076 p=0.665	-0.032 p=0.855	-0.214 p=0.218	-0.032 p=0.855
<b>Carotenoides</b>										-0.265 p=0.125	-0.032 p=0.855	-0.140 p=0.423	-0.032 p=0.855
<b>C</b>											0.214 p=0.218	<b>-0.369</b> <b>p=0.029</b>	0.214 p=0.218
<b>N</b>												0.020 p=0.910	10.000 p=---
<b>S</b>													0.020 p=0.910

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Morfologia da *Tetrademus wisconsinensis* Smith.

Nas descrições originais de Smith em 1913, não são descritas as tipologias e variações morfológicas que podem ser apresentadas por *T. wisconsinensis*. Sendo este o único material que descreve a esta espécie em ambiente de cultivos, inclusive utilizando vários meios de cultura, o presente trabalho permite um espaço de discussão sobre a mudanças morfológicas que a espécies pode apresentar em condições de estresse. Os autores Tsarenko; Hegewald; Braband (2005) e Wynne; Hallan (2016), debatem assuntos de nomenclatura do *Tetrademus* baseados na morfologia do cenóbio em amostras de campo e não necessariamente de morfologias, ou tipologias em meios de cultura diferentes deste gênero ou outras espécies do gênero.

Nos experimentos realizados ao longo deste projeto foi observado o morfotipo de autósporos da espécie em cultivos com densidade celular alta. Estes cistos podem ser elípticos lisos e alguns como elipses granulados que aparentemente estão próximos à liberação de cenóbios “reativados”. É muito característico observar este tipo de cenário em períodos em que as algas estão perto do tempo de repique ou seja, na etapa final de crescimento exponencial e perto da etapa estacionária, em sua curva de crescimento (LÓPEZ *et al.*, 2016). Os cistos podem variar em tamanho de 10  $\mu\text{m}$  a 24  $\mu\text{m}$ . Foi observado que os autósporos podem aumentar de tamanho até o momento em que se encontram em condição favorável para liberar os cenóbios, o que normalmente acontece por exemplo, no processo de repique da cultura. Vale destacar que nem todos os autósporos rigorosamente chegam ao máximo de tamanho para a liberação de células, a qual se dá pela presença de condições favoráveis para sua maturação.

Uma situação similar acontece com *Haematococcus pluvialis* por exemplo, que com sob condições de estresse se encistam e produzem o carotenóide astaxantina (MUNIZ SOUZA *et al.*, 2020). Em experimentos com *Ankistrodesmus falcatus*, utilizando uma alta intensidade de luz como fator de estresse (150  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , sendo de 60  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a condição de aclimação

normal), se viu que a espécie sofreu alteração no tamanho e na forma. Para o caso de *T. wisconsinensis*, esse tipo de variação se dá em condições de alta concentração celular, quase sempre na fase exponencial final, perto do repique de cultivo (intensidade de luz branca 70 - 130  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , temperatura de 20° a 22°C, aeração constante, fotoperíodo de 12h e meio de cultura padrão BBM).

## 5.2 Quantidade de luz apropriada para a aclimação.

Diversos fatores podem influenciar na produção de oxigênio durante um teste de curva  $P \times I$  (Fotossíntese vs. Irradiância) de um cultivo de algas. Assim, o procedimento foi repetido várias vezes, a fim de atingir uma curva equilibrada. Foi muito importante identificar as variáveis que influenciaram as condições estáveis deste processo. As variáveis mais importantes foram: concentração inicial de  $\text{O}_2$  no meio de cultivo, tempo de incubação, densidade celular e renovação do cultivo principalmente. É importante considerar que várias das espécies parentes da *T. wisconsinenses* têm comportamentos diferentes diante a quantidade de luz. Assim, por exemplo, *Scenedesmus bijuga* tem uma aceitação de faixa de luz que pode estar entre 3,8 e 500  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para experimentos de melhoramentos de produção de biomassa e cultivos de alta densidade (MATTOS *et al.*, 2015). Em outro estudo com *Scenedesmus obliquus* (FENG *et al.*, 2014), foram testadas intensidades de luz muito variadas desde 20 a 2200  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , para produção de lipídios como matéria prima de biodiesel. Claro que é muito importante considerar também o fato de que a seleção da intensidade de luz depende do objetivo. No caso de *T. wisconsinensis*, pretendeu-se obter uma informação relacionada à uma quantidade na qual a luz disponível não chegasse a inibir a produção de oxigênio e garantisse que ela pudesse ser máxima. Um detalhe importante de mencionar é que a produção de oxigênio não foi normalizada pela quantidade de clorofila ou pela biomassa o que dificulta a comparação com outras espécies. Ainda assim, foi muito importante fazer este procedimento para ter uma ideia da dimensão quantitativa da produtividade de *T. wisconsinensis* e para saber a quantidade de luz que seria ótima para a aclimação adequada do cultivo antes do experimento.

Fatores como a quantidade de biomassa a ser usada para este teste de curva  $P \times I$ , o tempo de incubação e a troca ou não de cultura para a medição de

produtividade de oxigênio, foram algumas das etapas que foram avaliadas após identificadas a série de intensidades de luzes que seriam utilizadas. No que diz respeito à quantidade de biomassa, se esta for muito densa no momento que ela esteja na etapa de incubação, pode chegar à saturação de oxigênio sem poder ser medida a quantidade exata de produção do mesmo. E no caso extremo contrário, estaríamos subestimando esse mesmo valor, ou seja, se o cultivo estivesse com uma biomassa de densidade muito baixa.

O tempo de incubação, em um experimento de curva  $P_{xI}$  depende da espécie (BEHRENFELD *et al.*, 2004). Para estabelecer o mesmo, foi importante ter testado a quantidade aproximada de biomassa necessária em avaliações prévias. O tempo de incubação longo resulta na saturação de uma cultura densa de células, ao passo que um tempo de incubação curto com a mesma condição de cultura pode resultar em valores baixos de produção de oxigênio.

Foi observado que *T. wisconsinensis* tem um valor de produção de oxigênio eficiente na faixa de 70 e 130  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A partir da irradiância de saturação de oxigênio, não necessariamente diminui completamente esta produção, evidenciando uma fase estacionária na curva  $P_{xI}$  que sugere mecanismos de tolerância ao excesso de luz e resiliência na produção primária. Pelo contrário, em *Scenedesmus* sp., uma vez que sobrepassa à irradiância de saturação, a atividade fotossintética diminui, resultando na acumulação de PSII da fotossíntese, que não podem ser reparados, devido ao reordenamento celular depois da saturação de luz (BEHRENFELD *et al.*, 2004). Podemos dizer que a quantidade de luz a ser usada em experimentos com *T. wisconsinensis*, pode inclusive ser muito maior que 200  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### **5.3 Exposição a diferentes cores luzes LED.**

É importante ressaltar que a presença de fotorreceptores nas algas permite o aproveitamento dos diferentes espectros de luz, podendo acarretar como consequência na síntese de bioprodutos. Um amplo número de processos está dirigido por luzes nas algas. Muitas respostas de síntese são controladas por luzes e nesses procedimentos estão envolvidos os fotorreceptores. Em algas, se encontram fitocromos e criptocromos como fotorreceptores que constituem o sistema de

pigmentos fotomorfogênicos análogos ao sistema de pigmentos de fotossíntese. Em algas verdes o fotoreceptor mais comum é o fitocromo. Em *Scenedesmus* sp. o desenvolvimento metabólico de composição de pigmentos, síntese de clorofila e formação de cloroplastos é controlado por luz azul. Porém, a ativação dos fotorreceptores como fitocromos são ativados pela luz vermelha (DRING, 1988). Em *T. wisconsinensis* não foi possível fazer esta associação já que não foi atingido o estado de estresse ou de expressão metabólica significativamente diferente.

Num experimento feito por Pagels *et al.* (2020), com a alga *Cyanobium* sp., demonstraram que uma combinação de três fatores aplicados aos cultivos desta espécie, uso de luz amarela de lâmpadas tipo SOX (que foi comparada com luz fluorescente), uma intensidade de  $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e uma combinação de meio de cultura BG11 enriquecido com nitrato de sódio e fosfato de potássio, permite uma melhor performance na produção de compostos fenólicos, carotenoides, ficocianina e antioxidantes. Com a perspectiva de que a luz branca tem todos os espectros de luz (e pode influenciar na ativação diferencial de fotorreceptores), ter usado luz amarela permitiu que a fotossíntese estivesse sendo totalmente saturada por uma intensidade de  $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dessa qualidade de luz na condição de controle. Assim, neste experimento, em todos os tratamentos foi usada a luz amarela para garantir a fotossíntese e nos tratamentos específicos de cada cor, foi adicionada cada uma das qualidades de luz (entretanto sem considerar uma irradiância efetiva para determinada resposta específica). No trabalho com *T. wisconsinensis*, embora não tenha sido saturada a fotossíntese com luz amarela, foram disponibilizadas quantidades de luz que garantissem a mesma irradiância efetiva ( $12 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) para a fotossíntese em todos os tratamentos. Entretanto, diferentemente do encontrado por Pagels *et al.* 2020 (que tiveram evidências de respostas possivelmente associadas a fitocromo em *Cyanobium* sp.), para *T. wisconsinensis*, a falta de um resultado significativo talvez esteja relacionado à quantidade de luz usada e não a qualidade e novamente mencionar que as condições ótimas de nutrição da alga durante o experimento não geraram um cenário apropriado de estresse ou que permitisse uma expressão de sínteses de biocompostos de forma diferenciada.

Tivemos respostas positivas com o tratamento de luz azul LED, que beneficiou altamente a produção de carbono e enxofre nas 12 horas de tratamento, e uma síntese significativa de proteínas, carbono e nitrogênio nas 24 horas.

HE *et al.* (2015) testaram intensidades de luz de  $40 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de luz fluorescente em cultivos de *Chlorella sp.* e *Monoraphidium dybowskii*, e observaram uma maior produção de proteínas quando comparados com cultivos em intensidades maiores de  $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e  $400 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* são espécies consideradas como muito atraentes para produção de lipídios e outros compostos entre eles as proteínas, mas na maioria dos casos usando como fator de estresse a alteração de níveis de nitrogênio. Seria de esperar, portanto, que *T. wisconsinensis* (da mesma família de *Scenedesmus sp.*), tenha resultados semelhantes usando os mesmos fatores de estresse. Vale ressaltar que uma intensidade de luz relativamente baixa (intensidade ótima de 70 a  $130 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) foi suficiente para o favorecimento à síntese de proteínas em *T. wisconsinensis*. atingindo  $415 \text{ mg g}^{-1}$  MS, como valor máximo com luz branca LED nas 12 horas. No trabalho de HE *et al.* (2015) foram observados valores de  $424 \text{ mg g}^{-1}$  MS para *Chlorella sp.* e de  $384 \text{ mg g}^{-1}$  MS em *Monoraphidium dybowskii*. Aparentemente o valor é maior em *Chlorella sp.*, mas as considerações mudam ao comparar a quantidade de tempo do tratamento. No trabalho com *Chlorella sp.*, o tempo de tratamento foi de 14 dias enquanto que na avaliação da *Tetrademus wisconsinensis* foi realizado em um período de tratamento de 8 dias com luz branca e 0, 12 e 24 horas com luz de diferentes cores, mantendo proporções elevadas de proteínas em todas as condições. Após 24 horas com luz azul, *T. wisconsinensis* apresentou  $432 \text{ mg g}^{-1}$  MS. É possível que a exposição das algas por um tempo maior de cultivo resultasse num incremento no teor de proteínas.

Hasan *et al.*, (2017) mencionaram que as luzes LED têm baixa penetração em condições de laboratório, mas nesta revisão eles não abordaram uma discussão sobre dados de coeficiente de atenuação. Isto poderia ser um fator muito importante ao considerar que a quantidade de luz ou o tempo de exposição utilizada para os cultivos de *T. wisconsinensis* possam ter sido baixas para alcançar um estresse mais significativo. Considerando a irradiância efetiva recebida pelas algas no tratamento foi de  $12 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \pm 0,6$  com as luzes monocromáticas tipo LED (e de  $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  para a luz branca LED - controle), podemos dizer que o restante

dessa intensidade não foi destinado a fazer fotossíntese (em cada cor), não foi suficiente para elicitar diferentemente o metabolismo de *T. wisconsinensis*.

Na luz azul LED se observaram os valores máximos absolutos de densidade óptica, peso seco e contagem celular que são os indicativos de favorecimento de produção de biomassa de *T. wisconsinensis*. Přibyl *et al.* (2016) mencionam que a taxa de crescimento das algas verdes principalmente se vem favorecidas pela luz monocromática azul. Um trabalho feito por Gonçalves *et al.* (2019) menciona que os tratamentos de cultivo de *Tetrademus* sp. com espectro de luz azul, acelera o crescimento das algas principalmente se são combinadas com luz branca com uma intensidade de  $95 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Esses autores afirmam que o tratamento reduz o período de fase lag, atingindo a fase exponencial depois do primeiro dia. Afirmam também que depois de 9 dias, a quantidade de biomassa continuou crescendo sendo irradiada com uma combinação luz branca – verde com a mesma intensidade anterior. Porém, com uma intensidade maior em uma combinação branca – verde e branca – vermelha e intensidade de  $190 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , observaram uma diminuição na produção de biomassa na alga *Tetrademus* sp., atribuindo esta resposta à fotoinibição pela alta intensidade de luz e não pela cor da luz. Isso deixa claro o aspecto que o tempo de exposição e a intensidade de luz poderiam ter sido maiores nos experimentos aqui realizados com *T. wisconsinensis*. Além disso, seria possível também executar uma combinação de cores específicas de luzes LED (HASAN *et al.*, 2017), dependendo do objetivo de produto que se deseja produzir.

Em condições de diminuição de nutrientes no meio de cultura, o cenário é mais favorável para ter resultados mais chamativos enquanto a síntese de outros biocompostos. O excesso (ou quantidade ótima) de nutrientes no meio de cultivo pode ter impedido que o metabolismo da *Tetrademus wisconsinensis* fosse desviado para a produção de compostos de interesse, o que acontece mais quando em cenário de estresse. Por exemplo, num experimento onde foi testado cultivos de *Scenedesmus* sp. em meios com e sem sal (0,3 M de NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub>), como fator de estresse, acharam que em cultivos com acréscimo de sal no meio houve uma melhor performance na composição e acumulação de carotenoides (ABURAI *et al.*, 2018). Em outro experimento, com *Scenedesmus dimorphus*, onde foram testadas várias concentrações de nitrato (KNO<sub>3</sub>: 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 M) foi

observado que na concentração de 0,6 M de  $\text{KNO}_3$ , houve uma acumulação de carotenoides totais, mas o resultado mais relevante foi o de produção de lipídios que aumentou 1:25.000 em comparação a carotenoides totais (PIÑEROS *et al.*, 2019).

Uma baixa quantidade (intensidade) de luz monocromática neste experimento com *Tetradismus wisconsinensis* pode não ter ativado completamente os fotorreceptores desta alga. Apesar que se sabe pouco sobre os mecanismos exatos de respostas dos fotorreceptores nas plantas e nas algas, é fato que são importantes complementos celulares que permitem a identificação da qualidade e a quantidade de luz (JIAO, LAU, & DENG, 2007). Uma baixa quantidade de luz pode não ter ativado ou excitado ao máximo esses fotorreceptores nas células desta alga e então podemos argumentar que por este motivo também não tivemos uma resposta mais ressaltante ou significativa na produção de carotenoides e pigmentos.

Apesar da problemática associada com a baixa quantidade de luz no experimento, que não foi suficiente para elicitar diferencialmente o metabolismo de *T. wisconsinensis*, é importante ressaltar que tanto a quantidade de luz vermelha, verde, amarela ou azul, ou mesmo a luz de branca resultaram em condições similares, porque a quantidade de luz foi otimizada pensando em proporcionar valores efetivos para manter o metabolismo celular de *T. wisconsinensis* funcionando, e a fotossíntese ativada por pigmentos que absorveram a diferentes comprimentos de onda de luzes monocromáticas. Isso porque foram observadas condições de manutenção do estado fisiológico das algas independentemente da cor que elas estivessem recebendo. Assim, para garantir fotossíntese equânime em diferentes cores, o experimento com *T. wisconsinensis* permitiu situações nas quais a alga manteve seu metabolismo e crescimento em quaisquer das cores aplicadas. Isso mostra a plasticidade fenotípica da alga para otimizar o aproveitamento da energia proveniente de quaisquer composições testadas do espectro eletromagnético disponibilizadas no experimento, com resultados significativamente similares, sem detecção de estresse por meio da fotossíntese. O acompanhamento com um fluorímetro de pulso de amplitude modulada poderia trazer mais indícios da existência ou não de estresses durante o monitoramento da espécie.

#### 5.4 Análise da Biomassa de *Tetrademus wisconsinensis* Smith

O total de proteínas de 43 % em *T. wisconsinensis* foi bastante alto, independentemente dos tratamentos, considerando a baixa quantidade nas intensidades das luzes monocromáticas e comparando com o conteúdo de outras algas aparentadas como *Scenedesmus dimorphus* cujo conteúdo de proteínas é de 8 a 18 %, *Scenedesmus quadricauda* de 47 %. Os resultados do presente estudo sugeriram que *T. wisconsinensis* é uma alga qualificada para a produção de proteínas, mas o rendimento de produção pode ser melhorado combinando um maior tempo de exposição ao tratamento com luz monocromática azul LED, com uma irradiância entre 130 e 200  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Com relação à produção de clorofila *a* e *b*, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Em um experimento feito com *S. quadricauda*, onde foram cultivados 2 L da alga com meio de cultura BBM, foi testado o crescimento desta alga durante duas semanas, a uma temperatura de 25 - 35 °C e uma irradiância de luz fluorescente de 70  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , os resultados de quantidade de clorofila foram de 14 % por grama de biomassa seca (NIIZAWA *et al.*, 2017). Quase a mesma quantidade de clorofila *a* foi obtida com luz monocromática verde LED em uma semana de experimento e 12 horas de tratamento com essa luz em *T. wisconsinensis*.

A produção de proteínas totais foi influenciada pela luz branca LED nas 12 horas e pela luz azul LED nas 24 horas. Aparentemente a quantidade de horas e a cor azul de luz são condições de variáveis bem assimiladas para uma produção de proteínas usando *T. wisconsinensis* como matéria prima.

Shih-Hsin Ho (2013), testaram produção de luteína por *Scenedesmus obliquus* com luzes LED branco, vermelho, azul e verde, com irradiância de 150  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os resultados foram muito diversos, ou seja, não se achou uma verdadeira relação entre a qualidade de luz e a produção de luteína, mas concluíram que o impacto da quantidade da luz é dependente da espécie com que se trabalha. A produção de luteína foi três vezes maior com luz branca não LED a uma intensidade 300  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Em *Scenedesmus* sp. foi testado a produção de carotenoides nessa condição (intensidade de luz branca de 200  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) mas, combinada com uma alta salinidade, obtiveram um melhor rendimento de produção.

## 6 CONCLUSÃO

Foram dois os fatores principais que tivemos em consideração para avaliar a produção de metabólitos (biocompostos) em *Tetrademus wisconsinensis* Smith, o tempo e as diferentes luzes monocromáticas tipo LED. Foi avaliado o valor de irradiância ótima necessária para o cultivo de *T. wisconsinensis*. Aplicando um fator de correção, foram determinadas as intensidades efetivas de luzes monocromáticas para os tratamentos de 12 e 24 horas.

Foram identificadas as características adequadas de cultivo de *T. wisconsinensis*. Foi determinada a capacidade fotossintética da alga com diferentes intensidades de luz. A faixa de intensidade de luz em que a alga atingiu o maior valor de produção de oxigênio é entre 70 e 130  $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Com maiores intensidades de luz a alga *T. wisconsinensis* produz a mesma quantidade de oxigênio já que ela aproveita só a quantidade de luz que precisa.

A classe de compostos de maior importância, pela quantidade encontrada na alga, foi a de proteínas, que somaram 43 a 45 % da massa seca, mas este dado de composição de acordo com as análises estatísticas não foi afetado significativamente pelos tratamentos de qualidades espectrais de luz e tampouco com o tempo. Assim, a quantidade de proteína indica um potencial promissor para esta espécie em condições de tratamento com luz azul e com adição de nitrogênio.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABOMOHRRA, A. E. F.; JIN, W.; EL-SHEEKH, M. 2019. Enhancement of lipid extraction for improved biodiesel recovery from the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Energy Conversion and Management*, 108, 23–29. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.11.007>
- ABURAI, N. *et al.* 2018. Development of a whole-cell-based screening method for a carotenoid assay using aerial microalgae. *Journal of Biotechnology*, 268(January), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.025>
- ABURAI, N.; SUMIDA, D.; ABE, K. 2015. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, 2015, 8, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>
- AMARO, H.M., *et al.*, 2017. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: Microalgal fatty acids—From harvesting until extraction. Woodhead Publishing. Ch: 16 / 369-400, ISBN 9780081010235.
- BEHRENFELD, M. J. *et al.*, 2004. In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. *Journal of Phycology*, 40(1), 4–25. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03083.x>
- CORZO PIÑEROS, R. J. *et al.*, 2019. Evaluación de carotenoides y lípidos en la microalga *Scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio. *Mutis*, 9(1), en prensa, doi: 10.21789/22561498.1471
- CASTILLO, O. S. *et al.*, 2017. Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas Biodiesel. *Hidrobiológica*, 27(3), 337–352. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972017000300337&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972017000300337&script=sci_arttext)
- CHISTI, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- CHRONOPOULOU, L. *et al.*, 2019. Extraction of carotenoids and fat-soluble vitamins from *Tetrademus obliquus* microalgae: An optimized approach by using supercritical CO<sub>2</sub>. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24142581>
- DE OLIVEIRA, F. C.; COELHO, S. T., 2017. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75(October 2016), 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.060>.
- DE FARIAS SILVA, C. E.; SFORZA, E.; BERTUCCO, A., 2018. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetrademus obliquus*.

*Journal of Applied Phycology*, 30(1), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1252-x>

DRING, M. J. 1988. Development in Algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (39), 157–174.

EVANGELISTA *et al.*, 2007. Algal Toxins: nature, occurrence, effect and detection. Dordrecht, The Netherlands. ISBN 978-1-4020-8480 -5 (e-book)

FENG, P. *et al.* .2014. Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology*, 173, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.123>

GEORGE, B. *et al.* 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.086>

GIMÉNEZ, A. 2016. Análisis de las variables biocinéticas, productividad y perfil lipídico de la microalga *Tetradismus wisconsinensis* en distintos medios de cultivo para la producción de biocombustible de tercera generación. *Investigación Agraria*. [S.2.], v. 19, n. 1, p. 35-46, jul. 2017. ISSN 2305-0683.

GONÇALVES, V. D. *et al.* 2019. Combination of Light Emitting Diodes (LEDs) for photostimulation of carotenoids and chlorophylls synthesis in *Tetradismus* sp. *Algal Research*, 43 (September), 101649. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101649>

GONG, M.; BASSI, A. 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>

GONZÁLEZ-BALDERAS, R.M.; S.B. VELÁSQUEZ-ORTA, M.T.; ORTA LEDESMA. 2020. Biorefinery process intensification by ultrasound and ozone for phosphorus and biocompounds recovery from microalgae, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, Volume 153, ISSN 0255-2701. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107951>.

GONZÁLEZ, A. *et al.* 2008. Biocombustibles de segunda generación y Biodiesel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería*, 28(1), 70–82.

GUIRY, M.D & GUIRY, G.M 2020. AlgaeBase. World electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acessado em 4.12.2020

- HAN, F. *et al.* 2016. Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. *Bioresource Technology* 209: 16-22. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.103
- HASAN, M. M. *et al.* 2017. An overview of LEDs' effects on the production of bioactive compounds and crop quality. *Molecules*, 22(9), 1–12.
- HAXO, F. T.; BLINKS, L. R. 1950. Photosynthetic action spectra of marine algae. *The Journal of General Physiology*, 33(4), 389–422. <https://doi.org/10.1085/jgp.33.4.389>
- HOEK, C. VAN DEN; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press. ISBN: 0 521 30419 9, 623 pág.
- HUANG, C. C. *et al.* 2012. Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: Influences of CO<sub>2</sub> and nitrogen sources on the accelerated growth. *Bioresource Technology*, 112, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.078>
- JIAO, Y.; LAU, O. S.; DENG, X. W. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 217–230. <https://doi.org/10.1038/nrg2049>
- KOMÁREK, J.; B. FOTT, 1983. *Das Phytoplankton des Süßwassers XIV.7.1. E. Schweitzerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.*
- LEÓN-SAIKI, G. M. *et al.* 2018. The impact of day length on cell division and efficiency of light use in a starchless mutant of *Tetrademus obliquus*. *Algal Research*, 31(January), 387–394.
- LÓPEZ, T. R. *et al.* 2016. Cinética de crecimiento y productividad lipídica del alga *Tetrademus wisconsinensis* S. obtenida en un cuerpo de agua de Paraguay. *Investigación Agraria*, 18(1), 22–29.
- MANDAL, S.; MALLICK, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 281–291. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6>
- MASSA, M. *et al.* 2017. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetrademus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. *New Biotechnology*, 36, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.007>
- MATTOS, E. R. *et al.* 2015. Enhancement of biomass production in *Scenedesmus bijuga* high-density culture using weakly absorbed green light. *Biomass and Bioenergy*, 81, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.029>
- MIOTTO, M. C. *et al.* 2017. Ecophysiological characterization and toxin profile of two strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from a subtropical lagoon in

Southern Brazil. *Hydrobiologia*, 802(1), 97–113. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3243-y>

MUNIZ SOUZA, R. L. *et al.* (2020). Technological innovations in the cultivation of *Haematococcus pluvialis* microalgae: review. *Sistemas & Gestão*, 15(3), 223–234. <https://doi.org/10.20985/1980-5160.2020.v15n3.1651>

NASCIMENTO, M. A. 2013. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2>

NASCIMENTO, T. C. *et al.* 2016. Determinação do perfil de carotenoides a partir de *Scenedesmus obliquus* (CPCC05) Extração dos carotenoides, *Bioenergy Research*, 1–6.

NIIZAWA, I. *et al.* 2017. Light wavelength distribution effects on the growth rate of *Scenedesmus quadricauda*. *Biochemical Engineering Journal*, 126, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.006>

NOVOVESKÁ, L. *et al.* 2019. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*, 17(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/md17110640>

ONUMA, H.; MATSUMOTO, S.; ARIMURA, T. H. 2020. How much household electricity consumption is actually saved by replacement with Light-Emitting Diodes (LEDs)? *Economic Analysis and Policy*, 68(March 2008), 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.eap.2020.09.015>

PAGELS, F. *et al.*, 2020 - Light quality triggers biochemical modulation of *Cyanobium* sp.—photobiology as tool for biotechnological optimization.pdf. (n.d.).

PATEL, V. K. *et al.* 2016. Rapid budding EMS mutants of *Synechocystis* PCC 6803 producing carbohydrate or lipid enriched biomass. *Algal Research*, 16, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.029>

PEREIRA, M. G. *et al.* 2012. The renewable energy market in Brazil: Current status and potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 3786–3802. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.024>

PIÑEROS, R. J. *et al.* (2019). Evaluación de carotenoides y lípidos en la microalga *Scenedesmus dimorphus* a escala laboratorio. <https://doi.org/10.21789/22561498.1471>

PLATT, T.; GALLEGOS C. L.; HARRISON W. G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 38, 103–111.

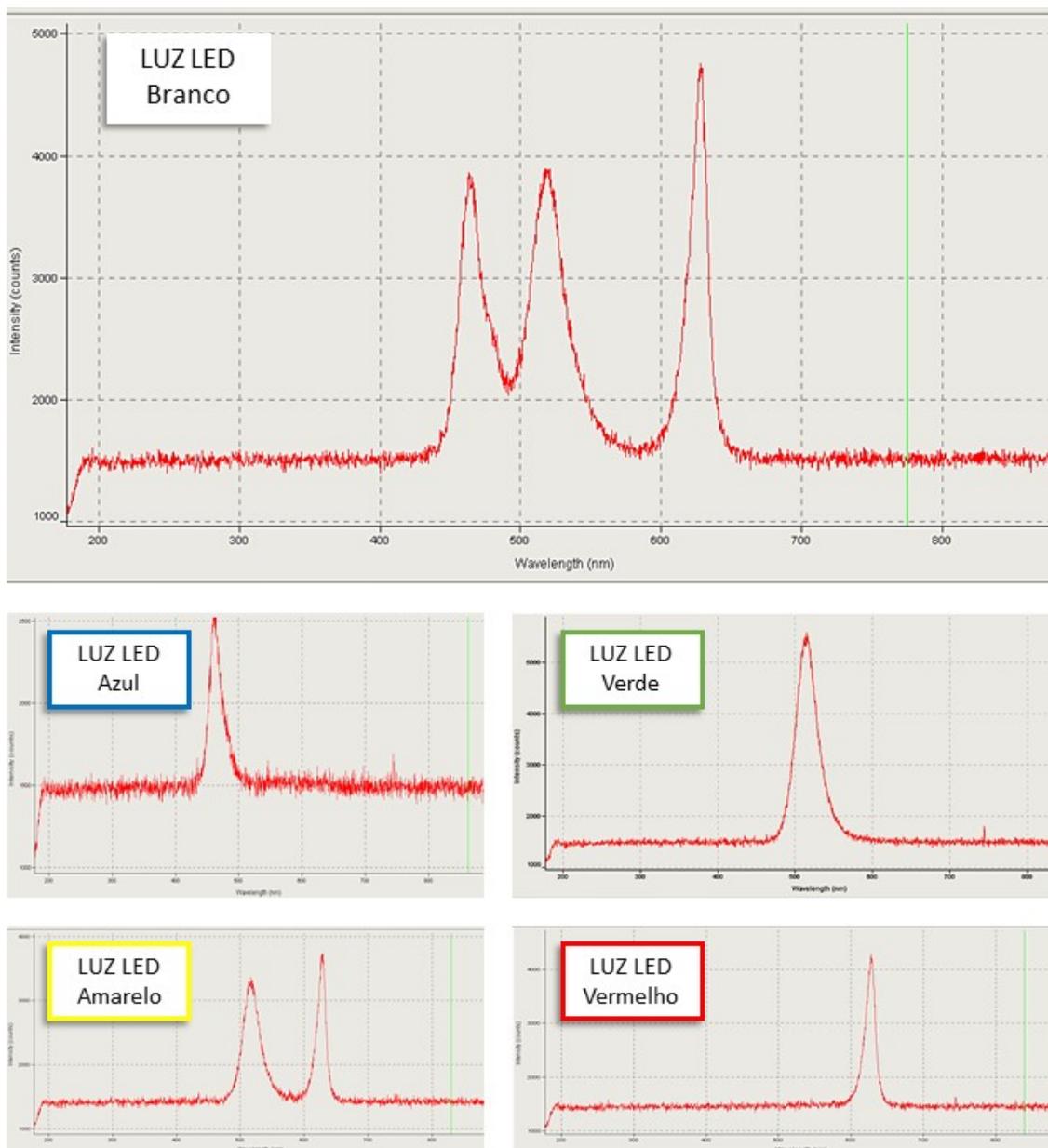
- PŘIBYL, P., *et al.* 2016. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, 16, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.028>
- RAMANNA, L.; RAWAT, I.; BUX, F. 2017. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80 (June 2016), 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.202>.
- REN, H. Y. *et al.* 2014. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology*, 169, 763–767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.062>
- RITCHIE, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- SCHULZE, P. S. C. *et al.* 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>
- SHAH, M. M. R. *et al.* 2016. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- SMITH, G. M. 1913. *Tetrademus*, a New Four-Celled Coenobitic Alga. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 40(2), 75-87. <https://doi.org/10.2307/2479812>
- SONG, M.; PEI, H., 2018. The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source, *Bioresource Technology*, Volume 263, pp 525-531, ISSN 0960-8524.
- STARR, RC; ZEIKUS, JA. 1993. UTEX-The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *Journal of Phycology* 29(s2):1-106.
- TANG, D. *et al.* 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>
- TEMPLETON, D. W.; LAURENS, L. M. L. 2015. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research*, 11, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>
- TREDICI, M. R.; ZLTTELLI, G. C. 1998. Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(2), 187–197.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J)

- TSARENKO, P. M.; HEGEWALD, E.; BRABAND, A. (2005). Scenedesmus-like algae of Ukraine. 1. Diversity of taxa from water bodies in Volyn Polissia. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 118(December), 1–45. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2006/0118-0001>
- URBAN, L. *et al.* 2016. Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.004>
- WEBB, W. L.; NEWTON, M.; STARR, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra* - A mathematical model. *Oecologia*, 17(4), 281–291. <https://doi.org/10.1007/BF00345747>
- WELLBURN, A. R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- WYNNE, M. J.; HALLAN, J. K. (2016). Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium*, 126(3–4), 83–86. <https://doi.org/10.1002/fedr.201500021>
- XIE, Y. *et al.*, 2013. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource Technology*, 144, 435–444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.064>

## 8 APÉNDICE A

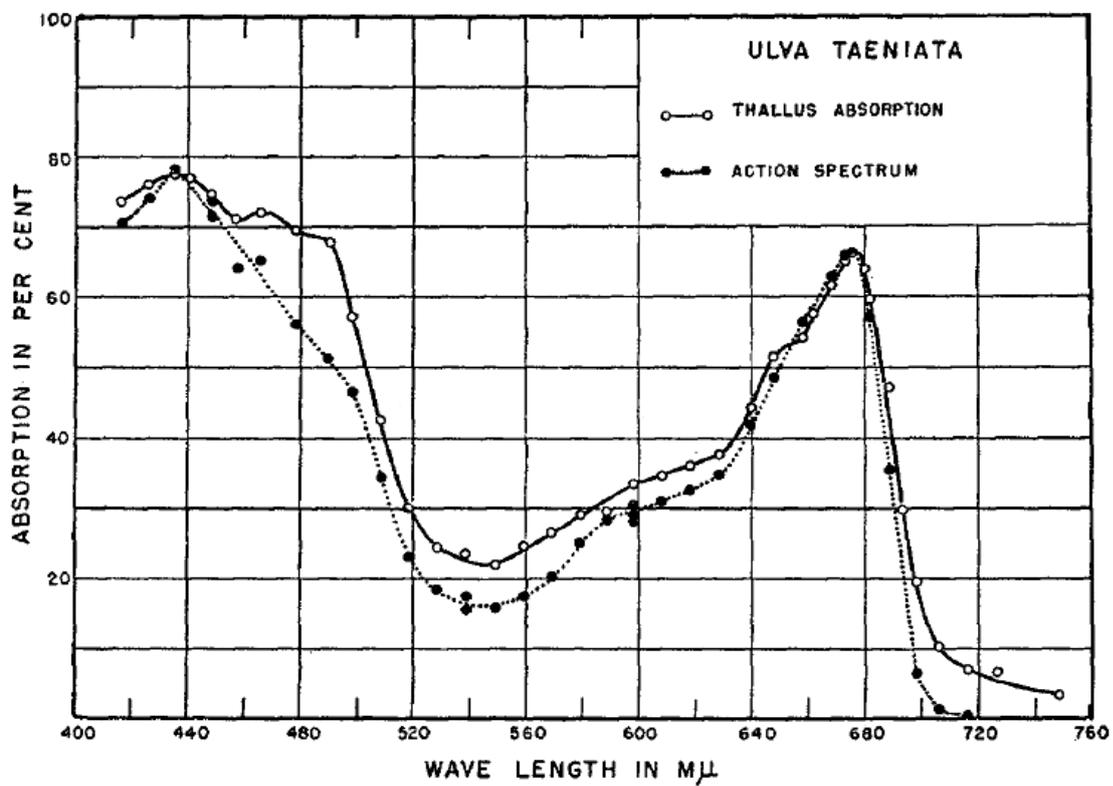
### 8.1 Caracterização das luzes LED



**Anexo A:** Gráficos de caracterização das luzes LED, utilizadas para o experimento de tratamento das amostras de *Tetrademus wisconsinensis* Smith. Luz branca, azul, verde, amarelo e vermelho.

## ANEXO A

## 8.2 Espectro de ação da fotossíntese



**Anexo B:** Espectro de ação da fotossíntese de uma alga verde (HAXO; BLINKS, 1950), desde 400 até 760 M $\mu$  de longitude de onda de luz.