



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOINTERAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARINE SOUZA DA SILVA**

**OTIMIZAÇÕES OPERACIONAIS DO CULTIVO DE MICROALGAS  
EM ÁGUA PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO VISANDO O  
SEU TRATAMENTO E REUSO EM UM PROCESSO DE PRODUÇÃO  
DE BIOATIVOS**

Salvador  
2025

**CARINE SOUZA DA SILVA**

**OTIMIZAÇÕES OPERACIONAIS DO CULTIVO DE MICROALGAS  
EM ÁGUA PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO VISANDO O  
SEU TRATAMENTO E REUSO EM UM PROCESSO DE PRODUÇÃO  
DE BIOATIVOS**

Versão final da tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

**Área de Concentração 2** - Biotecnologia Industrial e Ambiental. **Linha de Pesquisa:** Desenvolvimento de processos biológicos para a produção de bioprodutos de aplicação industrial.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Salvador  
2025

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SILVA, CARINE SOUZA da  
OTIMIZAÇÕES OPERACIONAIS DO CULTIVO DE MICROALGAS EM ÁGUA  
PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO VISANDO O SEU TRATAMENTO E REUSO EM  
UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOATIVOS / CARINE SOUZA da SILVA. -- Salvador, 2025.  
116 f.

Orientador: Fabio Alexandre Chinalia.  
Tese (Doutorado - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA) -- Universidade  
Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2025.

1. Dunaliella salina. 2. água produzida. 3. corrente alternada. 4. LED. 5. lipídios. I. Chinalia, Fabio  
Alexandre. II. Título.

**CARINE SOUZA DA SILVA**

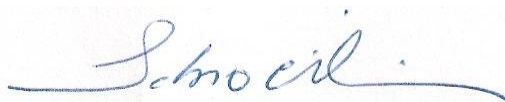
**OTIMIZAÇÕES OPERACIONAIS DO CULTIVO DE MICROALGAS  
EM ÁGUA PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO VISANDO O  
SEU TRATAMENTO E REUSO EM UM PROCESSO DE PRODUÇÃO  
DE BIOATIVOS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia,  
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Salvador, 4º de Abril de 2025.

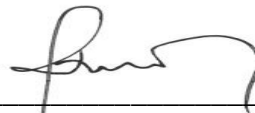
Banca examinadora

Fabio Alexandre Chinalia – Orientador



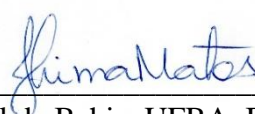
Doutor em Microbiologia Ambiental pela University of Aberdeen, ABDN, Escócia.  
Universidade Federal da Bahia.

Paulo Fernando Almeida



Doutor em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Josilene Borges Torres Lima Matos



Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Milleno Dantas Mota



Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.  
Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

Igor Carvalho Fontes Sampaio



Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.  
Universidade Estadual de Santa Cruz.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Jeová Deus por me permitir viver essa experiência e me conceder força para concluí-la. À minha mãe, Nice, por todo o apoio incondicional e por estar ao meu lado nos momentos de ansiedade e estresse ao longo desses anos de pesquisa. Aos meus irmãos, Carol e Samuel, às minhas primas, Élide, Luciana, Kelly, Yasmin e Melissa, à minha cunhada Lidiane e à minha amiga Claudinha, pela colaboração e incentivo.

Ao meu noivo, Valter, pela dedicação, apoio e companhia incansável durante as análises, experimentos e desafios enfrentados. Ao meu querido sobrinho, Samuelzinho, por trazer alegria aos meus dias. Em especial, ao meu pai, Teobaldo, que, embora não esteja presente para compartilhar este momento de conclusão, foi um pai extraordinário e exemplo em minha vida.

Durante o doutorado, enfrentei a dolorosa perda do meu primo Sansão, um amigo querido que sempre esteve disposto a ajudar. Sou imensamente grata por todas as vezes que me acompanhou ao ICS, inclusive em finais de semana e feriados.

Agradeço a todos os meus familiares pelo apoio, seja direta ou indiretamente.

Ao professor Fabio Alexandre Chinalia, por me proporcionar a oportunidade de ingressar na pesquisa científica, enxergando em mim capacidades que, muitas vezes, eu mesma não percebia. Sou grata por sua orientação acadêmica, paciência e dedicação ao longo dessa jornada.

À Gabi, pela colaboração essencial na realização dos experimentos e pela ajuda na correção dos meus relatórios e documentos.

Ao Gustavo e ao Rodrigo, pelo suporte técnico e pela disponibilização dos equipamentos necessários para os estímulos elétricos.

Aos colegas do Laboratório Moura Costa, pela companhia e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao laboratório LABEM, pela parceria e colaboração ao longo da pesquisa.

## RESUMO

A água produzida (AP) da indústria do petróleo representa um desafio ambiental significativo devido à sua alta salinidade e composição química complexa. O tratamento sustentável desse efluente é essencial para reduzir impactos ambientais e possibilitar seu reuso. Microalgas, como *Dunaliella salina*, destacam-se como alternativa biotecnológica para a remediação da AP, além de permitirem a produção de biocompostos de alto valor agregado, como lipídios e pigmentos. Este estudo avaliou os efeitos da aplicação de corrente elétrica alternada e diferentes espectros luminosos sobre o crescimento, produção de biomassa, lipídios e pigmentos de *D. salina* cultivada em AP e meio sintético. Foram testadas diferentes intensidades de corrente elétrica (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e frequências (1, 50 e 100 Hz), bem como iluminação com LED de distintos comprimentos de onda (vermelho, azul, rosa e branco), na intensidade luminosa de 3.800 lux. Os resultados demonstraram que a aplicação de 50  $\mu\text{A}$  na frequência de 1 Hz, 1x ao dia por 30 minutos, no meio Conway com salinidade de 8,5 % de sais, promoveu um aumento de 92% na taxa de crescimento específico. O melhor acúmulo de biomassa (70%), foi visto no Conway com 3,5% de sais, sob o estímulo elétrico de 50  $\mu\text{A}$  na frequência de 1 Hz, 1x ao dia por 30 minutos. O tratamento intermitente (5 minutos ligados e 5 minutos desligados), na intensidade de corrente alternada de 750  $\mu\text{A}$  na frequência de 1 Hz, no Conway 3,5% de sais, resultou em um aumento de 104% na produção de lipídios. A AP também mostrou efeitos positivos ao estímulo elétrico, na salinidade de 8,5% foi visto um incremento de 23% na produção de biomassa, na intensidade de corrente elétrica de 990  $\mu\text{A}$  aplicada 2x ao dia por 30 minutos. Enquanto a intensidade de corrente de 50  $\mu\text{A}$ , aplicada 1x por dia por 30 minutos, obteve 66% de acúmulo de lipídios. O estímulo luminoso apresentou impactos positivos na *D. salina*, sob o LED vermelho, houve um aumento de 62 e 34%, na taxa de crescimento específico e produção de biomassa, respectivamente, o LED azul estimulou a produção lipídica um aumento de aproximadamente 205%. Os achados reforçam o potencial da combinação de estímulos elétricos e luminosos para a otimização do cultivo de *D. salina*, contribuindo para bioprocessos sustentáveis e para a viabilidade do uso da AP como meio de cultivo em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Dunaliella salina*, água produzida, corrente alternada, lipídios, biomassa, LED.

## ABSTRACT

Produced water (PW) from the oil industry represents a significant environmental challenge due to its high salinity and complex chemical composition. Sustainable treatment of this effluent is essential to reduce environmental impacts and enable its reuse. Microalgae, such as *Dunaliella salina*, stand out as a biotechnological alternative for PW remediation, while also allowing the production of high-value biocompounds such as lipids and pigments. This study evaluated the effects of alternating electric current and different light spectra on the growth, biomass production, and accumulation of lipids and pigments in *D. salina* cultivated in PW and synthetic medium. Different electric current intensities (50, 750, and 990  $\mu\text{A}$ ) and frequencies (1, 50, and 100 Hz), as well as LED lighting with different wavelengths (red, blue, pink, and white) at a light intensity of 3,800 lux, were tested. The results showed that applying 50  $\mu\text{A}$  at a frequency of 1 Hz, once a day for 30 minutes, in Conway medium with 8.5% salt salinity, promoted a 92% increase in specific growth rate. The highest biomass accumulation (70%) was observed in Conway with 3.5% salts, under electric stimulation of 50  $\mu\text{A}$  at 1 Hz, once a day for 30 minutes. The intermittent treatment (5 minutes on and 5 minutes off), using 750  $\mu\text{A}$  of alternating current at 1 Hz in Conway 3.5% salts, resulted in a 104% increase in lipid production. PW also showed positive effects under electrical stimulation. At 8.5% salinity, biomass production increased by 23% when applying 990  $\mu\text{A}$  twice a day for 30 minutes. Meanwhile, an intensity of 50  $\mu\text{A}$  applied once a day for 30 minutes led to a 66% lipid accumulation. Light stimulation also had positive impacts on *D. salina*: under red LED light, there was a 62% and 34% increase in specific growth rate and biomass production, respectively, and blue LED light stimulated lipid production by approximately 205%. These findings highlight the potential of combining electrical and light stimuli to optimize *D. salina* cultivation, contributing to sustainable bioprocesses and enhancing the feasibility of using PW as a culture medium in biotechnological applications.

Keywords: *Dunaliella salina*, produced water, alternating current, lipids, biomass, LED.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL. ....   | 46 |
| FIGURA 2. CRESCIMENTO ESPECÍFICO. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO DA DUNALIELLA SALINA CULTIVADA POR 7 DIAS. AS BARRAS INDICAM AS CEPAS DE MICROALGAS ADAPTADA (ACLIMATADA-1 E ACLIMATADA-2) E NÃO ADAPTADA, CRESCIDA NA ÁGUA PRODUZIDA EM DIFERENTES SALINIDADES (8,5 E 10%), EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (A) INÓCULO DE 7 DIAS (IN 7D); (B) INÓCULO DE 14 DIAS (IN 14D). (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....     | 52 |
| FIGURA 3. PRODUÇÃO DE BIOMASSA. ACÚMULO DE BIOMASSA DE DUNALIELLA SALINA CULTIVADA POR 7 DIAS. AS BARRAS INDICAM AS CEPAS DE MICROALGAS ADAPTADA (ACLIMATADA-1 E ACLIMATADA-2) E NÃO ADAPTADA, CRESCIDA NA ÁGUA PRODUZIDA EM DIFERENTES SALINIDADES (8,5 E 10%), EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (A) INÓCULO DE 7 DIAS (IN 7D); (B) INÓCULO DE 14 DIAS (IN 14D). (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....                  | 54 |
| FIGURA 4. ACÚMULO DE CLOROFILA A. PRODUÇÃO DE CLOROFILA A DA DUNALIELLA SALINA CULTIVADA POR 7 DIAS. AS BARRAS INDICAM AS CEPAS DE MICROALGAS ADAPTADA (ACLIMATADA-1 E ACLIMATADA-2) E NÃO ADAPTADA, CRESCIDA NA ÁGUA PRODUZIDA EM DIFERENTES SALINIDADES (8,5 E 10%), EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (A) INÓCULO DE 7 DIAS (IN 7D) E (B) INÓCULO 14 DIAS (IN 14D). (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....              | 56 |
| FIGURA 5. ACÚMULO DE CAROTENÓIDES. PRODUÇÃO TOTAL DE CAROTENÓIDES PRODUZIDOS POR DUNALIELLA SALINA. AS BARRAS INDICAM AS CEPAS DE MICROALGAS ADAPTADA (ACLIMATADA-1 E ACLIMATADA-2) E NÃO ADAPTADA, CRESCIDA NA ÁGUA PRODUZIDA EM DIFERENTES SALINIDADES (8,5 E 10%), EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (A) INÓCULO DE 7 DIAS (IN 7D) E (B) INÓCULO 14 DIAS (IN 14D). (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....               | 58 |
| FIGURA 6. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL. ....   | 70 |
| FIGURA 7. CRESCIMENTO ESPECÍFICO ( $\mu$ ). COEFICIENTE DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO DA DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM O CRESCIMENTO ESPECÍFICO DA MICROALGA NO MEIO CONWAY E NA ÁGUA PRODUZIDA COM 8,5% DE SAIS, EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....   | 74 |
| FIGURA 8. ACÚMULO DE BIOMASSA. PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA MICROALGA NO MEIO CONWAY E NA ÁGUA PRODUZIDA COM 8,5% DE SAIS, EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....   | 76 |
| FIGURA 9. ACÚMULO DE LIPÍDIOS. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS DE DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM A PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS DA MICROALGA NO MEIO CONWAY E NA ÁGUA PRODUZIDA COM 8,5% DE SAIS, EM TRÊS INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA: 50, 750 E 990 $\mu$ A. ALÉM DOS SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....   | 78 |
| FIGURA 10. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL. ....  | 92 |
| FIGURA 11. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO. CRESCIMENTO ESPECÍFICO DA DUNALIELLA SALINA EM MEIO CONWAY COM 3,5 % DE SAIS, SOB ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE (5 MINUTOS LIGADOS E 5 MINUTOS DESLIGADOS) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA (50, 750 E 990 $\mu$ A) E FREQUÊNCIAS (1, 50 E 100 Hz), E SEUS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA E SOB ESTÍMULO CONTÍNUO DE CORRENTE (50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 Hz DE FREQUÊNCIA. (*) INDICA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P < 0,05). .... | 95 |
| FIGURA 12. PRODUÇÃO DE BIOMASSA. ACÚMULO DE BIOMASSA DA DUNALIELLA SALINA EM MEIO CONWAY COM 3,5 % DE SAIS, SOB ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE (5 MINUTOS LIGADOS E 5 MINUTOS DESLIGADOS) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA (50, 750 E 990 $\mu$ A) E FREQUÊNCIAS (1, 50 E 100 Hz), E SEUS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA E SOB ESTÍMULO CONTÍNUO DE CORRENTE (50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 Hz DE FREQUÊNCIA. (*) INDICA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA (P < 0,05). ....              | 96 |
| FIGURA 13. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS. ACÚMULO DE LIPÍDIOS DA DUNALIELLA SALINA EM MEIO CONWAY COM 3,5 % DE SAIS, SOB ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE (5 MINUTOS LIGADOS E 5 MINUTOS DESLIGADOS) EM   |    |

|  |     |
|--|-----|
| DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA (50, 750 E 990 $\mu$ A) E FREQUÊNCIAS (1, 50 E 100 Hz), E SEUS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA E SOB ESTÍMULO CONTÍNUO DE CORRENTE (50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 Hz DE FREQUÊNCIA. (*) INDICA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ( $P < 0,05$ ).<br>.....   | 98  |
| FIGURA 14. FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....   | 104 |
| FIGURA 15. CRESCIMENTO ESPECÍFICO ( $\mu$ ). COEFICIENTE DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO DA DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM OS VALORES DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL DA MICROALGA NO MEIO CONWAY COM 3,5% DE SAIS, EXPOSTA A DIFERENTES CUMPRIMENTOS DE ONDA DE LUZ LED (BRANCO, AZUL, ROSA E VERMELHO), COM INTENSIDADE DE 3800 LUX. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 106 |
| FIGURA 16. ACÚMULO DE BIOMASSA. PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM OS VALORES DE BIOMASSA TOTAL PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL DA MICROALGA NO MEIO CONWAY COM 3,5% DE SAIS, EXPOSTA A DIFERENTES CUMPRIMENTOS DE ONDA DE LUZ LED (BRANCO, AZUL, ROSA E VERMELHO), COM INTENSIDADE DE 3800 LUX. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....                                      | 109 |
| FIGURA 17. ACÚMULO DE LIPÍDIOS. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS DE DUNALIELLA SALINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS. AS BARRAS INDICAM OS VALORES DE BIOMASSA TOTAL PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL DA MICROALGA NO MEIO CONWAY COM 3,5% DE SAIS, EXPOSTA A DIFERENTES CUMPRIMENTOS DE ONDA DE LUZ LED (BRANCO, AZUL, ROSA E VERMELHO), COM INTENSIDADE DE 3800 LUX. (*) ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....                                      | 110 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1. TRABALHOS PUBLICADOS COM TRATAMENTOS DE ÁGUA PRODUZIDA COM MICROALGAS. ....   | 26  |
| TABELA 2. TRABALHOS PUBLICADOS COM ESTÍMULOS LUMINOSOS EM MICROALGAS. ....  | 30  |
| TABELA 3. TRABALHOS PUBLICADOS COM ESTÍMULOS ELÉTRICOS EM MICROALGAS. ....  | 35  |
| TABELA 4. COMPOSIÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA AP-7. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ÁGUA PRODUZIDA.  | 48  |
| TABELA 5. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PRINCIPAL (P). É ADICIONADO 1ML/L DESSA<br>SOLUÇÃO EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....  | 48  |
| TABELA 6. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS. A CADA UM LITRO É ADICIONADO<br>0,1 ML DESSA SOLUÇÃO DE VITAMINAS EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....   | 48  |
| TABELA 7. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES. VALORES DE PRODUÇÃO TOTAL DE<br>LIPÍDIOS (G/L), CONCENTRAÇÃO INICIAL (G/L) E REMOÇÃO (%) DE DQO (DEMANDA QUÍMICA DE<br>OXIGÊNIO), NITRATO E FOSFATO APÓS O CULTIVO DE DUNALIELLA SALINA (SELVAGEM,<br>ACLIAMATADA-1 E ACLIAMATADA-2) CULTIVADA NA ÁGUA PRODUZIDA (AP) NAS SALINIDADES DE 8,5<br>E 10%, COM INÓCULO DE 7 DIAS (IN 7D), SOB DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA<br>(50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 HZ DE FREQUÊNCIA. E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, NÃO ESTIMULADOS<br>ELETRICAMENTE. ....   | 60  |
| TABELA 8. PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES. VALORES DE PRODUÇÃO TOTAL DE<br>LIPÍDIOS (G/L), CONCENTRAÇÃO INICIAL (G/L) E REMOÇÃO (%) DE DQO (DEMANDA QUÍMICA DE<br>OXIGÊNIO), NITRATO E FOSFATO APÓS O CULTIVO DE DUNALIELLA SALINA (SELVAGEM,<br>ACLIAMATADA-1 E ACLIAMATADA-2) CULTIVADA NA ÁGUA PRODUZIDA (AP) NAS SALINIDADES DE 8,5<br>E 10%, COM INÓCULO DE 14 DIAS (IN 14D), SOB DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE<br>ALTERNADA (50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 HZ DE FREQUÊNCIA. E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, NÃO<br>ESTIMULADOS ELETRICAMENTE. .... | 61  |
| TABELA 9. COMPOSIÇÃO DA ÁGUA PRODUZIDA AP-7. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ÁGUA PRODUZIDA.  | 71  |
| TABELA 10. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PRINCIPAL (P). É ADICIONADO 1ML/L DESSA<br>SOLUÇÃO EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....   | 71  |
| TABELA 11. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS. A CADA UM LITRO É ADICIONADO<br>0,1 ML DESSA SOLUÇÃO DE VITAMINAS EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....  | 71  |
| TABELA 12. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DA D. SALINA. ....   | 81  |
| TABELA 13. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PRINCIPAL (P). É ADICIONADO 1ML/L DESSA<br>SOLUÇÃO EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....   | 93  |
| TABELA 14. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS. A CADA UM LITRO É ADICIONADO<br>0,1 ML DESSA SOLUÇÃO DE VITAMINAS EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....  | 93  |
| TABELA 15. REMOÇÃO DE NUTRIENTES. REMOÇÃO DE NITRATO E FOSFATO DA DUNALIELLA SALINA EM<br>MEIO CONWAY COM 3,5 % DE SAIS, SOB ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE (5 MINUTOS LIGADOS E 5<br>MINUTOS DESLIGADOS) EM DIFERENTES INTENSIDADES DE CORRENTE ALTERNADA (50, 750 E 990 $\mu$ A)<br>E FREQUÊNCIAS (1, 50 E 100 Hz), E SEUS CONTROLES SEM EXPOSIÇÃO À CORRENTE ALTERNADA E SOB<br>ESTÍMULO CONTÍNUO DE CORRENTE (50, 750 E 990 $\mu$ A) E 1 HZ DE FREQUÊNCIA. ....   | 99  |
| TABELA 16. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PRINCIPAL (P). É ADICIONADO 1ML/L DESSA<br>SOLUÇÃO EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....   | 105 |
| TABELA 17. MEIO CONWAY. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE VITAMINAS. A CADA UM LITRO É ADICIONADO<br>0,1 ML DESSA SOLUÇÃO DE VITAMINAS EM ÁGUA MARINHA NATURAL OU SINTÉTICA. ....  | 105 |
| TABELA 18. CINÉTICA DE CRESCIMENTO. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE DUNALIELLA SALINA,<br>CULTIVADA EM MEIO CONWAY COM SALINIDADE DE 3,5%, EXPOSTA A DIFERENTES CUMPRIMENTOS<br>DE ONDA DE LUZ LED (BRANCO, AZUL, ROSA E VERMELHO), COM INTENSIDADE DE 3800 LUX. ....  | 111 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| $\mu$            | Coefficiente de crescimento   |
| $\mu\text{A}$    | Microampere   |
| $\mu\text{g}$    | Micrograma  |
| $\mu\text{mol}$  | Micromole   |
| A                | Ampère  |
| Aclimatada-1     | <i>Dunaliella salina</i> adaptada a água produzida com 8.5% de sais |
| Aclimatada-2     | <i>Dunaliella salina</i> adaptada a água produzida com 10% de sais  |
| ANOVA            | Análise de Variância  |
| AP               | Água produzida ou Efluente da extração de petróleo e gás            |
| ATP              | Adenosina trifosfato  |
| BMIN             | Banco de Microalgas Iracema Nascimento                              |
| BRS              | Bactérias redutoras de sulfatos                                     |
| BTEX             | Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos                             |
| C                | Carbono   |
| CA               | Corrente elétrica alternada   |
| CC               | Corrente elétrica contínua  |
| CEF              | Fluxo cíclico de elétrons   |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de carbono  |
| D.O.             | Densidade óptica  |
| DQO              | Demanda química de oxigênio   |
| ERO              | Espécie reativa de oxigênio   |
| H <sub>2</sub> S | Sulfeto de hidrogênio   |
| HAPs             | Hidrocarbonetos poliaromáticos                                      |
| Hz               | Hertz   |
| IN 7D            | Inóculo com 7 dias de incubação                                     |
| IN 14D           | Inóculo com 14 dias de incubação                                    |
| K <sup>+</sup>   | Potássio  |
| kV/cm            | Quilovolts por centímetro   |
| LABEM            | Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos           |
| Labbiotec        | Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia                        |
| LED              | Diodo Emissor de Luz  |
| LN               | Logaritmo natural   |

|                  |   |
|------------------|---|
| Mg <sup>2+</sup> | Magnésio  |
| mA               | Miliampere  |
| N                | Nitrogênio  |
| NaCl             | Cloreto de sódio                                  |
| NADPH            | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| P                | Fósforo   |
| (P)              | Solução Principal                                 |
| PAR              | Radiação Fotossintética Ativa                     |
| Pearl chain      | Alinhamento de partículas em cadeia               |
| PSI              | Fotossistema I                                    |
| PSII             | Fotossistema II                                   |
| Rubisco          | Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenasse     |
| STD              | Sólidos totais dissolvidos                        |
| TAG              | Triglicerídeos                                    |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.2. REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.2. OBJETIVO GERAL .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.2.1. Objetivos Específicos .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>2.4.1. Composição da Água Produzida e Desafios para o Tratamento .....</b>                  | <b>20</b> |
| <b>2.4.1.1. Desafios no Tratamento da Água Produzida .....</b>                                 | <b>22</b> |
| <b>2.4.1.2. Microalgas no Tratamento de Águas Residuais e na Produção de Biocompostos.....</b> | <b>23</b> |
| <b>2.4.2. Efeitos de Estímulos Luminosos no Cultivo de Microalgas .....</b>                    | <b>27</b> |
| <b>2.4.2.1. Efeitos luminosos positivos .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.4.2.2. Efeito Luminosos Negativos.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>2.4.2.3. Limitações e Perspectivas Futuras para o Uso do Estímulo Luminoso .....</b>        | <b>29</b> |
| <b>2.4.3. Efeitos Positivos dos Estímulos Elétricos no Cultivo de Microalgas .....</b>         | <b>31</b> |
| <b>2.4.3.2. Efeitos negativos do estímulo elétrico .....</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>2.4.3.3. Limitações e perspectivas futuras para o uso do estímulo elétrico .....</b>        | <b>33</b> |
| <b>2.5. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.6. REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO DE CRESCIMENTO.....</b>                                | <b>44</b> |
| <b>3.1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>3.2. OBJETIVO GERAL .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.2.1. Objetivos Específicos .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.3. METODOLOGIA.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.3.1. Desenho Experimental.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.3.2. Microalga .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>3.3.3. Água produzida .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>3.3.4. Cinética de Crescimento e Análise Estatística .....</b>                              | <b>49</b> |
| <b>3.3.5. Análise Química.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>3.4.1. Taxa de Crescimento Específico .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>3.4.2. Produção de Biomassa .....</b>   | <b>52</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.3. Acúmulo de Pigmentos .....  | 54        |
| 3.4.4. Produção de lipídios e remoção de nutrientes.....   | 58        |
| 3.5. CONCLUSÃO.....  | 63        |
| 3.6. REFERÊNCIAS.....  | 64        |
| <b>CAPÍTULO III - EFEITO DE DIFERENTES REGIMES DE ESTÍMULO ELÉTRICO COM CORRENTE ALTERNADA EM <i>D. salina</i> EM DIFERENTES MEIOS SALINOS .....</b> | <b>67</b> |
| 4.1. INTRODUÇÃO .....  | 67        |
| 4.2. OBJETIVO.....   | 68        |
| 4.2.1. Objetivos Específicos .....   | 68        |
| 4.3. METODOLOGIA.....  | 69        |
| 4.3.1. Desenho Experimental .....  | 69        |
| 4.3.2. Microalga.....  | 70        |
| 4.3.3. Água Produzida.....   | 70        |
| 4.3.4. Cinética de Crescimento e Análise Estatística .....   | 72        |
| 4.3.5. Análise Química .....   | 72        |
| 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 72        |
| 4.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ ).....   | 73        |
| 4.4.2. Impedância e seu papel no desempenho do crescimento .....   | 74        |
| 4.4.3. Produção de Biomassa .....  | 75        |
| 4.4.4. Produção de Lipídios .....  | 76        |
| 4.4.5. Produção de Pigmentos .....   | 79        |
| 4.4.6. Remoção de nutrientes .....   | 82        |
| 4.5. CONCLUSÃO.....  | 83        |
| 4.6. REFERÊNCIAS.....  | 84        |
| <b>CAPÍTULO IV - Role of low-level alternating current and impedance for enhancing microalgae biomass and lipid production .....</b>                 | <b>88</b> |
| <b>CAPÍTULO V - ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE NO CULTIVO DE <i>D. salina</i> .....</b>  | <b>89</b> |
| 5.1. INTRODUÇÃO .....  | 89        |
| 5.2. OBJETIVO.....   | 90        |
| 5.2.1. Objetivos Específicos .....   | 90        |
| 5.3. METODOLOGIA.....  | 91        |
| 5.3.1. Sistema Experimental .....  | 91        |
| 5.3.2. Microalga.....  | 92        |
| 5.3.3. Cinética de Crescimento e Análise Estatística .....   | 93        |
| 5.3.4. Análise Química .....   | 93        |
| 5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 94        |

|   |     |
|---|-----|
| 5.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ ) .....                   | 94  |
| 5.4.2. Produção de Biomassa .....                                       | 95  |
| 5.4.3. Produção Lipídica .....  | 96  |
| 5.4.4. Remoção de nutrientes.....                                       | 98  |
| 5.5. CONCLUSÃO.....   | 100 |
| 5.6. REFERÊNCIAS.....   | 100 |
| CAPÍTULO VI - ESTÍMULO LUMINOSO NO CULTIVO DE <i>D. salina</i> .....    | 102 |
| 6.1. INTRODUÇÃO .....   | 102 |
| 6.2. OBJETIVO.....  | 103 |
| 6.2.1. Objetivos Específicos .....                                      | 103 |
| 6.3. METODOLOGIA.....   | 103 |
| 6.3.1. Desenho Experimental .....                                       | 103 |
| 6.3.2. Seleção de Microalga .....                                       | 104 |
| 6.3.3. Cinética de Crescimento e Análise Estatística .....              | 105 |
| 6.3.4. Análise Química .....  | 105 |
| 6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 106 |
| 6.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ ) em Meio Sintético ..... | 106 |
| 6.4.3. Produção de Biomassa em Meio Sintético .....                     | 107 |
| 6.4.4. Produção de Lipídios em Meio Sintético.....                      | 109 |
| 6.4.5. Produção de Pigmentos Fotossintetizante em Meio Sintético .....  | 110 |
| 6.5. CONCLUSÃO .....  | 111 |
| 6.6. REFERÊNCIAS.....   | 112 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 115 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente geração de água produzida (AP) pela indústria do petróleo representa um desafio ambiental significativo, devido ao seu alto teor salino e composição química complexa (Tabela 4). O tratamento adequado desse efluente é essencial para minimizar impactos ambientais e permitir sua reutilização de forma sustentável (Veil, et al., 2004; Guerra, et al., 2011). Nesse contexto, o uso de microalgas surge como uma estratégia biotecnológica promissora, pois esses microrganismos são capazes de metabolizar compostos presentes na AP, ao mesmo tempo que produzem biocompostos de alto valor agregado, como lipídios e pigmentos.

Dentre as microalgas estudadas, *Dunaliella salina* se destaca por sua alta tolerância à salinidade e potencial para a produção de bioprodutos de interesse industrial. Para otimizar seu cultivo, diferentes abordagens físicas e químicas têm sido testadas, incluindo variações na iluminação e a aplicação de campos elétricos. O uso de corrente alternada de baixa intensidade pode influenciar diretamente o crescimento e metabolismo celular das microalgas, promovendo alterações na permeabilidade da membrana e facilitando o transporte de nutrientes (Geng, et al., 2004; Tieleman, 2004). Da mesma forma, a manipulação do espectro luminoso tem se mostrado uma estratégia eficiente para maximizar a taxa de crescimento e o acúmulo de biomassa e lipídios, tornando o cultivo mais eficiente e economicamente viável (Jin, et al., 2021; Sui, et al., 2021).

Neste estudo, foi avaliado o impacto do estímulo elétrico e luminoso sobre *Dunaliella salina* cultivada em diferentes condições, incluindo o uso de água produzida e meio sintético. Foram testadas diferentes intensidades e frequências de corrente alternada, bem como variações no espectro luminoso, para determinar os efeitos dessas variáveis sobre a taxa de crescimento, produção de biomassa e acúmulo de lipídios e pigmentos. A hipótese central da pesquisa é que a combinação de estímulos elétricos e luminosos pode potencializar o rendimento das culturas de microalgas, otimizando a sua aplicação na biotecnologia e na remediação ambiental.

Assim, os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de novos métodos de cultivo sustentáveis e eficientes, ampliando as possibilidades de aplicação das microalgas tanto na produção de bioprodutos como no tratamento de efluentes industriais.

Esta tese foi estruturada no formato multipaper, contemplando capítulos organizados sob a forma de artigos científicos, já publicados ou em processo de submissão. Cada capítulo apresenta uma etapa distinta da pesquisa desenvolvida, abordando diferentes estratégias aplicadas ao cultivo de *Dunaliella salina* em meio sintético e água produzida, com ênfase na aplicação de estímulos elétricos e luminosos. O Capítulo I consiste em uma revisão bibliográfica aprofundada. Os Capítulos II a VI são compostos por trabalhos independentes, que tratam de aspectos específicos da pesquisa. Por fim, as Considerações Finais integram os principais resultados e conclusões obtidas ao longo do estudo.

## 1.2. REFERÊNCIAS

Geng, De-Gui, Yan Han, Yi-Qin Wang, Peng Wang, Li-Ming Zhang, Wen-Bin Li, and Yong-Ru Sun. "Construction of a system for the stable expression of foreign genes in *Dunaliella salina*." *Acta Bot Sin* 46, no. 3, 342-6, (2004).

Guerra, K; Dahm, K.; Dundorf, S. Oil and gas produced water management and beneficial use in the Western United States. US Department of the Interior, Bureau of Reclamation, (2011).

Jin, C., Yu, B., Qian, S., Liu, Q., & Zhou, X. Impact of combined monochromatic light on the biocomponent productivity of *Dunaliella salina*. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v. 13, n. 2, 2021.

Sui, Y.; Harvey, P. J. Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina*. *Foods*, v. 10, n. 5, p. 1018, 2021.

Tieleman, D. P. The molecular basis of electroporation. *BMC biochemistry* 5, no. 1, 1-12, (2004).

Veil, J. A.; Puder, M. G.; Elcock, D. A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane. Argonne National Lab., IL (US), 2004.

## CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera é a principal fonte de energia mundialmente utilizada. No entanto, sua atividade está associada a um alto consumo de água e, consequentemente, a geração de águas residuais. No caso da extração de petróleo pode-se destacar a chamada água produzida (AP). Este efluente, proveniente das atividades de extração, contém derivados de petróleo, compostos orgânicos e inorgânicos complexos, o que representa um significativo desafio ambiental. Conforme a PETROBRÁS (2024), o relatório de Sustentabilidade de 2023, foram consumidos 115 milhões de m<sup>3</sup> de água doce para suas atividades. Grande parte dessa água é utilizada em processos de recuperação de petróleo, gerando volumes expressivos de AP, cuja composição complexa exige tratamentos eficientes antes de seu despejo final ou reutilização.

Nesse cenário, as microalgas mostram-se uma alternativa promissora para o tratamento de efluentes, incluindo a água produzida. Além de sua capacidade de remediação ambiental, essas microalgas possuem potencial para a produção de biocompostos de alto valor agregado, utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e de biocombustíveis (Sivaramakrishnan, et al., 2022; Barkia, et al., 2019). O mercado global de microalgas, estimado em US\$ 11,8 bilhões em 2023 (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2023), reforça sua relevância econômica.

A *Dunaliella salina*, uma microalga halotolerante, destaca-se pela sua resiliência em condições extremas e pela capacidade de produzir biomoléculas valiosas, como lipídeos e carotenoides. Estudos recentes têm demonstrado que estímulos externos, como variações de nutrientes, intensidade luminosa e aplicação de campos elétricos, podem aumentar significativamente o rendimento produtivo dessa espécie (Conceição, et al., 2023; Sui, et al., 2021; Cheng, et al., 2022). Por exemplo, Sui, et al., (2021) observaram um aumento de 95% na biomassa de *Dunaliella salina* sob iluminação LED vermelha, enquanto Nezammahalleh et al. (2016) relataram um rendimento lipídico de 55% em cultivos tratados com corrente contínua de 2kV.

Com base nesse panorama, o presente estudo visa explorar o potencial de estímulos elétricos e luminosos na otimização do cultivo de *Dunaliella salina* em água produzida da indústria do petróleo, investigando suas implicações tanto para o tratamento desse efluente quanto para a produção de biomassa e lipídios de interesse industrial.

## 2.2. OBJETIVO GERAL

Fornecer uma base teórica sobre os avanços científicos no tratamento de água produzida utilizando microalgas, com ênfase na espécie *Dunaliella salina*.

### 2.2.1. Objetivos Específicos

- I. Revisar a composição da água produzida e os desafios associados ao seu tratamento.
- II. Revisar o potencial das microalgas no tratamento de águas residuais, com ênfase na *Dunaliella salina*.
- III. Discutir os efeitos de estímulos elétricos e luminosos no cultivo de microalgas, e os avanços científicos relacionados ao aumento de produtividade e síntese de biocompostos.
- IV. Identificar lacunas na literatura científica sobre o uso combinado de estímulos elétricos e luminosos no cultivo de *Dunaliella salina* em água produzida, justificando a abordagem experimental proposta neste estudo.

## 2.3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste capítulo consiste em uma revisão bibliográfica detalhada, com ênfase nas abordagens mais recentes e relevantes sobre o cultivo de microalgas, especialmente *Dunaliella salina*, em água produzida da indústria do petróleo. A revisão abrange estudos científicos publicados em periódicos especializados, livros, dissertações e teses, e foi realizada de forma abrangente, sem restrição temporal, visando fornecer uma visão atualizada e sólida sobre o tema.

A busca dos materiais foi realizada em bases de dados acadêmicas amplamente reconhecidas, como ScienceDirect, Scopus, Google Scholar e plataformas de publicações da indústria, como SpringerLink e Elsevier. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa incluíram termos como "microalgae", "*Dunaliella salina*", "produced water", "bioremediation", "lipid and biomass production", "electric field stimulation", "light wavelength", "LED", e "bioproducts". A busca foi refinada para identificar artigos que abordassem o uso de microalgas em águas residuais da indústria petrolífera, com foco nos efeitos de estímulos elétricos e variações na intensidade luminosa sobre o crescimento e produção de biocompostos.

A revisão se concentrou na análise de diferentes estratégias para otimizar o cultivo de *Dunaliella salina* em condições adversas. Foram discutidos os principais resultados experimentais relacionados ao aumento da biomassa, produção de lipídeos, e a aplicação de estímulos externos, como variações na intensidade luminosa (especialmente LED de diferentes comprimentos de onda) e a utilização de campos elétricos.

## 2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1. Composição da Água Produzida e Desafios para o Tratamento

A água produzida representa um dos maiores desafios ambientais enfrentados pela indústria de petróleo e gás devido à sua composição complexa e volume expressivo gerado durante o processo de extração. As características físico-químicas da AP variam amplamente, dependendo da formação geológica da área de extração, dos aditivos químicos empregados e das técnicas de extração utilizadas (Motta, et al., 2013). Geralmente, a rocha nas bacias sedimentares contendo petróleo está saturada com água do mar, o que implica que, durante a extração, os hidrocarbonetos menos densos migram para as armadilhas naturais, deslocando a água de formação para os reservatórios de hidrocarbonetos. Assim, as rochas impermeáveis do reservatório normalmente contêm hidrocarbonetos de petróleo (líquido e gás) e água. As fontes desta AP podem incluir fluxo acima ou abaixo da zona de hidrocarboneto, fluxo de dentro da zona de hidrocarboneto ou fluxo de fluidos e aditivos injetados resultantes de atividades de produção (Veil, et al., 2004). A água de formação consiste em um líquido natural que fica armazenado nos reservatórios rochosos (Teles, et al., 2010). A sua localização, o tipo de rochas e a bacia sedimentar onde a água de formação escoar determinam a concentração de compostos que vão conferir uma característica específica a este efluente.

A AP compreende o efluente gerado no processo de extração do petróleo e gás ou pode estar relacionada também aos resíduos gerados do processo de obtenção de gás de xisto e metano de camada de carvão. É caracterizada assim após ser extraída juntamente com o combustível fóssil no decorrer da atividade de extração, constituindo-se de um resíduo complexo contendo água de formação, água de injeção e aditivos resultantes do processo de produção (Neff, 2002; fakhru'l-razi, et al., 2009).

A AP é composta por uma mistura de componentes orgânicos e inorgânicos, incluindo sais dissolvidos, hidrocarbonetos, metais pesados, ácidos orgânicos e compostos químicos. Entre os compostos mais comuns estão os sais (como NaCl,  $Mg^{2+}$  e  $K^{+}$ ), hidrocarbonetos aromáticos como os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e

xilenos), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e metais pesados como bário, cobre, níquel e chumbo (Motta, et al., 2013; Al-ghouti, et al., 2019). Além disso, a água produzida pode conter compostos radioativos, como o rádio-226 e rádio-228, que são derivados do urânio e de certas formações rochosas (Utvik, 2003). A presença de óleo disperso, em sua maioria apolares, especialmente o mais pesado, também é um fator crítico, pois, devido ao seu alto peso molecular, o óleo tende a se sedimentar ou formar gotículas suspensas, contribuindo para impactos ambientais significativos ao reduzir a oxigenação da água (Stewart, et al., 2011).

Outro desafio importante na AP é sua salinidade elevada, que pode ser até 1000 vezes maior que a da água do mar, devido à dissolução de sais rochosos durante o processo de extração (Stewart, et al., 2011). Isso impõe uma dificuldade adicional para os métodos tradicionais de tratamento, que frequentemente têm dificuldades em lidar com a remoção eficaz desse composto. Além disso, a presença de gases como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, e metano, produzidos normalmente por bactérias redutoras de sulfatos (BRS), contribui para o aumento da complexidade no tratamento biológico da AP (Motta, et al., 2013).

Produtos químicos também são adicionados ao fluído de injeção para otimizar a extração de petróleo e gás, como inibidores de incrustação, anticorrosivos, fluidificantes (desemulsificantes e dispersantes) e biocidas para controle biológico (Wells, et al., 2011; Motta, et al., 2013). Esses aditivos podem aumentar ainda mais a toxicidade e a complexidade da AP, dificultando seu tratamento adequado.

Portanto, o texto acima destaca os seguintes itens:

- Origem da Água Produzida: A água de formação pode fluir de áreas próximas e é composta por água natural armazenada em reservatórios rochosos ou por fluido de injeção durante a recuperação avançada.
- Variedade de Composição: As características físico-químicas da água produzida variam amplamente, influenciadas por fatores como formação geológica, aditivos químicos e técnicas de extração.
- Componentes Comuns: Inclui sais dissolvidos, hidrocarbonetos (como BTEX e PAHs), metais pesados e, potencialmente, compostos radioativos como rádio-226 e rádio-228.
- Desafios Ambientais: A água produzida possui uma composição complexa e é gerado um volume elevado. A presença de óleo causa impactos ambientais significativos. A salinidade da água produzida pode ser até 1000 vezes maior que

a da água do mar, dificultando o tratamento tradicional. Produtos químicos, como inibidores de incrustação e biocidas, utilizados no processo de extração, podem aumentar a toxicidade da água produzida.

#### **2.4.1.1. Desafios no Tratamento da Água Produzida**

O tratamento da AP visa reduzir a concentração de substâncias tóxicas para possibilitar o descarte seguro ou a reutilização da água em diversos processos, como a recuperação de petróleo e gás, irrigação, e até o cultivo de microalgas (Veil, et al., 2004). No entanto, para que a AP seja reutilizada de forma eficiente, é necessário que ela atenda aos critérios de qualidade (Comissão OSPAR, 2015) exigidos para os usos específicos (Guerra, et al., 2011).

Atualmente, diversos métodos de tratamento da AP estão sendo investigados, incluindo métodos físicos, químicos, eletroquímicos e biológicos. Os tratamentos físicos envolvem a remoção de compostos por forças de van der Waals, enquanto os métodos químicos utilizam reagentes para oxidação e remoção de contaminantes orgânicos (Jain, et al., 2017). Já as tecnologias baseadas em membranas utilizam processos como ultrafiltração para separar os componentes da AP (Shannon, et al., 2010).

O tratamento biológico refere-se à utilização de microrganismos que aproveitam os poluentes disponíveis no efluente como fonte de crescimento, transformando compostos tóxicos complexos em elementos não tóxicos mais simples. A biooxidação, uma técnica de tratamento biológico, envolve a oxidação de compostos orgânicos por bactérias, fungos, algas e protozoários. Esse processo pode ocorrer por biodegradação ou biofloculação (lagoas de estabilização ou lodos ativados). Compostos orgânicos biodegradáveis, como os hidrocarbonetos presentes na AP são decompostos em moléculas mais simples por bactérias que utilizam a energia química liberada para o seu metabolismo. Na biofloculação, consórcios de microrganismos tem a capacidade de utilizar os compostos químicos presentes na AP como fonte de nutrientes e carbono. Nesse processo os microrganismos adsorvem e bloqueiam materiais solúveis e insolúveis dentro de sua própria matriz. Isso contribui para a sua remoção pela separação mecânica desses flocos, o sistema de lodo ativado é uma dessas metodologias. Os microrganismos tratam o efluente pelos mecanismos de oxidação e floculação. Embora essas abordagens sejam simples, econômica e ambientalmente amigáveis, elas podem gerar grandes volumes de resíduos, que exigem tratamento adicional. Uma alternativa para mitigar esse problema é a combinação do tratamento biológico com sistemas de membranas, como os

biorreatores de membrana, que permitem filtrar o efluente e reduzir a geração de resíduos (Shannon, et al., 2010).

Uma das abordagens promissoras no tratamento da AP é o uso de microalgas, que são capazes de degradar compostos tóxicos, como os hidrocarbonetos presentes na AP. As microalgas utilizam os BTEX em concentrações baixas como fonte de carbono, reduzindo a toxicidade da água produzida e, ao mesmo tempo, gerando bioprodutos de interesse industrial, tornando o processo mais sustentável (Mendes, et al., 2011; Das, et al., 2019). Além disso, o uso de microalgas tem o benefício adicional de ser uma técnica de baixo custo e alta eficiência na remoção de poluentes (Al-ghouti, et al., 2019).

Por fim, os desafios no tratamento da AP são ampliados pela presença de resíduos gerados durante os processos biológicos, como o método de lodo ativado, que pode gerar grandes volumes de material que requerem tratamento adicional.

O texto acima identifica os seguintes desafios para o tratamento:

- O tratamento da água produzida (AP) busca reduzir substâncias tóxicas para permitir descarte seguro ou reutilização como, por exemplo, os processos de recuperação de petróleo ou irrigação.
- Os tratamentos não biológicos incluem: métodos físicos, químicos e eletroquímicos.
- Os tratamentos Biológicos envolvem técnicas como: Biooxidação ou Biodegradação e Biofloculação.
- Desafios: Os tratamentos não biológicos são de custo elevado e, embora o tratamento biológico seja potencialmente mais econômico e ambientalmente amigável, o processo pode ser caso específico e estudos adicionais.

#### **2.4.1.2. Microalgas no Tratamento de Águas Residuais e na Produção de Biocompostos**

As microalgas desempenham um papel crucial na remediação ambiental de águas residuais, incluindo a água produzida da indústria do petróleo. Sua capacidade de fixar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), remover nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P) e de acumular substâncias úteis, como lipídeos e pigmentos, as tornam excelentes candidatas para o tratamento de efluentes. As microalgas utilizam esses nutrientes para o seu

crescimento, purificando a água ao mesmo tempo que produzem biomassa algal. Isso não só contribui para a redução de poluentes, mas também resulta na produção de biocompostos de interesse industrial, como carotenoides e lipídeos (Rao, et al., 2007; Santos, et al., 2013).

O uso de microalgas no tratamento de águas residuais apresenta diversas vantagens em relação a métodos convencionais, como os processos químicos e físicos. Diferente desses métodos, que podem exigir grandes quantidades de reagentes e energia, as microalgas não apenas tratam as águas residuais de maneira eficiente, mas também geram biomassa valiosa. No processo de fotossíntese, esses microrganismos fotossintéticos fixam o CO<sub>2</sub>, colaborando para a mitigação de mudanças climáticas. Além disso, são capazes de remover nutrientes inorgânicos da água e até degradar substâncias tóxicas, com menor demanda energética. Outro benefício importante é que o cultivo de microalgas pode ser realizado em ambientes de baixo custo, como águas residuais, o que reduz os custos associados à produção de biomassa, especialmente quando comparado com plantas oleaginosas (Guterman, et al., 1990; Chisti, 2007).

Dentre as espécies de microalgas mais promissoras, a *Dunaliella salina* destaca-se pela sua capacidade de crescer em ambientes de alta salinidade e por sua habilidade de produzir biocompostos de alto valor agregado, como carotenoides (principalmente  $\beta$ -caroteno) e lipídios. Sua resistência a condições extremas, como variações na salinidade e intensidade luminosa, torna-a uma microalga ideal para o cultivo em águas residuais de diversas origens, incluindo a água produzida na indústria do petróleo. Estudos demonstram que a *D. salina* pode acumular grandes quantidades de carotenoides quando cultivada sob condições de estresse, o que a torna valiosa para a indústria cosmética e farmacêutica (Chen, et al., 2009; Sui, et al., 2021).

Diversos estudos têm demonstrado o sucesso do uso de microalgas no tratamento de efluentes. Entre eles, destacam-se águas residuais de esgoto doméstico (Cabanelas, et al., 2013; Conceição, et al., 2019), efluente de biodigestores (Rodulfo, et al., 1980, Marques, et al., 2013), vinhaça de cana-de-açúcar (Marques, et al., 2013, Santana, et al., 2016), águas residuais da produção de soja (Zhang, et al., 2012) e resíduos da suinocultura (Travieso, et al., 2006). Em todos esses casos, as microalgas mostraram eficácia na remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, presentes nas águas residuais, além de produzirem lipídeos e outros compostos bioativos, conferindo ao processo benefícios tanto ambientais quanto econômicos.

No caso da água produzida, um resíduo complexo proveniente da indústria de petróleo, a presença de nitrogênio e fósforo, essenciais para o crescimento de microalgas (Williams, 2002), são variáveis e, muitas vezes, insuficiente. Isso pode ocasionar estresse fisiológico nas microalgas ou, dependendo do estágio de cultivo, induzir uma rota metabólica que maximize a produção de lipídeos ou bioativos como os carotenoides. Além disso, a alta salinidade desse efluente pode acentuar esse estresse (Hosseini Tafreshi, et al., 2009), mas também pode ser uma variável explorável para otimizar a produção de bioativos. Apesar disso, a presença de compostos tóxicos na água produzida (Tabela 4) pode ser prejudicial às microalgas (Graham, et al., 2017), o que exige uma cuidadosa escolha de cepas microalgais adaptadas a essas condições extremas.

Estudos sobre o uso de microalgas em água produzida de fontes convencionais têm mostrado resultados promissores, com pesquisas que analisaram a taxa de produtividade de biomassa e lipídios, assim como a eficiência do tratamento desses efluentes, como mostrado na Tabela 1. Além disso, fontes não convencionais de AP (gás de xisto e metano de camada de carvão) também foram investigadas. Nessas pesquisas, avaliou-se a produção de biomassa, a geração de bioprodutos e o acúmulo de lipídios (Godfrey, 2012; Wood, et al., 2015). Esses estudos demonstram que é possível cultivar microalgas com sucesso em água produzida, aproveitando seu potencial tanto para remediação ambiental quanto para a produção de biocompostos.

Em resumo, as microalgas representam uma alternativa eficaz e sustentável para o tratamento de águas residuais da indústria de petróleo, não só contribui para a remediação ambiental, mas também oferece uma oportunidade para a produção de biocompostos de alto valor agregado, com vantagens significativas em termos de sustentabilidade e custo-benefício em comparação com métodos tradicionais de tratamento de efluentes.

Tabela 1. Trabalhos publicados com tratamentos de água produzida com microalgas.

| AUTOR                           | MICROALGA   | MEIO DE CULTIVO   | RESULTADOS  |
|---------------------------------|---|---|---|
| Neal, et al., (2012)            | <i>Nannochloropsis salina</i>   | AP tratada com meio sintético   | A microalga consegue crescer na água produzida.   |
| Godfrey, et al., (2012)         | <i>Amphora coffeaformis</i> ,<br><i>Chaetoceros gracilis</i> e<br><i>Phaeodactylum tricornutum</i>                      | AP tratada e suplementada com nutrientes  | Aumento de 36% na biomassa e 16% da produtividade lipídica.   |
| Ariada, et al., (2014)          | <i>Nannochloropsis oculata</i>  | 0, 50 e 100% de AP em meio sintético.   | Aumento de 175% na taxa de crescimento na concentração de 50% de AP   |
| Wood, et al., (2015)            | <i>Nodosilinea sp.</i> ,<br><i>Plectonema terebrans</i> ,<br><i>Leptolyngbya sp.</i> e<br><i>Oscillatoria acuminata</i> | AP suplementada com nutrientes  | Rendimento de 4,8 g/m <sup>2</sup> de produtividade de biomassa e 19,6 g/m <sup>2</sup> de taxa de crescimento. |
| Ranjbar, et a., (2015)          | <i>Dunaliella salina</i>  | AP esterilizada com suplementação de nitrogênio e fósforo.  | Aumento na produção de lipídios de 35,1 e 62,1%.  |
| Tabeli, et a., (2016)           | <i>Dunaliella salina</i>  | Proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 de AP e água do mar.   | Aumento de 120, 65 e 263% de biomassa, lipídios e produtividade lipídica, respectivamente.                      |
| Ammar, et a., (2018)            | <i>Nannochloropsis oculata</i> e<br><i>Isochrysis galbana</i>   | 0, 10, 25, 50 e 100% de AP em meio sintético.   | Aumento de 19% na taxa de crescimento de <i>N. oculata</i> .  |
| Das, et a., (2019)              | <i>Chlorella sp.</i>  | AP pré tratada com 4 g/L de salinidade.   | Aumento de 30,3% na produção de biomassa.   |
| Calderón-delgado, et a., (2019) | <i>Chlorella vulgaris</i>   | 0, 25, 50, 75 e 100% de AP em meio sintético.   | 16 e 22% de aumento na densidade celular, nas concentrações de 25 e 100% de água produzida.                     |
| Hopkins, et a., (2019)          | <i>Cyanobacterium aponinum</i> e<br><i>Parachlorella kessleri</i>   | AP com diferentes salinidades (15, 30, 60, 75, 90, 105, 120 e 150 g/L de Cloreto de sódio) e nitrogênio (13, 30, 50 e 70 mg NH <sub>4</sub> -N/L) | Aumento de 48% no conteúdo lipídico nas concentrações de amônio e sais, 12 mg/L/d e 60 g/L, respectivamente.    |
| Hopkins, et a., (2019)          | <i>Dunaliella tertiolecta</i>   | AP em diferentes salinidades (30, 60, 120, 180 e 210 g TDS/L), suplementado com bicarbonato de sódio, nitrato e fosfato.                          | Produtividade de biomassa aumentou 226%, nas concentrações de 30, 60 e 120 g TDS/L.                             |
| Parsy, et a., (2020)            | <i>Nannochloropsis oculata</i>  | AP nas concentrações de 10, 20 e 30%, digestato líquido e meio sintético  | Aumento de 60 e 100,3% na taxa de crescimento e biomassa, respectivamente.                                      |

|                         |  |  |  |
|-------------------------|--|--|--|
| Rahman, et al., (2021)  | <i>Galdieria sulphuraria</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> | AP nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 50 e 100%. | <i>Galdieria sulphuraria</i> aumentou 53 e 199% na taxa de crescimento e biomassa, na concentração de 20% de AP. |
| Marques, et al., (2021) | <i>Nannochloropsis oculata</i>                           | AP nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100%.    | Aumento de lipídios de 40,4%, no tratamento com 25% de AP.   |

O texto apresenta os seguintes pontos de destaques:

- As microalgas são potencialmente ajustáveis para a remediação de água produzida da indústria do petróleo que possui carga orgânica geralmente baixa, devido à sua capacidade de fixar CO<sub>2</sub> e remover nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P).
- Durante o seu crescimento as microalgas estimulam a remoção de poluentes ao mesmo tempo que produzem biocompostos de interesse industrial, como carotenoides e lipídeos.
- Estudos comprovam que as microalgas são eficazes no tratamento de várias águas residuais, como esgoto doméstico, efluentes de biodigestores, vinhaça de cana-de-açúcar e resíduos da suinocultura.
- Pesquisas têm demonstrado a possibilidade de cultivar microalgas com sucesso em água produzida, demonstrando benefícios tanto ambientais quanto econômicos.
- O potencial uso da *Dunaliella Salina* como agente no tratamento de AP é promissor uma vez que esta microalga pode crescer em alta salinidade e produzir biocompostos de alto valor.

#### 2.4.2. Efeitos de Estímulos Luminosos no Cultivo de Microalgas

Em microrganismos fotossintetizantes o estímulo luminoso afeta diretamente a capacidade de realizar a fotossíntese e, conseqüentemente, seu crescimento e desenvolvimento (Teo, et al., 2014). Considerando a composição dos pigmentos nos complexos coletores de luz, responsáveis captação dos fótons, o comprimento de onda luminoso que estimula o seu crescimento será absorvido na faixa de Radiação Fotossintética Ativa (PAR) entre 400 e 700 nm (Thimijan & Hains, 1983; Keeling, 2013). O LED (Diodo Emissor de Luz) são fontes de luz artificial mais baratas e pode apresentar comprimento de ondas moduláveis ou específico. Essa característica é importante para

estabelecer os ótimos parâmetros de crescimento da microalga, principalmente ao aplicar estímulos luminosos específicos, como o LED.

O texto destaca que:

- A Radiação Fotossintética Ativa (RFA) para microalgas encontra-se entre 400 e 700 nm. No entanto, o comprimento de onda ótimo é caso específico e demanda testes práticos.
- O LED são fontes de luz artificial mais baratas e pode apresentar comprimento de ondas moduláveis ou específico.

#### **2.4.2.1. Efeitos luminosos positivos**

A otimização dos comprimentos de onda da luz pode ter efeitos significativos na fotossíntese das microalgas, promovendo maior crescimento e produção de biomassa, além de aumentar a produção de compostos específicos desejados para aplicações industriais e biotecnológicas. Diferentes comprimentos de onda têm efeitos variados na eficiência fotossintética das microalgas. A luz azul, por exemplo, é altamente eficaz na promoção do crescimento vegetativo das microalgas, pois é absorvida fortemente pela clorofila  $\alpha$  e  $\beta$ , principais pigmentos fotossintéticos. A luz vermelha também é bem absorvida pela clorofila e é altamente eficiente na condução de processos fotossintéticos, podendo aumentar a taxa de produção de oxigênio e a eficiência de uso de luz.

Além disso, microalgas podem produzir ficoeritrina e ficocianina (algas vermelhas e cianobactérias), pigmentos acessórios, que corresponde aos comprimentos de onda da luz vermelha e verde aumentando a eficiência da fotossíntese. Em condições de baixa intensidade de luz, a conversão de energia luminosa em química é diretamente proporcional à intensidade de luz, até atingir o ponto de saturação luminosa, onde o microrganismo perde a eficiência de captação energética da luz (Masojídek, et al., 2013). A taxa máxima de fotossíntese e a capacidade de absorção de luz são específicas para cada organismo fotossintético e refletem a eficiência de conversão da energia luminosa em energia química, o que influencia na resposta metabólica da microalga (Kwan, et al., 2021). Schulze, et al., (2016), cultivaram *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis chuii* sob diferentes comprimentos de onda e observaram que a *N. oculata* obteve maior rendimento de biomassa sob LED azul (465 nm) comparado com LED vermelho (660 nm) enquanto *T. chuii* teve maior rendimento de peso seco sem cinzas sob LED vermelho (660 nm) comparado com LED azul (465nm). Eles também relataram que, em todos os comprimentos de onda analisados, a *N. oculata* não apresentou fase lag no crescimento,

enquanto *T. chuii* mostrou uma fase lag de aproximadamente 24h (Tabela 2). Portanto, para obter os efeitos positivos esperados, é necessário delimitar os pontos de maior eficiência e saturação fotossintética do microrganismo.

Os pontos de destaque do texto listam:

- A otimização do uso de diferentes comprimentos de onda da luz tem um impacto significativo na fotossíntese das microalgas podendo promover maior crescimento e produção de biomassa.
- Os comprimentos de luz na faixa azul e vermelha são geralmente os mais utilizados para estimular a atividade fotossintética e o crescimento celular.

#### **2.4.2.2. Efeito Luminosos Negativos**

Dependendo da intensidade, a energia fotossintética do LED azul é mais alta do que a necessária para a taxa fotossintética microalgal, resultando em fotoinibição e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esses efeitos em cascata induzem a alga a acumular pigmentos fotoprotetores e atividades enzimáticas de enzimas oxi-redutoras (Schulze, et al., 2014; De Almeida Moreira, et al., 2021). Jin, et al., (2021), analisaram o crescimento e a produção de bioprodutos, como biomassa e lipídios, sob diferentes fontes luminosas e relataram que a *D. salina* sob LED azul monocromática não demonstrou aumento significativo no crescimento, porém aumentou o conteúdo de lipídios. Em contraste, o LED vermelho demonstrou os piores resultados no acúmulo de biomassa e biocomponentes (Tabela 2).

O texto destaca que:

- O uso de diferentes comprimentos de onda luminosa para o crescimento de microalgas pode resultar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).
- As microalgas podem possuir mecanismos de defesa ao ERRO como o aumento do acúmulo de pigmentos fotoprotetores e enzimas de poder oxi-redutor.

#### **2.4.2.3. Limitações e Perspectivas Futuras para o Uso do Estímulo Luminoso**

É importante considerar as características específicas de cada espécie e de cada produto de interesse ao selecionar a intensidade luminosa e o comprimento de onda ideal. Portanto, a aplicação de estímulos luminosos controlados, como os provenientes de diodos emissores de luz, não apenas permite regular a intensidade luminosa, mas também oferece a capacidade de ajustar o comprimento de onda de luz no cultivo, maximizando

assim a otimização do cultivo microalgal. A Tabela 2 resume os artigos encontrados relacionados ao processo de fotomodulação, ou seja, uso de diferentes ondas luminosas para estimular o cultivo de microalgas.

Tabela 2. Trabalhos publicados com estímulos luminosos em microalgas.

| AUTOR                           | MICROALGA  | CUMPRIMENTO DE LUZ   | RESULTADO  |
|---------------------------------|--|--|--|
| Song, et al., (2024)            | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 2.000 Lux   | Aumento de 46% no acúmulo de carotenóides.   |
| Tran-Nguyen, et al., (2023)     | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 40,5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                        | Densidade e taxa de crescimento celular, e rendimento de produção de $\beta$ -caroteno foram 54, 80 e 63%, respectivamente.           |
| Lan, et al., (2022)             | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 80 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                          | Aumento nos carotenóides totais, $\beta$ -caroteno e $\beta$ -criptoxantina de 43, 60 e 20%, respectivamente.                          |
| Jin, et al., (2021)             | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho e azul 81,64 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                | Produtividade lipídica e biomassa aumentou 35,33%, 13,34%, respectivamente.  |
| Sui, et al., (2021)             | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 400 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                         | Biomassa aumentou 95%.   |
| Sofiana, et al., (2021)         | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 3500-4000 lux   | $\beta$ -caroteno foi 101% maior que LED azul.   |
| Mirzaie, et al., (2021)         | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho e azul intermitente com 56 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  | Taxa de crescimento e biomassa aumentaram 177 e 88%, respectivamente.  |
| Sui, et al., (2021)             | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                         | Aumento de 9-cis- $\beta$ -caroteno produzido foi 38%.   |
| Moslemipetroudi, et al., (2021) | <i>Dunaliella salina</i>   | LED branco, azul, vermelho e amarelo 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Aumento de $\beta$ -caroteno de 72%.   |
| Li, et al., (2020)              | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                          | Aumento de carotenóides totais de 7%.  |
| Li, et al., (2020)              | <i>Dunaliella salina</i>   | LED azul 80 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                              | Aumento na taxa de crescimento específico de 8,5%.   |
| Bredda, et al., (2020)          | <i>Dunaliella salina</i>   | LED azul e verde 30 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                      | Aumento na produtividade lipídica de 103%.   |
| Xu, et al., (2019)              | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho 500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                         | Aumento de 21% de carotenóides totais.   |
| Han, et al., (2019)             | <i>Dunaliella salina</i>   | LED vermelho e azul 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                   | Aumento na produção de $\beta$ -caroteno de 19,7%.  |
| Pereira, et al., (2019)         | <i>D. salina</i> e <i>D. tertiolecta</i>   | LED azul 300 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                             | Carotenóides total foi 50% maior que LED vermelho.   |
| Jung, et al., (2019)            | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> e <i>Isochrysis galbana</i> | LED azul e verde 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$                     | Aumento na biomassa e taxa de crescimento em LED azul de 37,5 e 23% respectivamente. Produção de lipídios sob LED verde aumentou 39%. |
| Schulze, et al., (2016)         | <i>Nannochloropsis oculata</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>                                    | LED roxo, azul e vermelho 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$            | 24% de aumento em média na produtividade de biomassa nas LED's dicromáticas.   |

|                          |  |  |  |
|--------------------------|--|--|--|
| Gorai, et al., (2014)    | <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>C. gracilis</i> e <i>Heterocapsa circularisquama</i> | LED azul 60 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$                         | Aumento na taxa de crescimento específico foi 200%.  |
| Teo, et al., (2014)      | <i>Tetraselmis sp.</i> e <i>Nannocloropsis sp.</i>   | LED azul 100 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$                        | Aumento na taxa de crescimento e produção de lipídios foram aproximadamente 3 e 300%, respectivamente. |
| Saavedra, et al., (1996) | <i>Dunaliella bardawil</i>   | LED vermelho 50, 75, 150, 225 e 300 $\mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | Aumentou o conteúdo $\beta$ -caroteno.   |

### 2.4.3. Efeitos Positivos dos Estímulos Elétricos no Cultivo de Microalgas

O movimento de cargas polarizadas resulta numa corrente elétrica, um fenômeno importante com aplicações significativas em diversas áreas, incluindo saúde, no processo de cicatrização, indústria alimentícia, na preservação de alimentos e na separação de microrganismos (Laughton, et al., 2013; Mahnič-kalamiza, et al., 2014; Sahm, et al., 2022). Alguns dos efeitos dessa corrente elétrica em níveis celular e tecidual são explorados para várias finalidades, utilizando diferentes técnicas eletrofísicas.

As correntes elétricas que geram o campo elétrico podem ser divididas em dois tipos: a corrente elétrica contínua (CC), que é definida pelo fluxo de cargas elétricas em uma única direção, e a corrente elétrica alternada (CA), que envolve a movimentação bidirecional de cargas elétricas, mudando de sentido em intervalos de tempo (Laughton, et al., 2013). No caso da corrente elétrica alternada, em que há uma constante variação de movimentos oscilatórios, ocorre uma alteração no fluxo de cargas elétricas dentro das células, contribuindo para diversos efeitos celulares.

O estímulo elétrico tem o potencial de melhorar significativamente o crescimento e a produtividade das microalgas, oferecendo uma técnica promissora para otimizar cultivos em escala laboratorial e industrial (Tabela 3). O estímulo elétrico pode aumentar a permeabilidade das membranas celulares nas microalgas, facilitando a absorção de nutrientes essenciais para seu crescimento (Zimmermann, et al., 1982). Pode também melhorar a eficácia da fotossíntese, resultando em maior produção de biomassa devido a uma melhor distribuição de elétrons nos processos fotossintéticos (Kim, et al., 2018).

O estímulo com corrente elétrica alternada, por exemplo, induz o movimento rotacional de células em suspensão alterando mecanismos de absorção de nutrientes e de luz (Holzapfel, et al., 1982; Posudin, et al., 2010). A corrente elétrica alternada também

é utilizada em outras técnicas, como eletroporação ou permeabilidade celular, que consiste na aplicação de campo elétricos de curta e longa duração, e variada intensidade, visando aumentar temporariamente a permeabilidade das membranas celulares (Palti, et al., 1969). Na membrana celular, este processo promove a formação de poros reversíveis ou irreversíveis, dependendo da intensidade elétrica utilizada. (Zimmermann, et al., 1982; Zhan, et al, 2012; Geada, et al., 2018). A eletropermeabilização é particularmente interessante devido aos seus diversos mecanismos de ação nas células. Durante o processo de eletropermeabilização, estimulado pela corrente elétrica, as vias metabólicas da célula podem ser afetadas de várias maneiras (Posudin, et al., 2010).

Um exemplo de alteração de vias metabólicas acontece intermediado pelo átomo de cálcio no ciclo de Calvin-Benson-Bassham. Na fase escura da fotossíntese, a atividade da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RubisCo), responsável pela fixação de carbono, o cálcio exerce o papel de componente estrutural para estabilização da molécula (Hochmal, et al., 2015). O aumento citoplasmático do cálcio promove a elevação do fluxo cíclico de elétrons (CEF) no fotossistema I, esse aumento favorece formação do gradiente eletroquímico de prótons que induz a ativação da atividade enzimática da ATP sintase na produção de ATP, essa molécula energética será utilizada na síntese de lipídios. Esse processo pode ser afetado durante a estimulação elétrica da microalga (Tabela 3).

#### **2.4.3.2. Efeitos negativos do estímulo elétrico**

Embora a estimulação elétrica possa oferecer muitos benefícios para o cultivo de microalgas, é essencial considerar e mitigar os potenciais efeitos negativos. A pesquisa contínua focada na otimização dos parâmetros de estimulação e no monitoramento dos efeitos adversos pode ajudar a maximizar os benefícios dessa técnica enquanto minimiza os impactos negativos. Intensidades de corrente elétrica muito altas ou mal calibradas podem danificar as membranas celulares das microalgas, levando à lise celular e morte das células. A permeabilização excessiva pode causar um influxo descontrolado de íons e moléculas, prejudicando a homeostase celular e levando à perda de viabilidade celular. O estímulo elétrico também pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios, resultando em estresse celular e possível apoptose. A interferência com as vias metabólicas devido ao estímulo elétrico pode levar a um desequilíbrio metabólico, afetando negativamente o crescimento e a formação de metabólitos essenciais.

A diferença de potencial gerada pela corrente na membrana da célula promove o influxo de moléculas essenciais para as vias metabólicas, influenciando na disponibilidade de substratos metabólicos e modulando a atividade de enzimas e proteínas envolvidas nesses processos. Essa alteração pode resultar em mudanças nas vias metabólicas, sinalização celular e na regulação do transporte de íons e moléculas (Blank, 1987; Tsong, et al., 1989; Semenov, et al., 2013).

#### **2.4.3.3. Limitações e perspectivas futuras para o uso do estímulo elétrico**

O estímulo elétrico através de corrente alternada ou contínua, mostra-se uma metodologia promissora na otimização no processo de produção de biomassa e lipídios em microalgas. A capacidade de influenciar vias metabólicas e regular a atividade de enzimas e proteínas de forma positiva, coloca a corrente alternada como uma ferramenta potencializadora do crescimento de microalgas (Tabela.3). Porém, visto que os efeitos metabólicos são diversos, é necessário definir o tratamento elétrico ideal para cada microrganismo, que resulte nos melhores parâmetros de crescimento.

## **2.5. CONCLUSÃO**

Neste capítulo, foi revisado o uso de microalgas para tratamento do efluente industrial petrolífero e para a produção de biocompostos de alto valor agregado, com foco em *Dunaliella salina*. A revisão demonstrou que estímulos externos, como luz de diferentes comprimentos de onda e aplicação de campos elétricos, têm potencial para otimizar o cultivo de microalgas, promovendo maior produtividade e eficiência na síntese de bioprodutos de interesse industrial.

As características complexas da água produzida representam desafios significativos para métodos tradicionais de tratamento, mas também oferecem uma oportunidade única para explorar o uso de microalgas devido à presença de nutrientes essenciais. Os estudos destacados mostraram que ajustes precisos nas condições de cultivo podem maximizar o potencial de *Dunaliella salina*, mesmo em ambientes adversos.

Portanto, a aplicação de estímulos elétricos e luminosos no cultivo de *Dunaliella salina* emerge como uma abordagem inovadora e promissora, não apenas para reduzir impactos ambientais da água produzida, mas também para impulsionar a economia de bioprocessos sustentáveis. Os avanços discutidos neste capítulo fundamentam as

hipóteses e as estratégias experimentais que serão exploradas nos capítulos subsequentes desta tese.

Tabela 3. Trabalhos publicados com estímulos elétricos em microalgas.

| AUTOR                         | CORRENTE                                    | VOLTAGEM   | APLICAÇÃO  | RESULTADOS  |
|-------------------------------|---|--|--|---|
| He, et al., (2024)            | 1,0 A/m <sup>2</sup> e 2,0 A/m <sup>2</sup> |  | Estímulo no cultivo  | Aumentos de 58% de clorofila a, 34% de D.O., 62% de biomassa, 5% de lipídios, 100 e 78,45% remoção de TP e TN, respectivamente.             |
| Li, et al., (2024)            | 3 mA  |  | Estímulo no cultivo  | Aumentos de 61,25% de biomassa, 53,12% de teor de lipídios, 39,11% produção de lipídios, 50,58% de clorofila -a, em comparação ao controle. |
| Shi, et al., (2022)           |   | 0,5; 1,0 e 1,3 V                                   | Estímulo no cultivo  | Aumento de 47% biomassa, 50% de lipídios, comparado ao controle.  |
| He, et al., (2022)            | 0,5; 1; 2; e 4 A/m <sup>2</sup>             |  | Estímulo no cultivo  | Aumentos de 1,0 A/m <sup>2</sup> : BG11 - 32% biomassa, 30,1% lipídios; 2,0 A/m <sup>2</sup> : Efluente – 30,1% biomassa e 23,5% lipídios.  |
| Cheng, et al., (2022)         | 20; 350 mA                                  | 0,005; 0,5 e 1V                                    | Estímulo no cultivo  | 0,005 V: 32,09% biomassa, comparado ao controle.  |
| Kim, et al., (2021)           | 5, 10, 20 e 50 mA                           |  | Estímulo no cultivo  | 10 mA: 145% de paramilon.   |
| Fitriana, et al., (2021)      | 3mA (2V), 30mA (4V), 81mA (6V)              | Corrente catódica 2V<br>Corrente anódica 2, 4 e 6V | Câmara bioeletroquímica  | Aumento em 30mA, 4V: de 36,9% de astaxantina.   |
| Haberkorn, et al., (2021)     |   | 5; 10; 15 e 20kVcm <sup>-1</sup>                   | Câmara de tratamento   | Aumento de 50% de biomassa, comparado ao controle.  |
| Corpuz, et al., (2021)        | 0,5mA                                       |  | Eletrobiorreatore de membrana                                    | Aumento de 43,89 e 65,60% remoção de nitrogênio e fósforo, respectivamente, comparado ao controle.  |
| Bai, et al., (2020)           |   | 40kV cm <sup>-1</sup> = 8kV                        | Câmara de tratamento   | Aumento de 80% de astaxantina.  |
| Buchmann, et al., (2019)      |   | 10 kV cm <sup>-1</sup>                             | Câmara de tratamento   | Aumento de 13,1% de biomassa, 18,8% de aloficocianina, 19,5% de C-ficocianina.  |
| Sun, et al., (2019)           | 0, 0.2, 0.4, 0.6 e 0.8 A/m <sup>2</sup>     |  | Câmara de tratamento   | Aumento de 27.7% de teor de lipídios, 13% de biomassa, comparado ao controle.   |
| Choi, et al., (2019)          | 3; 31,3; 80,7 e 126,7 mA                    | 2; 4 (31mA); 6 (81mA) e 8 (127mA) V                | Reator eletroquímico   | Aumento de 209% de Triacilglicerol (TAG), comparado ao controle.  |
| Haberkorn, et al., (2019)     |   | 4 e 10 kV de 10 e 25 kV cm <sup>-1</sup>           | Câmara de tratamento   | umentando a biomassa em 17,53%.   |
| Kim, et al., (2018)           | 0; 60; 100 e 120mA                          | 0; 15; 25 e 30V                                    | Estímulo no cultivo  | Aumento de 20% densidade celular, 25% de clorofila a e 10% de astaxantina, em comparação ao controle.                                       |
| Bai, et al., (2017)           |   | 8kV = 40kVcm <sup>-1</sup>                         | Câmara de tratamento   | Investigou a resposta da microalga, sem dados de crescimento.   |
| Nezammahalleh, et al., (2016) |   | 2kV = 2,77kVcm <sup>-1</sup>                       | Campo elétrico, medição de condutividade no meio após o estímulo | 51% maior de mi, 21% de lipídios e 89% de clorofila, comparado ao controle.   |
| La, et al., (2016)            |   | 10 kV no ar  | Corrente aplicada no meio  | 46,8% de biomassa, 30,5% lipídios e 28,8% de produtividade lipídica   |
| Gusbeth, et al., (2013)       |   | 40 kV/cm; 30 min                                   | Cubeta   | 10-20% de biomassa.   |

## 2.6. REFERÊNCIAS

- Al-Ghouti, M. A., Al-Kaabi, M. A., Ashfaq, M. Y., & Da'na, D. A. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. *Journal of Water Process Engineering*, v. 28, p. 222-239, (2019).
- Ammar, S. H.; Khadim, H. J.; Mohamed, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 132-142, (2018).
- Arriada, A. A.; Abreu, P. C. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, v. 8, n. 3, (2014).
- Bai, F.; Gusbeth, C.; Frey, W.; Nick, P. "Nanosecond pulsed electric fields trigger cell differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859, 5, 651-661, (2017).
- Bai, F.; Gusbeth, C.; Frey, W.; Nick, P. "Nanosecond pulsed electric fields modulate the expression of the astaxanthin biosynthesis genes *psy*, *crtR-b* and *bkt 1* in *Haematococcus pluvialis*." *Scientific reports* 10, 1, 15508, (2020).
- Blank, M. "The surface compartment model: a theory of ion transport focused on ionic processes in the electrical double layers at membrane protein surfaces." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 906, no. 2, p. 277-294, (1987).
- Bredda, E. H., Da Silva, A. F., Silva, M. B., & Da Rós, P. C. M. Mixture design as a potential tool in modeling the effect of light wavelength on *Dunaliella salina* cultivation: an alternative solution to increase microalgae lipid productivity for biodiesel production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(4), 379-389, (2020).
- Buchmann, L.; Frey, W.; Gusbeth, C.; Ravaynia, P. S.; Mathys, A. "Effect of nanosecond pulsed electric field treatment on cell proliferation of microalgae." *Bioresource technology*, 271, 402-408, (2019).
- Cabanelas, I.T.D.; Arbib, Z.; Chinalia, F.A.; Souza, C.O.; Perales, J.A.; Almeida, P.F.; Druzian, J.I.; Nascimento, I.A. From waste to energy: microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy*, v. 109, p. 283-290, (2013).
- Calderón-Delgado, I C.; Mora-Solarte, D. A.; Velasco-Santamaría, Y. M. "Physiological and enzymatic responses of *Chlorella vulgaris* exposed to produced water and its potential for bioremediation." *Environmental monitoring and assessment* 191, no. 6, 399, (2019).
- Chen, H.; Jiang, J. G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology*, v. 219, n. 2, p. 251-258, (2009).
- Cheng, J.; Xin, K.; Wang, Z.; Zhu, Y.; Xia, R.; Yang, W., & Liu, J. Improving biomass growth of *Nannochloropsis oceanica* with electrical treatment. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, v. 58, p.101923, (2022).
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. v. 25, p. 294–306, (2007).

- Choi, S. A.; Lee, S. Y.; Lee, J.; Cho, J. M.; Lee, J. S.; Kim, S. W.; Kim, D. Y.; Park, S. K.; Jin, C. S.; Oh, Y. K. Rapid induction of edible lipids in *Chlorella* by mild electric stimulation. *Bioresource technology*, 292, 121950, (2019).
- Conceição, G. R.; Xavier, L. M.; Matos, J. B.; De Almeida, P. F.; De Moura-Costa, L. F.; E Chinalia, F. A. Glucose and Nitrogen Amendments Can Mitigate Wastewater-Borne Bacteria Competition Effect Against Algal Growth in Wastewater-Based Systems. *Journal of phycology*, v. 55, n. 5, p. 1050-1058, (2019).
- Conceição, G.R.; Silva, C.S.; Vale, T.O.; Santos, J.N.; Matos, J.B.L.; Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, (2023).
- Corpuz, M. V. A.; Borea, L.; Senatore, V.; Castrogiovanni, F.; Buonerba, A.; Oliva, G.; Ballesteros, F. Jr.; Zarra, T.; Belgiorno, V.; Choo, K. H., E Hasan, S.W. Wastewater treatment and fouling control in an electro algae-activated sludge membrane bioreactor. *Science of the total environment*, 786, 147475 (2021).
- Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Chaudhary, A. K., Alghasal, G., & Al-Jabri, H. M. S. Microalgal bioremediation of petroleum-derived low salinity and low pH produced water. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 1, p. 435- 444, (2019).
- de Almeida Moreira, B. R., Frias, Y. A., de Lima, E. W., Cruz, V. H., Lopes, P. R. M., & da Silva Viana, R. Algae-specific colorful LEDs: Biotechnological drivers to biorefinery and photobiological platforms. *Journal of Cleaner Production*, v. 316, p. 128350, (2021).
- Fakhru'l-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L. C., Biak, D. R. A., Madaeni, S. S., E Abidin, Z. Z. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of hazardous materials*, v. 170, n. 2-3, p. 530-551, (2009).
- Fitriana, H. N.; Lee, S. Y.; Choi, S. A.; Lee, J. Y.; Kim, B. L.; Lee, J. S.; Oh, Y. K. "Electric stimulation of astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*." *Applied Sciences* 11, 8, 3348, (2021).
- FUTURE MARKET INSIGHTS. Microalgae Market Outlook (2023 to 2033), Food and Beverage, 2022. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/microalgae-market>. Acesso em: 10 out. (2023).
- Geadá, P.; Rodrigues, R.; Loureiro, L.; Pereira, R.; Fernandes, B.; Teixeira, J. A.; Vasconcelos, V.; Vicente, A. A. "Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology—Applications, techniques and future trends." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n. 94, p. 656-668, (2018).
- Godfrey, V. *Production of biodiesel from oleaginous organisms using underutilized wastewaters*. 2012. 87 f. Dissertation (Master in Chemistry and Biochemistry) – Utah State University, Logan, 2012. Disponível em: <https://digitalcommons.usu.edu/etd/1337/>.
- Gorai, T.; Katayama, T.; Obata, M.; Murata, A.; Taguchi, S. Low blue light enhances growth rate, light absorption, and photosynthetic characteristics of four marine phytoplankton species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 459, 87-95, (2014).
- Graham, E. J. S.; Dean, C. A.; Yoshida, T. M.; Twary, S. N.; Teshima, M.; Alvarez, M. A.; Zidenga, T.; Heikoop, J. M.; Perkins, G.B.; Rahn, T. A.; Wagner, G. L. Oil and gas

produced water as a growth medium for microalgae cultivation: A review and feasibility analysis. *Algal research*, v. 24, p. 492-504, (2017).

Guerra, K.; Dahm, K.; Dundorf, S. Oil and gas produced water management and beneficial use in the Western United States. US Department of the Interior, Bureau of Reclamation, (2011).

Gusbeth, C. A.; Eing, C.; Göttel, M.; Frey, W. Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment. In 2013 Abstracts IEEE international conference on plasma science (ICOPS) (pp. 1-1), (2013). IEEE.

Guterman, H.; Vonshak, A.; Ben-Yaakov, S. A macro model for outdoor algal mass production. *Biotechnology & Bioengineering*. v. 35, p. 809-819, (1990).

Haberkorn, I., Buchmann, L., Hiestand, M., & Mathys, A. "Continuous nanosecond pulsed electric field treatments foster the upstream performance of *Chlorella vulgaris*-based biorefinery concepts." *Bioresource technology*, 293, 122029, (2019).

Haberkorn, I., Buchmann, L., Hiestand, M., & Mathys, A. "Nanosecond pulsed electric field processing of microalgae based biorefineries governs growth promotion or selective inactivation based on underlying microbial ecosystems." *Bioresource technology*, 319, 124173, (2021).

Han, S. I.; Kim, S.; Lee, C.; Choi, Y. E. Blue-Red LED wavelength shifting strategy for enhancing beta-carotene production from halotolerant microalga, *Dunaliella salina*. *Journal of microbiology*, 57, 101-106, (2019).

He, Z.; Jin, W.; Zhou, X.; Han, W.; Gao, S.; Chen, C.; Chen, Y.; Yin, S.; Jiang, G. Enhancing biomass and lipid yield of microalga *Scenedesmus obliquus* by the periodic direct current. *Journal of Water Process Engineering*, v. 48, p. 102872, (2022).

He, Z.; Jin, W.; Zhou, X.; Sun, J. Improving microalgal growth and nitrogen, and phosphorus removal by electric field in municipal wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*, 188, 549-558, (2024).

Hochmal, A. K.; Schulze, S.; Trompelt, K.; Hippler, M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1847, n. 9, p. 993-1003, (2015).

Holzapfel, C.; Vienken, J.; Zimmermann, U. "Rotation of cells in an alternating electric field theory and experimental proof." *The Journal of membrane biology*, v. 67, p. 13-26, (1982).

Hopkins, T. C.; Graham, E. J. S.; Schwilling, J.; Ingram, S.; Gómez, S. M.; Schuler, A. J. Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. *Algal Research*, 38, 101406, (2019).

Hopkins, T. C.; Sullivan Graham, E. J.; Schuler, A. J. Biomass and lipid productivity of *Dunaliella tertiolecta* in a produced water-based medium over a range of salinities. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3349-3358, (2019).

Hosseini Tafreshi, A.; Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14-35, (2009).

- Jain, P.; Sharma, M.; Dureja, P.; Sarma, P. M.; Lal, B. Bioelectrochemical approaches for removal of sulfate, hydrocarbon and salinity from produced water. *Chemosphere*, v. 166, p. 96-108, (2017).
- Jin, C.; Yu, B.; Qian, S.; Liu, Q.; Zhou, X. Impact of combined monochromatic light on the biocomponent productivity of *Dunaliella salina*. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v. 13, n. 2, (2021).
- Jung, J. H.; Sirisuk, P.; Ra, C. H.; Kim, J. M.; Jeong, G. T., & Kim, S. K. Effects of green LED light and three stresses on biomass and lipid accumulation with two-phase culture of microalgae. *Process Biochemistry*, 77, 93-99, (2019).
- Keeling, P. J. "The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution." *Annual review of plant biology*, v. 64, p. 583-607, (2013).
- Kim, J. Y.; Lee, C.; Jeon, M. S.; Park, J.; Choi, Y. E. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresource technology*, 268, 815-819, (2018).
- Kim, J. Y.; Oh, J. J.; Kim, D. H.; Kim, H. S.; Lee, C.; Park, J.; Choi, Y. E. Application of electrical treatment on *Euglena gracilis* for increasing paramylon production. *Applied microbiology and biotechnology*, 105, 1031-1039, (2021).
- Kwan, P. P.; Banerjee, S.; Shariff, M.; Md. Yusoff, F. Influence of light on biomass and lipid production in microalgae cultivation. *Aquaculture Research*, v. 52, n. 4, p. 1337-1347, 2021.
- La, H. J.; Choi, G. G.; Cho, C.; Seo, S. H.; Srivastava, A.; Jo, B. H.; Lee, J. Y.; Jin, Y. S.; Oh, H. M. Increased lipid productivity of *Acutodesmus dimorphus* using optimized pulsed electric field. *Journal of applied phycology* 28, 931-938 (2016).
- Lan, Y.; Song, Y.; Guo, Y.; Qiao, D.; Cao, Y.; Xu, H. DsLCYB Directionally Modulated  $\beta$ -Carotene of the Green Alga *Dunaliella salina* under Red Light Stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 12, 1622, (2022).
- Laughton, M. A.; Say, M. G. (Ed.). *Electrical engineer's reference book*. Elsevier, (2013).
- Li, Y.; Cai, X.; Gu, W.; Wang, G. Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* under red and blue light. *Journal of Oceanology and Limnology*, 38(1), 177-185, (2020).
- Li, Y.; Li, L.; Liu, J.; Qin, R. Light absorption and growth response of *Dunaliella* under different light qualities. *Journal of applied phycology*, 32, 1041-1052, (2020).
- Li, H.; Sun, X.; Sun, Y.; Ye, L.; Xue, H.; Gao, F.; Yang, Y. Enhancing lipid production in *Chlorella* under successive stresses of periodic micro-current and salinity: Performance and contribution. *Chemical Engineering Journal*, 486, 150409, (2024).
- Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavčič, D. Electroporation in food processing and biorefinery. *The Journal of membrane biology*, v. 247, p. 1279-1304, (2014).
- Marques, S.S.I.; Nascimento, I.A.; De Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. *Applied Biochemical and Biotechnology*. v. 171(8), p. 1933-1943, (2013).
- Marques, I. M.; Oliveira, A. C. V.; De Oliveira, O. M. C.; Sales, E. A.; Moreira, Í. T. A. A photobioreactor using *Nannochloropsis oculata* marine microalgae for removal of

polycyclic aromatic hydrocarbons and sorption of metals in produced water. *Chemosphere*, 281, 130775, (2021).

Masojídek, J.; Torzillo, G.; Koblížek, M. Photosynthesis in microalgae. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, p. 21-36, (2013).

Mendes, L.B.B.; Cunha, P.C.R.; D'oca, M.G.M.; Abreu, P.C.; Primel, E.G. Method for Removing Pollutants from Produced Water. U.S. Patent US 7,955,505, 7 June (2011).

Mirzaie, M. M.; Lak, Z. J.; Meybodi, F. H. A new shifting strategy in flashing light based on the cell growth curve to enhance  $\beta$ -carotene biosynthesis in *Dunaliella salina*. *Current Microbiology*, 78(7), 2733-2740, (2021).

Moslemipetroudi, M.; Pajoum Shariati, F.; Delavari Amrei, H.; Heydarinasab, A. The effect of different light spectra on beta-carotene production by *Dunaliella salina*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 40(6), 2079-2086, (2021).

Motta, A. R. P. D.; Borges, C. P.; Kiperstok, A.; Esquerre, K. P.; Araujo, P. M.; Branco, L. D. P. N. Tratamento de água produzida de petróleo para remoção de óleo por processos de separação por membranas: revisão. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, n. 1, p. 15-26, (2013).

Neff, J. M. Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water. Elsevier, (2002).

Nezammahalleh, H.; Ghanati, F.; Adams Ii, T. A.; Nosrati, M.; Shojaosadati, S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, v. 218, p. 700-711, (2016).

OSPAR Commission. Report Assessment of the Discharges, Spills and Emissions to Air on the Norwegian Continental Shelf, 2009-2013, 2015.

Palti, Y.; Adelman, W. J. Measurement of axonal membrane conductances and capacity by means of a varying potential control voltage clamp. *The Journal of membrane biology*, v. 1, p. 431-458, (1969).

Parsy, A.; Sambusiti, C.; Baldoni-Andrey, P.; Elan, T.; Périé, F. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* in saline oil & gas wastewater supplemented with anaerobic digestion effluent as nutrient source. *Algal Research*, 50, 101966, (2020).

Pereira, S.; Otero, A. Effect of light quality on carotenogenic and non-carotenogenic species of the genus *Dunaliella* under nitrogen deficiency. *Algal Research*, v. 44, p. 101725, (2019).

PETROBRÁS. Relatório de sustentabilidade 2023: Relatório anual. Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://sustentabilidade.petrobras.com.br/documents/1449993/82badcb9-71d0-47be-67dc-cbc99aa48a56>. Acesso em: 24 dez. 2024.

Posudin, Y. I.; Massjuk, N. P.; Lilitskaya, G. G.; Posudin, Y. I.; Massjuk, N. P.; Lilitskaya, G.G. Mechanisms of Photoreception and Photoorientation in *Dunaliella*. *Photomovement of Dunaliella* Teod., p. 50-52, (2010).

Rahman, A.; Pan, S.; Houston, C.; Selvaratnam, T. Evaluation of *Galdieria sulphuraria* and *Chlorella vulgaris* for the Bioremediation of Produced Water. *Water*, 13(9), 1183, (2021).

- Ranjbar, S.; Quaranta, J. D.; Tehrani, R.; Van Aken, B. Algae-Based Treatment of Hydraulic Fracturing Produced Water: Metal Removal and Biodiesel Production by the Halophilic Microalgae *Dunaliella salina*. In Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. (2015).
- Rao, A. R.; Dayananda, C.; Sarada, R.; Shamala, T. R.; Ravishankar, G. A. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. Bioresource technology, v. 98, n. 3, p. 560-564, (2007).
- Rodulfo, B. R.; Marmol, N. H. R.; Emralino, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. Phillipp Journal Science, v.109, p. 51-58, (1980).
- Saavedra, M. P. S.; Jiménez, C.; Figueroa, F. L. Variable fluorescence of chlorophyll a in *Dunaliella bardawil* with different b-carotene content. Scientia Marina, v. 60, n. 1, p. 227-231, (1996).
- Sahm, F.; Freiin Grote, V.; Zimmermann, J.; Haack, F.; Uhrmacher, A. M.; Van Rienen, U.; Bader, R.; Destch, R.; Jonitz-Heincke, A. Long-term stimulation with alternating electric fields modulates the differentiation and mineralization of human pre-osteoblasts. Frontiers in Physiology, v. 13, p. 965181, (2022).
- Santana, H.; Cereijo, C.R.; Teles, V.C.; Nascimento, R.C.; Fernandes, M.S.; Brunale, P.; Campanha, R.C.; Soares, I.P.; Silva, F.C.P.; Seixas Sabaini, P.; Siqueira, F.G.; Brasil, B.S.A. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization, Bioresource Technology. v. 228, p. 2133-140, (2016).
- Santos, A. M.; Lamers, P. P.; Janssen, M.; Wijffels, R. H. Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions. Algal Research, v. 2, n. 3, p. 204-211, (2013).
- Schulze, P. S.; Barreira, L. A.; Pereira, H. G.; Perales, J. A.; Varela, J. C. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. Trends in biotechnology, v. 32, n. 8, p. 422-430, (2014).
- Schulze, P. S., Pereira, H. G., Santos, T. F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., ... & Varela, J. C. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. Algal research, v. 16, p. 387-398, 2016.
- Semenov, I.; Xiao, S.; Pakhomov, A. G. Primary pathways of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by nanosecond pulsed electric field. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1828, n. 3, p. 981-989, 2013.
- Sivaramakrishnan, R., Suresh, S., Kanwal, S., Ramadoss, G., Ramprakash, B., & Incharoensakdi, A. Microalgal biorefinery concepts' developments for biofuel and bioproducts: Current perspective and bottlenecks. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 5, p. 2623, 2022.
- Shi, X., Mathew, A. S., Xu, Y., Yau, S. T., & Xu, G. Enhanced growth of microalgae and production of lipids via electrostatically controlled photosynthesis. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 10(35), 11459-11465, (2022).

- Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Ren, Y., Wu, T., & Chen, F. Cost-effective wastewater treatment in a continuous manner by a novel bio-photoelectrolysis cell (BPE) system. *Bioresource technology* 273, 297-304, (2019).
- Stewart, M.; Arnold, K. Produced water treatment field manual. Gulf Professional Publishing, 2011.
- Shannon, M. A. et al. Science and technology for water purification in the coming decades. In: *Nanoscience and technology: a collection of reviews from nature Journals*. p. 337-346, 2010.
- Sofiana, M. S. J., & Helena, S. Optimization of  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella salina* using led and different culture media. *Jurnal Ilmu Kelautan SPERMONDE* 7, no. 1, 36-41, (2021).
- Song, Y., Lan, Y., Li, K., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. Regulation of a novel DsGATA1 from *Dunaliella salina* on the synthesis of carotenoids under red light. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1-12, (2024).
- Sui, Y.; Harvey, P. J. Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina*. *Foods*, v. 10, n. 5, p. 1018, 2021.
- Talebi, A. F., Dastgheib, S. M. M., Tirandaz, H., Ghafari, A., Alaie, E., & Tabatabaei, M. Enhanced algal-based treatment of petroleum produced water and biodiesel production. *RSC advances* 6, no. 52, 47001-47009, (2016).
- Teles, D. R. De S.; Azevedo, E. G. De A.; Santos, C. P. L. dos. Caracterização Isotópica de Águas de Formação Hipersalinas de um Campo de Petróleo da Bacia do Recôncavo, Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica*. São Paulo, v. 28, n. 2, abr. 2010.
- Teo, C. L., Idris, A., Wahidin, S., & Lai, L. W. Effect of different light wavelength on the growth of marine microalgae. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, v. 67, n. 3, p. 97-100, 2014.
- Thimijan, R. W., & Heins, R. D. "Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: a review of procedures for interconversion." *HortScience*, v. 18, n. 6, p. 818-822, 1983.
- Travieso, L.; Benítez, F.; Sánchez, E.; Borja, R.; Martín, A.; Colmenarejo, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. *Ecological Engineering*. v. 28, n. 2, p. 158-165, 2006.
- Tran-Nguyen, Q. A., Tran, T. T. V., & Trinh-Dang, M. "Effects of Light on the Growth and  $\beta$ -carotene Accumulation in the Green Algae *Dunaliella salina*." *Asian Journal of Biology* 18, no. 1 (2023): 1-10.
- Tsong, T. Y., Liu, D. S., Chauvin, F., Gaigalas, A., & Astumian, R. D. Electroconformational coupling (ECC): An electric field induced enzyme oscillation for cellular energy and signal transductions. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 21, n. 3, p. 319-331, 1989.
- Utvik, T. I. R. Composition, characteristics of produced water in the North Sea. In: *produced water workshop, Aberdeen, Scotland*. Vol. 26327, 2003.

Veil, J. A.; Puder, M. G.; Elcock, D. A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane. Argonne National Lab., IL (US), 2004.

Zhang, Y.; Su, H.; Zhong, Y.; Zhang, C.; Shen, Z.; Sang, W.; Yan, G.; Zhou, X. The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products. Water research. v. 46, p. 5509-5516, 2012.

Travieso, L.; Benítez, F.; Sánchez, E.; Borja, R.; Martín, A.; Colmenarejo, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggy waste. Ecological Engineering. v. 28, n. 2, p. 158-165, 2006.

Xu, Yanan; Harvey, Patricia J. Carotenoid production by *Dunaliella salina* under red light. Antioxidants, v. 8, n. 5, p. 123, 2019.

Zimmermann, U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, v. 694, n. 3, p. 227-277, 1982a.

Zimmermann, U., and J. VIENKEN. "Electric field-induced cell-to-cell fusion." The Journal of membrane biology, v. 67, n. 1, p. 165-182, 1982b.

Wells, G. Management of produced water from oil and gas wells. Working Document of the NPC North American Resource Development Study Paper, p. 2-17, (2011).

Williams, J. A. Keys to Bioreactor Selection, CEP Magazine. Google Scholar, 2002, 34-41, (2007).

Wood, J. L., Miller, C. D., Sims, R. C., & Takemoto, J. Y. Biomass and phycocyanin production from cyanobacteria dominated biofilm reactors cultured using oilfield and natural gas extraction produced water. Algal research, v. 11, p. 165-168, 2015.

## CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE OTIMIZAÇÃO DE CRESCIMENTO

### 3.1. INTRODUÇÃO

As microalgas têm se destacado pelo seu potencial no tratamento de efluentes domésticos e industriais (Conceição, et al., 2019; Ammar, et al., 2018; Santana, et al., 2016). Esses resíduos líquidos contêm nutrientes essenciais que favorecem o crescimento das algas, contribuindo assim para a redução dos custos do processo de cultivo. Além disso, o uso de microalgas possibilita a produção de bioprodutos de alto valor agregado, além de um tratamento eficaz das águas residuais, permitindo seu descarte ou reutilização sem causar impactos ao meio ambiente.

A água produzida (AP), por sua vez, é um resíduo gerado durante a extração de petróleo e apresenta propriedades altamente variáveis, que dependem da formação geológica do reservatório. Entre seus principais compostos, destaca-se o cloreto de sódio (NaCl), cuja concentração pode atingir níveis extremamente elevados devido à dissolução de minerais das rochas. Em alguns casos, a salinidade da AP pode ser até 1000 vezes maior que a da água do mar (Stewart, et al., 2011), o que representa um desafio significativo para seu tratamento, especialmente em poços mais antigos.

O gênero *Dunaliella* é composto por microalgas halotolerantes, que possuem a capacidade de sobreviver em ambientes com salinidades variando de 2,92 a 321,44 g/L (Fang, et al., 2017; Hosseini Tafreshi, et al., 2009). Essas microalgas, comumente encontradas em águas marinhas com variações salinas significativas (Khatoon, et al., 2017; Borowitzka, et al., 1988), são particularmente adequadas para estudos envolvendo o tratamento de AP com alto teor salino. Além de sua resistência, *Dunaliella* é também capaz de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono em um crescimento mixotrófico, combinando fotossíntese e heterotrofia. Estudos prévios confirmaram que *Dunaliella salina* e *Dunaliella tertiolecta* conseguem crescer em água produzida e contribuir para a remoção de nutrientes (Ranjbar, et al., 2015; Talebi, et al., 2016).

A otimização do cultivo de *D. salina* em AP depende de parâmetros-chave, como o preparo do inóculo e a aplicação de estímulos que favoreçam o crescimento. O tempo de preparo do inóculo é um fator crítico, pois influencia diretamente a adaptação da microalga às condições de cultivo e, conseqüentemente, o desempenho final do processo. Embora estudos anteriores tenham abordado os efeitos da salinidade, ainda existem

lacunas em relação ao impacto do tempo de incubação do inóculo e sua interação com estímulos físicos no desempenho de *D. salina*.

Assim, este capítulo apresenta os resultados experimentais que avaliam a influência do tempo de preparo do inóculo e da aplicação de corrente elétrica alternada no cultivo de *D. salina* em AP. A escolha dessas variáveis se justifica pelo potencial de otimizar o cultivo de microalgas em efluentes industriais, contribuindo para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e sustentáveis.

## 3.2. OBJETIVO GERAL

Investigar como o tempo de preparo do inóculo e a aplicação de corrente elétrica alternada afetam a produção de biomassa e pigmentos de *Dunaliella salina* em meio à base de água produzida.

### 3.2.1. Objetivos Específicos

- Analisar o impacto do tempo de preparo do inóculo (7 e 14 dias) na taxa de crescimento específico de diferentes cepas de *D. salina*.
- Avaliar a influência da aplicação de correntes elétricas alternadas (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) na produção de biomassa em *D. salina* cultivada em AP.
- Investigar o acúmulo de pigmentos fotossintéticos, como clorofila  $\alpha$  e carotenoides, em resposta ao tempo de preparo do inóculo e às intensidades de corrente elétrica alternada.
- Comparar o desempenho das cepas selvagem (*D. salina*) e aclimatadas em diferentes condições de salinidade e estímulos elétricos.

## 3.3. METODOLOGIA

### 3.3.1. Desenho Experimental

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 500 mL, conectados a uma fonte de alimentação elétrica (Neurodyn, modelo ME03361A, Brasil) e a um osciloscópio (Osciloscópio 100 MHz, 2 canais, Minipa MVB-DSO, Brasil) para monitoramento das características elétricas do meio.

Cada frasco foi equipado com quatro eletrodos de aço inoxidável (AISI 302, número 19, diâmetro de 0,80 mm), posicionados equidistantes ( $7\text{ cm} \pm 0,5$ ) nas tampas.

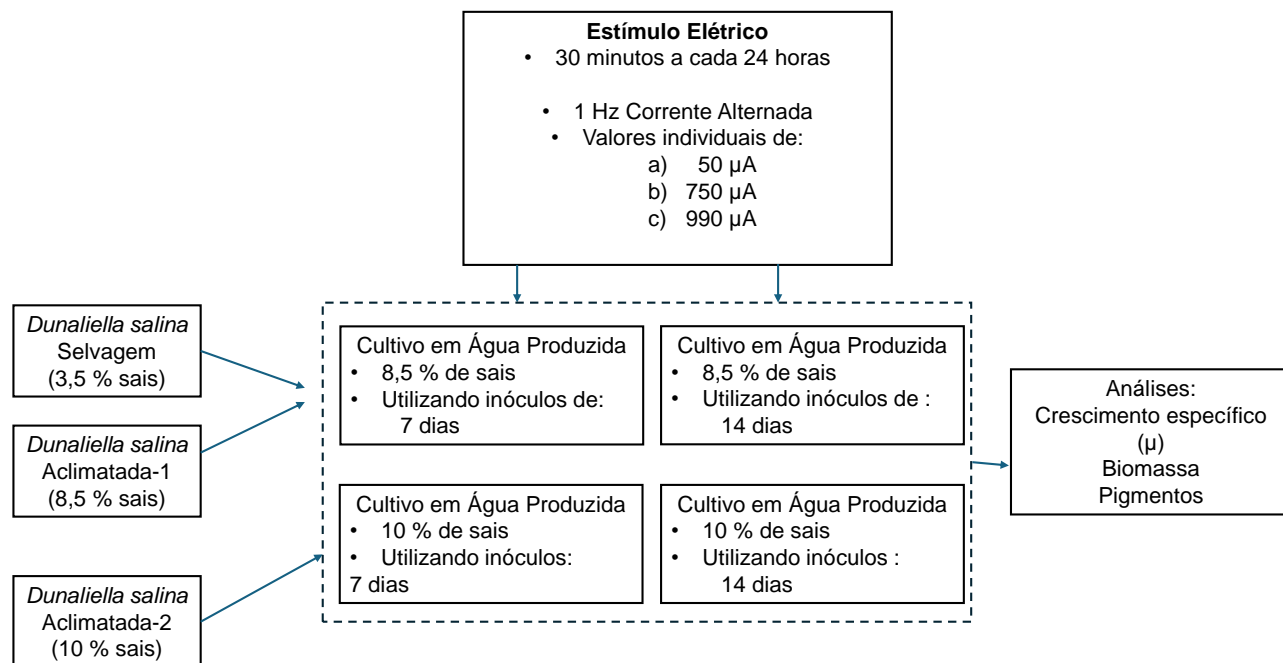
Dois eletrodos foram utilizados para introduzir a corrente alternada no meio de cultivo, enquanto os outros dois estavam conectados ao osciloscópio para medir a tensão no líquido. O aço inoxidável foi escolhido devido à sua alta resistência à corrosão e estabilidade estrutural sob condições elétricas variáveis, além de minimizar efeitos de eletrólise, garantindo estímulos consistentes e reduzindo possíveis contaminações ou degradação do meio de cultivo.

Após 8 semanas de sucessivos repiques de *Dunaliella salina* em água produzida com concentrações de sais de 8,5% e 10% (Aclimatada-1 e Aclimatada-2), foram realizados testes de eletroestimulação utilizando as mesmas condições salinas, avaliando tanto microalgas aclimatadas quanto não aclimatadas. Os inóculos foram preparados com tempos de incubação de 7 dias (IN 7D) e 14 dias (IN 14D). A estimulação elétrica, em triplicata, foi aplicada por meio de correntes alternadas de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ , com frequência de 1 Hz (da Silva, et al., 2025), durante 30 minutos a cada 24 horas, ao longo de um período de 7 dias. Controles sem aplicação de estímulos elétricos foram mantidos como referência para comparação dos tratamentos (Figura 1).

As condições de cultivo foram mantidas constantes, com intensidade luminosa de 3800 lux, agitação a 100 rpm, aeração com ar atmosférico, temperatura de 25 °C ( $\pm 2$ ), pH controlado entre 6 e 7, e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Durante o experimento, amostras foram coletadas diariamente para análise de pigmentos fotossintéticos (subtópico 3.3.5) e densidade óptica a 680 nm utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D, Brasil). Além disso, análises químicas de lipídios, nitrogênio (N) e fósforo (P) foram realizadas no início e no final do cultivo, garantindo um monitoramento completo dos parâmetros experimentais.

Figura 1. Fluxograma da metodologia experimental.



### 3.3.2. Microalga

*Dunaliella salina* da classe Chlorophyta foi escolhida por ser uma alga halotolerante com alto conteúdo lipídico (15-68%) (Huesemann, *et al.*, 2009). Conhecida por sua capacidade de crescer em diferentes ambientes e produzir biomassa em condições adversas, possui apenas uma membrana plasmática simples que lhe confere a habilidade de responder rapidamente às mudanças de salinidade do meio (Chen e Jiang, 2009). Os exemplares foram doados pelo Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) da Universidade Federal da Bahia. A alga foi mantida no meio Conway com salinidade de 35 g de STD/L, conforme o protocolo adaptado Walne, (1966).

### 3.3.3. Água produzida

A caracterização da água produzida é essencial para entender as condições iniciais do meio de cultivo e sua adequação às microalgas halotolerantes. A água produzida utilizada, fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM), foi coletada de campos de extração de óleo e gás, bem como estações de tratamento de água produzida. As características químicas foram resumidas na Tabela 4. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro borosilicato de 5L e/ou em galões com capacidade de 10L.

Após a preparação dos meios de cultivo e a caracterização a água produzida foi suplementada com as soluções Principal (Tabela 5) e solução de Vitaminais (Tabela 6) do meio Conway, os experimentos foram conduzidos em condições controladas de luz, temperatura e aeração, conforme descrito a seguir.

Tabela 4. Composição da água produzida AP-7. Caracterização química da água produzida.

| Componentes                   | Valores<br>AP-7              |
|-------------------------------|------------------------------|
| pH                            | 5.19                         |
| Salinidade                    | 100 g/L                      |
| Alcalinidade Total            | 55,56 mgCaCO <sub>3</sub> /L |
| STD (Sais Totais Dissolvidos) | 100 g/L                      |
| Cloreto                       | 97,33 g/L                    |
| Sulfato                       | 320,48 mg/L                  |
| Fosfato                       | 0,21 mg/L                    |
| Ferro                         | 20 mg/L                      |
| Cobre                         | 0,00148 mg/L                 |
| Óleos e graxas                | 100 mg/L                     |

Tabela 5. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.

| Componentes   | Valores (g/L) |
|---|---------------|
| C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Na EDTA sal sódico) | 45            |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido Bórico)   | 33.6          |
| NaNO <sub>3</sub> (Nitrato de Sódio)  | 100           |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O (Cloreto de Manganês)   | 0.36          |
| FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Cloreto de Ferro)  | 1.30          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Fosfato dissódico di-hidrogenado)                 | 20.0          |

Tabela 6. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.

| Concentração                      | Valores<br>(mg/L) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Vitamina B12 -<br>Cianocobalamina | 5                 |
| Vitamina B1 - Biotina             | 100               |

### 3.3.4. Cinética de Crescimento e Análise Estatística

Os parâmetros cinéticos de crescimento foram calculados aplicando regressão linear na fase exponencial de acumulação de biomassa (taxas de produção). Além disso, o logaritmo natural (LN) do acúmulo de biomassa foi submetido à regressão linear para estimar o coeficiente de crescimento ( $\mu$ ), conforme descrito por Chinalia, et al. (2008). Os parâmetros cinéticos de todos os tratamentos foram analisados estatisticamente em triplicatas usando ANOVA (software Minitab v2021).

### 3.3.5. Análise Química

A cada 24 horas, alíquotas foram coletadas para monitorar o conteúdo de clorofila  $\alpha$ , clorofila  $\beta$  e carotenoides, seguindo o método descrito por Rowan, (1989). Resumidamente, as amostras foram extraídas com 92,8% de etanol em banho-maria por 30 minutos a 60 °C, e as densidades ópticas foram medidas a 662, 645 e 470 nm, utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D, Brasil).

No início e no final do experimento, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foi analisado para determinar as concentrações de fosfato conforme protocolo adaptado de Keeny & Nelson (1982). O fosfato foi determinado pela reação com reagentes mistos contendo molibdato de amônio, ácido sulfúrico, ácido ascórbico e tartarato de antimônio e potássio, com leitura de absorbância a 882 nm. A determinação de nitrato foi realizada utilizando o kit colorimétrico CARD Kit Nitrato NTD (Alfakit, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

A demanda química de oxigênio (DQO) foi quantificada segundo protocolo adaptado de APHA et al., (2019). A extração lipídica foi realizada conforme o método de Freeman (1956), utilizando uma solução de clorofórmio/metanol (2:1), de acordo com a metodologia descrita por Conceição, et al., (2023).

## 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Silva (2021) reporta que *Dunaliella salina* apresentou um excelente crescimento em água produzida. Os testes de maximização de cultivo em AP com diferentes salinidades e exposta ao estímulo elétrico foram realizados baseados no protocolo de cultivo reportado por Silva (2021). Testou-se o tempo de preparação do inóculo, comparando os resultados após incubação por 7 dias (IN 7D) e 14 dias (IN 14D). Foi

utilizado estímulos elétricos com microcorrente. A corrente elétrica escolhida foi alternada, com intensidades de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ , e frequência de 1 Hz, aplicada por 30 minutos a cada 24 horas, durante 7 dias.

### 3.4.1. Taxa de Crescimento Específico

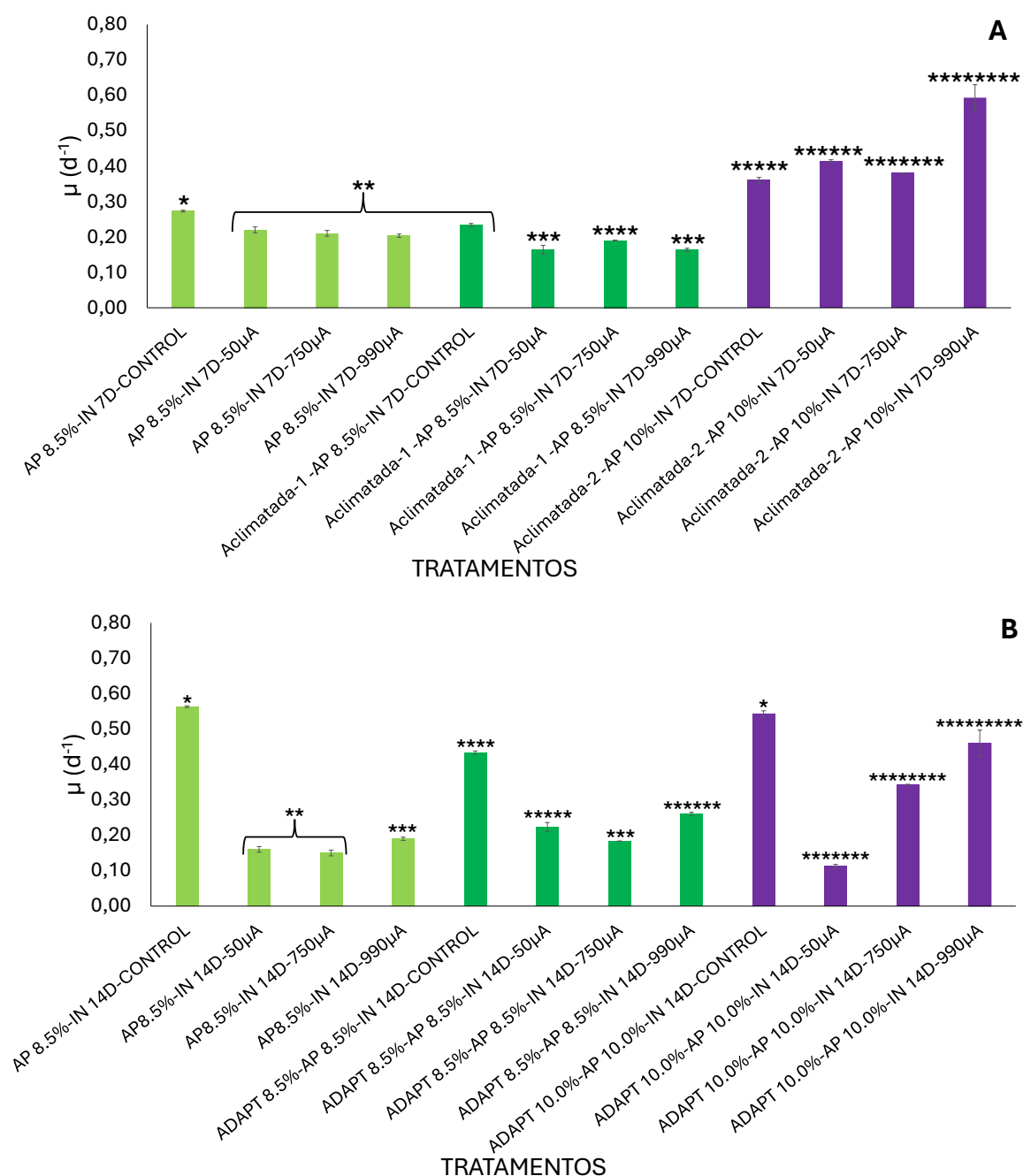
Conforme ilustrado na Figura 2a, no inóculo de 7 dias, *Dunaliella salina* sob microcorrente de 990  $\mu\text{A}$ , aclimatada em água produzida com 100 g/L de sais (Aclimatada-2), apresentou a melhor taxa de crescimento específico ( $0,59 \text{ d}^{-1}$ ), resultando em um incremento de 63% em relação ao controle (Aclimatada-2, sem estímulo). No entanto, essa rápida taxa de crescimento foi sustentada apenas até o 3º dia, apresentando uma redução nos dias subsequentes. Esses resultados corroboram com o trabalho de Ammar, et al. (2018), que utilizaram um método de aclimação na *Nannochloropsis oculata*, cultivada em meio BG-11 modificado com salinidade de 35 g/L, observando que a concentração de 25% de AP levou a uma taxa de crescimento de  $0,179 \text{ d}^{-1}$ , aproximadamente 19% superior ao controle. Comparativamente, a *D. salina* obteve uma taxa de crescimento específico 140% maior em um período de 7 dias na AP bruta, com salinidade 2,8 vezes maior que a de *N. oculata*. Esses resultados sugerem que a aclimação prévia ao efluente, em conjunto com a microcorrente, tem um efeito benéfico sobre o crescimento da microalga. A AP contém características intrínsecas que podem estimular o crescimento microalgal, e a alta salinidade pode potencializar esse efeito, como evidenciado pelos resultados positivos de *D. salina* em um período relativamente curto.

Em contrapartida, no inóculo de 14 dias, um comportamento distinto foi observado (Figura 2b). O controle de *D. salina* não aclimatada, na AP com 8,5% de sais, alcançou a maior taxa de crescimento específico ( $0,56 \text{ d}^{-1}$ ), superando o controle de Aclimatada-2, com um crescimento específico cerca de 100% maior. A alta salinidade da AP desempenha um papel crucial no metabolismo de *D. salina*, estimulando a síntese de glicerol para osmorregulação, um composto que pode representar até 55% do peso seco total da microalga (Ben-Amotz e Avron, 1973). Esse glicerol não apenas auxilia na adaptação a ambientes hipersalinos, mas também atua como mecanismo de proteção contra compostos tóxicos presentes no efluente, promovendo alterações nas vias metabólicas-chave.

Similarmente ao que ocorreu no inóculo de 7 dias, a *D. salina* não aclimatada, em AP com 8,5% de sais, não conseguiu manter sua alta taxa de crescimento por mais de 4 dias. Após esse período, a taxa de crescimento específico diminuiu, enquanto o controle Aclimatada-2, sem estímulo, manteve constante sua velocidade de crescimento ao longo dos 7 dias de cultivo.

Quanto ao estímulo elétrico, o tratamento Aclimatada-2 na intensidade de corrente de 990  $\mu\text{A}$  demonstrou o melhor desempenho entre os estímulos aplicados, obtendo um rendimento de 64% em relação ao controle. Esse resultado é similar ao observado no melhor resultado do inóculo de 7 dias já mencionado, sugerindo que a idade do inóculo não impacta de forma expressiva a taxa de crescimento específico na água produzida quando estimulada por microcorrente alternada.

Figura 2. Crescimento específico. Taxa de crescimento específico da *Dunaliella salina* cultivada por 7 dias. As barras indicam as cepas de microalgas adaptada (Aclimatada-1 e Aclimatada-2) e não adaptada, crescida na água produzida em diferentes salinidades (8,5 e 10%), em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ . Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (A) inóculo de 7 dias (IN 7D); (B) inóculo de 14 dias (IN 14D). (\*) Análise estatística.



### 3.4.2. Produção de Biomassa

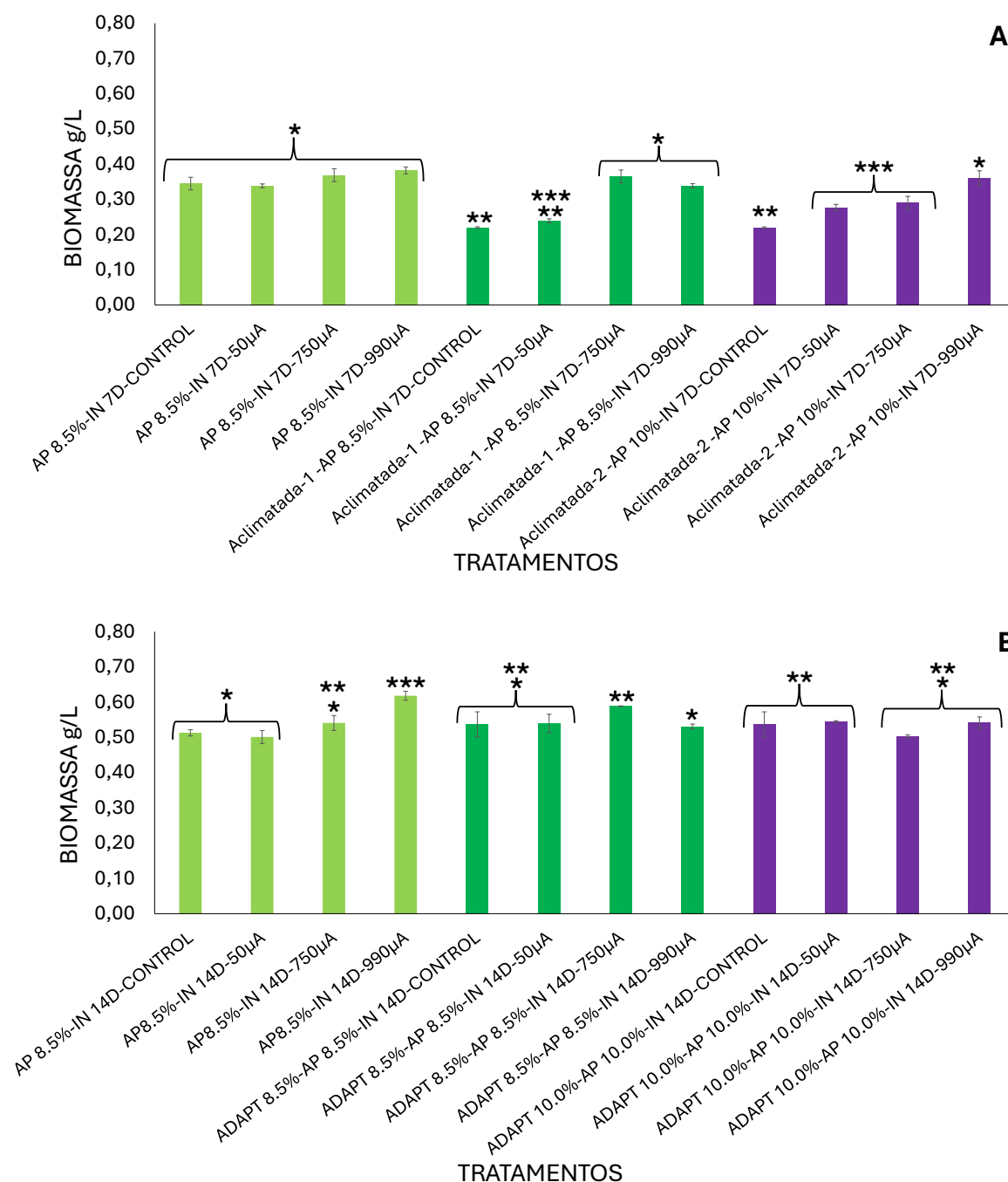
A produção de biomassa foi melhor na *D. salina* não aclimatada, cultivada na AP com 8,5% de sais. Embora a microcorrente de 990  $\mu\text{A}$  tenha promovido o maior acúmulo de biomassa (0,38 g/L), esse resultado não foi estatisticamente significativo em comparação com as correntes de 50 e 750  $\mu\text{A}$ , nem com o controle. Além disso, a Aclimatada-1 sob as intensidades de corrente de 750 e 990  $\mu\text{A}$ , e a Aclimatada-2 com a

intensidade de corrente de 990  $\mu\text{A}$  apresentaram resultados semelhantes (Figura 3a). Esses achados indicam que a produção de biomassa na *D. salina*, independentemente do estímulo aplicado, em 7 dias de incubação do inóculo, demonstrou rendimentos equivalentes, sem um impacto evidente do estímulo elétrico no acúmulo de biomassa.

No inóculo de 14 dias, a microalga não aclimatada sob a microcorrente alternada de 990  $\mu\text{A}$  obteve a maior produção de biomassa (0,61 g/L), com um incremento de 19% em relação ao controle (Figura 3b). O tempo de preparo do inóculo mostrou-se um fator determinante, influenciando diretamente a produção final de biomassa. A maior densidade celular observada no inóculo de 14 dias parece ter favorecido o acúmulo de metabólitos microalgais, conforme sugerido por Nezammahalleh, et al. (2016). Este fator representa um dos principais desafios na escala industrial, pois uma elevada densidade celular pode interferir na síntese de produtos de interesse (Borowiak, et al., 2020). Com base em nossos resultados, a microcorrente de 990  $\mu\text{A}$  demonstrou os melhores resultados de acúmulo de biomassa para ambos os tipos de inóculos. Contudo, no inóculo de 14 dias, o aumento da produção foi de aproximadamente 60% em comparação com o inóculo de 7 dias, indicando que a idade do inóculo pode influenciar positivamente o acúmulo de biomassa quando associada ao estímulo elétrico.

Além disso, o tempo prolongado de incubação do inóculo (14 dias) desempenhou um papel crucial na aclimação da *D. salina* ao ambiente de cultivo com alta salinidade. Durante esse período, as microalgas podem ter passado por um processo de osmorregulação, ajustando suas células para tolerar melhor as condições osmóticas do meio, o que pode ter favorecido o acúmulo de biomassa (Nadersha, et al., 2022). A maior densidade celular observada no inóculo de 14 dias pode ser atribuída a essa idade do inóculo, resultando em uma melhoria na capacidade de assimilação de nutrientes e na produção de metabólitos essenciais, como lipídios e proteínas. Este processo também pode ter ativado mecanismos antioxidantes, protegendo as células de danos induzidos pela salinidade e pela microcorrente (Fitriana, et al., 2021).

Figura 3. Produção de biomassa. Acúmulo de biomassa de *Dunaliella salina* cultivada por 7 dias. As barras indicam as cepas de microalgas adaptada (Aclimatada-1 e Aclimatada-2) e não adaptada, crescida na água produzida em diferentes salinidades (8,5 e 10%), em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu$ A. Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (A) inóculo de 7 dias (IN 7D); (B) inóculo de 14 dias (IN 14D). (\*) Análise estatística.



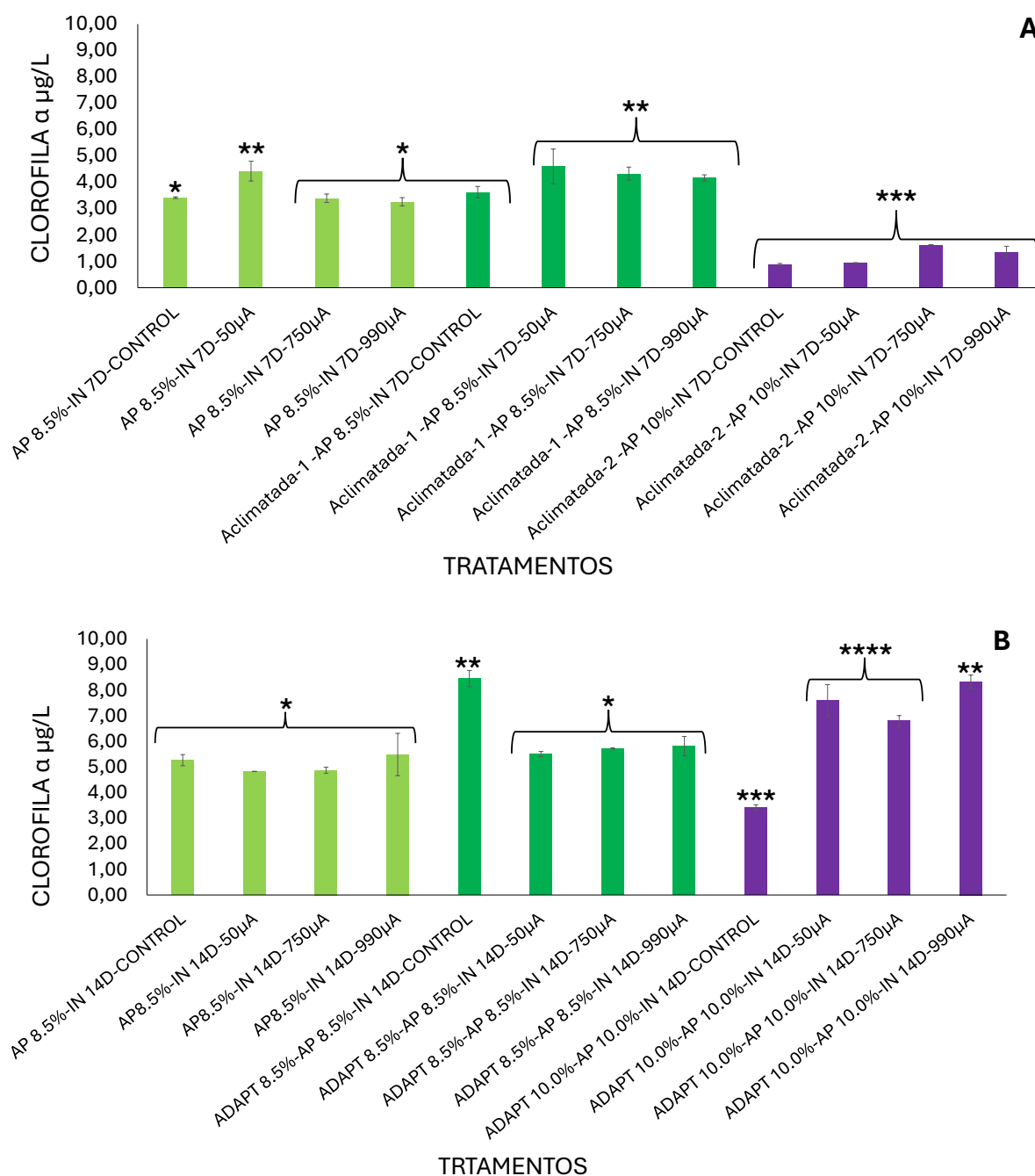
### 3.4.3. Acúmulo de Pigmentos

O estímulo elétrico apresentou efeitos positivos sobre o acúmulo de pigmentos nas microalgas do inóculo de 7 dias (Figura 4a). O tratamento com corrente alternada de 50  $\mu$ A na cepa Aclimatada-1, cultivada em AP com 8,5% de sais, resultou no maior acúmulo de clorofila  $\alpha$ , com um aumento de aproximadamente 27% em relação ao

controle. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa em comparação com as correntes de 750 e 990  $\mu\text{A}$  desta cepa, nem com o controle da *D. salina* não aclimatada sob corrente de 50  $\mu\text{A}$ . Esses resultados indicam que o impacto da microcorrente no acúmulo de pigmentos fotossintéticos pode depender de uma combinação de fatores, como salinidade e idade do inóculo da microalga. A aplicação de corrente alternada parece estimular a síntese de pigmentos fotossintéticos, favorecendo a eficiência da transferência de elétrons e, conseqüentemente, potencializando a produção de biocompostos essenciais para o crescimento celular (Figura 4a).

No inóculo de 14 dias (Figura 4b), a cepa Aclimatada-2, cultivada em AP com 100 g/L de sais, apresentou um acúmulo de clorofila  $\alpha$  (8,33  $\mu\text{g/L}$ ) sob a maior intensidade de corrente alternada (990  $\mu\text{A}$ ), um incremento de 144% em relação ao seu controle. No entanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo em comparação com o controle da Aclimatada-1. Este dado sugere que, sob alta salinidade, *D. salina* pode se osmorregular de forma mais eficiente, utilizando a síntese de glicerol (Chen, et al., 2009) como uma via energética para manter a homeostase celular. Esse processo requer gasto energético, o que pode levar a um aumento na produção de pigmentos fotossintéticos, como clorofila  $\alpha$ , para otimizar a captura de energia luminosa (Hoefnagel, et al., 1998).

Figura 4. Acúmulo de clorofila  $\alpha$ . Produção de clorofila  $\alpha$  da *Dunaliella salina* cultivada por 7 dias. As barras indicam as cepas de microalgas adaptada (Aclimatada-1 e Aclimatada-2) e não adaptada, crescida na água produzida em diferentes salinidades (8,5 e 10%), em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu$ A. Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (A) Inóculo de 7 dias (IN 7D) e (B) Inóculo 14 dias (IN 14D). (\*) Análise estatística.

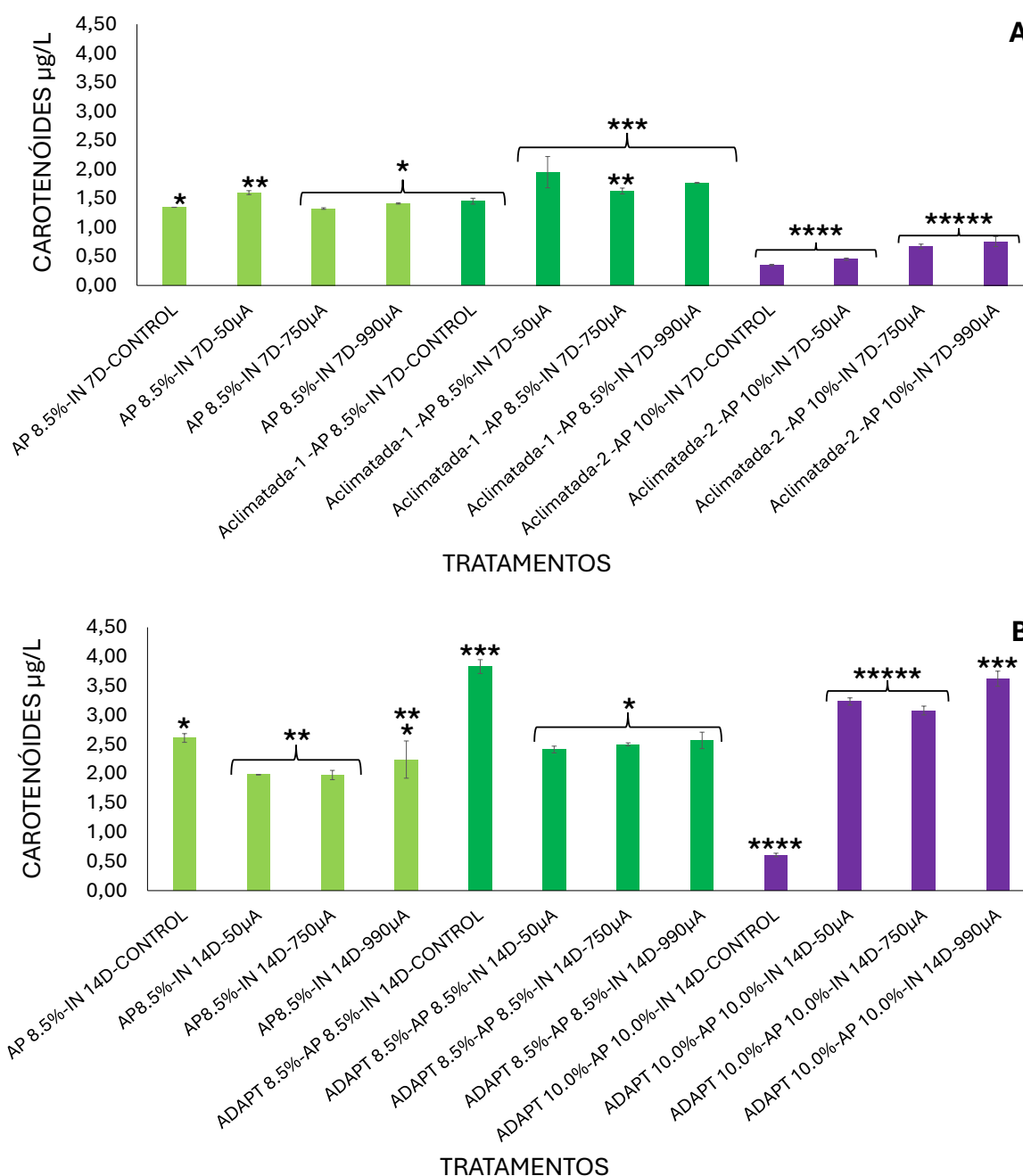


Em relação aos carotenóides, que são pigmentos acessórios essenciais para *D. salina* em processos metabólicos relacionados a estresses ambientais, como o aumento da salinidade, os resultados mostraram que, no inóculo de 7 dias, a cepa Aclimatada-1 sob corrente de 50  $\mu$ A obteve a maior produção de carotenóides, com um aumento de 34%

em relação ao controle (Figura 5a). Contudo, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com as outras intensidades (750 e 990  $\mu\text{A}$ ) para esta cepa ou para a microalga não aclimatada sob corrente de 50  $\mu\text{A}$ .

No inóculo de 14 dias, a resposta observada foi distinta (Figura 5b). A microalga Aclimatada-2 sob a corrente de 990  $\mu\text{A}$  um aumento de aproximadamente 503% em relação ao seu controle na produção de carotenóides. Porém esse resultado não foi estatisticamente diferente do controle Aclimatada-1. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, sob condições de estresse elevado, como altas concentrações salinas e a aplicação de corrente elétrica alternada, os pigmentos fotossintéticos, como a clorofila, podem ser superexcitados, levando a um desequilíbrio na cadeia de transferência de elétrons. Esse desequilíbrio pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em altas concentrações, podem causar danos celulares. Como resposta de defesa, as microalgas aumentam a produção de carotenóides, que funcionam como fotoprotetores, mitigando os danos causados pelas EROs (Masojídek, et al., 2021).

Figura 5. Acúmulo de carotenóides. Produção total de carotenóides produzidos por *Dunaliella salina*. As barras indicam as cepas de microalgas adaptada (Aclimatada-1 e Aclimatada-2) e não adaptada, crescida na água produzida em diferentes salinidades (8.5 e 10%), em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ . Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (A) Inóculo de 7 dias (IN 7D) e (B) Inóculo 14 dias (IN 14D). (\*) Análise estatística.



### 3.4.4. Produção de lipídios e remoção de nutrientes

A aplicação de 990  $\mu\text{A}$  no tratamento Aclimatada-2 com inóculo de 7 dias resultou em um aumento de aproximadamente 423% no rendimento lipídico em comparação ao seu controle (Tabela 7). Esse aumento sugere que a combinação de maior intensidade de

corrente alternada e alta salinidade atuou sinergicamente para potencializar a produção de lipídios.

Além disso, a Aclimatada-2 apresentou a maior remoção de DQO, atingindo 99% tanto no controle quanto nos tratamentos com estímulo elétrico (Tabela 7). A remoção de nitrato, por outro lado, foi mais eficiente na Aclimatada-1, tanto no controle como os tratamentos, obtiveram uma redução de 84% (Tabela 7).

Já a cepa selvagem, quando submetida a 990  $\mu\text{A}$ , obteve uma remoção de 72% do fosfato, o maior valor entre os tratamentos testados (Tabela 7). Esses resultados indicam que a aplicação de corrente alternada pode influenciar positivamente tanto a produção de lipídios quanto a remoção de contaminantes, destacando a viabilidade dessa abordagem para otimização do cultivo de *Dunaliella salina*.

Tabela 7. Produção de lipídios e remoção de nutrientes. Valores de produção total de lipídios (g/L), concentração inicial (g/L) e remoção (%) de DQO (Demanda Química de Oxigênio), nitrato e fosfato após o cultivo de *Dunaliella salina* (Selvagem, Aclimatada-1 e Aclimatada-2) cultivada na água produzida (AP) nas salinidades de 8,5 e 10%, com inóculo de 7 dias (IN 7D), sob diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e 1 Hz de frequência. E seus respectivos controles, não estimulados eletricamente.

|                        | Tratamentos ( $\mu\text{A}$ ) com AP 8,5 e 10,0% de sais – IN 7D |                          |                          |                          |                              |                          |                          |                          | Controle                 |                          |                          |                          |
|------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                        | Controle   | 50                       | 750                      | 990                      | Controle<br>Aclimatada-<br>1 | 50                       | 750                      | 990                      | Aclimatada-<br>2         | 50                       | 750                      | 990                      |
| Lipídios Totais (g/L)  | 0,017<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,024<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,030<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,044<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,055<br>( $\pm 0,00$ )      | 0,037<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,044<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,058<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,013<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,026<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,020<br>( $\pm 0,00$ )  | 0,068<br>( $\pm 0,00$ )  |
| DQO Inicial (g/L)      | 22,691<br>( $\pm 0,01$ )   | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ )     | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Remoção de DQO (%)     | 53<br>( $\pm 0,00$ )   | 51<br>( $\pm 0,00$ )     | 54<br>( $\pm 0,00$ )     | 53<br>( $\pm 0,00$ )     | 40<br>( $\pm 0,00$ )         | 38<br>( $\pm 0,00$ )     | 38<br>( $\pm 0,00$ )     | 41<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     |
| Nitrato Inicial (mg/L) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ )   | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ )     | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Remoção de Nitrato (%) | 72<br>( $\pm 0,00$ )   | 72<br>( $\pm 0,00$ )     | 80<br>( $\pm 0,00$ )     | 80<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )         | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     |
| Fosfato Inicial (mg/L) | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )      | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  |
| Remoção de Fosfato (%) | 68<br>( $\pm 0,00$ )   | 67<br>( $\pm 0,00$ )     | 68<br>( $\pm 0,00$ )     | 72<br>( $\pm 0,00$ )     | 30<br>( $\pm 0,00$ )         | 39<br>( $\pm 0,00$ )     | 42<br>( $\pm 0,00$ )     | 38<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 66<br>( $\pm 0,00$ )     | 67<br>( $\pm 0,00$ )     | 66<br>( $\pm 0,00$ )     |

Tabela 8. Produção de lipídios e remoção de nutrientes. Valores de produção total de lipídios (g/L), concentração inicial (g/L) e remoção (%) de DQO (Demanda Química de Oxigênio), nitrato e fosfato após o cultivo de *Dunaliella salina* (Selvagem, Aclimatada-1 e Aclimatada-2) cultivada na água produzida (AP) nas salinidades de 8,5 e 10%, com inóculo de 14 dias (IN 14D), sob diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu$ A) e 1 Hz de frequência. E seus respectivos controles, não estimulados eletricamente.

|                        | Tratamentos ( $\mu$ A) com AP 8,5 e 10,0% de sais – IN 14D |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                        | Controle   | 50                       | 750                      | 990                      | Controle Aclimatada -1   | 50                       | 750                      | 990                      | Controle Aclimatada -2   | 50                       | 750                      | 990                      |
| Lipídios Totais (g/L)  | 0,05<br>( $\pm 0,00$ )                                     | 0,08<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,06<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,07<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,09<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,08<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,07<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,05<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,10<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,13<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,06<br>( $\pm 0,00$ )   | 0,11<br>( $\pm 0,00$ )   |
| DQO Inicial (g/L)      | 22,691<br>( $\pm 0,01$ )                                   | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 22,691<br>( $\pm 0,01$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) | 28,166<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Remoção de DQO (%)     | 72<br>( $\pm 0,00$ )                                       | 51<br>( $\pm 0,00$ )     | 50<br>( $\pm 0,00$ )     | 52<br>( $\pm 0,00$ )     | 40<br>( $\pm 0,00$ )     | 41<br>( $\pm 0,00$ )     | 50<br>( $\pm 0,00$ )     | 36<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     | 99<br>( $\pm 0,00$ )     |
| Nitrato Inicial (mg/L) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ )                                   | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) | 276,75<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Remoção de Nitrato (%) | 72<br>( $\pm 0,00$ )                                       | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 84<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 88<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     |
| Fosfato Inicial (mg/L) | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )                                    | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 5,291<br>( $\pm 0,00$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  | 9,513<br>( $\pm 0,01$ )  |
| Remoção de Fosfato (%) | 68<br>( $\pm 0,00$ )                                       | 59<br>( $\pm 0,00$ )     | 58<br>( $\pm 0,00$ )     | 63<br>( $\pm 0,00$ )     | 30<br>( $\pm 0,00$ )     | 45<br>( $\pm 0,00$ )     | 45<br>( $\pm 0,00$ )     | 43<br>( $\pm 0,00$ )     | 60<br>( $\pm 0,00$ )     | 69<br>( $\pm 0,00$ )     | 72<br>( $\pm 0,00$ )     | 72<br>( $\pm 0,00$ )     |

Os resultados indicam que a aplicação de estímulo elétrico na cepa Aclimatada-2 teve um impacto positivo na produção de lipídios e na remoção de contaminantes. A corrente de 50  $\mu$ A aplicada ao inóculo de 14 dias resultou na maior produção lipídica, representando um aumento de 30% em relação ao controle (Tabela 8).

No entanto, apesar do percentual de aumento ser menor que em outros tratamentos, a produção final de lipídios foi superior. Por exemplo, a aplicação de 990  $\mu\text{A}$  na Aclimatada-2 com inóculo de 7 dias levou a um aumento expressivo de 423% no rendimento lipídico em relação ao seu controle (0,013 g/L), porém a produção final (0,068 g/L) foi inferior à obtida com 50  $\mu\text{A}$  no inóculo de 14 dias. Esses resultados sugerem que, além da intensidade da corrente, a idade do inóculo e as condições fisiológicas da microalga desempenham um papel fundamental na maximização da produção lipídica. Assim, correntes mais elevadas podem induzir um maior percentual de aumento em relação ao controle, mas não necessariamente resultam na maior produção final de lipídios.

Além disso, a cepa Aclimatada-2 manteve uma alta remoção de DQO, atingindo 99% tanto no controle quanto nos tratamentos com estímulo elétrico (Tabela 8). Isso indica que, independentemente da aplicação da corrente, a cepa aclimatada possui uma elevada capacidade de assimilação e biodegradação de matéria orgânica. No entanto, a ausência de uma diferença significativa entre o controle e o tratamento sugere que, para esse parâmetro, a corrente elétrica não desempenhou um papel crucial no aumento da remoção.

Em relação à remoção de nutrientes, a corrente de 50  $\mu\text{A}$  aplicada à Aclimatada-2 promoveu uma redução de 88% no nitrato, um aumento expressivo de 46% em relação ao controle (Tabela 8). Esse resultado evidencia que o estímulo elétrico pode favorecer a assimilação de nitrato pela microalga, possivelmente devido a alterações na permeabilidade celular ou na atividade metabólica induzida pela corrente (Posudin, et al., 2010). Já a remoção de fosfato sob correntes de 750 e 990  $\mu\text{A}$  atingiu 72%, um aumento de 20% em relação ao controle (Tabela 8), sugerindo que correntes mais elevadas podem intensificar a absorção desse nutriente.

### 3.5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas análises de taxa de crescimento específico, produção de biomassa e acúmulo de pigmentos indicam que o tempo de preparo do inóculo e a intensidade do estímulo elétrico têm um impacto significativo sobre o desempenho de *Dunaliella salina* nas condições de cultivo com água produzida.

Na taxa de crescimento específico, os melhores resultados foram observados no inóculo de 7 dias sob a intensidade de 990  $\mu\text{A}$ , na cepa Aclimatada-2, indicando que a microalga foi capaz de manter uma alta taxa de crescimento nas primeiras fases do cultivo. No entanto, após o terceiro dia, foi observada uma redução na taxa de crescimento, sugerindo que a aclimação ao efluente e à corrente elétrica teve um impacto limitado a curto prazo. Em contrapartida, o inóculo de 14 dias, embora tenha mostrado um crescimento ligeiramente inferior em comparação ao inóculo de 7 dias nas primeiras fases, demonstrou um comportamento mais sustentado ao longo do tempo, favorecendo a aclimação da microalga ao estresse do efluente.

Em relação à produção de biomassa, a microalga cultivada no inóculo de 14 dias obteve um aumento de aproximadamente 19% em relação ao controle. A idade do inóculo prolongada favoreceu o acúmulo de biomassa, provavelmente devido a uma maior densidade celular e melhor adaptação ao ambiente de cultivo. A intensidade de corrente elétrica de 990  $\mu\text{A}$  também se mostrou eficaz para promover esse aumento na produção de biomassa, indicando que a corrente elétrica, associada a um tempo adequado de preparo do inóculo, exerce um efeito positivo sobre a produtividade das microalgas.

Quanto ao acúmulo de pigmentos, a cepa Aclimatada-2 apresentou o maior acúmulo de clorofila  $\alpha$  e carotenóides sob a corrente alternada de 990  $\mu\text{A}$  no inóculo de 14 dias, sendo esta produção significativamente superior à de outros tratamentos. O aumento nos pigmentos fotossintéticos pode ser atribuído à maior eficiência na captura de luz e à adaptação das microalgas ao estresse salino, além da ativação de respostas fotoprotetivas. Esse resultado corrobora a ideia de que o tempo prolongado de aclimação é benéfico para maximizar a síntese de pigmentos essenciais para a fotossíntese e a proteção contra os estresses ambientais.

De maneira geral, os resultados indicam que a aclimação prolongada (14 dias) favorece tanto a taxa de crescimento quanto a produção de biomassa e o acúmulo de pigmentos, principalmente quando associada ao estímulo elétrico de 990  $\mu\text{A}$ . Esses achados sugerem que, para otimizar a produção e a qualidade dos produtos metabólicos

de *Dunaliella salina*, é fundamental considerar não apenas a intensidade da corrente elétrica, mas também o tempo adequado de aclimação. Isso possibilita uma melhor adaptação das microalgas ao ambiente de cultivo e ao estresse induzido, promovendo condições que otimizem tanto a viabilidade celular quanto a produção de biomassa e metabólitos valiosos.

Esses resultados têm implicações significativas para a implementação de métodos sustentáveis de cultivo de microalgas em sistemas de tratamento de água produzida, contribuindo para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e ambientalmente amigáveis. A combinação de práticas de aclimação e estimulação elétrica pode abrir novas perspectivas para a utilização de microalgas em biotecnologia, visando não apenas a remediação ambiental, mas também a geração de bioprodutos de alto valor agregado. A continuidade da pesquisa nessa área poderá fundamentar estratégias para maximizar a eficiência dos cultivos e melhorar a viabilidade econômica do uso de microalgas na indústria.

### 3.6. REFERÊNCIAS

- Ammar, S. H., Khadim, H. J., & Mohamed, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 132-142, 2018.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, (2019).
- Ben-Amotz, A.; Avron, M. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant physiology*, v. 51, n. 5, p. 875-878, (1973).
- Borowiak, D., Pstrowska, K., Wiśniewski, M., & Grzebyk, M. Propagation of Inoculum for *Haematococcus pluvialis* Microalgae Scale-Up Photobioreactor Cultivation System. *Applied Sciences*, 10,18: 6283, 2020.
- Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. *Algal biotechnology*. Elsevier Applied Science, Essex, UK, pp. 371-381,1988.
- Chen, H.; Jiang, J. G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology* 219, no. 2, 251-258, (2009).
- Chinalia, F. A., Paton, G. I., & Killham, K. S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. *Bioresource technology*, 99(4), 714-721 (2008).
- Conceição, G. R. Xavier, L. M., Matos, J. B., De Almeida, P. F., De Moura-Costa, L. F., & Chinalia, F. A. Glucose and Nitrogen Amendments Can Mitigate Wastewater-Borne

Bacteria Competition Effect Against Algal Growth in Wastewater-Based Systems. *Journal of phycology*, v. 55, n. 5, p. 1050-1058, 2019.

Conceição, G.R.; Silva, C.S.; Vale, T.O.; Santos, J.N.; Matos, J.B.L.; Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, (2023).

da Silva, C. S., Santos, G. M. P., Conceição, G. R., da Silva Andrade, I., Silva, A. N., Santos, R. M. P., ... & Chinalia, F. A. Role of low-level alternating current and impedance for enhancing microalgae biomass and lipid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 139, 5, 369-376, (2025).

Fang, Lei, Qi, S., Xu, Z., Wang, W., He, J., Chen, X., & Liu, J. De novo transcriptomic profiling of *Dunaliella salina* reveals concordant flows of glycerol metabolic pathways upon reciprocal salinity changes. *Algal research*, v. 23, p. 135-149, 2017.

Fitriana, H. N.; Lee, S. Y.; Choi, S. A.; Lee, J. Y.; Kim, B. L.; Lee, J. S.; Oh, Y. K. Electric stimulation of astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Sciences* 11, 8, 3348, (2021).

Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Ng, Y. C., And Nichols, A. V. Serum lipide analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 449-464, (1956).

Gallego-Cartagena, Euler; Castillo-Ramírez, Margarita; Martínez-Burgos, Walter. Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. *Saudi journal of biological sciences*, v. 26, n. 7, p. 1325-1330, 2019.

Hoefnagel, M. H; Atkin, O. K.; Wiskich, J. T. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1366, n. 3, p. 235-255, (1998).

Hosseini Tafreshi, A.; Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, v. 107, n. 1, p. 14-35, (2009).

Khatoon, Helena H., Haris, N., Banerjee, S., Rahman, N. A., Begum, H., Mian, S., ... & Endut, A. Effects of different salinities on the growth and proximate composition of *Dunaliella sp.* isolated from South China Sea at different growth phases. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 112, p. 280-287, 2017.

Huesemann, M. H.; Benemann, J. R. Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella sp.* In: Ben-Amotz, A.; Jacoby, B.; Vazquez-Romero, A. (Eds.). *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*. Enfield, NH: Science Publishers, p. 445-474 (2009).

Keeny, D. R.; Nelson, D. W. Inorganic forms of nitrogen. *Methods of Soil Analysis*, Part, 2, 643-98, (1982).

Masojídek, J., Ranglova, K., Lakatos, G. E., Silva Benavides, A. M., & Torzillo, G. Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures. *Processes*, v. 9, n. 5, p.820, (2021).

Nezammahalleh, H., Ghanati, F., Adams Ii, T. A., Nosrati, M., & Shojaosadati, S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, v. 218, p. 700-711, 2016.

- Nadersha, S., & Hassan, A. A. Biodesalination and treatment of raw hypersaline produced water samples using indigenous wastewater algal consortia. *Desalination*, 528, 115638, (2022).
- Posudin, Y. I.; Massjuk, N. P.; Lilitskaya, G. G.; Posudin, Y. I.; Massjuk, N. P.; Lilitskaya, G.G. Mechanisms of Photoreception and Photoorientation in *Dunaliella*. Photomovement of *Dunaliella* Teod., p. 50-52, (2010).
- Ranjbar, S., Quaranta, J. D., Tehrani, R., & Van Aken, B. Algae-Based Treatment of Hydraulic Fracturing Produced Water: Metal Removal and Biodiesel Production by the Halophilic Microalgae *Dunaliella salina*. In Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. 2015.
- Rowan, K.S. Photosynthetic pigments of algae Cambridge University Press: Cambridge, UK, (1989).
- Santana, H.; Cereijo, C.R.; Teles, V.C.; Nascimento, R.C.; Fernandes, M.S.; Brunale, P.; Campanha, R.C.; Soares, I.P.; Silva, F.C.P.; Seixas Sabaini, P.; Siqueira, F.G.; Brasil, B.S.A. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization, Bioresource Technology. v. 228, p. 2133-140, 2016.
- Silva, C. S. Valoração da eficiência de tratamento de água produzida através do cultivo de microalgas para produção de lipídios e pigmentos. 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021. Disponível em: <<http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/33105>>.
- Stewart, M.; Arnold, K. Produced water treatment field manual. Gulf Professional Publishing, 2011.
- Talebi, A. F., Dastgheib, S. M. M., Tirandaz, H., Ghafari, A., Alaie, E., & Tabatabaei, M. Enhanced algal-based treatment of petroleum produced water and biodiesel production. RSC advances 6, no. 52, 47001-47009, (2016).
- Walne, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Journal of Fishery Investigations, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, 2, 25-53 (1966).

### **CAPÍTULO III - EFEITO DE DIFERENTES REGIMES DE ESTÍMULO ELÉTRICO COM CORRENTE ALTERNADA EM *D. salina* EM DIFERENTES MEIOS SALINOS**

#### **4.1. INTRODUÇÃO**

A indústria petrolífera é caracterizada pelo alto volume de consumo de água e geração de águas residuais oriundas às atividades de extração; denominada água produzida (AP). Segundo o Relatório Anual de Sustentabilidade da Petrobrás de 2024 a empresa reportou o consumo de 115 milhões de m<sup>3</sup> de água doce para suas atividades (PETROBRÁS, 2024). Grande parte desse volume é injetado em processos de recuperação avançada de petróleo, gerando quantidades significativas de AP. No entanto, é desafiador quantificar precisamente o volume gerado, uma vez que, além dos fluidos injetados, que nem sempre são detalhados nos relatórios corporativos, há também a água do reservatório extraída juntamente com o petróleo. Essa água residual apresenta alto potencial poluidor devido a presença de hidrocarbonetos, compostos químicos complexos e substâncias utilizadas nos processos de extração e recuperação, demandando tratamentos eficientes antes de sua reutilização ou descarte. Assim, o tratamento de AP representa um desafio biotecnológico crucial para o gerenciamento sustentável desse efluente (Jiménez, et al., 2018).

Entre as alternativas promissoras para o tratamento de efluentes, destacam-se as microalgas, organismos fotossintetizantes capazes de produzir biocompostos de alto valor agregado com aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e de biocombustíveis (Sivaramakrishnan, et al., 2022; Barkia, et al., 2019). Projeções econômicas estimam que o mercado global de microalgas alcance USD 25.4 bilhões em 2033 (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2023). Para otimizar o cultivo de microalgas e reduzir custos, diversas estratégias têm sido empregadas, como variações de temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, intensidade luminosa e eletroestímulos.

A utilização de corrente elétrica em sistemas biológicos apresenta amplo potencial em diversas áreas, como cicatrização de feridas, preservação de alimentos e separação de microrganismos (Sahm, et al., 2022; Mahnič-Kalamiza, et al., 2014; Laughton, et al., 2013). Em particular, o campo elétrico alternado, caracterizado por oscilações de cargas elétricas, induz alterações na permeabilidade das membranas celulares, facilitando o influxo de moléculas extracelulares, como íons, aminoácidos e nutrientes. Esse processo, conhecido como eletropermeabilização, pode impactar significativamente as vias

metabólicas ao modular a disponibilidade de substratos, a atividade enzimática e a sinalização celular (Kotnik, et al., 2012; Tieleman, 2004; Tsong, et al., 1989).

As microalgas têm demonstrado resiliência a condições ambientais adversas, incluindo a exposição a efluentes petrolíferos com elevada salinidade e estímulos elétricos, resultando em melhorias na taxa de crescimento e no acúmulo de lipídios, ambos relevantes para a produção de biocombustíveis (Arriada, et al., 2014; Ammar, et al., 2018; He, et al., 2022; Sun et al., 2019). Estudos revelam o impacto positivo de campos elétricos na biomassa e no rendimento lipídico de microalgas. NEZAMMAHALLEH, et al. (2016) relataram um aumento de 55% no rendimento lipídico de *Chlorella vulgaris* com a aplicação de um campo elétrico estático moderado de 2 kV por 50 minutos. Gusbeth, et al. (2013) e Haberkorn, et al. (2019) observaram incrementos de 20% e 17%, respectivamente, na biomassa algal com o uso de campos elétricos pulsados de nanossegundos.

Diante desse panorama, este estudo tem como objetivo explorar o potencial da corrente elétrica alternada no cultivo de *Dunaliella salina* em água produzida e meio sintético com alta salinidade, visando otimizar a produção de biomassa e lipídios para aplicações biotecnológicas.

## 4.2. OBJETIVO

- Explorar o potencial da aplicação de corrente elétrica alternada no cultivo de *Dunaliella salina* em água produzida e meio sintético com alta salinidade, com o intuito de otimizar a produção de biomassa e lipídios para aplicações biotecnológicas.

### 4.2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *Dunaliella salina* em diferentes condições de cultivo, utilizando água produzida e meio sintético com alta salinidade.
- Investigar os efeitos da aplicação de corrente elétrica alternada sobre a taxa de crescimento, produção de biomassa, lipídios e pigmentos de *Dunaliella salina*.
- Comparar a eficiência do cultivo em água produzida e em meio sintético, com e sem aplicação de corrente elétrica alternada.

## 4.3. METODOLOGIA

### 4.3.1. Desenho Experimental

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 500 mL, conectados a uma fonte de alimentação elétrica (Neurodyn, modelo ME03361A, Brasil) e a um osciloscópio (Osciloscópio 100 MHz, 2 canais, Minipa MVB-DSO, Brasil) para monitoramento das características elétricas do meio.

Cada frasco foi equipado com quatro eletrodos de aço inoxidável (AISI 302, número 19, diâmetro de 0,80 mm), posicionados equidistantes ( $7\text{ cm} \pm 0,5$ ) nas tampas. Dois eletrodos foram utilizados para introduzir a corrente alternada no meio de cultivo, enquanto os outros dois estavam conectados ao osciloscópio para medir a tensão no líquido. O aço inoxidável foi escolhido devido à sua alta resistência à corrosão e estabilidade estrutural sob condições elétricas variáveis, além de minimizar efeitos de eletrólise, garantindo estímulos consistentes e reduzindo possíveis contaminações ou degradação do meio de cultivo.

As culturas de *Dunaliella salina* foram cultivadas em meio Conway e a água produzida foi suplementada com as soluções Principal e Vitaminas do meio Conway. A salinidade dos meios de cultivo foi ajustada e mantida em 8,5%. A estimulação elétrica, em triplicata, foi aplicada de duas formas de estímulo elétrico:

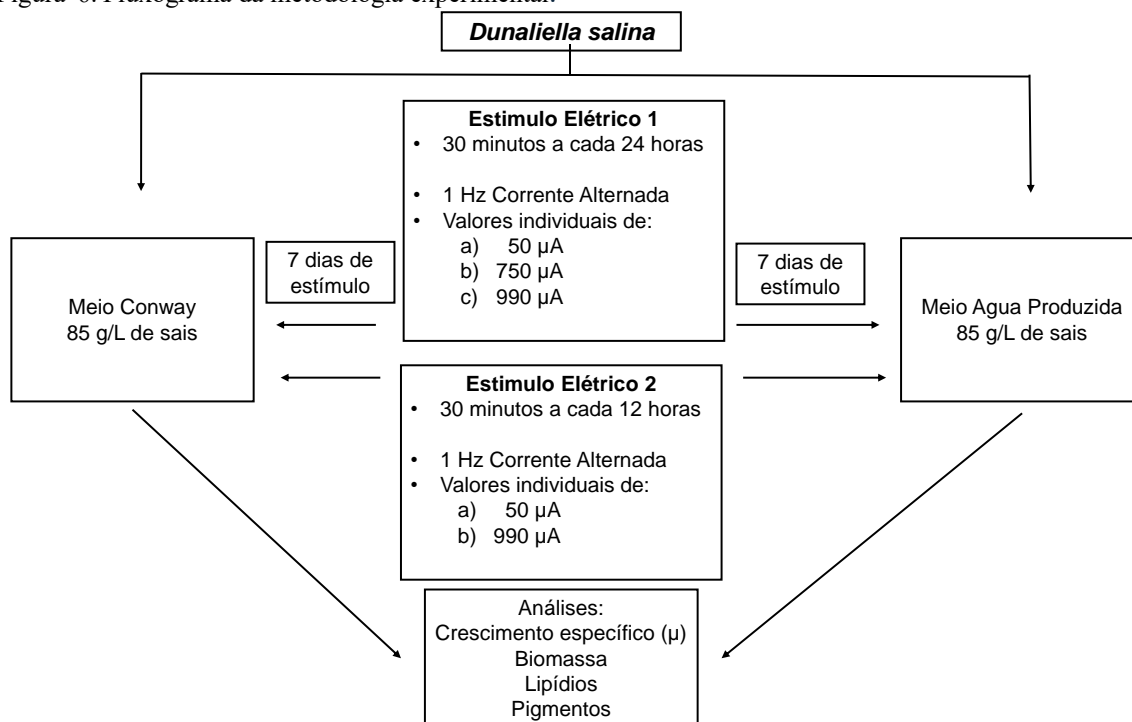
- Microcorrentes alternadas de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ , com frequência de 1 Hz, durante 30 minutos, a cada 24 horas ao longo de 7 dias, (Figura 6)
- Microcorrentes alternadas de 50e 990  $\mu\text{A}$  a cada 12 horas, ao longo de 7 dias (Figura 6).

Para controle, cepas sem estímulos elétricos foram mantidas.

As condições de cultivo foram mantidas constantes, com intensidade luminosa de 3800 lux, agitação a 100 rpm, aeração com ar atmosférico, temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ , pH controlado entre 6 e 7, e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Durante o experimento, amostras foram coletadas diariamente para análise de pigmentos fotossintéticos e densidade óptica a 680 nm utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D, Brasil). Além disso, análises químicas de lipídios, nitrogênio (N) e fósforo (P) foram realizadas no início e no final do cultivo, garantindo um monitoramento completo dos parâmetros experimentais.

Figura 6. Fluxograma da metodologia experimental.



#### 4.3.2. Microalga

*Dunaliella salina* da classe Chlorophyta foi escolhida por ser uma alga halotolerante com alto conteúdo lipídico (15-68%) (Huesemann, et al., 2009). Conhecida por sua capacidade de crescer em diferentes ambientes e produzir biomassa em condições adversas, possui apenas uma membrana plasmática simples que lhe confere a habilidade de responder rapidamente às mudanças de salinidade do meio (Chen & Jiang, 2009). Os exemplares foram doados pelo Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) da Universidade Federal da Bahia. A alga foi mantida no meio Conway com salinidade de 35 g de STD/L, conforme o protocolo adaptado Walne, (1966).

#### 4.3.3. Água Produzida

A caracterização da água produzida (AP) é essencial para avaliar sua adequação como meio de cultivo para microalgas halotolerantes. A água utilizada neste estudo foi fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM), sendo coletada de campos de extração de petróleo e gás, na estação de tratamento AP, GALP Estação 36 - PETROGAL (Fazenda da Pedra, Sn - Zona Rural, Santo Amaro das

Brotas - 49180-000, Sergipe, Brasil). As características químicas da amostra estão apresentadas na Tabela 9.

As amostras foram armazenadas em frascos de vidro borossilicato de 5 L e/ou galões de polietileno com capacidade de 10 L. Após a caracterização, os meios de cultivo foram preparados, e suplementado o meio Conway (Tabela 10 e 11) e os experimentos conduzidos sob condições controladas de luz, temperatura e aeração.

Tabela 9. Composição da água produzida AP-7. Caracterização química da água produzida.

| Componentes                   | Valores AP-7                 |
|-------------------------------|------------------------------|
| pH                            | 5.19                         |
| Salinidade                    | 100 g/L                      |
| Alcalinidade Total            | 55,56 mgCaCO <sub>3</sub> /L |
| STD (Sais Totais Dissolvidos) | 100 g/L                      |
| Cloreto                       | 97,33 g/L                    |
| Sulfato                       | 320,48 mg/L                  |
| Fosfato                       | 0,21 mg/L                    |
| Ferro                         | 20 mg/L                      |
| Cobre                         | 0,00148 mg/L                 |
| Óleos e graxas                | 100 mg/L                     |

Tabela 10. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.

| Componentes   | Valores (g/L) |
|---|---------------|
| C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Na EDTA sal sódico) | 45            |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido Bórico)   | 33.6          |
| NaNO <sub>3</sub> (Nitrato de Sódio)  | 100           |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O (Cloreto de Manganês)   | 0.36          |
| FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O (Cloreto de Ferro)  | 1.30          |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O (Fosfato dissódico di-hidrogenado)                 | 20.0          |

Tabela 11. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.

| Concentração                   | Valores (mg/L) |
|--------------------------------|----------------|
| Vitamina B12 - Cianocobalamina | 5              |
| Vitamina B1 - Biotina          | 100            |

#### 4.3.4. Cinética de Crescimento e Análise Estatística

Os parâmetros cinéticos de crescimento foram calculados aplicando regressão linear na fase exponencial de acumulação de biomassa (taxas de produção). Além disso, o logaritmo natural (LN) da acumulação de biomassa foi submetido à regressão linear para estimar o coeficiente de crescimento ( $\mu$ ), conforme descrito por Chinalia, et al., (2008). Os parâmetros cinéticos de todos os tratamentos foram analisados estatisticamente em triplicatas usando ANOVA (software Minitab v2021).

#### 4.3.5. Análise Química

A cada 24 horas, alíquotas foram coletadas para monitorar o conteúdo de clorofila  $\alpha$ , clorofila  $\beta$  e carotenoides, seguindo o método descrito por Rowan, (1989). Resumidamente, as amostras foram extraídas com 92,8% de etanol em banho-maria por 30 minutos a 60 °C, e as densidades ópticas foram medidas a 662, 645 e 470 nm, utilizando um espectrofotômetro Pro-tools (V-1100D, Brasil).

No início e no final do experimento, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foi analisado para determinar as concentrações de fosfato e nitrato, conforme protocolo adaptado de Keeny e Nelson, (1982). O fosfato foi determinado pela reação com reagentes mistos contendo molibdato de amônio, ácido sulfúrico, ácido ascórbico e tartarato de antimônio e potássio, com leitura de absorbância a 882 nm. A determinação de nitrato foi realizada utilizando o kit colorimétrico CARD Kit Nitrato NTD (Alfakit, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

A demanda química de oxigênio (DQO) foi quantificada segundo protocolo adaptado de APHA et al., (2019). A extração lipídica foi realizada conforme o método de Freeman, et al., (1956), utilizando uma solução de clorofórmio/metanol (2:1), de acordo com a metodologia descrita por Conceição, et al., (2023).

### 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do estímulo elétrico no crescimento e na produção de biomassa de *Dunaliella salina* foi avaliada em diferentes meios de cultivo, com ênfase na água produzida (PW) e no meio sintético Conway. Este estudo visou compreender os efeitos de microcorrentes alternadas aplicadas em dois regimes de estímulo (uma e duas vezes ao dia) sobre o crescimento específico, a produção de biomassa, lipídios e pigmentos.

#### 4.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ )

A taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) no meio sintético demonstrou que qualquer estímulo elétrico promoveu o crescimento em comparação ao controle (Figura 7). A aplicação de corrente elétrica de 50  $\mu\text{A}$  uma vez ao dia resultou em uma taxa de crescimento específico de  $0,54\text{ d}^{-1}$ , representando um aumento de aproximadamente 92% em relação ao controle. Contudo, essa taxa foi mantida apenas até o 5º dia de cultivo, apresentando redução nos dias subsequentes. Esse comportamento refletiu-se nos parâmetros de crescimento, como a produtividade de biomassa ( $0,08\text{ g/L/d}$ ) e a biomassa total ( $0,47\text{ g/L}$ ) (Tabela 12).

Sob a aplicação de 990  $\mu\text{A}$  no mesmo meio, a taxa de crescimento específico foi menor ( $0,35\text{ d}^{-1}$ , 54% inferior à obtida com 50  $\mu\text{A}$ ), mas sustentou-se por 7 dias, resultando em produtividade de biomassa equivalente ( $0,08\text{ g/L/d}$ ) e biomassa total superior ( $0,56\text{ g/L}$ ), correspondendo a um incremento de 17% em relação ao tratamento com 50  $\mu\text{A}$  (Tabela 12). Esses resultados sugerem que uma taxa de crescimento específico constante e moderada, favorece maior acúmulo de biomassa total em comparação a uma taxa inicial elevada que declina rapidamente.

No cultivo em água produzida, o controle apresentou o  $\mu$  de  $0,56\text{ d}^{-1}$ , um aumento de 37% em relação aos tratamentos com estímulos elétricos (Figura 7). Isso indica que a água produzida, por si só, tem um efeito estimulante sobre o crescimento de *D. salina*. No entanto, essa taxa elevada foi mantida apenas até o 4º dia de cultivo, resultando em produtividade de biomassa de  $0,10\text{ g/L/d}$  e a biomassa total de  $0,51\text{ g/L}$  (Tabela 12).

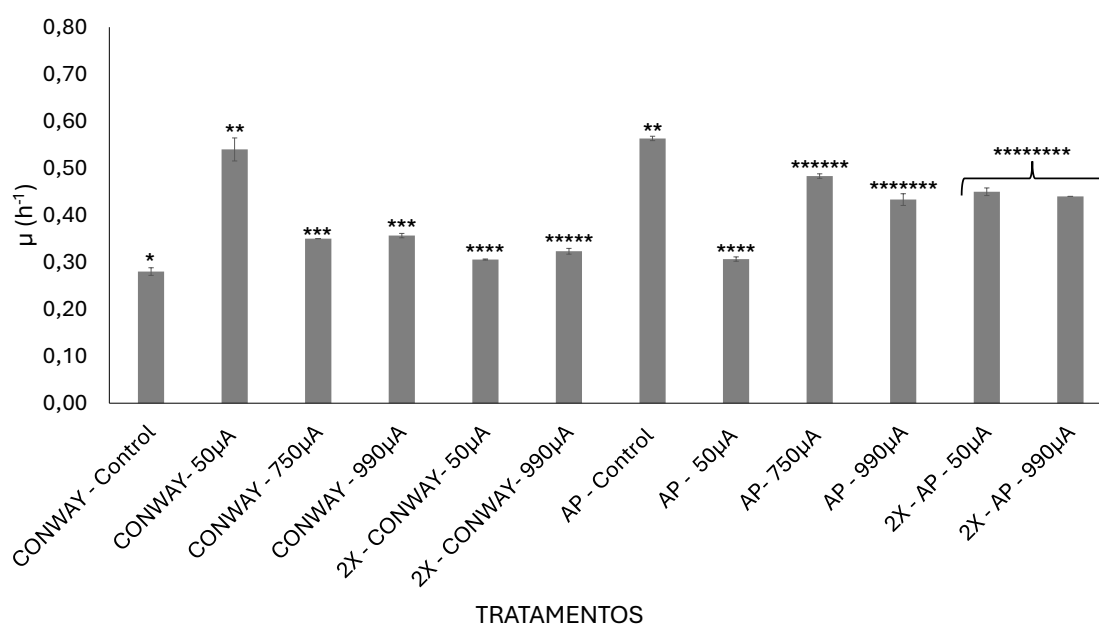
A aplicação de corrente alternada de 990  $\mu\text{A}$  duas vezes ao dia resultou em  $\mu$  de  $0,44\text{ d}^{-1}$  (27% inferior ao controle), mas sustentada por 5 dias. Apesar da produtividade de biomassa ser ligeiramente inferior ( $0,09\text{ g/L/d}$ ), a biomassa total foi maior ( $0,63\text{ g/L}$ ), representando um aumento de 23%. Assim, embora a água produzida favoreça o crescimento inicial, a aplicação de corrente alternada promove maior estabilidade do cultivo, permitindo maior acúmulo de biomassa total.

Esses resultados evidenciam que a intensidade e a frequência do estímulo elétrico influenciam significativamente o crescimento e a produtividade de biomassa. Ammar, et al., (2018) relataram que *Nannochloropsis oculata* cultivada em 25% de água produzida obteve  $\mu$  de  $0,179\text{ d}^{-1}$  em 21 dias, enquanto *D. salina* cultivada em água produzida bruta a 85 g/L de sais alcançou  $\mu$  de  $0,563\text{ d}^{-1}$  em 7 dias, um aumento de 140%. Esses dados

indicam que a alta salinidade do efluente petrolífero exerce forte influência sobre o crescimento da microalga.

No meio Conway, tratamentos com estímulos aplicados uma vez ao dia apresentaram  $\mu$  média 29% superior ao controle, enquanto estímulos aplicados duas vezes ao dia resultaram em aumento de apenas 10%. No entanto, no cultivo em água produzida, estímulos elétricos não resultaram em melhoria significativa em  $\mu$ , sugerindo que a composição química desse meio pode ter limitado os efeitos do estímulo elétrico.

Figura 7. Crescimento Específico ( $\mu$ ). Coeficiente de crescimento específico da *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam o crescimento específico da microalga no meio Conway e na água produzida com 8.5% de sais, em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu$ A. Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (\*) Análise estatística.



#### 4.4.2. Impedância e seu papel no desempenho do crescimento

A correlação entre a taxa de crescimento específico e a impedância foi observada no meio Conway, onde o maior valor de impedância (100  $\Omega$ ) resultou na maior taxa de crescimento específico (0,54  $d^{-1}$ ) (Table 12), conforme relatado por Silva, et al., (2025). No entanto, embora a água produzida tenha apresentado o mesmo valor de impedância (100  $\Omega$ ), esse padrão não foi reproduzido, uma vez que a maior taxa de crescimento específico no efluente não foi associada ao maior valor de impedância, sendo o controle o tratamento com melhor desempenho no coeficiente de crescimento específico. Esses resultados sugerem que, mesmo em condições de salinidade semelhantes, a voltagem dos

meios apresentou variações, possivelmente devido às características intrínsecas da água produzida, que podem ter influenciado sua interação com a corrente alternada de maneira distinta daquela observada no meio sintético.

#### 4.4.3. Produção de Biomassa

Nos experimentos realizados, observou-se que o estímulo elétrico foi mais eficaz no meio sintético, resultando em um aumento médio de 64% na produção de biomassa total em relação ao controle (Figura 8). Comparativamente, He, et al. (2022) observaram aumentos de 32 e 26%, na biomassa de *Scenedesmus obliquus* cultivada em meio BG-11, com correntes contínuas de 1 e 2 A/m<sup>2</sup> aplicadas por 12 horas diárias durante 5 dias. Em nosso estudo, a aplicação de microcorrente alternada de 990  $\mu$ A por 30 minutos, em intervalos de 12 horas durante 7 dias, em *Dunaliella salina* cultivada em meio Conway, resultou em um aumento substancial de 80% na biomassa, quando comparado ao controle. Esses dados sugerem que a microcorrente alternada, aplicada por curtos períodos duas vezes ao dia, pode ser mais eficaz na promoção do acúmulo de biomassa, destacando-se como uma alternativa promissora e economicamente viável para a produção de biomassa.

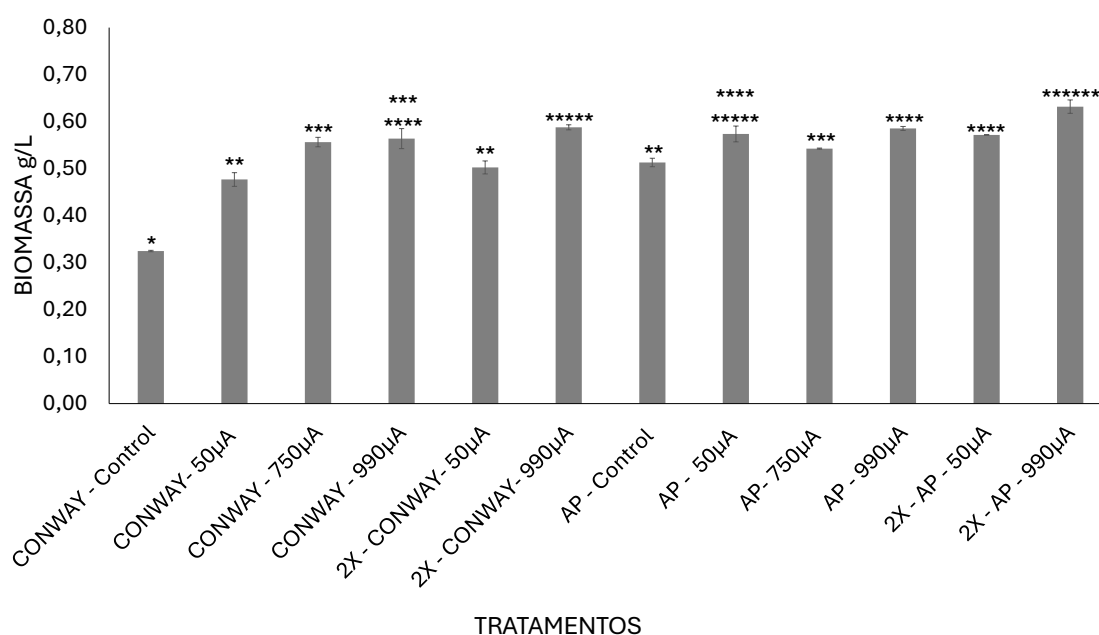
O efluente industrial, observou-se um aumento médio de 10% nos tratamentos elétricos em comparação ao controle no regime de estímulo uma vez ao dia, enquanto a microcorrente de 990  $\mu$ A, duas vezes ao dia promoveu um incremento de 23% em relação ao controle (Figura 8). Esses resultados destacam o potencial intrínseco do efluente para estimular o crescimento microalgal, devido à sua composição química rica em nutrientes e sais. He, et al. (2022) relataram resultados similares em *Scenedesmus obliquus* cultivada em efluente municipal com correntes contínuas de 1 e 2 A/m<sup>2</sup> por 12 horas diárias, resultando em aumentos de 22% e 30%, respectivamente, na biomassa. As diferenças entre os resultados podem ser atribuídas às características distintas dos efluentes utilizados: enquanto o efluente municipal requer estímulo elétrico para aumentar a biomassa, a água produzida já contém compostos que promovem o crescimento das microalgas. Essa diferença é evidenciada ao compararmos os rendimentos de biomassa no meio Conway e na água produzida sem estímulo elétrico, sendo que o efluente petrolífero promoveu um aumento de 57% em relação ao meio sintético.

Adicionalmente, a alta salinidade da AP desempenha um papel crucial no metabolismo de *D. salina*, estimulando a síntese de glicerol para osmorregulação, composto que pode representar até 55% do peso seco total da microalga (Ben-Amotz E Avron, 1973). Esse glicerol não apenas auxilia na adaptação a ambientes hipersalinos,

mas também atua como mecanismo de proteção contra compostos tóxicos presentes no efluente, promovendo mudanças nas vias metabólicas chave e maximizando o acúmulo de biomassa.

Portanto, a água residual petrolífera apresenta-se como um ambiente promissor e economicamente viável para o cultivo de *D. salina*, representando uma alternativa relevante para processos industriais baseados em microalgas. No cultivo de *D. salina*, a microcorrente alternada de 990  $\mu\text{A}$  aplicada duas vezes ao dia demonstrou melhor desempenho em comparação à microcorrente de 50  $\mu\text{A}$  e aos tratamentos realizados uma vez ao dia, destacando-se como a estratégia mais eficiente para a produção de biomassa.

Figura 8. Acúmulo de Biomassa. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam a produção de biomassa da microalga no meio Conway e na água produzida com 8.5% de sais, em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ . Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (\*) Análise estatística.



#### 4.4.4. Produção de Lipídios

A aplicação de microcorrente alternada demonstrou efeitos positivos no acúmulo de lipídios em *Dunaliella salina*, especialmente quando o estímulo foi aplicado uma vez ao dia. No meio Conway, a exposição diária à corrente elétrica resultou em um aumento significativo na produção lipídica, destacando-se as correntes de 750 e 990  $\mu\text{A}$ , com um rendimento médio de aproximadamente 39%, em comparação ao controle (Figura 9). Contudo, o estímulo aplicado duas vezes ao dia apresentou desempenho inferior. Este

fenômeno pode ser atribuído ao fato de que a exposição prolongada à microcorrente alternada pode ter desviado as rotas metabólicas da microalga, o que contrasta com os efeitos positivos observados quando os estímulos são mais curtos e menos frequentes (BEN-AMOTZ e AVRON, 1973; NEZAMMAHALLEH, et al., 2016).

Ao comparar os resultados obtidos com dados da literatura, HE, et al. (2022) cultivaram *Scenedesmus obliquus* em meio BG-11 sob exposição a correntes contínuas de 1 e 2 A/m<sup>2</sup> durante 12 horas por dia, ao longo de 5 dias. No 7º dia de cultivo, observaram um aumento de 30% e 21% no conteúdo de lipídios, respectivamente, em comparação ao controle. No presente estudo, *Dunaliella salina*, cultivada em meio sintético e exposta a correntes alternadas de 750 e 990 µA, aplicadas durante 30 minutos diários por 7 dias, resultou em um aumento significativamente maior de 65% no acúmulo lipídico, quando comparado ao controle. Essas discrepâncias podem ser atribuídas ao tipo de corrente aplicada e à duração do estímulo. A microcorrente alternada, aplicada em períodos curtos uma vez ao dia, parece induzir um estresse metabólico mais eficiente, favorecendo a conversão de carbono em lipídios.

No cultivo em água produzida, a salinidade elevada e a composição química complexa demonstraram papel crucial no metabolismo de *D. salina*. Sob estímulos de 50 µA, aplicados uma vez ao dia, observou-se um aumento significativo de 66% no acúmulo lipídico em relação ao controle, corroborando a hipótese de que a AP pode funcionar como um meio promissor e economicamente viável para a produção de lipídios. Em contraste, estímulos mais frequentes (duas vezes ao dia) resultaram em rendimentos inferiores, indicando que a intensidade e a frequência da estimulação elétrica devem ser ajustadas cuidadosamente para evitar impactos metabólicos adversos.

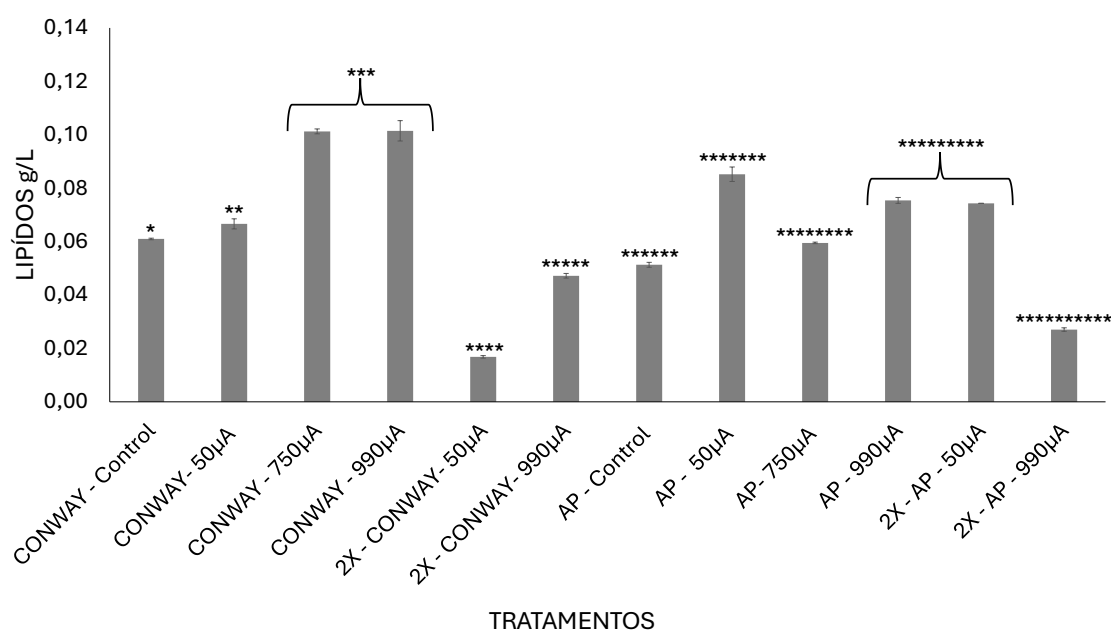
Como já citado, HE, et al. (2022) realizaram experimentos com *Scenedesmus obliquus* cultivada agora em efluente municipal, exposta a corrente contínua de 1 A/m<sup>2</sup> por 12 horas diárias, durante 5 dias. Os autores observaram um aumento de 8% na produção de lipídios em comparação ao controle. Em contraste, nossos resultados, com *D. salina* exposta a microcorrente alternada de 50 µA uma vez ao dia, demonstraram um incremento substancial de aproximadamente 39% no acúmulo de lipídios, comparado ao controle. Esses dados ressaltam que as diferenças nos parâmetros de estimulação elétrica, incluindo o tipo de corrente, a duração da exposição e as características dos efluentes, desempenham um papel crucial na resposta metabólica das microalgas. No caso da água produzida, sua composição complexa e alta salinidade, aliadas ao estímulo de

microcorrente alternada, parecem criar condições ideais para a biossíntese lipídica de *D. salina*.

Por outro lado, a aplicação de microcorrente alternada duas vezes ao dia, não apresentou efeitos positivos, a corrente de 990  $\mu\text{A}$  demonstrou uma redução de 53% no acúmulo lipídico, comparado ao mesmo estímulo aplicado uma vez ao dia. Esses resultados indicam que, embora o aumento na exposição ao estímulo elétrico não favoreceu o acúmulo de lipídios na *D. salina* em meio sintético.

No cultivo em água produzida, os tratamentos realizados duas vezes ao dia, utilizando microcorrente de 50  $\mu\text{A}$ , apresentou um rendimento de aproximadamente 174% em relação a 990  $\mu\text{A}$ , também aplicados duas vezes ao dia. Contudo, quando comparado ao mesmo estímulo aplicado uma vez ao dia, houve uma redução de 12%. A composição rica e complexa da água produzida, com 8,5% de sais e possíveis compostos tóxicos, pode ter interagido de maneira mais intensa com o estímulo elétrico aplicado duas vezes ao dia, promovendo alterações metabólicas ou condições estressantes adicionais que impactaram produção lipídica. Esses resultados reforçam que o impacto do estímulo elétrico está diretamente relacionado às características do meio de cultivo e às respostas adaptativas das microalgas às condições de salinidade e toxicidade.

Figura 9. Acúmulo de Lipídios. Produção de lipídios de *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam a produção de lipídios da microalga no meio Conway e na água produzida com 8.5% de sais, em três intensidades de corrente alternada: 50, 750 e 990 $\mu\text{A}$ . Além dos seus respectivos controles sem exposição à corrente alternada. (\*) Análise estatística.



#### 4.4.5. Produção de Pigmentos

Sob altas salinidades a *D. salina* consegue se osmorregular de forma rápida, uma via bem conhecida é pela síntese de glicerol (Chen, et al., 2009). Esse processo envolve elevado gasto energético, o que pode levar à maior captação de energia através da luz, sintetizando assim mais pigmentos fotossintetizante como clorofila  $\alpha$  (Hoefnagel, et al., 1998). Nossos resultados sugerem que a corrente alternada potencializou essa resposta positiva, em sinergia com a salinidade.

No meio sintético, todos os tratamentos apresentaram melhor rendimento na produção de clorofila  $\alpha$  em relação ao controle, com destaque para a microcorrente alternada de 50 $\mu$ A aplicada uma vez ao dia, que resultou em um aumento de aproximadamente 38% (Tabela 12). Comparativamente, He, et al., (2022), reportaram aumento na produção de clorofila  $\alpha$  de 9,7% em *Scenedesmus obliquus* cultivada em meio BG-11, sob corrente contínua de 1 A/m<sup>2</sup> aplicada por 12h diárias ao longo de 5 dias. Esses dados reforçam que a microcorrente alternada, com períodos curtos de aplicação diária, pode melhorar significativamente a atividade fotossintética de *D. salina*, destacando-se como uma abordagem promissora e economicamente viável para a produção de clorofila  $\alpha$ , um pigmento de relevância industrial. Na água produzida, a maioria dos tratamentos com corrente alternada também resultou em melhor acúmulo de clorofila  $\alpha$  em relação ao controle, exceto para o estímulo de 50  $\mu$ A aplicado duas vezes ao dia (Tabela 12). Esses resultados confirmam que as características do meio de cultivo, como salinidade e composição química complexa (Tabela 9), juntamente com o tempo de exposição a corrente elétrica, influenciam significativamente a resposta fotossintética da microalga.

Os carotenoides, especialmente em microalgas, desempenham papel fundamental na fotoproteção celular, particularmente sob condições de estresse. Esse mecanismo é especialmente importante em situações em que o excesso de energia leva à superexcitação dos pigmentos fotossintéticos, resultando em desequilíbrio na cadeia de transporte de elétrons e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em níveis elevados, podem causar danos celulares (Masojídek, et al., 2021). Em níveis moderados, as EROs atuam como sinalizadores que ativam a via metabólica de biossíntese de carotenoides, auxiliando na dissipação do excesso de energia luminosa como calor e minimizando os efeitos negativos das EROs.

Nosso estudo encontrou que a aplicação de estímulos elétricos uma vez ao dia resultou em um aumento médio de 24% na produção de carotenoides, enquanto a aplicação duas vezes ao dia reduziu em 56%, sugerindo que a estimulação excessiva pode ter causado um aumento nas EROs, prejudicando o processo de biossíntese de carotenoides (Tabela 12). Esses resultados estão em consonância com os achados de Sathiyavahisan, et al., (2023), que sugerem que níveis elevados de EROs podem interferir no mecanismo de defesa antioxidante das células. Fitriana, et al., (2021), relataram que a câmara catódica com 3 mA, aplicada por dois dias na microalga *Haematococcus pluvialis*, resultou em uma redução de 57% no acúmulo de astaxantina, em comparação ao controle, e promoveu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, o que causou danos significativos nas células. Apesar de a astaxantina ser um antioxidante importante, sua produção como resposta ao estresse oxidativo pode ser limitada quando a concentração de EROs atinge níveis elevados. Isso ocorre porque o acúmulo excessivo de EROs pode desestabilizar o metabolismo celular, interferindo na própria produção de carotenoides antioxidantes e, eventualmente, comprometendo a capacidade de defesa antioxidante, o que pode levar à morte celular.

Comportamento semelhante foi observado na água produzida, que, apesar de ser rica em sais e compostos que podem ser tóxicos para as células, apresentou aumento na produção de carotenoides quando o estímulo elétrico foi aplicado uma vez ao dia, com um incremento de 22%. No entanto, quando a estimulação foi duplicada ao dia, observou-se uma redução acentuada de 85% na produção de carotenoides, sugerindo que o estímulo excessivo prejudicou a biossíntese de pigmentos.

Tabela 12. Parâmetros de crescimento da *D. salina*.

|   | Controle<br>Conway | Tratamentos (μA) com<br>Conway 8.5% de sais |                  |                  | Tratamentos (μA)<br>2x por dia no<br>Conway 8.5% de<br>sais |                  | Controle<br>AP   | Tratamentos (μA) com AP<br>8.5% de sais |                  |                  | Tratamentos (μA)<br>2x por dia na AP<br>8.5% de sais |                  |
|---|--------------------|---|------------------|------------------|---|------------------|------------------|---|------------------|------------------|--|------------------|
|   |                    | 50  | 750              | 990              | 50  | 990              |                  | 50                                      | 750              | 990              | 50   | 990              |
| Tensão elétrica medida no meio<br>(mV)                    | -                  | 5<br>(±0.06)                                | 10<br>(±0.06)    | 25<br>(±0.06)    | 5<br>(±0.06)  | 25<br>(±0.06)    | -                | 5<br>(±0.01)                            | 9<br>(±0.01)     | 15<br>(±0.01)    | 5<br>(±0.01)   | 15<br>(±0.01)    |
| Resistência ou Impedância<br>Calculada do Meio (Ω)        | -                  | 100<br>(±0.06)                              | 13.3<br>(±0.06)  | 25.2<br>(±0.06)  | 100<br>(±0.06)  | 25.2<br>(±0.06)  | -                | 100<br>(±0.01)                          | 12<br>(±0.01)    | 15.15<br>(±0.01) | 100<br>(±0.01)                                       | 15.15<br>(±0.01) |
| Taxa de produtividade de<br>biomassa (g/L <sup>-1</sup> ) | 0.044<br>(±0.00)   | 0.080<br>(±0.00)                            | 0.081<br>(±0.00) | 0.085<br>(±0.00) | 0.066<br>(±0.00)  | 0.082<br>(±0.00) | 0.101<br>(±0.00) | 0.071<br>(±0.00)                        | 0.083<br>(±0.00) | 0.102<br>(±0.00) | 0.095<br>(±0.00)                                     | 0.092<br>(±0.00) |
| Taxa de produtividade lipídica<br>(g/L <sup>-1</sup> )    | 0.011<br>(±0.00)   | 0.012<br>(±0.00)                            | 0.019<br>(±0.00) | 0.019<br>(±0.00) | 0.012<br>(±0.00)  | 0.015<br>(±0.00) | 0.019<br>(±0.00) | 0.013<br>(±0.00)                        | 0.015<br>(±0.00) | 0.019<br>(±0.00) | 0.018<br>(±0.00)                                     | 0.017<br>(±0.00) |
| Clorofila α Total (μg/L)                                  | 4.91<br>(±0.13)    | 6.59<br>(±0.10)                             | 6.21<br>(±0.03)  | 6.35<br>(±0.07)  | 5.06<br>(±0.20)   | 5.93<br>(±0.03)  | 5.26<br>(±0.21)  | 6.66<br>(±0.11)                         | 7.44<br>(±0.24)  | 7.11<br>(±0.09)  | 4.76<br>(±0.11)                                      | 6.63<br>(±0.14)  |
| Carotenoides totais (μg/L)                                | 2.27<br>(±0.05)    | 3.04<br>(±0.02)                             | 2.29<br>(±0.00)  | 3.06<br>(±0.01)  | 1.47<br>(±0.05)   | 1.42<br>(±0.00)  | 2.60<br>(±0.07)  | 3.17<br>(±0.05)                         | 3.54<br>(±0.10)  | 3.40<br>(±0.04)  | 1.28<br>(±0.05)                                      | 1.53<br>(±0.05)  |
| Concentração inicial de DQO<br>(g/L)                      | 13.73<br>(±0.00)   | 13.73<br>(±0.00)                            | 13.73<br>(±0.00) | 13.73<br>(±0.00) | 13.73<br>(±0.00)  | 13.73<br>(±0.00) | 23<br>(±0.03)    | 23<br>(±0.03)                           | 23<br>(±0.03)    | 23<br>(±0.03)    | 23<br>(±0.03)  | 23<br>(±0.03)    |
| % de remoção de DQO                                       | 22<br>(±0.00)      | 20<br>(±0.00)                               | 19<br>(±0.00)    | 17<br>(±0.00)    | 23<br>(±0.00)   | 42<br>(±0.00)    | 72<br>(±0.01)    | 51<br>(±0.00)                           | 50<br>(±0.00)    | 52<br>(±0.00)    | 67<br>(±0.00)  | 71<br>(±0.01)    |
| Concentração inicial de N (mg/L)                          | 110<br>(±0.01)     | 110<br>(±0.01)                              | 110<br>(±0.01)   | 110<br>(±0.01)   | 110<br>(±0.01)  | 110<br>(±0.01)   | 276<br>(±0.01)   | 276<br>(±0.01)                          | 276<br>(±0.01)   | 276<br>(±0.01)   | 276<br>(±0.01)                                       | 276<br>(±0.01)   |
| % de remoção de N   | 98<br>(±0.01)      | 99<br>(±0.01)                               | 99<br>(±0.01)    | 99<br>(±0.01)    | 96<br>(±0.01)   | 98<br>(±0.01)    | 80<br>(±0.01)    | 60<br>(±0.01)                           | 60<br>(±0.01)    | 60<br>(±0.01)    | 60<br>(±0.01)  | 60<br>(±0.01)    |
| Concentração inicial de P (mg/L)                          | 6.58<br>(±0.00)    | 6.58<br>(±0.00)                             | 6.58<br>(±0.00)  | 6.58<br>(±0.00)  | 6.58<br>(±0.00)   | 6.58<br>(±0.00)  | 11.03<br>(±0.00) | 11.03<br>(±0.00)                        | 11.03<br>(±0.00) | 11.03<br>(±0.00) | 11.03<br>(±0.00)                                     | 11.03<br>(±0.00) |
| % de remoção de P   | 59<br>(±0.00)      | 60<br>(±0.00)                               | 59<br>(±0.00)    | 60<br>(±0.00)    | 57<br>(±0.00)   | 53<br>(±0.00)    | 63<br>(±0.02)    | 72<br>(±0.00)                           | 67<br>(±0.01)    | 70<br>(±0.00)    | 48<br>(±0.00)  | 52<br>(±0.00)    |

#### 4.4.6. Remoção de nutrientes

A água produzida é um efluente caracterizado por elevada concentração de NaCl e baixa carga orgânica. A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é um parâmetro utilizado para estimar o teor de matéria orgânica presente na amostra. O excesso de carga orgânica em efluentes pode causar impactos ambientais adversos, como acidificação, salinização e eutrofização (Brasil, 2006). Dessa forma, o controle dessa variável é essencial para a eficiência do tratamento do efluente.

De acordo com Ammar, et al., (2018), a elevada concentração de compostos presentes na água produzida, associada à alta salinidade, pode reduzir a taxa de remoção de DQO por microalgas. No entanto, espécies adaptadas a ambientes hipersalinos apresentam maior resistência ao estresse osmótico, podendo realizar e/ou estimular a biodegradação de compostos orgânicos.

Os resultados deste estudo demonstraram uma remoção significativa da Demanda Química de Oxigênio (DQO) ao longo do cultivo. No controle contendo apenas água produzida, a taxa de remoção atingiu 72%, um valor aproximadamente 24% superior ao observado nos cultivos submetidos à estimulação por corrente alternada (Tabela 12). Esses achados indicam que a própria água produzida pode fornecer condições favoráveis ao crescimento e metabolismo de *Dunaliella salina*, promovendo a biodegradação da matéria orgânica presente no meio.

O descarte inadequado da água produzida pode causar impactos ambientais significativos, principalmente devido à presença de nitrogênio e fósforo, que podem desencadear a formação de zonas hipóxicas e comprometer a qualidade dos ecossistemas aquáticos receptores (Geddes, 1984; Veil, et al., 2005). Dessa forma, mesmo quando presentes em baixas concentrações, esses nutrientes precisam ser removidos de forma eficiente durante o tratamento do efluente.

Hopkins et al., (2019), relataram que a remoção de nutrientes em microalgas está diretamente relacionada à salinidade do meio, visto que células expostas a condições hiperosmóticas podem aumentar o consumo de nitrato e fosfato para suprir demandas metabólicas e energéticas associadas ao crescimento.

Os resultados deste estudo (Tabela 12) indicam que a alta salinidade gerou um estresse significativo nas células, promovendo uma remoção de nitrato superior a 95% no meio Conway. Dentre os tratamentos avaliados, aqueles submetidos a estímulo elétrico diário a cada 24 horas, com correntes de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ , atingiram remoção de 99%.

No entanto, no cultivo realizado em água produzida, os resultados diferiram, apresentando um padrão semelhante ao observado para a remoção de DQO. A condição controle demonstrou a maior eficiência na remoção de nitrato (80%), enquanto os cultivos submetidos à corrente alternada removeram em média aproximadamente 60% do nutriente.

A menor eficiência na remoção de nitrato nos tratamentos com corrente alternada pode estar associada a um efeito adverso da estimulação elétrica sobre a fisiologia celular. Embora a corrente alternada possa ativar vias metabólicas alternativas, sua aplicação também pode induzir um estresse adicional às microalgas, comprometendo a assimilação de nutrientes. Possíveis mecanismos envolvidos incluem a interferência no transporte iônico, alteração da homeostase osmótica, modificação na atividade enzimática responsável pela assimilação de nitrogênio e fósforo, ou até mesmo impactos na eficiência fotossintética.

Por outro lado, a remoção de fosfato apresentou um comportamento distinto, sendo mais eficiente no meio com água produzida. No tratamento submetido a estímulo elétrico diário a cada 24 horas, a corrente de 50  $\mu\text{A}$  resultou em uma remoção de 72%, enquanto no meio Conway as correntes de 50 e 990  $\mu\text{A}$  promoveram remoções de 60% (Tabela 12). A maior remoção de fosfato na água produzida pode estar associada à maior disponibilidade inicial desse nutriente, que apresentou uma concentração de 11,03 mg/L, em comparação a 6,58 mg/L no meio Conway. Além disso, a especiação química do fósforo na água produzida pode ter favorecido sua assimilação pelas microalgas. A presença de outros compostos nesse meio também pode ter atuado como um fator de bioestimulação, intensificando a atividade metabólica das células e, consequentemente, a remoção de fosfato.

Diante disso, estudos complementares, como análises de expressão gênica e atividade enzimática, são necessários para compreender melhor os efeitos da corrente alternada sobre a remoção de nutrientes e otimizar o uso dessa abordagem no tratamento de efluentes salinos.

## 4.5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo reforçam o potencial de utilização de estímulos elétricos como ferramenta para otimizar o cultivo de microalgas, especialmente em meios residuais como a água produzida. Além disso, a *D. salina* demonstrou ser uma microalga

resiliente e versátil, com capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, posicionando-se como uma candidata promissora para aplicações industriais, incluindo produção de biodiesel, bioprodutos e tratamento de efluentes.

No entanto, a escolha dos parâmetros de estimulação elétrica deve ser feita com base nos objetivos específicos do processo, destacando a necessidade de um equilíbrio entre intensidade e tempo de exposição para otimizar os resultados. Embora o aumento na exposição ao estímulo elétrico possa favorecer a produção de biomassa na microcorrente alternada de 990  $\mu\text{A}$  no meio Conway e AP, ele pode ser contraproducente para a produção de lipídios e o crescimento específico. O uso do resíduo industrial petrolífero demonstrou potencial como meio de cultivo economicamente viável para *D. salina*, especialmente devido às suas características intrínsecas que favorecem o crescimento microalgal. A composição rica e complexa da água produzida, com 8,5% de sais e possíveis compostos tóxicos, pode ter interagido de maneira mais intensa com o estímulo elétrico aplicado duas vezes ao dia, promovendo alterações metabólicas ou condições estressantes adicionais que impactaram positivamente a produção de biomassa, mas negativamente o crescimento e a produção lipídica.

Portanto, é fundamental que a exposição do estímulo elétrico seja cuidadosamente ajustada de acordo com as características físico-químicas específicas de cada meio de cultivo, seja ele efluente ou meio sintético. Os resultados sugerem que a aplicação de microcorrente uma vez ao dia pode ser mais eficiente e economicamente viável para maximizar o crescimento microalgal e a produção lipídica.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

Ammar, S. H.; Khadim, H. J.; Mohamed, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 132-142, (2018).

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC (2005).

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, (2019).

- Arriada, A. A.; Abreu, P. C. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, v. 8, n. 3, (2014).
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs* 17, no. 5, 304, (2019).
- Ben-Amotz, A.; Avron, M. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant physiology*, v. 51, n. 5, p. 875-878, (1973).
- Chen, H.; Jiang, J. G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of cellular physiology* 219, no. 2, 251-258, (2009).
- Chinalia, F. A., Paton, G. I., & Killham, K. S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. *Bioresource technology*, 99(4), 714-721 (2008).
- Conceição, G.R.; Silva, C.S.; Vale, T.O.; Santos, J.N.; Matos, J.B.L.; Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, (2023).
- Fitriana, H. N.; Lee, S. Y.; Choi, S. A.; Lee, J. Y.; Kim, B. L.; Lee, J. S.; Oh, Y. K. Electric stimulation of astaxanthin biosynthesis in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Sciences* 11, 8, 3348, (2021).
- FUTURE MARKET INSIGHTS. Microalgae Market Outlook (2023 to 2033), Food and Beverage, 2022. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/microalgae-market>. Acesso em: 10 out. (2023).
- Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Ng, Y. C., And Nichols, A. V. Serum lipide analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 449-464, (1956).
- Geddes, M. C. Limnology of Lake Alexandrina, River Murray, South Australia, and the effects of nutrients and light on the phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, v. 35, n. 4, p. 399-415, 1984.
- Gusbeth, C. A.; Eing, C.; Göttel, M.; Frey, W. Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment. In 2013 Abstracts IEEE international conference on plasma science (ICOPS) (pp. 1-1), (2013). IEEE.
- Haberkorn, I., Buchmann, L., Hiestand, M., & Mathys, A. Continuous nanosecond pulsed electric field treatments foster the upstream performance of *Chlorella vulgaris*-based biorefinery concepts. *Bioresource technology*, 293, 122029 (2019).
- He, Z. Jin, W., Zhou, X., Han, W., Gao, S., Chen, C., ... & Jiang, G. Enhancing biomass and lipid yield of microalga *Scenedesmus obliquus* by the periodic direct current. *Journal of Water Process Engineering*, v. 48, p. 102872, (2022).
- Hoefnagel, M. H; Atkin, O. K.; Wiskich, J. T. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1366, n. 3, p. 235-255, (1998).

- Hopkins, T. C., Graham, E. J. S., Schwilling, J., Ingram, S., Gómez, S. M., & Schuler, A. J. Effects of salinity and nitrogen source on growth and lipid production for a wild algal polyculture in produced water media. *Algal Research*, 38, 101406, (2019).
- Huesemann, M. H.; Benemann, J. R. Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella sp.* The alga *Dunaliella*: Biodiversity, physiology, genomics, and biotechnology. Enfield: Science Publishers, (2009).
- Jiménez, S.; Micó, M. M.; Arnaldos, M.; Medina, F.; Contreras, S. State of the art of produced water treatment. *Chemosphere*, v. 192, p. 186-208, (2018).
- Keeny, D. R.; Nelson, D. W. Inorganic forms of nitrogen. *Methods of Soil Analysis*, Part, 2, 643-98, (1982).
- Kotnik, T.; Kramar, P.; Pucihar, G.; Miklavcic, D.; Tarek, M. Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28(5), 14-23 (2012).
- Laughton, M. A.; Say, M. G. (Ed.). *Electrical engineer's reference book*. Elsevier, (2013).
- Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavčič, D. Electroporation in food processing and biorefinery. *The Journal of membrane biology*, v. 247, p. 1279-1304, (2014).
- Masojídek, J., Ranglova, K., Lakatos, G. E., Silva Benavides, A. M., & Torzillo, G. Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures. *Processes*, v. 9, n. 5, p.820, (2021).
- Nezammahalleh, H.; Ghanati, F.; Adams Ii, T. A.; Nosrati, M.; Shojaosadati, S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, v. 218, p. 700-711, (2016).
- PETROBRÁS. Relatório de sustentabilidade 2023: Relatório anual. Rio de Janeiro, 2024. Disponível em: <https://sustentabilidade.petrobras.com.br/documents/1449993/82badcb9-71d0-47be-67dc-cbc99aa48a56>. Acesso em: 24 dez. (2024).
- Rowan, K.S. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press. Archive, (1989).
- Sahm, F.; Freiin Grote, V.; Zimmermann, J.; Haack, F.; Uhrmacher, A. M.; Van Rienen, U.; Barder, R.; Detsch, R.; Jonitz-Heincke, A. Long-term stimulation with alternating electric fields modulates the differentiation and mineralization of human pre-osteoblasts. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 965181, (2022).
- Sivaramakrishnan, R., Suresh, S., Kanwal, S., Ramadoss, G., Ramprakash, B., & Incharoensakdi, A. Microalgal biorefinery concepts' developments for biofuel and bioproducts: Current perspective and bottlenecks. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 5, p. 2623, (2022).
- Sun, H.; Zhao, W.; Mao, X.; Ren, Y.; Wu, T.; Chen, F. Cost-effective wastewater treatment in a continuous manner by a novel bio-photoelectrolysis cell (BPE) system. *Bioresource technology*, 273, 297-304, (2019).

Tieleman, D. P. The molecular basis of electroporation. BMC biochemistry, 5, 1-12 (2004).

Tsong, T. Y.; Liu, D. S.; Chauvin, F.; Gaigalas, A; Astumian, R. D. Electroconformational coupling (ECC): An electric field induced enzyme oscillation for cellular energy and signal transductions. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 21, n. 3, p. 319-331, (1989).

Veil, J. A.; Kimmell, T. A.; Rechner, A. C. Characteristics of produced water discharged to the Gulf of Mexico hypoxiczone (No. ANL/EAD/05-3). Argonne National Lab. (ANL), Argonne, IL (United States), 2005.

Walne, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Journal of Fishery Investigations, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, Series 2, 25-53 (1966).

## CAPÍTULO IV - Role of low-level alternating current and impedance for enhancing microalgae biomass and lipid production



Journal of Bioscience and Bioengineering

Available online 10 March 2025

In Press, Corrected Proof [What's this?](#)



# Role of low-level alternating current and impedance for enhancing microalgae biomass and lipid production

Carine Souza da Silva <sup>1</sup>✉, Gustavo Miranda Pires Santos <sup>2</sup>✉,  
Gabriele Rodrigues Conceição <sup>1</sup>✉, Ian da Silva Andrade <sup>1</sup>✉, Alana Nogueira Silva <sup>1</sup>✉,  
Rodrigo Miranda Pires Santos <sup>2</sup>✉, Paulo Fernando de Almeida <sup>2</sup>✉,  
Fabio Alexandre Chinalia <sup>1</sup> ✉

[Show more](#)

Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2025.02.001>

[Get rights and content](#)

## CAPÍTULO V - ESTÍMULO ELÉTRICO INTERMITENTE NO CULTIVO DE *D. salina*

### 5.1. INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas tem despertado interesse crescente devido à sua ampla aplicação em biotecnologia, incluindo a produção de biocombustíveis, pigmentos e compostos bioativos de alto valor agregado. *Dunaliella salina* é uma das espécies mais estudadas para esses fins, destacando-se por sua capacidade de crescer em condições extremas de salinidade e por produzir lipídios e carotenoides, que possuem grande relevância comercial (Chen & Jiang, 2009; Kiran, et al. 2014; Tinoco, et al., 2015). Entretanto, avanços na otimização do cultivo ainda são necessários para maximizar sua produtividade e viabilizar economicamente o uso em larga escala.

Entre as estratégias emergentes para otimizar o cultivo de microalgas, a aplicação de estímulos físicos, como correntes elétricas, tem se mostrado promissora por seu potencial em modular o metabolismo microalgal, promovendo maior produção de biomassa e biocompostos (Arriada, et al., 2014; Ammar, et al., 2018; He, et al., 2022; Sun, et al., 2019). Para espécies como *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, estudos indicam que a aplicação de campos elétricos estáticos ou pulsados pode aumentar a permeabilização celular, facilitando a absorção de nutrientes e gerando aumentos significativos tanto na biomassa quanto no rendimento lipídico (Nezammahalleh, et al., 2016; Gusbeth, et al., 2013; Haberkorn, et al., 2019). No entanto, a aplicação de correntes elétricas em *Dunaliella salina*, uma microalga de interesse industrial, ainda não foi investigada, representando uma lacuna importante na literatura científica.

A introdução de regimes de estímulo intermitente, alternando períodos de aplicação e repouso, pode representar um avanço significativo em relação aos estímulos contínuos tradicionalmente testados (La, et. al., 2016; Corpuz, et al., 2021). Essa abordagem tem o potencial de minimizar os danos celulares associados à aplicação prolongada de corrente elétrica, ao mesmo tempo que permite a recuperação metabólica entre os ciclos de estímulo. Além disso, diferentes frequências de corrente podem influenciar de forma distinta o metabolismo das células, destacando a necessidade de explorar essas variáveis para identificar condições ideais de cultivo.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de estímulos elétricos intermitentes com corrente alternada sobre o crescimento e a produção de bioprodutos

por *D. salina* em meio sintético. Este trabalho busca não apenas explorar o impacto de regimes de estímulo intermitente em *D. salina*, mas também contribuir com dados inéditos para o avanço de bioprocessos envolvendo microalgas, oferecendo insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis e eficientes de cultivo.

## 5.2. OBJETIVO

Avaliar o crescimento e a produção de bioprodutos de *D. salina* sob estímulos elétricos intermitentes aplicados em diferentes intensidades e frequências de corrente alternada.

### 5.2.1. Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do estímulo elétrico intermitente em diferentes intensidades de corrente alternada no crescimento celular de *Dunaliella salina*.
- Analisar o efeito do estímulo elétrico intermitente em diferentes frequências de corrente alternada no crescimento celular de *Dunaliella salina*.
- Avaliar a influência de diferentes frequências de corrente alternada sobre o rendimento de bioprodutos, como lipídios, pigmentos e proteínas, em *Dunaliella salina*.
- Investigar a interação entre intensidade e frequência da corrente alternada no aumento da produção de biomassa e biocompostos por *D. salina*.

## 5.3. METODOLOGIA

### 5.3.1. Sistema Experimental

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 500 mL, conectados a uma fonte de alimentação elétrica (Neurodyn, modelo ME03361A, Brasil) e a um osciloscópio (Osciloscópio 100 MHz, 2 canais, Minipa MVB-DSO, Brasil) para monitoramento das características elétricas do meio.

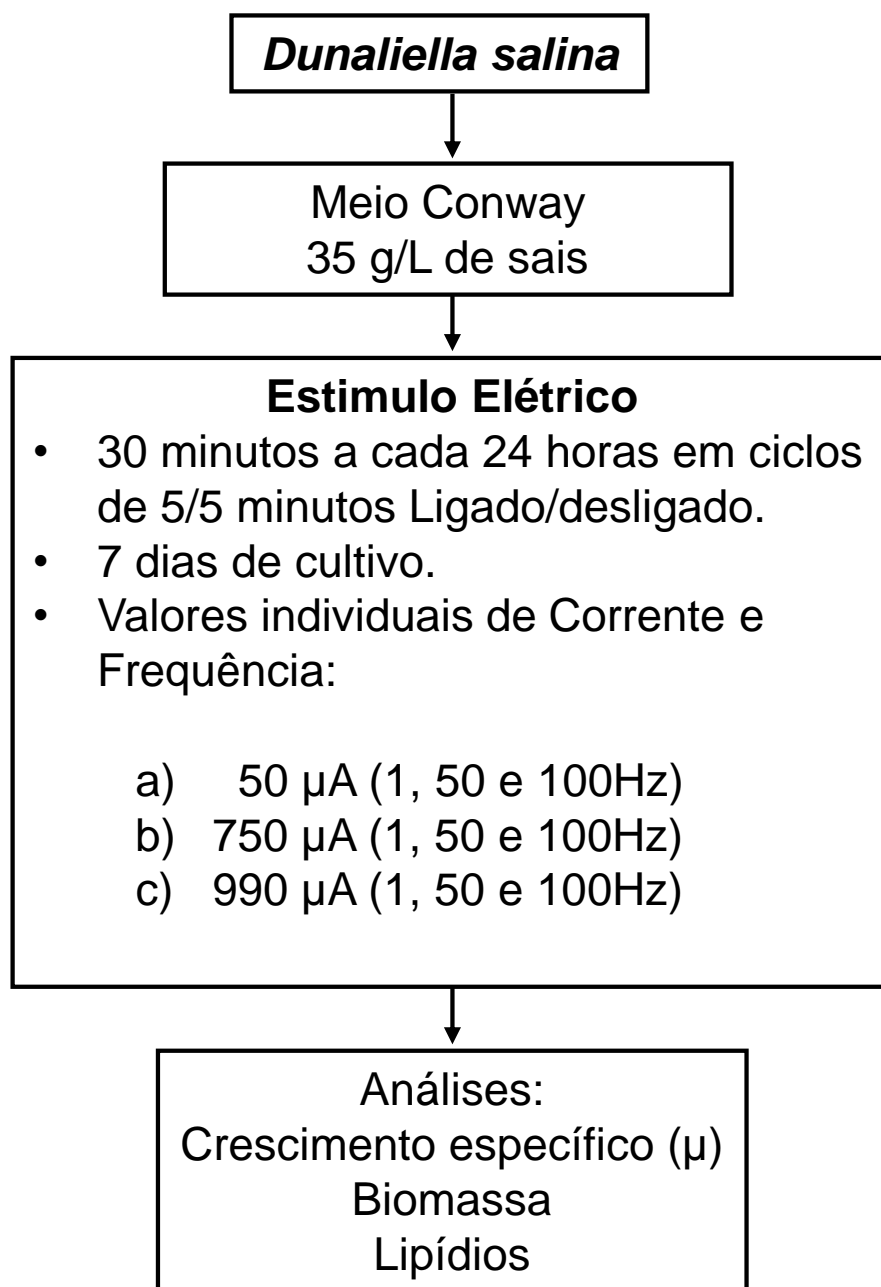
Cada frasco foi equipado com quatro eletrodos de aço inoxidável (AISI 302, número 19, diâmetro de 0,80 mm), posicionados equidistantes ( $7\text{ cm} \pm 0,5$ ) nas tampas. Dois eletrodos foram utilizados para introduzir a corrente alternada no meio de cultivo, enquanto os outros dois estavam conectados ao osciloscópio para medir a tensão no líquido. O aço inoxidável foi escolhido devido à sua alta resistência à corrosão e estabilidade estrutural sob condições elétricas variáveis, além de minimizar efeitos de eletrólise, garantindo estímulos consistentes e reduzindo possíveis contaminações ou degradação do meio de cultivo.

As culturas de *Dunaliella salina* foram cultivadas em meio Conway com salinidade de 3,5%. A estimulação elétrica foi realizada em triplicatas, utilizando microcorrentes alternadas de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ , em frequências de 1, 50 e 100 Hz, em ciclos de 5 minutos ligados e 5 minutos desligados, totalizando 30 minutos diários de corrente aplicada, distribuídos em seis ciclos de 5 minutos ao longo de 7 dias. Como controle, foram mantidas cepas sem estímulos elétricos, assim como cepas submetidas a estímulo contínuo de corrente alternada de 30 minutos diários, nas intensidades de 50, 750 e 990  $\mu\text{A}$  (Figura 10).

As condições de cultivo foram mantidas constantes, com intensidade luminosa de 3800 lux, agitação a 100 rpm, aeração com ar atmosférico, temperatura de 25 °C ( $\pm 2$ ), pH controlado entre 6 e 7, e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Durante o experimento, amostras foram coletadas diariamente para análise de pigmentos fotossintéticos e densidade óptica a 680 nm utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D). Além disso, análises químicas de lipídios, nitrogênio (N) e fósforo (P) foram realizadas no início e no final do cultivo, garantindo um monitoramento completo dos parâmetros experimentais.

Figura 10. Fluxograma da metodologia experimental.



### 5.3.2. Microalga

A microalga *Dunaliella salina*, foi selecionada devido à sua elevada halotolerância e significativo conteúdo lipídico, que varia de 15% a 68% (Huesemann, et al., 2009). As cepas utilizadas foram cedidas pelo Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) da Universidade Federal da Bahia.

A manutenção da microalga foi realizada no meio Conway com salinidade ajustada a 35 g de STD/L, seguindo o protocolo adaptado de Walne, (1966). O meio foi preparado utilizando uma solução principal (Tabela 13) combinada com uma solução de vitaminas (Tabela 14) em água marinha sintética. Para a reconstituição da água marinha sintética, foram utilizados sais marinhos comerciais (Red Sea Salt, Red Sea Ltda), frequentemente empregados em aquários ornamentais.

Tabela 13. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.

| Componentes  | Valores (g/L) |
|--|---------------|
| $C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ (Na EDTA sal sódico)     | 45            |
| $H_3BO_3$ (Ácido Bórico)                                   | 33.6          |
| $NaNO_3$ (Nitrato de Sódio)                                | 100           |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Cloreto de Manganês)                 | 0.36          |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Cloreto de Ferro)                    | 1.30          |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Fosfato dissódico di-hidrogenado) | 20.0          |

Tabela 14. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.

| Concentração                   | Valores (mg/L) |
|--------------------------------|----------------|
| Vitamina B12 - Cianocobalamina | 5              |
| Vitamina B1 - Biotina          | 100            |

### 5.3.3. Cinética de Crescimento e Análise Estatística

Os parâmetros cinéticos de crescimento foram calculados aplicando regressão linear na fase exponencial de acumulação de biomassa (taxas de produção). Além disso, o logaritmo natural (LN) da acumulação de biomassa foi submetido à regressão linear para estimar o coeficiente de crescimento ( $\mu$ ), conforme descrito por Chinalia, et al., (2008). Os parâmetros cinéticos de todos os tratamentos foram analisados estatisticamente em triplicatas usando ANOVA (software Minitab v2021).

### 5.3.4. Análise Química

A extração lipídica foi realizada conforme o método de Freeman, et al., (1957), utilizando uma solução de clorofórmio/metanol (2:1), de acordo com a metodologia descrita por Conceição, et al., (2023).

No início e no final do experimento, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foi analisado para determinar as concentrações de fosfato conforme protocolo adaptado de Keeny & Nelson (1982). O fosfato foi determinado pela reação

com reagentes mistos contendo molibdato de amônio, ácido sulfúrico, ácido ascórbico e tartarato de antimônio e potássio, com leitura de absorvância a 882 nm. A determinação de nitrato foi realizada utilizando o kit colorimétrico CARD Kit Nitrato NTD (Alfakit, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

## **5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este estudo avaliou os efeitos de estímulos elétricos intermitentes sobre o crescimento e a produção de biomassa, clorofila  $\alpha$ , carotenoides e lipídios por *Dunaliella salina*. Para tanto, as culturas foram submetidas a ciclos de estímulos elétricos de ciclos de 5 minutos ligados e 5 minutos desligados, totalizando seis ciclos ao longo de 30 minutos diários, em frequências de 1, 50 e 100 Hz. Os resultados obtidos foram comparados a culturas submetidas a estímulos contínuos (30 minutos a cada 24 horas, frequência de 1 Hz) e a controles sem estímulo elétrico. Os dados obtidos indicaram que os estímulos intermitentes afetaram significativamente a produção de biomassa e a concentração de compostos bioativos, com resultados que corroboram estudos anteriores sobre os benefícios dos estímulos elétricos em microalgas.

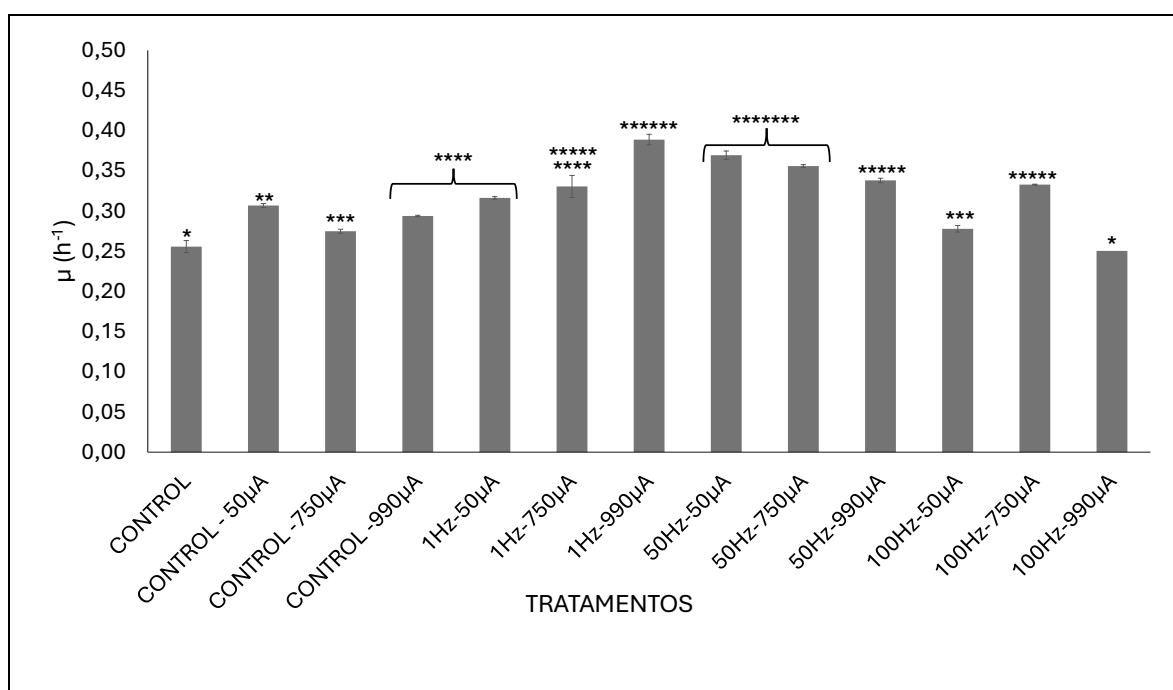
### **5.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ )**

A análise das taxas de crescimento específico observadas nos diferentes tratamentos mostra uma variação significativa em resposta aos estímulos elétricos aplicados. O tratamento com corrente alternada de 990  $\mu$ A a 1 Hz resultou na maior taxa de crescimento específico ( $0,38 \text{ d}^{-1}$ ), superior a todos os outros tratamentos experimentais, incluindo os controles e os tratamentos com diferentes intensidades e frequências (Figura 11).

Esse valor representa um aumento expressivo de 52% em relação ao controle sem estímulo elétrico e de 31% em comparação ao tratamento com corrente contínua (990  $\mu$ A a 1 Hz). Esses resultados indicam que os estímulos intermitentes são mais eficazes para promover o crescimento celular, provavelmente porque os períodos de repouso entre os ciclos de estimulação permitem a recuperação metabólica das células. Durante essas pausas, as células podem otimizar seu metabolismo e se preparar para o próximo ciclo de estímulo, o que contribui para um maior aproveitamento dos estímulos e um aumento significativo na taxa de crescimento (La, et al., 2016).

Ao comparar os resultados do estímulo a 990  $\mu\text{A}$  e 1 Hz com frequências mais altas, como 50 Hz e 100 Hz, verificou-se a frequência de 1 Hz proporcionou aumentos de 15% e 52%, respectivamente, em relação aos tratamentos de 50 e 100 Hz. Esses dados reforçam que frequências mais baixas, como 1 Hz, são mais eficazes para equilibrar os estímulos e evitar possíveis efeitos adversos associados a frequências mais altas, como estresse celular ou danos estruturais (Haberkorn, et al., 2019). Assim, a frequência de 1 Hz parece ser ideal para otimizar o crescimento de *Dunaliella salina* em condições de estímulo intermitente.

Figura 11. Taxa de Crescimento Específico. Crescimento específico da *Dunaliella salina* em meio Conway com 3,5 % de sais, sob estímulo elétrico intermitente (5 minutos ligados e 5 minutos desligados) em diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e frequências (1, 50 e 100 Hz), e seus controles sem exposição à corrente alternada e sob estímulo contínuo de corrente (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e 1 Hz de frequência. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



#### 5.4.2. Produção de Biomassa

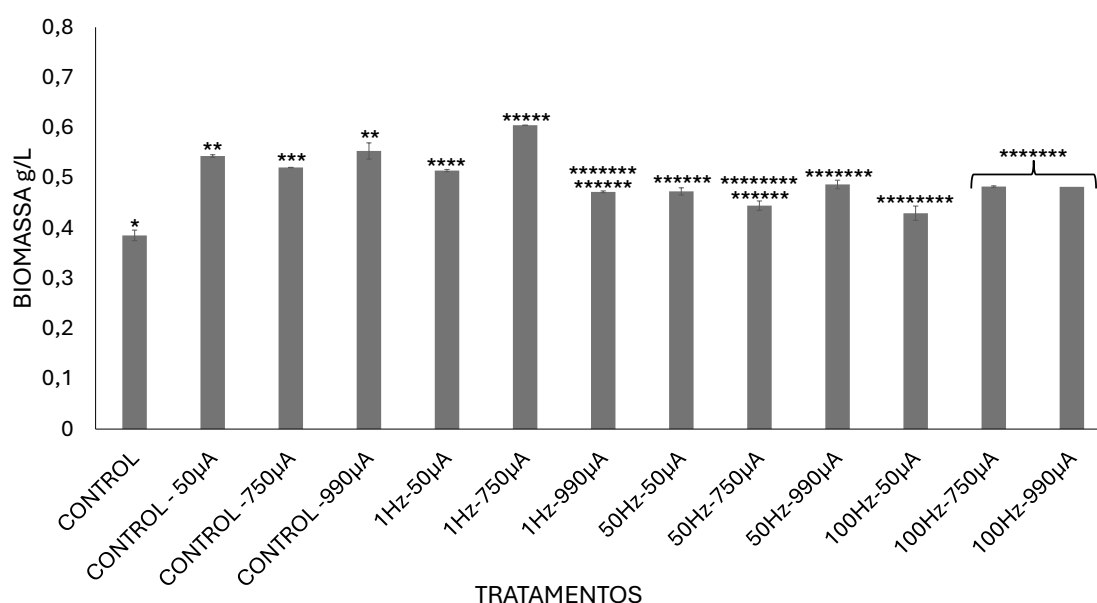
O estímulo intermitente de 1 Hz destacou-se como o mais eficiente para o acúmulo de biomassa, com a corrente alternada de 750  $\mu\text{A}$  apresentando uma produção de 0,60 g/L (Figura 12). Esse valor mostrou-se estatisticamente superior aos demais tratamentos, representando aumentos de 57% em relação ao controle sem estímulo elétrico e de 15% em comparação ao tratamento com corrente contínua na mesma intensidade (750  $\mu\text{A}$ ).

Ao comparar o tratamento intermitente de 750  $\mu\text{A}$  a 1 Hz com as frequências de 50 e 100 Hz na mesma intensidade de corrente, observou-se incrementos de 36% e 25%, respectivamente, corroborando a hipótese de que frequências mais baixas são mais

eficazes para estimular o crescimento e a produção de biomassa microalgal. Resultados semelhantes foram reportados por Haberkorn, et al., (2019), que verificaram que *Chlorella vulgaris* estimulada com corrente contínua, intensidade de campo elétrico de 10 kV/cm (100 A) e frequência de 5 Hz apresentou um aumento de 8% na produção de biomassa em comparação ao controle. O estudo concluiu que frequências mais baixas aumentam a sensibilização celular ao campo elétrico, promovendo maior permeabilização das membranas e permitindo que as células tenham mais tempo para se adaptar e responder aos pulsos elétricos, resultando em maior acúmulo de biomassa.

Esses resultados indicam que o estímulo elétrico intermitente em baixa frequência, combinado com a intensidade de corrente adequada, é uma estratégia promissora para a otimização do cultivo de *D. salina*, maximizando a produção de biomassa com custos reduzidos.

Figura 12. Produção de Biomassa. Acúmulo de biomassa da *Dunaliella salina* em meio Conway com 3,5 % de sais, sob estímulo elétrico intermitente (5 minutos ligados e 5 minutos desligados) em diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu$ A) e frequências (1, 50 e 100 Hz), e seus controles sem exposição à corrente alternada e sob estímulo contínuo de corrente (50, 750 e 990  $\mu$ A) e 1 Hz de frequência. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



### 5.4.3. Produção Lipídica

Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento intermitente com corrente alternada de 750  $\mu$ A a 1 Hz apresentou o maior rendimento lipídico, alcançando 0,133 g/L (Figura 13). Esse valor representou um aumento significativo de aproximadamente

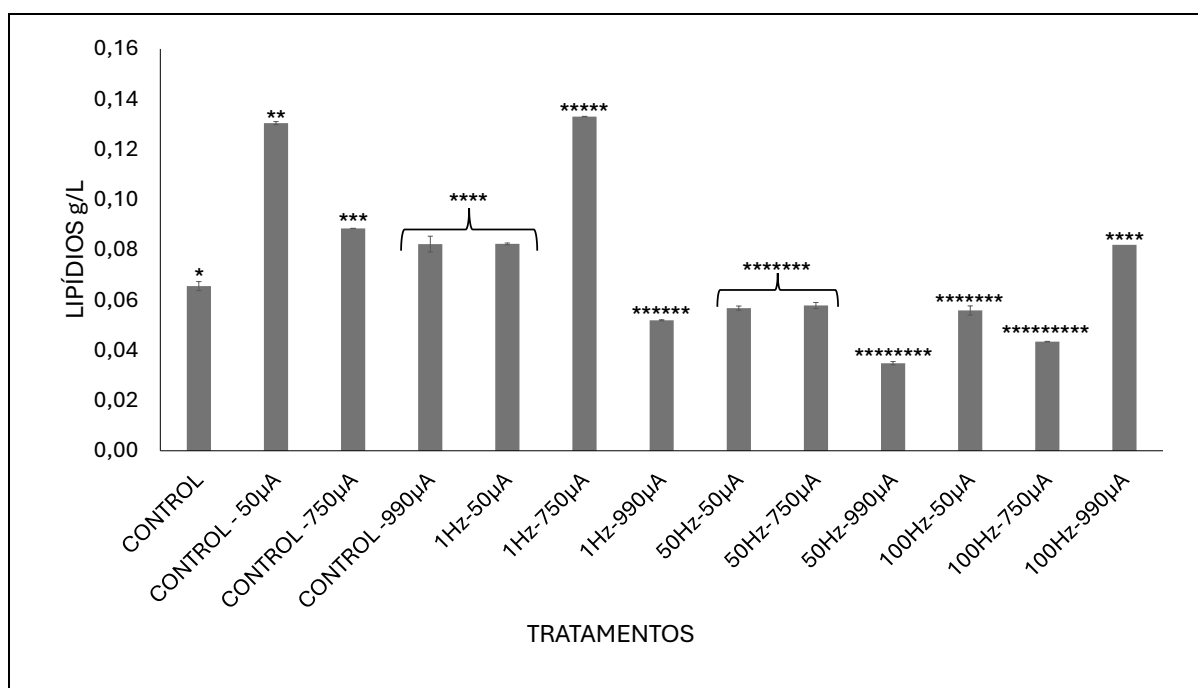
104% em comparação ao controle sem estímulo elétrico e de 51% em relação ao tratamento contínuo na mesma intensidade de corrente (750  $\mu$ A). Esses achados indicam que o estímulo elétrico intermitente é uma abordagem eficaz para maximizar a produção lipídica em *Dunaliella salina*.

Estudos anteriores corroboram essa observação. La, et al. (2016) relataram que o cultivo de *Acutodesmus dimorphus* em ciclos intermitentes (2 segundos ligado e 60 segundos desligado), sob campo elétrico pulsado e corrente contínua de 1,56 A, resultou em um aumento de 28% na produtividade lipídica em relação ao controle. Os autores sugerem que os intervalos de repouso entre os estímulos elétricos permitem que as microalgas se recuperem metabolicamente, promovendo o acúmulo de lipídios neutros para armazenamento energético sem prejudicar o crescimento celular.

Ao comparar o tratamento intermitente de 750  $\mu$ A a 1 Hz com as frequências mais altas (50 Hz e 100 Hz) na mesma intensidade de corrente, os resultados evidenciaram que a frequência de 1 Hz resultou em um rendimento lipídico 133% maior que a frequência de 50 Hz e 209% maior que a de 100 Hz. Esses dados reforçam que frequências mais baixas favorecem o acúmulo lipídico, possivelmente devido à maior sensibilização celular ao estímulo elétrico e ao aumento da permeabilidade da membrana, que facilita a assimilação de nutrientes e a canalização dos metabólitos para vias de armazenamento energético.

A aplicação de estímulos intermitentes, combinando baixa frequência e intensidade de corrente ajustada, demonstra ser uma estratégia promissora para a otimização da produção lipídica em cultivos de microalgas, apresentando ainda potencial para redução de custos energéticos no processo.

Figura 13. Produção de Lipídios. Acúmulo de lipídios da *Dunaliella salina* em meio Conway com 3,5 % de sais, sob estímulo elétrico intermitente (5 minutos ligados e 5 minutos desligados) em diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e frequências (1, 50 e 100 Hz), e seus controles sem exposição à corrente alternada e sob estímulo contínuo de corrente (50, 750 e 990  $\mu\text{A}$ ) e 1 Hz de frequência. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



#### 5.4.4. Remoção de nutrientes

Tabela 15. Remoção de nutrientes. Remoção de nitrato e fosfato da *Dunaliella salina* em meio Conway com 3,5 % de sais, sob estímulo elétrico intermitente (5 minutos ligados e 5 minutos desligados) em diferentes intensidades de corrente alternada (50, 750 e 990  $\mu$ A) e frequências (1, 50 e 100 Hz), e seus controles sem exposição à corrente alternada e sob estímulo contínuo de corrente (50, 750 e 990  $\mu$ A) e 1 Hz de frequência.

|                           | Tratamentos ( $\mu$ A) com meio Conway 3,5% de sais |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|---------------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                           | Tratamento contínuo (1 Hz)                          |                         |                         |                         |                         | Tratamento intermitente |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|                           | Controle  | 50 $\mu$ A              | 750 $\mu$ A             | 990 $\mu$ A             | 1 Hz -<br>50 $\mu$ A    | 1 Hz -<br>750 $\mu$ A   | 1 Hz -<br>990 $\mu$ A   | 50 Hz -<br>50 $\mu$ A   | 50 Hz -<br>750 $\mu$ A  | 50 Hz -<br>990 $\mu$ A  | 100 Hz -<br>50 $\mu$ A  | 100 Hz -<br>750 $\mu$ A | 100 Hz -<br>990 $\mu$ A |
| Nitrato Inicial<br>(mg/L) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ )                             | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) | 110,7<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Remoção de<br>Nitrato (%) | 96<br>( $\pm 0,00$ )                                | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 98<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 98<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 98<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    | 99<br>( $\pm 0,00$ )    |
| Fosfato Inicial<br>(mg/L) | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )                              | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  | 7,74<br>( $\pm 0,01$ )  |
| Remoção de<br>Fosfato (%) | 88<br>( $\pm 0,00$ )                                | 85<br>( $\pm 0,00$ )    | 86<br>( $\pm 0,00$ )    | 89<br>( $\pm 0,00$ )    | 59<br>( $\pm 0,00$ )    | 60<br>( $\pm 0,00$ )    | 98<br>( $\pm 0,00$ )    | 63<br>( $\pm 0,00$ )    | 63<br>( $\pm 0,00$ )    | 63<br>( $\pm 0,00$ )    | 60<br>( $\pm 0,00$ )    | 65<br>( $\pm 0,00$ )    | 61<br>( $\pm 0,00$ )    |

Os resultados demonstraram uma remoção eficiente de nitrato em todos os tratamentos, com taxas superiores a 98%. No entanto, a ausência de diferença significativa entre os controles e os tratamentos indica que a aplicação de corrente elétrica não teve um impacto relevante nesse parâmetro (Tabela 15). Isso sugere que a assimilação do nitrato pode ter ocorrido predominantemente devido ao metabolismo natural da *Dunaliella salina*, sem influência direta da estimulação elétrica. Outra possibilidade é que a remoção já tenha atingido um patamar próximo ao máximo possível sob as condições do experimento, reduzindo a capacidade de detecção de efeitos adicionais da corrente elétrica.

Em relação ao fosfato, a aplicação de corrente de 990  $\mu$ A-1 Hz no tratamento intermitente resultou na melhor remoção, atingindo 98%. Esse valor representa um aumento de 11% e 10% em comparação ao controle sem estímulo e ao estímulo contínuo de 1 Hz a 990  $\mu$ A,

respectivamente (Tabela 15). Esse achado indica que a estimulação elétrica intermitente pode favorecer a remoção de fosfato, possivelmente por promover alterações transitórias na superfície celular da microalga, facilitando a adsorção ou assimilação do nutriente. Além disso, a modulação intermitente pode ter influenciado processos eletroquímicos no meio, como a precipitação de fosfato, um mecanismo que merece investigação mais aprofundada.

## 5.5. CONCLUSÃO

A aplicação de corrente alternada intermitente em microampère demonstrou um impacto positivo nos parâmetros de crescimento da *Dunaliella salina*, com destaque para o tratamento de 750  $\mu$ A a 1 Hz, que resultou um rendimento de aproximadamente 57% na produção de biomassa e 104% na produção de lipídios em relação ao controle sem estímulo.

Os resultados indicam que a utilização de corrente alternada intermitente no cultivo de *D. salina* em meio salino é uma abordagem promissora para maximizar a produção de biomassa e lipídios. Além disso, essa metodologia demonstra potencial como uma alternativa mais econômica e eficiente para o cultivo de microalgas, com aplicações relevantes nas indústrias de bioenergia, cosméticos e biotecnologia. Esses achados abrem novas perspectivas para o uso de estímulos elétricos na otimização de processos biotecnológicos.

## 5.6. REFERÊNCIAS

Ammar, S. H.; Khadim, H. J.; Mohamed, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 132-142, (2018).

Arriada, A. A.; Abreu, P. C. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, v. 8, n. 3, (2014).

Chen, H.; Jiang, J. G. "Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity." *Journal of cellular physiology* 219, no. 2, 251-258, (2009).

Conceição, G.R.; Silva, C.S.; Vale, T.O.; Santos, J.N.; Matos, J.B.L.; Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, (2023).

Chinalia, F. A., Paton, G. I., & Killham, K. S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. *Bioresource technology*, 99(4), 714-721 (2008).

Corpuz, M. V. A.; Borea, L.; Senatore, V.; Castrogiovanni, F.; Buonerba, A.; Oliva, G.; Ballesteros, F. Jr.; Zarra, T.; Belgiorno, V.; Choo, K. H., E Hasan, S.W. Wastewater treatment and fouling control in an electro algae-activated sludge membrane bioreactor. *Science of the total environment*, 786, 147475 (2021).

Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Ng, Y. C., And Nichols, A. V. Serum lipide analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 449-464, (1956).

Gusbeth, C. A.; Eing, C.; Göttel, M.; Frey, W. Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment. In 2013 Abstracts IEEE international conference on plasma science (ICOPS) (pp. 1-1), (2013). IEEE.

Haberkorn, I., Buchmann, L., Hiestand, M., & Mathys, A. Continuous nanosecond pulsed electric field treatments foster the upstream performance of *Chlorella vulgaris*-based biorefinery concepts. *Bioresource technology*, 293, 122029 (2019).

He, Z. Jin, W., Zhou, X., Han, W., Gao, S., Chen, C., ... & Jiang, G. Enhancing biomass and lipid yield of microalga *Scenedesmus obliquus* by the periodic direct current. *Journal of Water Process Engineering*, v. 48, p. 102872, (2022).

Huesemann, M. H.; Benemann, J. R. Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella sp.* In: Ben-Amotz, A.; Jacoby, B.; Vazquez-Romero, A. (Eds.). *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics, and Biotechnology*. Enfield, NH: Science Publishers, p. 445-474 (2009).

Keeny, D. R.; Nelson, D. W. Inorganic forms of nitrogen. *Methods of Soil Analysis*, Part, 2, 643-98, (1982).

Kiran, B.; Kumar, R.; Deshmukh, D. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*. v. 88, p. 1228– 1244, (2014).

La, H. J.; Choi, G. G.; Cho, C.; Seo, S. H.; Srivastava, A.; Jo, B. H.; Lee, J. Y.; Jin, Y. S.; Oh, H. M. Increased lipid productivity of *Acutodesmus dimorphus* using optimized pulsed electric field. *Journal of applied phycology* 28, 931-938 (2016).

Nezammahalleh, H.; Ghanati, F.; Adams Ii, T. A.; Nosrati, M.; Shojaosadati, S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, v. 218, p. 700-711, (2016).

Rowan, K.S. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press. Archive, (1989).

Sun, H.; Zhao, W.; Mao, X.; Ren, Y.; Wu, T.; Chen, F. Cost-effective wastewater treatment in a continuous manner by a novel bio-photoelectrolysis cell (BPE) system. *Bioresource technology* 273, 297-304, (2019).

Tinoco, N. A.; Teixeira, C. M. L.; De Rezende, C. M. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1421-1440, (2015).

Walne, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Journal of Fishery Investigations*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, 2, 25-53 (1966).

## **CAPÍTULO VI - ESTÍMULO LUMINOSO NO CULTIVO DE *D. salina***

### **6.1. INTRODUÇÃO**

As microalgas se destacam por sua alta produtividade e eficiência no uso de recursos presentes em efluentes ou água residuária (Conceição, et al., 2023; Sui, et al., 2021; Cheng, et al., 2022). No entanto, o seu desempenho é diretamente influenciado pelas condições de cultivo como a energia presente na iluminação e o seu comprimento de ondas (Schulze, et al., 2016; Teo, et al., 2014). É um grande desafio fornecer a quantidade e qualidade de luz mais adequados ao cultivo de microalga (Schulze, et al., 2016; De Almeida Moreira, et al., 2021). O uso de diodos emissores de luz (LED) surge como uma alternativa inovadora e promissora que não apenas permite uma maior eficiência energética na produção de luz, mas também o controle preciso do seu espectro luminoso, intensidade e fotoperíodo (Jin, et al., 2021; Sui, et al., 2021).

Estudos recentes têm explorado os efeitos da iluminação com LEDs em diferentes espécies de microalgas, demonstrando benefícios como aumento na taxa de crescimento celular e na produção de metabólitos de interesse (Song, et al., 2024; Tran-Nguyen, et al., 2023; Lan, et al., 2022). No entanto, a maioria das pesquisas tem sido realizada em meios sintéticos e controlados, enquanto lacunas permanecem quanto à aplicação prática dessa tecnologia em meios complexos, como a água produzida pela indústria de petróleo. Essa limitação destaca a necessidade de estudos que abordem a viabilidade do estímulo luminoso com LED em cenários que representem condições reais de uso.

Neste estudo, foram realizados experimentos com diferentes LED em meio sintético, incluindo as luzes azul, vermelho, rosa e branco, a fim de otimizar os parâmetros de cultivo. Esses resultados iniciais fornecem uma base importante para futuras investigações sobre o comportamento da microalga cultivada na água produzida sob estímulos luminosos, visando expandir o uso de LED no cultivo de microalgas em meios mais complexos e representar condições reais de aplicação, como o cultivo em água produzida.

## **6.2. OBJETIVO**

Avaliar o crescimento e acúmulo de biomassa e lipídios da microalga cultivada em meio sintético, submetidas a diferentes estímulos luminosos utilizando LED (azul, vermelho, rosa e branco).

### **6.2.1. Objetivos Específicos**

- Comparar o impacto de diferentes LED (azul, vermelho, rosa e branco) no cultivo de microalgas em meio sintético, avaliando a taxa de crescimento celular e a produção de biomassa e lipídios.
- Determinar a influência de diferentes comprimentos de onda de luz na eficiência fotossintética das microalgas, com base na produção de bioprodutos como lipídios.
- Analisar a viabilidade do uso de LED em sistemas de cultivo mais complexos, como a água produzida, em comparação com os meios sintéticos.

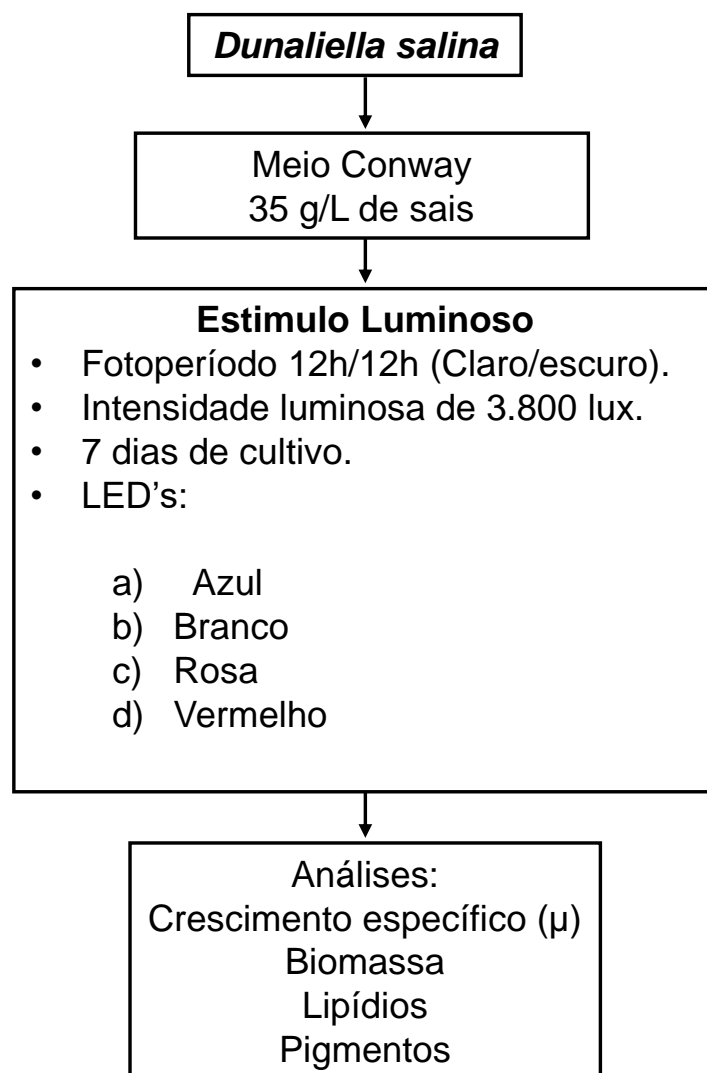
## **6.3. METODOLOGIA**

### **6.3.1. Desenho Experimental**

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com volume útil de 600 mL, em triplicata, com 60mL reservados para o inóculo. A estimulação luminosa foi fornecida por LED nas cores azul, rosa, vermelho e branco (controle), com intensidade luminosa de 3.800 lux. As condições de cultivo foram mantidas constantes, com agitação a 100 rpm, aeração com ar atmosférico, temperatura de 25 °C ( $\pm 2$ ), pH controlado entre 6 e 7, e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Utilizou-se o meio sintético Conway com 3,5% de concentração de sais (Figura 14).

Amostras foram coletadas diariamente para análise de pigmentos fotossintéticos e densidade óptica a 680 nm, utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D, Brasil). Além disso, análises químicas de lipídios, nitrogênio (N) e fósforo (P) foram realizadas no início e no final do cultivo, garantindo um monitoramento completo dos parâmetros experimentais.

Figura 14. Fluxograma da metodologia experimental.



### 6.3.2. Seleção de Microalga

*Dunaliella salina* da classe Chlorophyta foi escolhida por ser uma alga halotolerante com alto conteúdo lipídico (15-68%) (Huesemann, et al., 2009). Os exemplares foram doados pelo Banco de Microalgas Iracema Nascimento (BMIN) do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) da Universidade Federal da Bahia. A alga foi mantida no meio Conway com salinidade de 35 g de STD/L, conforme o protocolo adaptado Walne, (1966). O meio foi preparado misturando a composição principal (Tabela 16) com a solução de vitaminas (Tabela 17) em água marinha sintética. A água marinha sintética foi obtida dissolvendo sais marinhos da Red Sea Salt, um produto da marca Red Sea Ltda utilizado para reconstituição de água marinha para aquários ornamentais.

Tabela 16. Meio Conway. Composição da Solução Principal (P). É adicionado 1ml/L dessa solução em água marinha natural ou sintética.

| Componentes  | Valores (g/L) |
|--|---------------|
| $C_{10}H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ (Na EDTA sal sódico)     | 45            |
| $H_3BO_3$ (Ácido Bórico)                                   | 33.6          |
| $NaNO_3$ (Nitrato de Sódio)                                | 100           |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Cloreto de Manganês)                 | 0.36          |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Cloreto de Ferro)                    | 1.30          |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Fosfato dissódico di-hidrogenado) | 20.0          |

Tabela 17. Meio Conway. Composição da Solução de Vitaminas. A cada um litro é adicionado 0,1 ml dessa solução de vitaminas em água marinha natural ou sintética.

| Concentração                   | Valores (mg/L) |
|--------------------------------|----------------|
| Vitamina B12 - Cianocobalamina | 5              |
| Vitamina B1 - Biotina          | 100            |

### 6.3.3. Cinética de Crescimento e Análise Estatística

Os parâmetros cinéticos de crescimento foram calculados aplicando regressão linear na fase exponencial de acumulação de biomassa (taxas de produção). Além disso, o logaritmo natural (LN) do acúmulo de biomassa foi submetido à regressão linear para estimar o coeficiente de crescimento ( $\mu$ ), conforme descrito por Chinalia, et al., (2008). Os parâmetros cinéticos de todos os tratamentos foram analisados estatisticamente em triplicatas usando ANOVA (software Minitab v2021).

### 6.3.4. Análise Química

A cada 24 horas, alíquotas foram coletadas para monitorar o conteúdo de clorofila  $\alpha$ , clorofila  $\beta$  e carotenoides, seguindo o método descrito por Rowan, (1989). Resumidamente, as amostras foram extraídas com 92,8% de etanol em banho-maria por 30 minutos a 60 °C, e as densidades ópticas foram medidas a 662, 645 e 470 nm, utilizando um espectrofotômetro (Pro-tools V-1100D, Brasil).

No início e no final do experimento, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foi analisado para determinar as concentrações de fosfato, conforme protocolo adaptado de Keeny & Nelson, (1982). O fosfato foi determinado pela reação com reagentes mistos contendo molibdato de amônio, ácido sulfúrico, ácido ascórbico e tartarato de antimônio e potássio, com leitura de absorbância a 882 nm. A determinação de nitrato foi realizada utilizando o kit colorimétrico CARD Kit Nitrato NTD (Alfakit, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

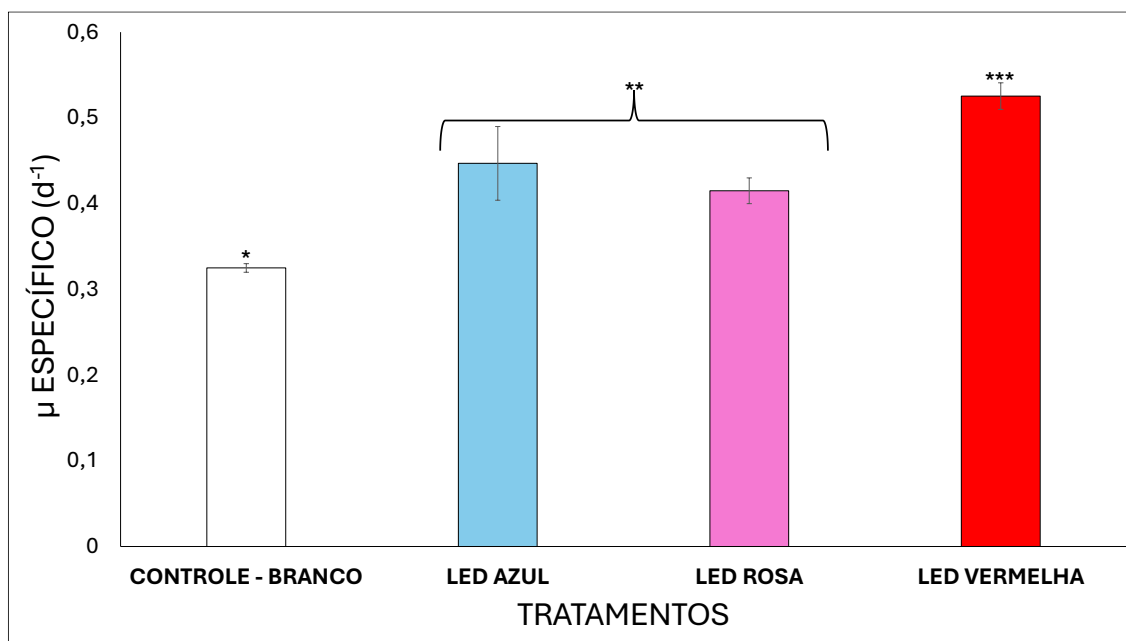
A extração lipídica foi realizada conforme o método de Freeman (1956), utilizando uma solução de clorofórmio/metanol (2:1), de acordo com a metodologia descrita por Conceição, et al., (2023).

## 6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Dunaliella salina* foi submetida a estímulos luminosos em diferentes comprimentos de luz LED, inicialmente em meio sintético, com o objetivo de otimizar seu crescimento, a fim de determinar os parâmetros de crescimento mais favoráveis. Os comprimentos de onda utilizados incluíram LED azul, vermelho, rosa e branco (controle), com intensidade luminosa de 3.800 lux, durante 7 dias, em regime de fotoperíodo de 12h/12 h (claro/escuro). Efeitos positivos foram observados com esses estímulos luminosos.

### 6.4.1. Taxa de Crescimento Específico ( $\mu$ ) em Meio Sintético

Figura 15. Crescimento Específico ( $\mu$ ). Coeficiente de crescimento específico da *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam os valores de crescimento específico para cada condição experimental da microalga no meio Conway com 3,5% de sais, exposta a diferentes comprimentos de onda de luz LED (branco, azul, rosa e vermelho), com intensidade de 3800 lux. (\*) Análise estatística.



A taxa de crescimento específico é um parâmetro importante para avaliar o crescimento e a multiplicação celular de microalgas em cultivo, refletindo diretamente na divisão celular e no aumento populacional. Esse parâmetro é fundamental para entender como diferentes estímulos, como a intensidade e a qualidade da luz, influenciam o

crescimento da *Dunaliella salina*. O tratamento com LED vermelho apresentou a maior taxa de crescimento específico ( $0,52 \text{ d}^{-1}$ ), com um rendimento de aproximadamente 62% em relação ao controle (Figura 15). Tran-Nguyen, et al., (2023) observaram um aumento de 80% no crescimento específico da *Dunaliella salina* ( $0,18 \text{ d}^{-1}$ ), cultivada em meio sintético na salinidade de 3,7%, sob LED vermelho, com intensidade de  $30 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$  (1.620 lux) e fotoperíodo 16h/8h (claro/escuro) durante 6 dias. Embora esses resultados confirmem os efeitos positivos do LED vermelho sobre o crescimento de *D. salina*, o presente estudo obteve uma taxa de crescimento específico quase três vezes maior, utilizando uma intensidade luminosa de 3800 lux, fotoperíodo 12h/12 h (claro/escuro) e cultivo por 7 dias, em meio sintético com 3,5% de sais. A diferença observada pode ser atribuída à intensidade luminosa, fotoperíodo e tempo de cultivo.

Por outro lado, Jin, et al., (2021) cultivaram *D. salina* em meio sintético com salinidade de 3,0% e intensidade de  $81,64 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  (4.898 lux) sob LED vermelho, com fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) durante 22 dias, e observaram uma redução de aproximadamente 11% na taxa de crescimento específico quando comparado ao controle (LED branco). Em contraste, a presente pesquisa, com *D. salina* cultivada em meio Conway (salinidade de 3,5%), obteve um crescimento específico mais de três vezes superior, corroborando a evidência de que variáveis como intensidade luminosa, fotoperíodo e tempo de cultivo impactam significativamente a taxa de crescimento de *D. salina*.

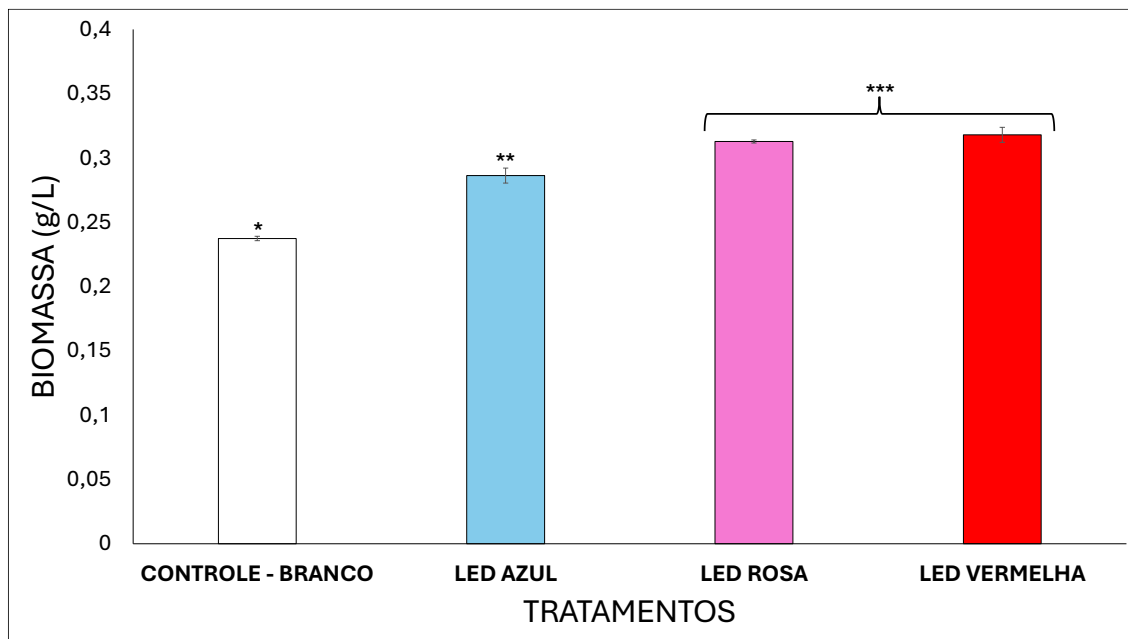
#### 6.4.3. Produção de Biomassa em Meio Sintético

A produção de biomassa em microalgas é um parâmetro fundamental para avaliar a viabilidade de seu cultivo em sistemas industriais e biotecnológicos. A eficiência na produção de biomassa está diretamente relacionada a fatores como a intensidade e qualidade da luz, a temperatura, a concentração de nutrientes e o fotoperíodo. No caso de *Dunaliella salina*, as condições impostas neste tratamento demonstraram que os comprimentos de onda de luz LED vermelho e rosa proporcionaram o maior rendimento de biomassa, alcançando  $0,31 \text{ g/L}$ , um aumento de 34% em relação ao controle (Figura 16). Esses resultados podem ser explicados pela maior eficiência dos comprimentos de onda vermelho e rosa na absorção de luz pelos pigmentos fotossintéticos da microalga, como clorofila e carotenoides.

Ao comparar nossos resultados com estudos anteriores, observamos diferenças significativas. Sui, et al., (2021) relataram a produção de  $1,2 \text{ g/L}$  de biomassa ao cultivar



Figura 16. Acúmulo de Biomassa. Produção de biomassa de *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam os valores de biomassa total para cada condição experimental da microalga no meio Conway com 3,5% de sais, exposta a diferentes comprimentos de onda de luz LED (branco, azul, rosa e vermelho), com intensidade de 3800 lux. (\*) Análise estatística.



#### 6.4.4. Produção de Lipídios em Meio Sintético

A produção de lipídios microalgais pode ser promovida pelo desvio na rota metabólica ocasionado por alterações nas condições de cultivo. Esse mecanismo ocorre porque, sob condições desfavoráveis ao crescimento celular, a microalga redireciona os recursos metabólicos para o armazenamento de compostos energéticos, como os lipídios, em vez de priorizar a divisão celular (Sun, et al., 2019). No presente estudo, *Dunaliella salina* cultivada sob LED azul (3.800 lux), fotoperíodo 12h/12 h (claro/escuro) durante 7 dias, apresentou uma produção total de lipídios de 4,77 g/L, equivalente a um aumento de 205% em relação ao controle (Figura 17) e estatisticamente superior aos demais tratamentos. O conteúdo lipídico alcançado foi de 17,20%, um incremento de 160% comparado ao controle (Tabela 18).

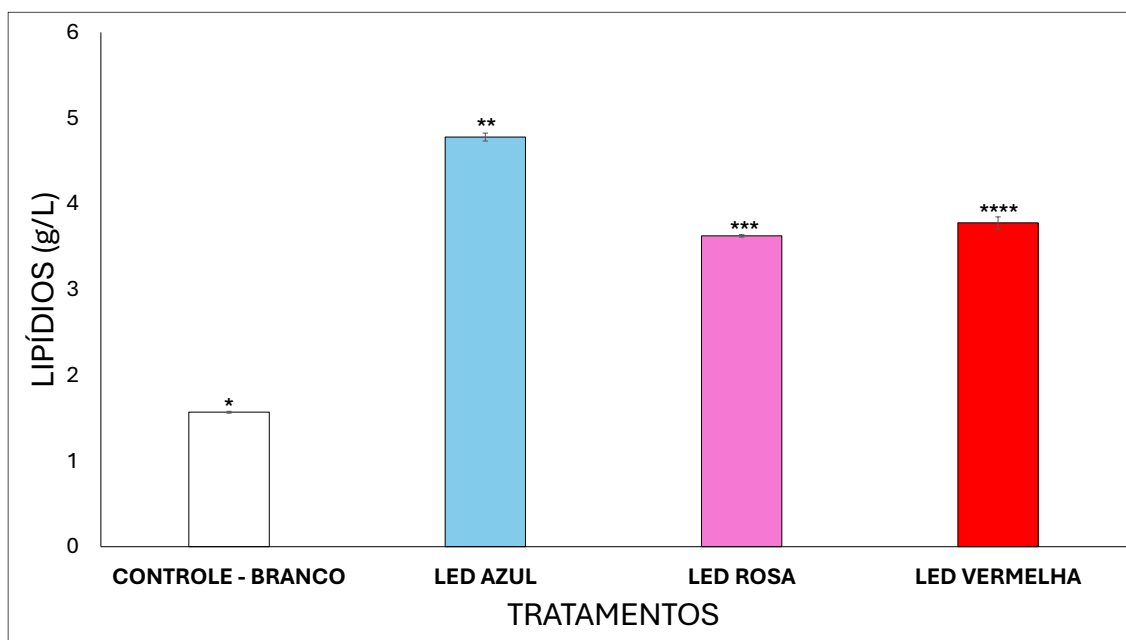
Weldy & Huesemann, (2007) observaram que *D. salina* exposta a LED azul (800  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 16000 lux) por 24 horas, suplementado com 20 mM de  $\text{NO}_3$  e cultivada continuamente por 11 dias acumulou 31% de lipídios. Apesar da menor intensidade luminosa (76% inferior), ausência de suplementação de nitrato e menor tempo de cultivo,

os resultados do presente estudo demonstram eficiência na promoção do acúmulo lipídico.

A produtividade lipídica alcançada foi de 0,679 g/L/d (Tabela 18), valor 838 vezes maior que o obtido por Bredda, et al., (2020), que relataram 0,00081 g/L/d ao cultivar *D. salina* sob LED azul contínuo (500  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^2/\text{s}$ , 10.000 lux) por 7 dias. Esse resultado evidencia que a combinação de menor intensidade luminosa e fotoperíodo alternado otimizou as condições metabólicas da microalga.

Os dados indicam que ajustes na intensidade luminosa e no fotoperíodo podem maximizar a produtividade lipídica de forma eficiente, reduzindo o consumo energético e os custos operacionais. Além disso, diferenças na composição do meio e nas estratégias de cultivo podem contribuir para o desempenho superior observado.

Figura 17. Acúmulo de Lipídios. Produção de lipídios de *Dunaliella salina* sob diferentes condições experimentais. As barras indicam os valores de biomassa total para cada condição experimental da microalga no meio Conway com 3,5% de sais, exposta a diferentes comprimentos de onda de luz LED (branco, azul, rosa e vermelho), com intensidade de 3800 lux. (\*) Análise estatística.



#### 6.4.5. Produção de Pigmentos Fotossintetizante em Meio Sintético

A eficiência fotossintética em microalgas está diretamente relacionada à presença e funcionalidade dos pigmentos fotossintetizantes, como clorofilas e carotenoides, essenciais na captação de energia luminosa e conversão em energia química. Esses

pigmentos também refletem a adaptação das microalgas às condições de cultivo, como intensidade e espectro luminoso (Melis, 2009).

No presente estudo, *Dunaliella salina* cultivada na luz LED vermelho apresentou a maior produção de clorofila  $\alpha$  (8,14  $\mu\text{g/L}$ ), 22% superior ao controle (Tabela 18), corroborando os achados de Xu & Harvey, (2019). A luz emitida pelo LED vermelho (625–680 nm) coincide com o espectro ideal para absorção de fótons por clorofilas, principais pigmentos fotossintéticos em *D. salina*. Além disso, a produção de carotenoides foi significativamente maior sob luz vermelha (5,37  $\mu\text{g/L}$ ), representando um aumento de 45% em relação ao controle (Tabela 18).

O acoplamento da produção de carotenoides à redução de oxigênio sob luz vermelha reduz os efeitos da fotoinibição, promovendo maior estabilidade celular (Xu & Harvey, 2019). Esses resultados reforçam a importância do ajuste do espectro luminoso no cultivo de microalgas para maximizar a produção de pigmentos fotossintetizantes e aumentar a eficiência fotossintética.

Tabela 18. Cinética de Crescimento. Parâmetros de crescimento de *Dunaliella salina*, cultivada em meio Conway com salinidade de 3,5%, exposta a diferentes comprimentos de onda de luz LED (branco, azul, rosa e vermelho), com intensidade de 3800 lux.

| Estímulo luminoso com LED em <i>D. salina</i> no meio Conway a salinidade de 3,5% |                         |                         |                         |                         |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Parâmetros  | BRANCO                  | AZUL                    | ROSA                    | VERMELHO                |
| Produtividade de Biomassa (g/L/d)   | 0,032<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,039<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,045<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,045<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Produtividade Lipídica (g/L/d)  | 0,214<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,679<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,527<br>( $\pm 0,00$ ) | 0,540<br>( $\pm 0,00$ ) |
| Porcentagem de Lipídios (%)   | 6,610<br>( $\pm 0,91$ ) | 17,20<br>( $\pm 0,68$ ) | 11,59<br>( $\pm 1,73$ ) | 11,88<br>( $\pm 0,69$ ) |
| Clorofila $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )  | 6,644<br>( $\pm 0,11$ ) | 4,226<br>( $\pm 0,01$ ) | 5,646<br>( $\pm 0,02$ ) | 8,148<br>( $\pm 0,04$ ) |
| Carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )  | 3,704<br>( $\pm 0,05$ ) | 2,482<br>( $\pm 0,00$ ) | 3,166<br>( $\pm 0,15$ ) | 5,379<br>( $\pm 0,00$ ) |

## 6.5. CONCLUSÃO

Este estudo investigou o efeito de diferentes comprimentos de onda de luz LED no crescimento, produção de biomassa, acúmulo de lipídios e síntese de pigmentos fotossintetizantes por *Dunaliella salina* cultivada em meio sintético, visando sua futura

aplicação no tratamento de água produzida. Os resultados demonstraram que a qualidade e a intensidade luminosa impactam significativamente os parâmetros de crescimento e metabolismo celular dessa microalga.

Os achados deste estudo demonstram que o espectro luminoso afeta de maneira distinta a fisiologia de *D. salina*. A iluminação com LED vermelho favoreceu o incremento de 62% na taxa de crescimento celular e 34% no acúmulo de biomassa, enquanto o LED azul induziu um aumento de 205% na produção de lipídios. Além disso, a síntese de pigmentos fotossintetizantes foi potencializada sob luz vermelha, apresentando um aumento de 22% na produção de clorofila  $\alpha$  e 45% em carotenóides, indicando um impacto direto do espectro luminoso na eficiência fotossintética. Esses resultados reforçam a relevância do controle das condições luminosas para a otimização do cultivo de *D. salina* em sistemas industriais e biotecnológicos, contribuindo para o aprimoramento de sua aplicação em bioprodutos e no tratamento de efluentes.

## 6.6. REFERÊNCIAS

- Bredda, E. H., Da Silva, A. F., Silva, M. B., & Da Rós, P. C. M. Mixture design as a potential tool in modeling the effect of light wavelength on *Dunaliella salina* cultivation: an alternative solution to increase microalgae lipid productivity for biodiesel production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(4), 379-389, (2020).
- Cheng, J.; Xin, K.; Wang, Z.; Zhu, Y.; Xia, R.; Yang, W., & Liu, J. Improving biomass growth of *Nannochloropsis oceanica* with electrical treatment. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, v. 58, p.101923, (2022).
- Chinalia, F. A., Paton, G. I., & Killham, K. S. Physiological and toxicological characterization of an engineered whole-cell biosensor. *Bioresource technology*, 99(4), 714-721 (2008).
- Conceição, G.R.; Silva, C.S.; Vale, T.O.; Santos, J.N.; Matos, J.B.L.; Almeida, P.F.; Chinalia, F.A. Culture operational strategies for the production of methane and algal oil using ethanol vinasse effluent. *Journal of Applied Phycology*, (2023).
- De Almeida Moreira, B. R., Frias, Y. A., De Lima, E. W., Cruz, V. H., Lopes, P. R. M., & Da Silva Viana, R. Algae-specific colorful LEDs: Biotechnological drivers to biorefinery and photobiological platforms. *Journal of Cleaner Production*, v. 316, p. 128350, (2021).
- Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Ng, Y. C., And Nichols, A. V. Serum lipide analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 449-464, (1956).
- Huesemann, M. H.; Benemann, J. R. Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential, with special focus on *Dunaliella sp.* The alga *Dunaliella*:

Biodiversity, physiology, genomics, and biotechnology. Enfield: Science Publishers, (2009).

Jin, C., Yu, B., Qian, S., Liu, Q., & Zhou, X. Impact of combined monochromatic light on the biocomponent productivity of *Dunaliella salina*. Journal of Renewable and Sustainable Energy, 13(2), (2021).

Keeny, D. R.; Nelson, D. W. Inorganic forms of nitrogen. Methods of Soil Analysis, Part, 2, 643-98, (1982).

Lan, Y.; Song, Y.; Guo, Y.; Qiao, D.; Cao, Y.; Xu, H. DsLCYB Directionally Modulated  $\beta$ -Carotene of the Green Alga *Dunaliella salina* under Red Light Stress. Journal of Microbiology and Biotechnology, 32, 12, 1622, (2022).

Masojídek, J.; Torzillo, G.; Koblížek, M. Photosynthesis in microalgae. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, p. 21-36, (2013).

Melis, A. "Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency." Plant science 177, no. 4, 272-280, (2009).

Pérez-Pazos, J. V., & Fernández-Izquierdo, P. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella sp.* under different light and carbonate conditions. CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro, 4(4), 47-58, (2011).

Rowan, K.S. Photosynthetic pigments of algae Cambridge University Press: Cambridge, UK, (1989).

Schulze, P. S., Pereira, H. G., Santos, T. F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., ... & Varela, J. C. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. Algal research, v. 16, p. 387-398, (2016).

Song, Y., Lan, Y., Li, K., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. Regulation of a novel DsGATA1 from *Dunaliella salina* on the synthesis of carotenoids under red light. Applied Microbiology and Biotechnology, 108(1), 1-12, (2024).

Sui, Y., Mazzucchi, L., Acharya, P., Xu, Y., Morgan, G., & Harvey, P. J. A comparison of  $\beta$ -carotene, phytoene and amino acids production in *Dunaliella salina* DF 15 (CCAP 19/41) and *Dunaliella salina* CCAP 19/30 using different light wavelengths. Foods, 10(11), 2824, (2021).

Sui, Y., & Harvey, P. J. Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina*. Foods, 10(5), 1018, (2021).

Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Ren, Y., Wu, T., E Chen, F. Cost-effective wastewater treatment in a continuous manner by a novel bio-photoelectrolysis cell (BPE) system. Bioresource technology 27, 297-304, (2019).

Tran-Nguyen, Q. A., Tran, T. T. V., & Trinh-Dang, M. Effects of Light on the Growth and  $\beta$ -carotene Accumulation in the Green Algae *Dunaliella salina*. Asian J. Biol, 18(1), 1-10, (2023).

Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M., & Idris, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. Bioresource technology, 162, 38-44, (2014).

- Xu, Y.; Harvey, P. J. Carotenoid production by *Dunaliella salina* under red light. *Antioxidants*, v. 8, n. 5, p. 123, 2019.
- Xu, Y.; Harvey, P. J. Red light control of  $\beta$ -carotene isomerisation to 9-cis  $\beta$ -carotene and carotenoid accumulation in *Dunaliella salina*. *Antioxidants*, v. 8, n. 5, p. 148, 2019.
- Walne, P. R. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Journal of Fishery Investigations*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, 2, 25-53 (1966).
- Weldy, C. S.; & Huesemann, M. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *Journal of Undergraduate Research*, 7, (2007).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados demonstraram que o uso de corrente alternada e estímulos luminosos influenciam significativamente o crescimento, a produção de biomassa e o metabolismo de *Dunaliella salina*. Os principais achados incluem:

1. **Impacto do Estímulo Elétrico:** A aplicação de corrente alternada em microampères promoveu um aumento significativo na taxa de crescimento específico e na produção de biomassa. Foi observado que a aclimação prolongada das microalgas ( $\geq 14$  dias) aliada à aplicação de 990  $\mu\text{A}$  favoreceu tanto o crescimento celular sustentado quanto o acúmulo de pigmentos fotossintéticos e lipídicos.
2. **Efeito do Estímulo Luminoso:** A iluminação com LED vermelho apresentou os melhores resultados na taxa de crescimento e no acúmulo de biomassa, enquanto o LED azul favoreceu o aumento da produção lipídica. Isso indica que a seleção de comprimentos de onda específicos pode modular o metabolismo da microalga e otimizar a produção de biocompostos de interesse industrial.
3. **Relevância para a Biotecnologia:** Os achados deste estudo fornecem subsídios para a aplicação de *D. salina* em sistemas sustentáveis de bioprodução e tratamento de efluentes. A utilização combinada de corrente alternada e controle espectral da iluminação abre novas perspectivas para o aprimoramento de processos biotecnológicos.
4. **Implicações Ambientais e Industriais:** A adoção dessas estratégias pode contribuir para a redução do impacto ambiental da indústria do petróleo, por meio da reutilização da água produzida, além de possibilitar a produção de bioprodutos com alto valor agregado, como pigmentos e lipídios para a indústria de biocombustíveis, alimentícia e farmacêutica.
5. **Perspectivas Futuras:** Estudos futuros podem investigar a sinergia entre diferentes estímulos, combinando variações na intensidade da corrente alternada, duração da exposição ao campo elétrico e espectro luminotécnico otimizado. Além disso, testar a aplicação dessas técnicas em escala industrial permitirá

avaliar a viabilidade econômica e produtiva dessas estratégias para o cultivo de microalgas.

Além dos benefícios mencionados, este estudo também sugere que a integração de estímulos físicos no cultivo de *Dunaliella salina* pode abrir novas possibilidades para aplicações comerciais e industriais. O uso estratégico de correntes elétricas e iluminação controlada não apenas melhora o desempenho metabólico da microalga, mas também pode representar um avanço para a biotecnologia ambiental, reduzindo custos e otimizando a eficiência da produção.

A implementação dessas estratégias pode ser ampliada para outras espécies microalgais, explorando diferentes combinações de estímulos para maximizar a produção de compostos bioativos. A longo prazo, o aprimoramento dessas técnicas pode consolidar o uso das microalgas em processos industriais sustentáveis, reforçando sua aplicabilidade na bioeconomia.

Dessa forma, este estudo representa um avanço na compreensão dos efeitos do estímulo elétrico e luminoso sobre *Dunaliella salina*, fornecendo bases científicas para o aprimoramento da sua produção e aplicação na biotecnologia ambiental e industrial. Os resultados obtidos reforçam a importância de investir em novas abordagens tecnológicas para otimizar o cultivo de microalgas e ampliar suas aplicações no desenvolvimento de bioprodutos sustentáveis.