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

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A MODULAÇÃO DA COLORAÇÃO DA BIOMASSA DE *SPIRULINA*

GABRIELA MOURA KUROWISKI DE BRITO

MICHELE GREQUE DE MORAIS-COSTA
Orientador

LUÍSA BARREIRA
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2026

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

ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A MODULAÇÃO DA COLORAÇÃO DA BIOMASSA DE *SPIRULINA*

GABRIELA MOURA KUROWISKI DE BRITO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos

MICHELE GREQUE DE MORAIS-COSTA
Orientador

LUÍSA BARREIRA
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2026

B862e

Brito, Gabriela Moura Kurowiski de
Estratégias biotecnológicas para a modulação da coloração da biomassa de spirulina/ Gabriela Moura Kurowiski de Brito. – 2026.
150 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2026.

Orientadora: Dra. Michele Greque de Morais Costa
Coorientadora: Dra.Luísa Barreira

1. Engenharia e Ciência de Alimentos . 2. Biomassa. 3. Cianobactéria. 4. Heterotrofia. 5. Mutagênese. 6. Pigmentos. 7.Alimentos I.Costa, Michele Greque de Morais. II. Barreira, Luísa.

CDU 664

Catalogação na fonte: Bibliotecária Brenda Sequeira CRB10/1979

APROVAÇÃO

Tese defendida por Gabriela Moura Kurowiski de Brito, com orientação da Profa. Dra. Michele Greque de Morais Costa e coorientação da Profa. Dra. Luísa Barreira, aprovada em 17 de setembro de 2026, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

gov.br Documento assinado digitalmente
MICHELE GREQUE DE MORAIS COSTA
Data: 23/09/2026 12:44:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Michele Greque de Morais Costa – FURG

Assinado por: **João Carlos Serafim Varela**
Data: 2026.09.23 16:13:40 +0100

Prof. Dr. João Carlos Serafim Varela – UAlg

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCIANE MARIA COLLA
Data: 23/09/2026 12:57:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Luciane Maria Colla – UPF

gov.br Documento assinado digitalmente
ITACIARA LARROZA NUNES
Data: 23/09/2026 13:19:10-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes – UFSC

gov.br Documento assinado digitalmente
JESSICA HARTWIG DUARTE
Data: 23/09/2026 15:33:15-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Jessica Hartwig Duarte – FURG

Dedico esta tese às minhas irmãs, Mariana, Isadora e Alice; aos meus pais, Rodrigo e Michele; e à minha avó, Cleusa, com todo o meu amor, gratidão e carinho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que, em sua infinita bondade, me concedeu o dom da vida e me guiou ao longo deste caminho, sustentando-me nos momentos em que precisei de coragem, força e perseverança. Aos meus **guias espirituais e protetores**, minha profunda gratidão pelo amparo constante, pela intuição nos momentos de dúvida e por fortalecerem meu espírito ao longo de toda esta jornada.

À minha avó, **Cleusa**, pelas orações, pelo apoio, pelos conselhos e, sobretudo, por se fazer presente em toda a minha trajetória acadêmica, iniciada em 2015. Obrigada por acreditar em mim e por acompanhar cada etapa desse caminho.

Aos meus pais, **Michele e Rodrigo**, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, vibrarem com minhas conquistas, aconselharem-me quando precisei e apoiarem, incondicionalmente, todas as minhas loucuras. Obrigada por serem meu porto seguro e por nunca medirem esforços para me apoiar.

Às minhas irmãs, **Mariana, Isadora e Alice**, por compreenderem minhas ausências, escutarem minhas queixas e me apoiarem incondicionalmente. Obrigada por tornarem a caminhada mais leve e por estarem sempre presentes, mesmo quando eu não pude estar.

Aos demais familiares, pela compreensão diante das minhas ausências, pelo carinho e por nunca desistirem de mim.

À minha orientadora, **Michele**, por estes quatro anos de parceria, confiança e incentivo. Obrigada por acreditar no meu potencial desde nossa primeira conversa e por ter me presenteado com este tema de tese, que se tornou tão importante para minha trajetória. Agradeço pela orientação de excelência, pela disponibilidade, por ouvir meus medos e inquietações e, principalmente, por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis. Sua confiança e seu incentivo foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha coorientadora, **Luísa**, também por estes quatro anos de parceria e aprendizado. Obrigada pelas conversas instigantes sobre ciência, pela orientação e supervisão cuidadosas e pelos tantos conselhos científicos que contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento desta tese.

Ao **Professor Jorge**, pelo apoio à pesquisa, pelos conselhos, pelos ensinamentos e também pelos necessários puxões de orelha, que contribuíram para meu crescimento acadêmico e profissional.

À **Professora Ana Priscila**, por ter me iniciado na pesquisa em 2017, por ter me incentivado e acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava ser capaz de cursar uma

pós-graduação. Talvez a Gabriela doutora só exista porque tivemos aquela nossa conversa, lá em 2022. Serei eternamente grata por ter acreditado em um potencial que eu ainda não conseguia enxergar.

À **Dra. Bruna Vaz**, por contribuir para o aprimoramento da escrita de praticamente todos os documentos que desenvolvi ao longo destes quatro anos. Obrigada pela disponibilidade, pelas correções, pelos ensinamentos e por sempre me ajudar a encontrar uma forma melhor de colocar minhas ideias no papel.

À **Dra. Thaisa Duarte**, por toda a ajuda na redação de tantos textos, pelos bons conselhos e por ser, tantas vezes, um verdadeiro oráculo dentro da sala de estudos do LEB.

À **Dra. Luiza Moraes**, pelas correções, orientações e conselhos durante o processo de escrita da patente desenvolvida a partir desta tese, e por todas as contribuições ao longo dessa trajetória.

À **Dra. Juliana Latorres**, pelas grandes colaborações no Artigo III desta tese, por disponibilizar seu tempo, sua energia e sua paixão pela ciência para contribuir com o desenvolvimento e o aprimoramento deste trabalho.

À equipe do **LEB, MIBI e CEAS**, por ser minha segunda casa desde 2017. Obrigada a todos os colegas pelas conversas, orientações, ensinamentos e pelo compartilhamento de experiências. Foi, e continua sendo, uma honra fazer parte desses grupos e compartilhar com vocês tantos momentos dessa trajetória.

Aos técnicos do **LEB, MIBI e CEAS**, **Adriano e Andrei**, por estarem sempre dispostos a ajudar, pela disponibilidade e por todo o suporte ao longo dos anos.

À equipe **MarBiotech-UAlg**, especialmente **Professor João**, **Nicolle**, **Cristiana, Manuel, Madalena, Chaturika, Verônica, Marta, Filipa, Tamara, Beatriz e Davide**, por me acolherem durante meu período de doutorado-sanduíche como um verdadeiro membro da equipe. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas, pelas orientações e pela generosidade com que compartilharam conhecimento e experiências comigo.

Ao **GreenColab**, especialmente **Kricelle, Daniel e Gabriel**, por disponibilizarem estrutura, tempo e conhecimento para a realização de experimentos que fizeram parte desta tese, além das valiosas orientações científicas e de toda a disponibilidade durante esse período.

Às minhas amigas, **Nicolle e Letícia**, pelo apoio, pela torcida e por terem sido minha família em Portugal. Tivemos um verdadeiro encontro de almas, e espero que nossa amizade perdure por toda a vida. Obrigada por tornarem aquele período tão especial e por fazerem com que, mesmo longe de casa, eu nunca me sentisse sozinha.

Às minhas amigas de jornada na **FURG**, **Jenyfer, Gabriela e Carolini**, por estarem comigo nos momentos mais difíceis, por não me deixarem desistir e por contribuírem para tornar essa caminhada mais leve. Obrigada pela amizade, pela escuta e por todos os momentos compartilhados.

Aos meus amigos e companheiros do **PPGECA**, **Ana Cláudia, Matheus, Liliane, Jacinta, Tais Lopes, Richard e Thays Rassía**, por deixarem os dias mais leves, pelo compartilhamento de experiências, pelas conversas e pela ótima companhia durante os almoços na "mãe FURG". Esses momentos certamente ficarão entre as melhores lembranças dessa trajetória.

Ao meu amigo **Rai**, por escutar todas as minhas lamúrias, pela paciência com minhas queixas, por me tirar de casa nos momentos em que eu mais precisava e por sempre ter um bom conselho para oferecer. Obrigada por estar presente e por tornar muitos dias difíceis um pouco mais fáceis.

Às **caroneiras do Cassino, Jessica, Thaisa, Lana, Gabi e Jaci**, por tornarem as idas e vindas à FURG mais engraçadas, acolhedoras e, muitas vezes, terapêuticas. Obrigada por todas as conversas, risadas e histórias compartilhadas ao longo do caminho.

Ao **CNPq e à CAPES**, pelo apoio à ciência e à formação de pesquisadores no país e pelo financiamento que possibilitou minha dedicação à pesquisa durante parte desta trajetória.

À **FURG**, pelo ensino público, gratuito e de qualidade. Por ter sido minha casa e, de certa forma, minha mãe, durante os anos em que estive nesta instituição, desde a graduação até o doutorado. Levo comigo não apenas os conhecimentos adquiridos, mas também as pessoas, experiências e memórias que fizeram parte dessa história.

Por fim, **a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a construção deste trabalho e para que eu chegasse até aqui, meu mais sincero e profundo agradecimento.** Esta tese representa não apenas anos de pesquisa, experimentos, escrita e aprendizado, mas também o resultado de uma caminhada construída com a ajuda, o carinho, a confiança e a presença de muitas pessoas. A cada uma delas, o meu muito obrigada!

In a world filled with hate, we must still dare to hope. In a world filled with anger, we must still dare comfort. In a world filled with despair, we must still dare to dream. And in a world filled with distrust, we must still dare to believe.

Michael Jackson

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Microscopia óptica de *Spirulina* evidenciando a morfologia característica dos tricomas (40×). 32
Figura 2 - Representação esquemática da radiação fotossintética ativa (banda de absorção) dos pigmentos. 34

CAPÍTULO III

ARTIGO I

Figura 1 - Curvas de Crescimento (a) e Perfil de pH (b) de *Spirulina* sp. LEB 18 das condições controle e heterotróficas ao longo de 10 dias de cultivo. (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio, e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. 58
Figura 2 - Varredura de pigmentos ao longo de 10 dias de cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18: (a) Bandas de referência de Pagels *et al.* (2020), (b) Tempo 0, (c) Tempo 5, (d) Tempo 10. 60
Figura 3 - Concentrações de pigmentos: (a) clorofila *a*, (b) ficocianina e (c) carotenoides na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada por 10 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). 66
Figura 4 - Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 obtida a partir dos controles e dos cultivos heterotróficas com suplementação de glicose e acetato de sódio em diferentes concentrações: (a) Controle Negativo Luz, (b) Controle Positivo Luz, (c) 0,2 g L^{-1} Glicose, (d) 1,0 g L^{-1} Glicose, (e) 2,0 g L^{-1} Glicose, (f) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (g) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (h) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. 71

ARTIGO II

Figura 1 - Organograma das condições de cultivo aplicadas a *Spirulina platensis* LEB 52... 88
Figura 2 - Curva de crescimento dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 sob redução gradual da luz..... 93
Figura 3 – Consumo de (a) glicose e (b) nitrato de sódio de *Spirulina platensis* LEB 52 durante o cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz (MixoHet-RGL)..... 94
Figura 4 - Concentrações de pigmentos de *Spirulina platensis* LEB 52: (a) clorofila *a*, (b) ficocianina e (c) carotenoides. 99
Figura 5 - Imagens de microscopia óptica (40×) de células de *Spirulina platensis* LEB 52 cultivadas sob redução gradual da luz: (a) cultivo autotrófico (AutoCtrl-RGL) e (b) cultivo mixotrófico/heterotrófico (MixoHet-RGL). 106

ARTIGO III

Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de oxifluorfen (OXI) sobre o crescimento celular, a densidade óptica e a fluorescência de pigmentos fotossintéticos durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm)..... 121
Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de norflurazon (NFZ) sobre o crescimento celular, a densidade óptica e a fluorescência de pigmentos fotossintéticos durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm)..... 122
Figura 3 - Curvas de crescimento e densidade óptica de *Spirulina platensis* LEB 52 sob diferentes concentrações de EMS. (a) Concentração celular (células mL^{-1}); (b) densidade óptica

a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) taxa de sobrevivência (%) em função da concentração de EMS após 10 dias de cultivo. 126
Figura 4 - Medições de fluorescência de *Spirulina platensis* LEB 52 sob diferentes concentrações de EMS. (a) Fluorescência de clorofila (Ex488 nm / Em685 nm); (b) Fluorescência de ficocianina (Ex620 nm / Em653 nm). 128
Figura 5 - Efeito do EMS e dos herbicidas durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm). 132

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II
Tabela 1 - Composição percentual de macromoléculas em espécies de microalgas. 31

CAPÍTULO III
ARTIGO I
Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa (X_{max}) e produtividade máxima de biomassa (P_{max}) de cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 sob condições autotróficas e heterotróficas. 57
Tabela 2 - Concentrações de carboidratos, proteínas e lipídeos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada sob fotoperíodo autotrófico claro/escuro (12/12 h) e condições. 63
Tabela 3 - Percepção de cor para as diferentes biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18. 70
Tabela 4 - Croma (C*ab), Ângulo de Tonalidade (h°ab) e Diferença de Cor (ΔE) da biomassa obtida de *Spirulina* sp. LEB 18. 70
ARTIGO II
Tabela 1 - Intensidades luminosas e respectivos pulsos de alimentação para o cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz (MixoHet-RGL). 88
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 sob redução gradual da luz.....93
Tabela 3 - Coordenadas L*, a* e b* e percepção da cor dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em diferentes intervalos de tempo. 103
Tabela 4 - Croma (C*ab), ângulo de tonalidade (h°ab) e diferença total de cor (ΔE) dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em diferentes intervalos de tempo.....105

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
ATP – Trifosfato de adenosina
CIELAB – Espaço de cor definido pela Commission Internationale de l'Éclairage (L*a*b*)
CNE – Controle Negativo
CNL – Controle Negativo de Luz
CO2 – Dióxido de carbono
CPE – Controle Positivo
CPL – Controle Positivo de Luz
CZ – Meio Zarrouk modificado
CZA – Meio Zarrouk modificado suplementado com acetona
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DO – Densidade óptica
DP – Desvio-padrão
EM – Via de Embden-Meyerhof
EMS – Metanossulfonato de etila
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
LED – Diodo emissor de luz (Light Emitting Diode)
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)
NFZ – Norflurazon
OD680 – Densidade óptica a 680 nm
OD750 – Densidade óptica a 750 nm
OGM – Organismo geneticamente modificado
ONU – Organização das Nações Unidas
OXI – Oxifluorfen
PDS – Fitoeno dessaturase
PHB – Polihidroxibutirato
PP - Via das pentoses fosfato
PPO – Protoporfirinogênio oxidase
PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados
RGL – Redução gradual de luz
TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
UAlg – Universidade do Algarve
UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

± – Mais ou menos (desvio-padrão em relação à média)
% – Porcentagem
°C – Graus Celsius
Δ – Delta (variação de uma grandeza)
ΔE – Diferença total de cor
Δa* – Variação da coordenada de cor a*
Δb* – Variação da coordenada de cor b*
ΔL*– Variação da luminosidade L*
a* – Coordenada de cor no eixo verde (–) – vermelho (+)
b* – Coordenada de cor no eixo azul (–) – amarelo (+)
C*ab – Croma (intensidade da cor)
g – Grama
g L^{-1} – Grama por litro
h – Hora
h°ab – Ângulo de matiz (tonalidade da cor, em graus)
kg – Quilograma
L – Litro
L* – Luminosidade (0 = preto; 100 = branco)
mg g^{-1} – Miligrama por grama
min – Minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
m^{-2} – Por metro quadrado
nm – Nanômetro
p – Probabilidade (nível de significância estatística)
pH – Potencial hidrogeniônico
rpm – Rotações por minuto
s^{-1} – Por segundo
µmol – Micromol
v/v – Volume por volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 18
RESUMO GERAL 19
GENERAL ABSTRACT 20
1 INTRODUÇÃO GERAL 27
2 OBJETIVOS 29
2.1 OBJETIVO GERAL 29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

CAPÍTULO II 30
3 REVISÃO DA LITERATURA 31
3.1 MICROALGAS 31
3.1.1 *Spirulina* 32
3.2 PIGMENTOS MICROALGAIS 33
3.2.1 Clorofila 35
3.2.2 Carotenoides 36
3.2.3 Ficobiliproteínas 37
3.3 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM BIOMASSA de *Spirulina* 37
3.4 INFLUÊNCIA DA COR NO CONSUMO DE ALIMENTOS 39
3.5 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS 40
3.6 MUTAÇÃO 41
3.7 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA 42
3.8 HISTÓRICO DOS LABORATÓRIOS LEB, MIBI E MARBIOTECH 44
3.9 OBJETIVOS DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (ODS) 46

CAPÍTULO III 48
ARTIGO I 49
RESUMO 50
1 INTRODUÇÃO 50
2 MATERIAL E MÉTODOS 52
2.1 MICROALGA 52
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO 52
2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO 53
2.4 VARREDURA DE PIGMENTOS 54
2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA 54
2.6 QUANTIFICAÇÃO DA COR 54

2.7 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA 55
2.8 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS 55
2.8.1 Teor de Ficocianina 55
2.8.2 Teor de Clorofila e Carotenoides 56
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL E PRODUÇÃO DE BIOMASSA 57
3.2 DINÂMICA DA PIGMENTAÇÃO DURANTE O CULTIVO 60
3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA 63
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS 65
3.5 MEDIÇÕES DE COR E APARÊNCIA VISUAL DA BIOMASSA 69
4 CONCLUSÃO 74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

ARTIGO II 83
RESUMO 84
1 INTRODUÇÃO 84
2 MATERIAL E MÉTODOS 86
2.1 MICROALGA E MEIO DE CULTURA 86
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO 87
2.3 CONSUMO DE GLICOSE E NITRATO 89
2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO 89
2.5 BALANÇO TOTAL DE C/N 89
2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS 90
2.6.1 Teor de Ficocianina 90
2.6.2 Clorofila *a* e Carotenoides 90
2.7 CARACTERÍSTICAS DE COR DOS CULTIVOS 91
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 92
3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO MICROALGAL E CONSUMO DE SUBSTRATO 92
3.2 MODULAÇÃO DE PIGMENTOS SOB REDUÇÃO COMBINADA DE LUZ E ALIMENTAÇÃO COM NUTRIENTES 98
3.3 MODULAÇÃO DA COR PELA COMBINAÇÃO DE LUZ E ALIMENTAÇÃO DE NUTRIENTES 101
4 CONCLUSÃO 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

ARTIGO III **114**
RESUMO **115**
1 INTRODUÇÃO **115**
2 MATERIAL E MÉTODOS **117**
2.1 LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO 117
2.2 PRESSÃO SELETIVA UTILIZANDO INIBIDORES DE BIOSSÍNTESE DE PIGMENTOS 118
2.3 SOBREVIVÊNCIA AO EMS E MUTAGÊNESE QUÍMICA 118
2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR, FLUORESCÊNCIA E CONSUMO DE GLICOSE 119
2.5 ANÁLISE DE DADOS 120
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO **120**
3.1 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES DE BIOSSÍNTESE DE PIGMENTOS 120
3.2 RESPOSTA CELULAR À MUTAGÊNESE QUÍMICA INDUZIDA POR EMS 125
3.3 INTEGRAÇÃO DE MUTAGÊNESE QUÍMICA E PRESSÃO SELETIVA 130
4 CONCLUSÃO **135**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **136**

CAPÍTULO IV **142**
CONCLUSÃO GERAL **143**

CAPÍTULO V **144**
RESÍDUOS GERADOS E DESTINO **145**

CAPÍTULO VI **146**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **147**

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

A intensa coloração verde característica da biomassa de *Spirulina* constitui uma das principais limitações à sua incorporação em alimentos, apesar de seu elevado valor nutricional e potencial bioativo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo aplicar e avaliar estratégias biotecnológicas de cultivo e de mutagênese aleatória para modular a coloração da biomassa de *Spirulina*, visando a obtenção de biomassas com características cromáticas de interesse para aplicações alimentícias. Foram investigadas três abordagens. Na primeira, *Spirulina* sp. LEB 18 foi submetida ao cultivo heterotrófico em batelada alimentada com glicose e acetato de sódio como fontes de carbono, avaliando-se crescimento, cor, pigmentos e composição bioquímica. Na segunda, *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada em batelada alimentada com glicose e nitrato de sódio, associada à redução gradual da intensidade luminosa ao longo de 130 dias. Na terceira, foi desenvolvida uma plataforma não-OGM de mutagênese química com metanossulfonato de etila (EMS), seguida de pressão seletiva com os inibidores norflurazon e oxifluorfen, utilizando parâmetros fisiológicos e fluorescência de pigmentos para a triagem de variantes. Na primeira abordagem o cultivo heterotrófico de *Spirulina* sp. LEB 18 promoveu redução da clorofila *a*, de 29,1 mg g^{-1} no controle para 9,4-18,0 mg g^{-1}, enquanto ficocianina (52,0-74,4 mg g^{-1}) e carotenoides foram relativamente preservados frente ao controle (62,0 mg g^{-1}). O acetato de sódio, especialmente a 2,0 g L^{-1}, proporcionou maior diferença de cor (ΔE de 12,83), enquanto a glicose favoreceu carboidratos e lipídios; a condição com 0,2 g L^{-1} de acetato apresentou o teor proteico mais próximo do controle (32,18% frente a 38,68%). Para *Spirulina platensis* LEB 52, a redução gradual da intensidade luminosa associada à alimentação com glicose e nitrato resultou em alterações perceptíveis na coloração, associado ao aumento (+) do parâmetro a* e b*, e em maior produção de biomassa, atingindo 3,0 g L^{-1} e produtividade de 96,9 mg L^{-1} d^{-1}, aumento de cerca de 55% frente ao controle autotrófico (1,8 g L^{-1}; 62,5 mg L^{-1} d^{-1}) na fase mixotrófica. Já na abordagem de mutagênese, a concentração de 300 mM de EMS mostrou-se adequada para indução de variabilidade genética, com taxa de sobrevivência celular de 6%, dentro da faixa recomendada (5-10%), frente a 58% e 37% nas concentrações de 100 e 200 mM. As concentrações de 1200 µM de norflurazon e oxifluorfen foram selecionadas como pressão seletiva, com consumo de glicose de 98% em todos os ensaios. O norflurazon apresentou maior compatibilidade com o cultivo heterotrófico, e a fluorescência de ficocianina destacou-se como o marcador fenotípico mais sensível para a triagem inicial. Em conjunto, os resultados demonstram que estratégias de cultivo e mutagênese aleatória podem ser empregadas para modular características relacionadas à coloração da biomassa de *Spirulina.* As estratégias desenvolvidas apresentam, portanto, potencial para a obtenção de biomassas de *Spirulina* com características visuais diferenciadas e maior adequação à aplicação como ingrediente alimentício onde a coloração verde é uma limitação.

Palavras-Chave: Biomassa. Cianobactéria. Heterotrofia. Mutagênese. Pigmentos. Alimentos.

ABSTRACT

BIOTECHNOLOGICAL STRATEGIES FOR MODULATING *SPIRULINA* BIOMASS COLORATION

The intense green coloration characteristic of *Spirulina* biomass constitutes one of the main limitations to its incorporation into foods, despite its high nutritional value and bioactive potential. In this context, the present study aimed to apply and evaluate biotechnological cultivation and random mutagenesis strategies to modulate the coloration of *Spirulina* biomass, with the goal of obtaining biomass with chromatic characteristics of interest for food applications. Three approaches were investigated. In the first, *Spirulina* sp. LEB 18 was subjected to heterotrophic fed-batch cultivation using glucose and sodium acetate as carbon sources, and growth, color, pigments, and biochemical composition were evaluated. In the second, *Spirulina platensis* LEB 52 was cultivated in fed-batch mode using glucose and sodium nitrate, combined with a gradual reduction in light intensity over 130 days. In the third, a non-GMO chemical mutagenesis platform using ethyl methanesulfonate (EMS) was developed, followed by selective pressure with the inhibitors norflurazon and oxyfluorfen, using physiological parameters and pigment fluorescence for variant screening. In the first approach, heterotrophic cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 reduced chlorophyll a content from 29.1 mg g^{-1} in the control to 9.4–18.0 mg g^{-1}, whereas phycocyanin (52.0–74.4 mg g^{-1}) and carotenoids were relatively preserved compared with the control (62.0 mg g^{-1}). Sodium acetate, particularly at 2.0 g L^{-1}, resulted in the greatest color difference ($\Delta E = 12.83$), whereas glucose favored carbohydrate and lipid accumulation; the condition containing 0.2 g L^{-1} acetate showed the protein content closest to that of the control (32.18% versus 38.68%). For *Spirulina platensis* LEB 52, gradual reduction in light intensity combined with glucose and nitrate feeding resulted in perceptible changes in biomass coloration, associated with increases in the a* and b* parameters, as well as greater biomass production, reaching 3.0 g L^{-1} and a productivity of 96.9 mg L^{-1} d^{-1}, representing an approximately 55% increase compared with the autotrophic control (1.8 g L^{-1}; 62.5 mg L^{-1} d^{-1}) during the mixotrophic phase. In the mutagenesis approach, an EMS concentration of 300 mM was found to be suitable for inducing genetic variability, with a cell survival rate of 6%, within the recommended range (5–10%), compared with 58% and 37% at concentrations of 100 and 200 mM, respectively. Concentrations of 1200 µM norflurazon and oxyfluorfen were selected as selective pressures, with 98% glucose consumption in all assays. Norflurazon showed greater compatibility with heterotrophic cultivation, and phycocyanin fluorescence stood out as the most sensitive phenotypic marker for initial screening. Overall, the results demonstrate that cultivation and random mutagenesis strategies can be employed to modulate characteristics related to the coloration of *Spirulina* biomass. Therefore, the strategies developed show potential for obtaining *Spirulina* biomass with differentiated visual characteristics and greater suitability for use as a food ingredient in applications where intense green coloration is a limitation.

Keywords: Biomass. Cyanobacteria. Heterotrophy. Mutagenesis. Pigments. Food.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A busca por alimentos que aliem valor nutricional a benefícios para a saúde tem impulsionado a procura por novas fontes de ingredientes e compostos bioativos. Nesse contexto, a biomassa microalgal destaca-se como matéria-prima de interesse, por produzir proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos e outros compostos de valor biotecnológico, com aplicações nos setores alimentício, farmacêutico e cosmético (Lucas *et al.*, 2022; Oliveira e Bragotto, 2022). A sua produção ainda é associada a sistemas mais sustentáveis, já que dispensa áreas agrícolas convencionais e permite assimilação de dióxido de carbono durante o crescimento fotossintético (Costa *et al*., 2019).

Entre as espécies de interesse, destaca-se a *Spirulina*, cianobactéria filamentosa de elevado teor proteico e rica em compostos bioativos, como ficobiliproteínas e carotenoides. A biomassa de *Spirulina* possui histórico consolidado de uso em alimentos e suplementos, representando alternativa promissora para diversificar as fontes de nutrientes destinadas à alimentação humana (Chaudhary *et al.*, 2026; Costa *et al*., 2019; Lafarga *et al*., 2020).

Apesar disso, a incorporação de *Spirulina* em alimentos ainda esbarra em limitações sensoriais, principalmente a intensa coloração verde-azulada, que pode alterar a aparência do produto e restringir sua aplicação em matrizes onde outras tonalidades são esperadas. Como a cor é um dos principais atributos avaliados pelo consumidor, essa característica pode comprometer a aceitação do produto (Batista *et al.*, 2019; García-Vaquero, Brunton e Lafarga, 2021; Lafarga, 2019; Rasia *et al.*, 2024; Silva, Valle e Perrone, 2021).

Essa coloração está diretamente ligada à presença e à proporção de pigmentos fotossintéticos, os quais são responsáveis pela captura e transferência de energia durante o processo de fotossíntese. As alterações na concentração ou composição desses pigmentos, podem resultar na modificação da cor da biomassa. Tal fato abre espaço para estratégias biotecnológicas capazes de direcionar suas características visuais conforme a aplicação pretendida (Pagels *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023).

A modificação das condições de cultivo é uma das principais abordagens para alterar o metabolismo e a composição bioquímica das microalgas. Fatores como disponibilidade de nutrientes, intensidade luminosa e fonte de carbono interferem na síntese de pigmentos. O cultivo heterotrófico, que utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono e energia e reduz a dependência de luz, é uma dessas estratégias capazes de alterar a composição de pigmentos e, consequentemente, a cor da biomassa (Dufossé, 2018; Le *et al.*, 2024; Perez-Garcia *et al.*, 2011). O uso de diferentes fontes de carbono direciona o metabolismo celular para distintas vias

de síntese, enquanto a redução da luminosidade diminui a necessidade do uso dos pigmentos fotossintéticos (Abreu *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2018; Le *et al.*, 2024). Estudos já demonstraram que condições de cultivo alteram a concentração de pigmentos em microalgas, embora ainda faltem trabalhos que explorem especificamente a modulação da cor da biomassa de *Spirulina* para fins alimentícios (Chen e Zhang, 1997; Chen *et al.*, 2006; Marquez *et al.*, 1993, 1995).

Contudo, respostas obtidas por meio das condições de cultivo tendem a ser dependentes do ambiente e reversíveis quando essas condições são restabelecidas. Uma alternativa para gerar fenótipos estáveis é a mutagênese aleatória, que utiliza agentes físicos ou químicos para aumentar a variabilidade genética disponível para seleção. Diferentemente da engenharia genética, que insere DNA exógeno de forma direcionada, a mutagênese aleatória gera variantes sem inserção de material genético externo, configurando-se como alternativa não-OGM (organismos geneticamente modificados) (Bleisch *et al.*, 2022; Trovão *et al.*, 2022a).

Quando aplicada a microrganismos, a mutagênese aleatória resulta em variabilidade genética das populações, as quais fenótipos de interesse podem ser selecionados. No caso dos pigmentos, alterações em genes ligados à sua síntese ou regulação podem mudar a coloração da biomassa. Como trata-se de um método não direcionado, exige estratégia eficientes para a seleção dos mutantes resultantes. Em termos de pigmentos, essa seleção pode ser favorecida pelo uso de inibidores como norflurazon e oxifluorfen, que atuam sobre etapas específicas da biossíntese de pigmentos e, sob condições controladas, exercem pressão seletiva sobre populações previamente mutagenizadas (Bleisch *et al.*, 2022; Linden *et al.*, 1990; Schüler *et al.*, 2020; Trovão *et al.*, 2022a, 2024).

Assim, embora o emprego de estratégias como o cultivo heterotrófico e a mutagênese aleatória já tenham sido empregadas em linhagens do gênero *Spirulina* com diferentes objetivos biotecnológicos, sua aplicação direcionada à modulação da coloração da biomassa ainda é pouco explorada. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o emprego complementar dessas abordagens para a obtenção de biomassas com *Spirulina* com características cromáticas diferenciadas e, consequentemente, ampliar suas possibilidades de aplicação em alimentos. Enquanto a modificação das condições de cultivo direciona o metabolismo celular e altera a composição de pigmentos, a mutagênese aleatória amplia a variabilidade fenotípica e favorece a seleção de variantes com características pigmentares de interesse. Dessa forma, o diferencial da abordagem proposta está na utilização dessas estratégias não apenas para aumentar a produtividade ou modificar a composição da biomassa, mas especificamente como ferramentas para modular sua coloração, considerando simultaneamente as alterações no perfil de pigmentos e o potencial de aplicação da biomassa em diferentes matrizes alimentícias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar e avaliar estratégias biotecnológicas de cultivo e de mutagênese aleatória para modular a coloração da biomassa de *Spirulina*, visando a obtenção de biomassas com características cromáticas de interesse para aplicações alimentícias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do cultivo heterotrófico em batelada alimentada, utilizando diferentes fontes de carbono orgânico, sobre a coloração, a composição de pigmentos e a composição bioquímica da biomassa de *Spirulina*.

- Avaliar o efeito da redução gradual da intensidade luminosa, associada ao cultivo em batelada alimentada, sobre o crescimento, a composição de pigmentos e a coloração da biomassa de *Spirulina*.

- Avaliar o potencial da mutagênese aleatória na geração de variabilidade fenotípica relacionada à pigmentação de *Spirulina*, empregando pressão seletiva e marcadores fenotípicos para a triagem de variantes.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos unicelulares capazes de fixar dióxido de carbono (CO_2) durante o processo de fotossíntese. Esses microrganismos são fontes de compostos de alto valor agregado, como carotenoides, ficocianina, ácidos graxos poli-insaturados e aminoácidos essenciais. Por esse motivo, a biomassa microalgal é aplicada em áreas como cosmética, farmacêutica e alimentícia (Global Growth Insights, 2025; Morais *et al*., 2022; Sun *et al*., 2023).

Em relação a indústria alimentícia, as microalgas são consideradas fonte sustentável, pois não necessitam de solo, combatem o efeito estufa e podem atuar como alimento funcional (Razzak *et al.*, 2023). A composição microalgal é caracterizada pela presença de compostos capazes de suprir as necessidades nutricionais humanas. Dentre esses compostos destacam-se os carboidratos, proteínas e lipídios (Ang *et al.*, 2025; Borowitzka, 1999). Na Tabela 1, os percentuais dessas macromoléculas são mostrados em diferentes espécies de microalgas.

Tabela 1 - Composição percentual de macromoléculas em espécies de microalgas.

Espécie	Proteínas (% m/m)	Carboidratos (% m/m)	Lipídios (% m/m)	Referência
Spirulina sp. LEB 18	71,4	12,4	11,9	(Rosa *et al.*, 2016)
Chlorella vulgaris LEB 112	64,1	21,2	23,9	(Cruz, Rosa e Costa, 2023)
Tetraselmis chui CCMM 03/0201	55,2	34,7	10,1	(Villar-Navarro *et al.*, 2022)
Chlamydomonas reinhardtii CC1021	60,4	22,3	17,3	(Cassuriaga *et al.*, 2020)

Além de serem fonte de nutrição, os compostos microalgais podem possuir atividades biológicas, destacando-se atividades antibacteriana (Guleria *et al.*, 2024; Santhakumaran, Ayyappan e Ray, 2020; Schuelter *et al.*, 2019), antifúngica (Schmid *et al.*, 2022; Toshkova-Yotova *et al.*, 2022), antioxidante (León-Vaz *et al.*, 2023; Zayadi e Bakar, 2020) e anti-inflamatória (Gallego *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2024). Os principais compostos responsáveis pelas bioatividades são os carotenoides, biopeptídeos e ficobiliproteínas (Acquah *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2024; Moreira *et al.*, 2021).

As condições de cultivo das microalgas são determinantes para direcionar a produção dos metabólitos. Quando as microalgas são submetidas a condições químicas e ambientais adversas tendem a desviar sua via metabólica para a produção de compostos de interesse. Os diferentes gêneros de microalgas possuem pH e temperaturas ótimas, de modo que alterações nesses parâmetros podem resultar em variação no seu crescimento e produtividade (Daneshvar

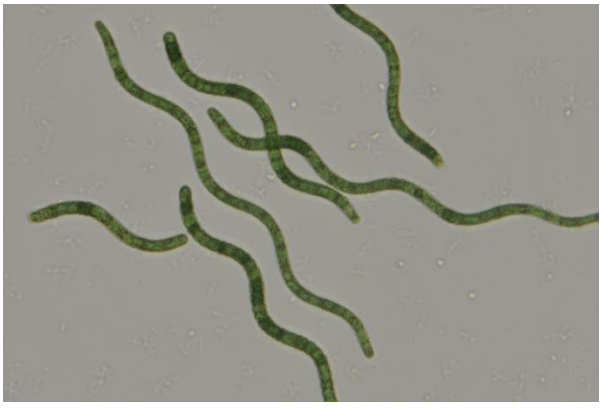
et al., 2021; Nazloo, Moheimani e Ennaceri, 2022; Nitsos *et al.*, 2020; Oliveira e Bragotto, 2022; Sun *et al.*, 2023). De maneira geral, as microalgas necessitam de macronutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo para seu desenvolvimento (Costa *et al*., 2019).

Para o cultivo das microalgas, utilizam-se sistemas que fornecem controle dos parâmetros de crescimento, denominados fotobiorreatores. Esses sistemas são classificados conforme suas características técnicas, podendo ser sistemas abertos ou fechados. Os reatores com sistema aberto são susceptíveis a contaminações, a baixa penetração da energia solar e uma alta evaporação, o que pode resultar em baixa produtividade de biomassa. Os sistemas fechados são uma maneira de contornar os problemas gerados nos abertos, garantindo maior controle e assepsia. Em relação a geometria dos reatores, os mais comuns utilizados são tipo frasco, tubular e raceways (Costa *et al*., 2019; Razzak *et al*., 2023).

3.1.1 *Spirulina*

Arthrospira, também conhecida como *Spirulina*, é cianobactéria verde-azulada, filamentosa, espiralada, que forma tricomas cilíndricos (Figura 1). Esta microalga é caracterizada por apresentar células procarióticas organizadas e por realizar sua divisão celular por fissão binária (Tomasselli, 1997). O seu cultivo é realizado em meio alcalino (pH 9,5 a 9,8), com temperatura ótima entre 30 à 38 ºC (AlFadhly *et al*., 2022; Costa *et al*., 2019).

Figura 1 - Microscopia óptica de *Spirulina* evidenciando a morfologia característica dos tricomas (40×).



Espécies como *Spirulina máxima* e *Spirulina platensis* são classificadas como microrganismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental que controla alimentos no Estados Unidos. Esta certificação indica a ausência de patogenicidade e toxicidade quando cultivada em condições apropriadas. Além disso, *Spirulina* sp. possui certificação europeia pela EFSA (*European Food*

Safety Association) e brasileira pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Por esse motivo, pode ser empregada na elaboração de alimentos (Chaudhary *et al.*, 2026; Lafarga *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2018; Oliveira e Bragotto, 2022). A relevância do seu uso em alimentos está associada a alta composição de proteínas em sua biomassa, por este fato é considerada superalimento (Chaudhary *et al.*, 2026; Lupatini, 2016).

Dentre as linhagens de *Spirulina* utilizadas em estudos biotecnológicos e alimentícios, destacam-se *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52. A linhagem *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa da Mangueira, localizada no município de Santa Vitória do Palmar, no Rio Grande do Sul (Morais *et al.*, 2008). Este microrganismo tem sido estudado para diversas aplicações, como a obtenção de compostos fenólicos (Christ-Ribeiro *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2021), nanopartículas bioativas (Assunção *et al.*, 2021; Rasia *et al.*, 2024), incorporação em achocolatado (Oliveira *et al.*, 2021) e produção de filmes (Sellaoui *et al.*, 2024). Por sua vez, a linhagem *Spirulina platensis* LEB 52 também apresenta potencial para aplicações biotecnológicas e alimentícias, tendo sido investigada em estudos relacionados à produção de biomassa, otimização das condições de cultivo e obtenção de compostos de interesse (Amarante *et al.*, 2020; Lima *et al*., 2022; Costa, Colla e Duarte Filho, 2004).

3.2 PIGMENTOS MICROALGAIS

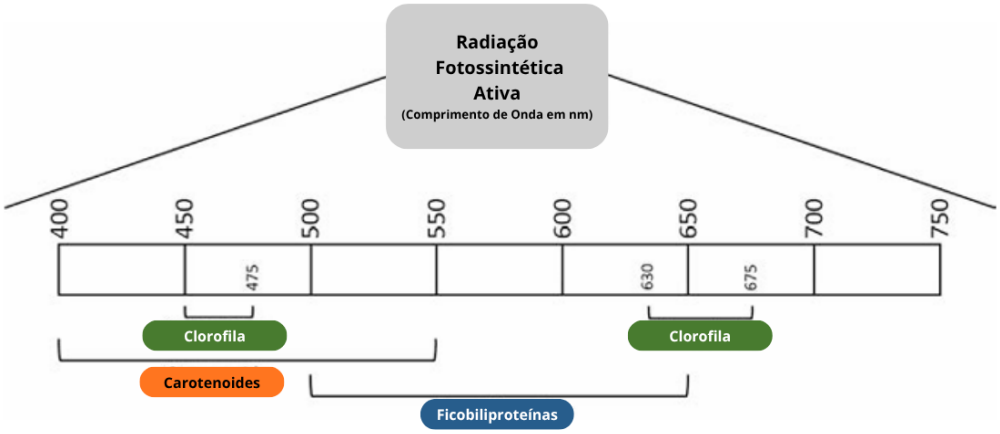
Os pigmentos fotossintéticos desempenham papel fundamental na captura da energia luminosa e na sua transferência para as reações fotoquímicas. Esses compostos integram os complexos antena e estão associados às membranas tilacoidais, que, nas microalgas eucarióticas, estão localizadas nos cloroplastos, enquanto, nas cianobactérias, encontram-se distribuídas no citoplasma, próximas e paralelas à superfície celular (Pagels *et al.*, 2020; Srivastava *et al.*, 2022). Nas espécies fotossintéticas, a conversão da energia luminosa em energia química ocorre por meio dos fotossistemas, estruturas constituídas por pigmentos capazes de absorver diferentes regiões do espectro luminoso e direcionar a energia para as reações bioquímicas envolvidas na síntese de moléculas energéticas, como adenosina trifosfato (ATP) e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH), além de carboidratos (Bukhov, 2004; Marzzoco e Torres, 2015).

Embora a fotossíntese constitua importante via de obtenção de energia para muitas microalgas, esses organismos não dependem exclusivamente desse processo. Algumas espécies são capazes de crescer em condições heterotróficas, utilizando compostos orgânicos como fontes de carbono e energia (Le *et al.*, 2024). Essa flexibilidade metabólica permite que as

condições de cultivo sejam moduladas de acordo com o objetivo de produção, inclusive visando à alteração ou ao acúmulo de determinados pigmentos de interesse (Dufossé, 2018; Le *et al.*, 2024; Morales-Sánchez *et al.*, 2015).

Os pigmentos fotossintéticos são classificados em três principais grupos: clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas. Essas moléculas apresentam diferentes propriedades espectrais e, consequentemente, absorvem regiões distintas do espectro da luz, ampliando a capacidade dos organismos fotossintéticos de captar energia luminosa. Dessa forma, cada classe de pigmento apresenta características de coloração associadas às respectivas bandas de absorção no espectro visível (Figura 2). Em microalgas e cianobactérias, a coloração observada na biomassa resulta, portanto, da composição e da concentração relativa desses pigmentos, podendo variar, de maneira geral, entre tonalidades de verde, amarelo, laranja, azul e vermelho (D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016; Pagels *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2023).

Figura 2 - Representação esquemática da radiação fotossintética ativa (banda de absorção) dos pigmentos.



Fonte: Adaptado de Pagels *et al.* (2020).

A composição de pigmentos da biomassa pode ser influenciada por diferentes condições de cultivo, possibilitando o direcionamento do metabolismo para o acúmulo de pigmentos específicos. Essa característica tem relevância biotecnológica, uma vez que os pigmentos microalgais apresentam potencial para aplicação como corantes naturais e funcionais na indústria de alimentos. Entre os principais pigmentos de interesse destacam-se a clorofila *a*, associada à coloração verde e encontrada, por exemplo, em *Chlorella* e *Spirulina*; a ficocianina, de coloração azul e característica de *Spirulina*; o β-caroteno, de coloração amarelada, produzido em elevada concentração por *Dunaliella*; e a astaxantina, que pode apresentar tonalidades do amarelo ao vermelho e é encontrada em *Haematococcus* (Christaki, Bonos e Florou-Paneri, 2015; Lichtenthaler, 1987; Pagels *et al.*, 2020; Sankaran *et al.*, 2018).

Para a aplicação em alimentos, os pigmentos podem ser extraídos da biomassa microalgal por meio de solventes apropriados, cuja seleção deve considerar, entre outros fatores, a polaridade dos compostos de interesse. Esses pigmentos são utilizados principalmente para conferir ou intensificar a coloração dos alimentos, tornar sua aparência visual mais atrativa, restaurar a cor perdida durante o processamento e conferir coloração a produtos originalmente incolores (García-Vaquero, Brunton e Lafarga, 2021).

3.2.1 Clorofila

As clorofilas são os pigmentos responsáveis pela coloração verde característica na maioria das microalgas. Esses são pigmentos fundamentais para a realização da fotossíntese em todos os organismos autotróficos (García-Vaquero, Brunton e Lafarga, 2021). A sua região de absorção está concentrada de 450 a 475 nm e 630 a 675 nm (Pagels *et al.*, 2020). As clorofilas são lipossolúveis, fazendo com que sejam utilizados para sua extração solventes como acetona, etanol e metanol (Roca, Chen e Pérez-Gálvez, 2016).

As estruturas das clorofilas são derivadas da porfina, a qual é caracterizada por estrutura macrocíclica insaturada composta por quatro anéis ligados por ponte de carbono. A partir destas conformações são originadas as clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*. A clorofila *a* é o centro das reações da fotossíntese, enquanto as demais são pigmentos acessórios para ampliação da faixa de absorção de luz (Damodaram, Parkin e Fennema, 2010).

A clorofila *a*, *b*, *c*, e *d* possuem as cores azul-esverdeada, verde-brilhante, verde-amarelo, verde floresta e verde esmeralda, respectivamente. Desta maneira, a variedade de cores está associada ao grande intervalo de absorção. Nem todas as formas de clorofila estão presentes nos organismos. A clorofila *a* é encontrada em plantas, algas verdes e cianobactérias, como *Spirulina*. Enquanto a clorofila *b* é encontrada nas clorófitas e euglenófitas, como a *Chlorella* e *Euglena*, e a clorofila *c* e *d* nas rodófitas (Christaki, Bonos e Florou-Paneri, 2015; Maxwell e Johnson, 2000; Roca, Chen e Pérez-Gálvez, 2016; Srivastava *et al.*, 2022).

As clorofilas são aplicadas na elaboração de alimentos como corantes quando na forma de clorofila de cobre e sódio, devido sua maior estabilidade e absorção. Adicionalmente, as clorofilas são associadas a benefícios como impulsionadoras do sistema imunológico, efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos e anticarcionogênicos. No entanto, quando incorporadas em alimentos resultam em baixa aceitação sensorial, devido ao odor herbáceo, sabor amargo e cor que faz os consumidores a associarem a sabores e ingredientes negativos ao seu paladar. Dessa

forma, o uso das clorofilas geralmente é combinado com estratégias de mascaramento (Cao *et al.*, 2023; Gohara-Beirigo *et al.*, 2022).

3.2.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais que realizam funções fundamentais na fotossíntese, absorvendo luz em regiões em que a clorofila não é eficiente e atuando como fotoprotetor. A banda de absorção dos carotenoides compreende a faixa de 400 a 550 nm. Esses pigmentos são caracterizados por serem insolúveis em água, fazendo com que sejam solúveis em solventes como clorofórmio, acetona e álcool (D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016; Pagels *et al.*, 2020).

A estrutura primária dos carotenoides é formada por 40 carbonos, os quais são caracterizados por unidades de isopreno com ligações covalentes (Damodaram, Pakin e Fennema, 2010). Esta estrutura é precursora de mais de 750 tipos de carotenoides (García-Vaquero, Brunton e Lafarga, 2021). Dentre essas categorias de carotenoides as principais presentes em microalgas são β-caroteno, astaxantina, zeaxantina, violaxantina, luteína e licopeno (D'Alessandro e Antoniosi Filho, 2016).

O estudo dos carotenoides é incentivado principalmente por sua importância para a nutrição humana. Os carotenoides não podem ser sintetizados pelo organismo humano, sendo obtidos apenas por via exógena, por meio da alimentação. Os benefícios do consumo de carotenoides a saúde são relacionados ao melhoramento de funções cognitivas e imunológicas, diminuição do risco de inflamações e doenças crônicas (Cao *et al.*, 2023; Levasseur, Perré e Pozzobon, 2020).

A produção de carotenoides por fontes naturais enfrenta dificuldades relacionadas aos custos elevados de fabricação. Todavia, a síntese deste pigmento por microalgas tem ganhado destaque devido à alta produtividade sua relação com a facilidade de absorção pelo organismo humano. Exemplos notáveis incluem as microalgas *Spirulina* e *Chlorella*, que são empregadas na produção de β-caroteno e luteína, os quais são empregados como corantes alimentícios e nutraceuticos. Para explorar todo o potencial dessas microalgas, ainda devem ser realizados estudos dos carotenoides para o aprimoramento das condições de cultivo que resultem no maior acúmulo e pureza (Cao *et al.*, 2023).

3.2.3 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos normalmente presentes nas Glaucófitas, Criptófitas, algas vermelhas e cianobactérias. Esses pigmentos absorvem luz na faixa de 500 a 650 nm. Além disso, possuem natureza hidrofílica, podendo ser extraídas com o uso de tampão salino, por meio da variação do pH no intervalo de 6,5 a 8,0 (García-Vaquero, Brunton e Lafarga, 2021; Yu *et al.*, 2024).

A estrutura das ficobilinas é composta por grupos protéticos lineares ligados a resíduos específicos do aminoácido cisteína (Christaki, Bonos e Florou-Paneri, 2015; Yu *et al.*, 2024). Por este fato compõem maior parte do conteúdo proteico celular. Desta estrutura são originárias quatro ficobiliproteínas, sendo elas: c-ficocianina (azul), aloficocianina (verde-azulada), ficoeritrina (roxo) e ficoeritrocianina (laranja) (Madji *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2023).

Na cianobactéria *Spirulina*, a ficobiliproteína típica é a c-ficocianina. O seu cromóforo, junto com a clorofila, é o que confere a coloração verde-azulada característica do gênero (Stokkum et al., 2025). Esse pigmento é muito utilizado na indústria alimentícia como corante natural em substituição aos sintéticos. Isso porque garantem baixa toxidade e podem conferir ao alimento atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. A aloficocianina também é produzida pela *Spirulina* e possui os mesmos atributos para fins de saúde descritos para a c-ficocianina (Ji *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Assim, apesar das suas vantagens descritas anteriormente, possuem dificuldades relacionadas a produção, pureza e estabilidade. Em relação ao custo, por exemplo, o preço da comercialização de c-ficocianina pode ser cerca de 40 vezes maior quando comparado a produção de pó seco de *Spirulina*. Em virtude disso, a maioria dos estudos baseiam-se em condições de cultivo que resultem em maiores acúmulos deste pigmento e maior facilidade da sua separação dos outros componentes da biomassa microalgal (Cao *et al.*, 2023; Jaeschke *et al.*, 2021).

3.3 ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM BIOMASSA DE *SPIRULINA*

O aumento da população global vem sendo preocupação da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), isso porque proporcionalmente a este incremento, ocorre o acréscimo da demanda por alimento (FAO, 2023). A grande dificuldade está relacionada a segurança alimentar, pois esses alimentos não devem apenas estarem disponíveis e suficientes, mas também devem atender as necessidades nutricionais da

sociedade. A escassez alimentícia é uma realidade e pode ser visualizada com o impacto da pandemia de COVID-19, o qual mostrou as limitações na produção de alimentos, distribuição e consumo (Ahmad e Ashraf, 2023; FAO; *et al.*, 2024).

Neste contexto, as microalgas como a *Spirulina*, surgem como fonte sustentável de bioprodutos alimentícios. O seu uso na área alimentícia destaca-se, pois, seu cultivo não requer a utilização de grandes quantidades de água doce, pesticidas e terra. Ainda, pode realizar a mitigação de gases do efeito estufa durante seu cultivo. A biomassa proveniente, quando incorporada em alimentos, é associada a benefícios a saúde como consequência da presença de substâncias bioativas em sua composição. Por conta disso, também é muito utilizada como fonte de nutrição para consumidores que buscam dieta mais saudável (Chen *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023).

Em razão das suas vantagens, estudos estão sendo realizados para avaliar seu comportamento na incorporação em alimentos. Lucas *et al.* (2018) desenvolveram *snacks* enriquecidos com 2,6% de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Quando comparado ao controle (0% de *Spirulina*), mostrou aumento na composição nutricional de 22,65% de proteínas, 28,1% em lipídios, 46,4% em minerais e influência significativa dos pigmentos microalgais na cor dos *snacks*. Além disso, a formulação apresentou índice de aceitação sensorial de 82%. Silva, Valle e Perrone (2021) produziram biscoitos veganos enriquecidos com 20% de biomassa de *Spirulina máxima* microencapsulada em *spray-dryer*. O resultado foi biscoito com 40% (10,8 g/ 100 g de produto) mais proteínas (controle = 8,05 g/100 g de produto) e aceitação de 79,2% do mercado, com diminuição 7% na pontuação de intenção de compra devido a aparência. Santos *et al.* (2016), desenvolveram *shake* com sabor chocolate enriquecido com *Spirulina* sp. LEB 18. A composição apresentou 42% de proteínas e 46% de carboidratos, com taxas médias de aceitação de 7,68, a qual é considerada bem aceita pelo público-alvo.

Apesar dos benefícios associados à incorporação de *Spirulina* em alimentos, a coloração verde-azulada característica de sua biomassa pode constituir uma limitação para sua aplicação em diferentes matrizes alimentícias. A incompatibilidade de alimentos com a coloração verde pode comprometer a aceitação sensorial do produto. Estudos demonstram que a incorporação de *Spirulina* pode modificar significativamente a aparência dos produtos. Zouari *et al.* (2011) observaram que o aumento da concentração de *Spirulina platensis* em massas alimentícias promoveu o escurecimento do produto e a intensificação da coloração verde. Lafarga (2019) observaram que o aumento da concentração de *Spirulina* em sopas de brócolis resultou em colorações mais escuras, enquanto Paternina *et al.*(2022) demonstraram que concentrações crescentes de *Spirulina* sp. LEB 18 intensificaram a coloração verde de gomas de gelatina.

Silva, Valle e Perrone (2021) também observaram alterações na aparência de biscoitos veganos enriquecidos com *Spirulina*. Esses resultados demonstram que a incorporação de biomassa microalgal pode modificar de maneira significativa as características cromáticas dos alimentos, evidenciando a necessidade de estratégias que permitam adequar a coloração da biomassa às diferentes aplicações alimentícias.

Os estudos destacados, que exploram a incorporação de microalgas em uma variedade de produtos, demonstram seu potencial para melhorar a composição nutricional dos alimentos. As propriedades únicas da *Spirulina* podem trazer benefícios à saúde quando incorporadas em alimentos. Portanto, investir na pesquisa e implementação de tecnologias alimentares baseadas em microalgas pode ser uma estratégia promissora para promover a segurança alimentar global e construir um futuro mais sustentável (Chaudhary *et al.*, 2026; Franco Lucas e Brunner, 2024; Gohara-Beirigo *et al.*, 2022).

3.4 INFLUÊNCIA DA COR NO CONSUMO DE ALIMENTOS

A cor interfere diretamente na percepção dos alimentos pelos consumidores, uma vez que é a primeira característica observada, dirigindo as expectativas sensoriais e hedônicas. A importância deste atributo é associada a qualidade dos alimentos, pois é através dela que os consumidores associam se um alimento está maduro ou deteriorado (Macdougall, 2010). As propriedades sensoriais dos alimentos podem sofrer interferência prévia devido ao impacto visual da cor e da aparência. A observação gera uma expectativa, o que torna fator decisivo antes da experiência do sabor. Deste modo, a cor é uma das características dominantes que determinam a evasão do consumo do alimento (Silva *et al.*, 2025; Spence e Piqueras-Fiszman, 2016).

Na maioria das vezes, a evasão alimentar está associada a concentração de corantes alimentares. Os consumidores relacionam a cor marcante a aditivos que causam malefícios a saúde. Isso torna as questões sobre aceitação do alimento mais amplas que as sensoriais discriminativas. Essas implicações psicológicas podem induzir o consumidor a ter alterações no gosto e ingestão, considerando a sua predileção por determinada coloração. Isso faz com que cores vibrantes tenham maior índice de rejeição pelos consumidores (Hutchings, 2012; Silva *et al.*, 2025; Spence e Piqueras-Fiszman, 2016).

A cor em alimentos produzidos com a incorporação de biomassa microalgal é exemplo do impacto visual e das implicações psicológicas. Ainda que sejam reconhecidas como produtos com elevada qualidade nutricional e físico-química, a cor verde intensa é fator que leva a baixa

aceitação sensorial (Ang *et al.*, 2025; Lafarga, 2019; Olsen, Olsen e Jensen, 2024). Por isso, estudos vêm sendo realizados com a finalidade de anular ou diminuir a intensidade de cor da biomassa, utilizando técnicas que envolvem a mutação das linhagens (Schüler et al., 2020; Trovão et al., 2022). A expectativa é que a incorporação dessas linhagens mutantes em alimentos resulte em maior aceitação dos consumidores.

3.5 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS

O cultivo heterotrófico de microalgas caracteriza-se pela manutenção desses microrganismos na ausência de luz, utilizando fontes orgânicas de carbono para o crescimento celular. Essa estratégia é frequentemente empregada com o objetivo de direcionar as rotas metabólicas das microalgas para a produção e o acúmulo de compostos. A ausência de luz também está associada à degradação da clorofila, o que pode influenciar a produção de outros pigmentos assessórios, como as ficobiliproteínas, e fotoprotetores, como carotenoides (Hu *et al.*, 2018; Mostafa e Hashem, 2024).

O desenvolvimento celular de microalgas em cultivo heterotrófico requer a suplementação do meio com uma fonte de carbono orgânico. Isso ocorre porque, em condições heterotróficas, não há disponibilidade de luz para sustentar a assimilação fotossintética do carbono inorgânico presente nos meios de cultivo convencionais. Entre as fontes de carbono orgânico mais utilizadas estão a glicose, o glicerol e os acetatos, cuja concentração no meio pode ser ajustada de acordo com a relação carbono/nitrogênio (C/N), visando favorecer o crescimento e a composição da biomassa (Lacroux *et al.*, 2023).

Além da suplementação com carbono orgânico, o modo escolhido para conduzir a adição desse substrato é fator importante em cultivo heterotrófico. Os dois principais modos de operação utilizados são batelada e batelada alimentada. Entretanto, quando se busca obter maiores concentrações celulares e, consequentemente, maiores rendimentos de biomassa, a operação em batelada alimentada pode ser empregada. Nesse sistema, o fornecimento gradual de carbono permite maior disponibilidade de substrato ao longo do cultivo, favorecendo o melhor desenvolvimento celular (Ruiz *et al.*, 2022; Velea, Oancea e Fischer, 2017).

Contudo, nem todas as espécies de microalgas são capazes de assimilar o carbono orgânico do meio. Em decorrência disso não podem ser cultivadas em condições heterotróficas, devido à ausência de transportadores de carbono característico da membrana celular de heterótrofos. Gênero como *Spirulina*, possuem mecanismos que permitem a utilização de fontes orgânicas de carbono e podem, ainda, ser submetidos a estratégias de cultivo específicas para

favorecer o acúmulo de compostos bioativos. O aprimoramento das linhagens também pode ser realizado por meio de estratégias de melhoramento genético, visando à obtenção de características de interesse, incluindo alterações em características relacionadas ao crescimento e à composição da biomassa (Mühling, Belay e Whitton, 2005; Nagarajan, Lee e Chang, 2018; Velea, Oancea e Fischer, 2017).

Quando comparado ao cultivo autotrófico, o cultivo heterotrófico de microalgas apresenta vantagens relacionadas à velocidade de crescimento, à eficiência energética, à flexibilidade nutricional e ao potencial de aplicação industrial. Além disso, os sistemas de cultivo não precisam necessariamente ser conduzidos em fotobiorreatores, sendo possível utilizar fermentadores, o que pode facilitar a ampliação da escala de produção. Entretanto, entre as principais limitações dessa estratégia estão a maior suscetibilidade à contaminação por bactérias e o custo associado às fontes de carbono utilizadas para a suplementação dos cultivos (Le *et al.*, 2024; Lu *et al.*, 2024; Yousuf, 2019).

3.6 MUTAÇÃO

A replicação, transcrição e tradução do DNA são processos bem definidos que podem sofrer imperfeições. Os erros em um material genético, ou mesmo alterações na sequência, são denominados de mutações. Este fenômeno apesar de ser associado a condições prejudiciais, é um dos principais processos que garantem a variabilidade genética. Assim, as mutações podem ocorrer através do surgimento de novos alelos de forma espontânea ou induzida. Esses alelos são reagrupados em novas combinações por meio da recombinação, outro processo primordial na evolução genética (Zeigler, 2014).

As mutações podem ser de natureza cromossômica, onde ocorrem modificações na estrutura ou no número de cromossomos, ou gênica, aquelas que ocorrem em genes individuais. Todavia, as mutações mais estudadas são aquelas que resultam na alteração de pequeno número de bases adjacentes ou único par de bases nitrogenadas, conhecidas como mutações de ponto (Clark, Pazdernik e McGehee, 2019).

As mutações de ponto são causadas por mecanismos como: transição, quando ocorre a substituição de uma base por outra de mesma classe química; transversão, quando a base é substituída por uma de classe química diferente; e, indel, quando há a adição ou deleção de pares de bases. Essas alterações podem originar mudanças na matriz de leitura dos códons, resultando em proteínas sem parte da estrutura ou sem função biológica (Griffths *et al.*, 2015). Desta maneira, as mutações podem exercer influência nas regiões codificadoras e não

codificadoras. Nas regiões codificadoras as mutações podem ocorrer de forma silenciosa, sentido trocado e sem sentido. As silenciosas acontecem quando o códon é modificado por outro que expresse o mesmo aminoácido. Já as com sentido trocado, ou não sinônimas, o códon de um aminoácido é trocado por outro. Nas mutações sem sentido, o códon é modificado por um de término de tradução (Zeigler, 2014).

Em regiões não codificadoras, as mutações podem atuar reduzindo a quantidade de produto expresso, resultando em modificações em tecidos e em estímulos ambientais. Essas mudanças resultam em pouca ou nenhuma alteração fenotípica, pois os sítios de mutações podem estar envolvidos a proteínas reguladoras com funções irrelevantes, ou que poderão ter sua função duplicada (Griffths *et al.*, 2015).

Para os erros descritos nos parágrafos anteriores, existem diversos mecanismos de reparo que revertem os efeitos dos processos mutagênicos. Dentre esses destacam-se: o reparo por fotoreativação enzimática, os quais impedem a replicação dos dímeros de pirimidina; reparo por excisão, onde ocorre a remoção de uma base defeituosa e inserção da base correta; reparo por excisão de nucleotídeos, a qual reconhece e corrige lesões do DNA causadas por radiação; reparo de bases malpareadas, corrigidos em filamentos recém sintetizados do DNA; e, sistema de reparação por resgate, onde é resgatada a sequência de fita normal a qual é repolimerizada (Clark, Pazdernik e McGehee, 2019). Assim, as mutações podem ter origem espontânea em erros na replicação do DNA ou mutações induzidas. As mutações induzidas são desenvolvidas por meio da exposição a agentes mutagênicos físicos ou químicos. As mutações realizadas em laboratório pela exposição controlada de agente mutagênicos é denominada mutagênese (Gerlai, 2018).

3.7 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA

A mutagênese aleatória emerge como uma poderosa ferramenta para induzir alterações genéticas específicas em microalgas, buscando aprimorar características fenotípicas e ampliar a variabilidade genética. Essa abordagem emprega agentes mutagênicos capazes de aumentar a frequência de alterações no material genético, acelerando a geração de variabilidade em relação aos processos de mutação espontânea e possibilitando a seleção de características de interesse biotecnológico, como alterações na produção de metabólitos e na composição da biomassa (Trovão *et al*., 2022).

A principal vantagem da mutagênese aleatória está relacionada em sua abordagem natural, que evita a introdução de material genético de outras espécies. O foco está na aceleração

de processos celulares espontâneos, que resultam em mudanças fenotípicas irreversíveis. A eficácia dessa técnica é monitorada através da taxa de sobrevivência celular e da taxa de mutação, sendo crucial avaliar a concentração do agente mutagênico utilizado (Bleisch *et al*., 2022; Trovão *et al*., 2022).

Os mutagênicos utilizados podem ser de natureza química ou física. Os físicos são caracterizados principalmente pela utilização de fonte de radiação, destacando-se a ultravioleta (UV) e ionizante. Dentre os químicos, os mais utilizados são os agentes alquilantes, os quais realizam a alquilação das bases nitrogenadas, o que resulta na modificação do nucleotídeo complementar (Bleisch *et al.*, 2022; Fathy *et al.*, 2023; Spencer-Lopes *et al.*, 2018).

No contexto das microalgas, a obtenção de variantes com características fenotípicas distintas depende da geração de variabilidade genética e da posterior identificação e seleção dos indivíduos que apresentem o fenótipo de interesse. Em particular, estratégias de cultivo podem ser empregadas em conjunto com a mutagênese para favorecer a identificação de características específicas. Nesse sentido, o cultivo heterotrófico pode constituir uma condição de seleção relevante para a obtenção de variantes com alterações na composição de pigmentos e, consequentemente, na coloração da biomassa. Entretanto, como as alterações promovidas pela mutagênese aleatória ocorrem de maneira não direcionada, torna-se necessário estabelecer estratégias de seleção capazes de identificar e recuperar as linhagens que expressem o fenótipo desejado (Bleisch *et al.*, 2022; Schüler *et al.*, 2020).

Além disso, o cultivo heterotrófico pode desempenhar um papel adicional no contexto da mutagênese ao influenciar mecanismos celulares envolvidos no reparo do DNA. Entre esses mecanismos está a fotorreativação enzimática, processo no qual enzimas específicas utilizam energia luminosa para reparar lesões no DNA, incluindo aquelas decorrentes da formação de dímeros de pirimidina. Como a fotorreativação depende da exposição à luz, a manutenção das células em condições de ausência de iluminação pode reduzir a atuação desse mecanismo de reparo sobre determinadas lesões induzidas no DNA (Clark, Pazdernik e McGehee, 2019).

As aplicações da mutagênese aleatória em microalgas têm demonstrado potencial para modificar características de interesse biotecnológico, incluindo o conteúdo de carotenoides, características relacionadas à biossíntese de clorofila e o acúmulo de lipídios. Entretanto, para viabilizar a utilização dessas linhagens em aplicações alimentícias, é fundamental realizar uma caracterização criteriosa das variantes obtidas, considerando tanto suas características fenotípicas quanto sua composição nutricional e segurança (Beacham *et al*., 2015; Schüler *et al*., 2020, 2021; Trovão *et al*., 2024).

É importante ressaltar que organismos obtidos por mutagênese convencional ou aleatória não são necessariamente classificados da mesma forma que organismos geneticamente modificados (OGMs) obtidos por técnicas de engenharia genética. Dessa forma, a utilização de biomassa proveniente de linhagens mutagenizadas em aplicações alimentícias deve ser acompanhada de avaliações que permitam caracterizar suas propriedades nutricionais e sua segurança para o consumo. Nesse contexto, a mutagênese aleatória em microalgas constitui uma estratégia promissora para ampliar a variabilidade genética disponível e possibilitar a seleção de características de interesse, contribuindo para o desenvolvimento de novas linhagens destinadas a aplicações nos setores de alimentos e biotecnologia (Schüler *et al*., 2020; Trovão *et al*., 2022).

3.8 HISTÓRICO DOS LABORATÓRIOS LEB, MIBI E MARBIOTECH

Os laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB) e Bioquímica e Microbiologia (MiBi), pertencentes a Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foram fundados em 1996 e 2014, respectivamente. Ambos os laboratórios têm como principal linha de pesquisa a biotecnologia com microalgas, a qual envolve o isolamento de novas linhagens, alterações nas condições de cultivo e aplicação de biomassa no desenvolvimento de alimentos.

As linhagens utilizadas no presente trabalho consistem na *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52, ambas pertencentes ao banco de cepas do LEB (Morais *et al.*, 2015). Em pesquisas no LEB e MiBi, as duas linhagens são associadas a trabalhos que visam o aperfeiçoamento de condições de cultivo que consequentemente resultem no melhoramento da conversão e composição das biomassas resultantes (Andrade e Costa, 2008; Andrade e Costa, 2008; Bezerra *et al*., 2020; Cardoso *et al*., 2020; Margarites *et al*., 2017; Mata *et al*., 2020).

Em termos da incorporação em alimentos, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 destaca-se: no melhoramento nutricional de Kefir (Nascimento *et al.*, 2022) ; produção de *Snacks* (Lucas *et al.*, 2018), repositores energéticos em gel (Moreira *et al.*, 2018); *shakes* (Santos *et al.*, 2016), nanoencapsulação da biomassa para uso em alimentos funcionais (Rasia *et al.*, 2024). Para a *Spirulina platensis* LEB 52, o histórico de aplicação em alimentos está principalmente relacionado à utilização de seus pigmentos, com destaque para a C-ficocianina. A biomassa dessa linhagem foi empregada como fonte para obtenção e purificação de C-ficocianina, visando sua utilização como corante natural em alimentos (Sala, 2017). Posteriormente, a C-ficocianina obtida de *Spirulina platensis* LEB 52 foi incorporada em sorvete, demonstrando seu

potencial como corante natural e ingrediente bioativo em uma matriz alimentícia (Amarante *et al.*, 2020).

Em paralelo, o laboratório *Marine Biotechnology* (MarBiotech) do Centro de Ciências do Mar (CCMar) é pertencente a Universidade do Algarve (UAlg) em Portugal. A suas linhas de pesquisa abrangem microalgas e outros organismos marinhos, as quais visam a valoração de biomassa, reaproveitamento de nutrientes, aumento da produtividade, biorremediação de águas residuais e isolamento de compostos bioativos.

O MarBiotech tem empregado a mutagênese química aleatória associada a estratégias de seleção para o melhoramento de características metabólicas e cromáticas de microalgas. Em *Tetraselmis striata* CTP4, a combinação de mutagênese, citometria de fluxo e norflurazona possibilitou a obtenção de variantes com maior conteúdo de carotenoides e ácidos graxos de interesse (Schüler *et al.*, 2021b). Posteriormente, no projeto ProFuture, a utilização de EMS e métodos de seleção visual e por citometria permitiu obter variantes de *Chlorella vulgaris* e *Tetraselmis chui* com maior conteúdo proteico e menor teor de clorofila, destacando-se a linhagem GL3 de *C. vulgaris*, com coloração amarelada, cerca de 20 vezes menos clorofila e maior conteúdo proteico (Bombo, 2021; Schüler *et al.*, 2020). Mais recentemente, o uso combinado de EMS e oxifluorfeno possibilitou o isolamento de variantes de *Scenedesmus rubescens* e *C. vulgaris* com diferentes colorações e reduções de até 55% e 95% no conteúdo de clorofila, respectivamente, reforçando o potencial dessa abordagem para melhorar características sensoriais e adequar a biomassa microalgal a aplicações alimentícias (Trovão *et al.*, 2024).

Assim, os estudos desenvolvidos pelos grupos LEB, MIBI e MarBiotech constituem bases complementares para a presente pesquisa. No LEB e MIBI, o histórico de estudos com *Spirulina* contribuiu para o conhecimento das condições de cultivo, composição da biomassa, produção de pigmentos e aplicação em alimentos, culminando na investigação da modulação da coloração por meio da alteração das condições de cultivo. No MarBiotech, a experiência com mutagênese aleatória e seleção de variantes demonstrou a possibilidade de direcionar características pigmentares e organolépticas de microalgas por meio do melhoramento de linhagens. Nesse contexto, o presente trabalho integra essas duas abordagens em *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52, empregando a modificação das condições de cultivo e a mutagênese aleatória como estratégias complementares para a modulação da coloração da biomassa, considerando as alterações no conteúdo e no perfil de pigmentos como fatores associados às mudanças cromáticas e visando à obtenção de biomassas com características mais adequadas à aplicação em alimentos.

3.9 OBJETIVOS DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (ODS)

A Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu, em 2015, 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que integram a Agenda 2030 e têm como finalidade orientar ações voltadas à promoção do desenvolvimento econômico, social e ambiental de forma integrada (United Nations, 2015). Nesse contexto, o presente trabalho apresenta contribuições relacionadas a seis ODS:

- ODS 2 – Fome Zero e Agricultura Sustentável: A biomassa de *Spirulina*, rica em proteínas e pigmentos bioativos, representa uma fonte alternativa e sustentável de ingredientes alimentícios, cujo cultivo não depende de áreas agrícolas convencionais, contribuindo para a diversificação de matérias-primas na produção de alimentos.
- ODS 3 – Saúde e Bem-Estar: A biomassa apresenta elevado valor nutricional e compostos bioativos de interesse alimentício e funcional. As estratégias avaliadas nesta tese focaram na modulação da pigmentação e composição da biomassa, ampliando seu potencial de aplicação, no entanto, sem avaliar diretamente efeitos fisiológicos ou clínicos na saúde humana.
- ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura: Foram desenvolvidas e avaliadas estratégias biotecnológicas para modulação da biomassa de *Spirulina*, incluindo cultivo heterotrófico, redução gradual da intensidade luminosa e mutagênese aleatória associada a pressão seletiva. Essa última consiste em uma alternativa não-OGM para geração e triagem de variantes de pigmentação, contribuindo para o desenvolvimento de biomassas com características diferenciadas e potencial industrial.
- ODS 12 – Consumo e Produção Responsáveis: O cultivo heterotrófico e a redução da intensidade luminosa modificaram a coloração e composição da biomassa, favorecendo sua incorporação em alimentos onde a aparência é uma barreira de aceitação. O cultivo heterotrófico ainda reduz a dependência de iluminação artificial, favorecendo a eficiência do processo produtivo.
- ODS 17 – Parcerias e Meios de Implementação: A colaboração internacional com a Universidade do Algarve (Portugal) favoreceu o intercâmbio científico e tecnológico em biotecnologia de microalgas, alinhando-se ao fortalecimento de parcerias para o desenvolvimento sustentável.

Em conjunto, as estratégias investigadas contribuem para a modulação e diversificação da biomassa de *Spirulina*, reduzindo limitações associadas à coloração e ampliando seu

potencial como ingrediente alimentício, com ênfase nos ODS 2, 9 e 12, e contribuições complementares aos ODS 3 e 17.

CAPÍTULO III

ARTIGO I

BIOMASSA DE *SPIRULINA* COM COR MODULADA PRODUZIDA POR CULTIVO HETEROTRÓFICO PARA APLICAÇÃO COMO INGREDIENTE ALIMENTÍCIO SUSTENTÁVEL

BRITO, G.M.K.; COSTA, J.A.V.; BARREIRA, L.; MORAIS, M.G. **Color-Modulated *Spirulina* Biomass Produced Under Heterotrophic Cultivation as a Sustainable Food Ingredient**. *Foods*, v. 15, n. 15, p. 2761, 2026.

BIOMASSA DE *SPIRULINA* COM COR MODULADA PRODUZIDA POR CULTIVO HETEROTRÓFICO PARA APLICAÇÃO COMO INGREDIENTE ALIMENTÍCIO SUSTENTÁVEL

RESUMO

A intensa coloração verde da biomassa de *Spirulina* limita sua incorporação em produtos alimentícios, apesar de seu elevado valor nutricional e da presença de compostos bioativos. Este estudo avaliou o cultivo heterotrófico em batelada alimentada de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando glicose e acetato de sódio, com o objetivo de modular a coloração da biomassa e preservar composição nutricionalmente relevante para sua aplicação como ingrediente alimentício. Após 10 dias, todos os cultivos heterotróficos apresentaram atenuação da coloração verde, com diferenças totais de cor superiores a $\Delta E > 7$ em relação aos controles. A redução do teor de clorofila *a* foi consistente com as alterações de cor observadas, enquanto os teores de ficocianina e carotenoides não diferiram significativamente dos controles autotróficos. O cultivo suplementado com acetato de sódio alimentado a 0,2 g L^{-1} apresentou composição proteica semelhante à do controle e foi a condição que exibiu a maior atenuação da coloração ($\Delta E = 10,33$), sem redução acentuada do teor de proteínas. Os cultivos suplementados com glicose resultaram em maior acúmulo de lipídios e carboidratos, refletindo o redirecionamento do carbono para compostos de reserva energética. Os resultados demonstram que o cultivo heterotrófico de *Spirulina* sp. LEB 18 constitui uma estratégia promissora para modular a coloração e a composição da biomassa, ampliando sua aplicabilidade, particularmente em matrizes alimentícias nas quais a coloração verde limita a aceitação pelos consumidores.

Palavras-Chave: Cianobactéria. Composição Nutricional. Pigmentos. Fontes de Carbono.

1 INTRODUÇÃO

A escassez de recursos e o crescimento descontrolado da população mundial têm despertado preocupação entre governos, organizações e a comunidade científica, particularmente no que se refere à nutrição e à segurança alimentar (Ahmad; Ashraf, 2023). Como resultado, intensificou-se a busca por fontes alternativas que não dependam do uso de solo e de água doce, visando à produção sustentável de alimentos com elevado valor nutricional (Sutherland *et al.*, 2021). Nesse contexto, as microalgas emergem como uma fonte sustentável de biomassa e de bioprodutos alimentícios. O uso de microalgas na produção de alimentos contribui para cinco dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS): 2 - Fome Zero e Agricultura Sustentável; 3 - Saúde e Bem-Estar; 9 - Indústria, Inovação e Infraestrutura; 12 - Consumo e Produção Responsáveis; e 14 - Vida na Água (Yan *et al.*, 2025).

Spirulina é uma cianobactéria filamentosa amplamente explorada para aplicações alimentícias e biotecnológicas. Embora seja taxonomicamente classificada como uma cianobactéria, é comumente referida como microalga nas áreas de alimentos e biotecnologia devido ao seu uso histórico e industrial (Costa *et al.*, 2019a, 2019b). É reconhecida por seu potencial para mitigar as emissões de gases de efeito estufa e é certificada como segura para consumo tanto pela FDA (Food and Drug Administration) quanto pela EFSA (European Food Safety Authority) (Costa *et al.*, 2019a; Sankaran *et al.*, 2018). A biomassa proveniente do cultivo de *Spirulina* é utilizada na indústria de alimentos como ingrediente funcional por ser rica em compostos bioativos, como pigmentos com atividade antioxidante, aminoácidos essenciais e ácidos graxos poli-insaturados (Costa *et al.*, 2020; Ismaiel; El-Ayouty; Piercey-Normore, 2016; Lafarga, 2019).

Embora a biomassa de *Spirulina* apresente inúmeros benefícios relacionados à sustentabilidade e à saúde, suas características sensoriais impõem limitações ao seu uso como ingrediente alimentício. A biomassa, com sua intensa coloração verde, frequentemente resulta em baixa aceitação sensorial pelos consumidores devido ao impacto da aparência em alimentos como pães, *snacks* e bebidas (Batista *et al.*, 2019; Hafsa *et al.*, 2014; Lucas *et al.*, 2018; Rodríguez De Marco *et al.*, 2014). Portanto, a obtenção de biomassa com coloração verde atenuada, mantendo ou até mesmo potencializando seus benefícios nutricionais, pode representar uma estratégia para melhorar sua aceitação (Hu *et al.*, 2018; Lafarga *et al.*, 2020; Withana *et al.*, 2025).

A modificação das condições de cultivo de *Spirulina* pode resultar em alterações na coloração da biomassa devido ao acúmulo ou à degradação de pigmentos fotossintéticos. O cultivo heterotrófico, realizado na ausência de luz e suplementado com fontes orgânicas de carbono, contorna a fase da fotossíntese dependente de luz. Consequentemente, pode ocorrer redução no teor de clorofila *a*, o principal pigmento fotossintético. Alterações nas condições metabólicas também podem afetar o perfil de pigmentos secundários, como a ficocianina e os carotenoides. Dessa forma, é possível promover modificações na coloração da biomassa microalgal produzida (Abreu *et al.*, 2022; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Tocca *et al.*, 2024). Embora diversos estudos tenham investigado os efeitos do cultivo heterotrófico sobre o crescimento e a composição bioquímica de microalgas, poucos exploraram a modulação intencional da coloração da biomassa como estratégia para ampliar a aplicabilidade tecnológica da *Spirulina* como ingrediente alimentício (Chojnacka; Noworyta, 2004; Ivušić; Rezić; Šantek, 2022; Marquez *et al.*, 1993, 1995; Schwarz *et al.*, 2020; Trabelsi *et al.*, 2013; Venkata Mohan *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2020). Além disso, a literatura disponível ainda é limitada quanto à

avaliação da influência simultânea de diferentes fontes orgânicas de carbono sobre a coloração da biomassa, a composição de pigmentos, a composição centesimal e as propriedades colorimétricas instrumentais em cultivo heterotrófico em batelada alimentada.

Assim, o desenvolvimento de biomassa de *Spirulina* com coloração atenuada representa uma abordagem promissora para reduzir as limitações sensoriais associadas à sua intensa coloração verde, favorecendo sua incorporação em diferentes matrizes alimentícias sem comprometer o teor de compostos bioativos e nutricionais (García-Vaquero; Brunton; Lafarga, 2021; Hu *et al.*, 2018; Lafarga, 2019; Withana *et al.*, 2025). Além disso, o cultivo heterotrófico pode contribuir para processos de produção mais sustentáveis em razão da menor dependência de iluminação artificial. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o cultivo heterotrófico em batelada alimentada de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando glicose e acetato de sódio, com o propósito de modular a coloração da biomassa e preservar uma composição nutricionalmente relevante para sua aplicação como ingrediente alimentício.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi usada para o desenvolvimento do presente trabalho, a qual faz parte do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga foi isolada da Lagoa da Mangueira, com latitude 33◦31′08″ S e longitude 53◦22′05″ W (Morais *et al.*, 2008).

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram iniciados com uma concentração de inóculo de 0,2 g L^{-1}. Os experimentos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, com volume de trabalho de 400 mL, mantidos em agitador orbital (Innova 44, New Brunswick, Estados Unidos) a 30±2°C e 100 rpm durante 10 dias. Os cultivos foram realizados sob condições heterotróficas, com a câmara do agitador mantida em completa ausência de luz, em sistema de batelada alimentada utilizando glicose (G) ou acetato de sódio (NaAc) como fontes orgânicas de carbono, avaliadas separadamente nas concentrações de 0,2, 1,0 e 2,0 g L^{-1}. O meio de cultivo utilizado foi o meio de Zarrouk (Zarrouk, 1966), no qual a fonte de carbono inorgânico ($NaHCO_3$) foi substituída pela respectiva fonte orgânica de carbono. O pH inicial foi ajustado para 9,5 por meio da adição de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), correspondente ao

pH ótimo para o crescimento de *Spirulina*. Os cultivos foram alimentados a cada dois dias utilizando soluções-estoque de glicose e acetato de sódio na concentração de 40 g L^{-1}, sendo adicionada, a cada alimentação, a mesma concentração de carbono correspondente a cada tratamento (0,2, 1,0 ou 2,0 g L^{-1}). Quatro condições-controle foram avaliadas: meio de Zarrouk completo sob fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro com iluminação por LED branco (fitas, 6500 K, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) (Controle Positivo Luz, CPL); meio de Zarrouk sem $NaHCO_3$ sob fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro com iluminação por LED branco (fitas, 6500 K, 60 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) (Controle Negativo Luz, CNL); meio de Zarrouk completo sob escuro contínuo (Controle Positivo Escuro, CPE); e meio de Zarrouk sem $NaHCO_3$ sob escuro contínuo (Controle Negativo Escuro, CNE). Ao final do período de cultivo, a concentração de glicose foi determinada pelo ensaio de açúcares redutores utilizando ácido 3,5-dinitrossalicílico (método DNS) (Miller, 1959). Como o acetato de sódio não reage no ensaio de DNS, apenas a glicose residual foi subtraída da quantificação de carboidratos totais nos cultivos alimentados com glicose.

2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

Os cultivos foram monitorados a cada dois dias, do início ao término do experimento, por meio da determinação do pH e da concentração de biomassa. O pH foi medido utilizando um pHmetro digital (FiveGo FG2, Mettler Toledo, Suiça). A concentração celular (X_{cel}) foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (*Neubauer-Bright Line*, BOECO, Alemanha). A concentração de biomassa (X) foi determinada a partir de X_{cel}, utilizando a correlação tripla entre essa variável, a densidade óptica (DO) e o peso seco.

$$DO = 4 \times 10^6 X_{cel} + 0{,}0557 \ (R^2=0{,}98) \quad (1)$$

$$X\left(g\ L^{-1}\right)=0{,}4628\ DO - 0{,}022 \ (R^2=0{,}99) \quad (2)$$

As Equações 1 e 2 foram obtidas por regressão linear para a determinação de X. Os parâmetros cinéticos concentração máxima (X_{max}, g L^{-1}) e produtividade máxima (P_{max}, g L^{-1} d^{-1}, Equação 3) foram determinados a partir da concentração de biomassa (Bailey; Ollis, 1986).

$$P_{max}= \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \quad (3)$$

2.4 VARREDURA DE PIGMENTOS

Varreduras espectrais a partir de alíquotas dos cultivos foram realizadas a cada 5 dias para avaliar o comportamento dos pigmentos. Para isso, foi construído um gráfico de comprimento de onda (400 a 700 nm) em função da absorbância, por meio da medição das densidades ópticas das amostras estudadas (UV 1900, Shimadzu, Japão) (Wellburn, 1994). Os intervalos de comprimento de onda descritos por Pagels *et al.* (2020) foram utilizados como referência para a identificação dos pigmentos, conforme segue: clorofilas, 450–475 nm e 630–675 nm; carotenoides, 400–450 nm; e ficobiliproteínas, 500–650 nm.

2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

Após 10 dias, o cultivo foi centrifugado (Hitachi, Himac CR-GIII, Tokyo, Japão) a 2000 × g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e água foi adicionada para lavar os pellets, removendo, assim, os sais residuais do meio de cultivo. A biomassa obtida foi então congelada a -80°C (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) e submetida à liofilização (LAB CONCO, Estados Unidos) por 48 horas, sendo posteriormente armazenada a -20°C até sua caracterização.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DA COR

Para identificar a diferença de cor em relação ao cultivo controle positivo sob luz (CPL), foram determinadas as coordenadas de cor. As amostras de biomassa secas obtidas dos cultivos foram distribuídas individualmente sobre suportes circulares de vidro com 50 mm de diâmetro e 10 mm de altura. Os valores de L*, a* e b* foram medidos em três pontos equidistantes utilizando um colorímetro digital (CR-400, Konica Minolta, Tokyo, Japão), com iluminante D65 e ângulo padrão de observação de 10°. Foram determinados os seguintes parâmetros: croma (C*ab, Equação 4), representando a intensidade da cor; ângulo de matiz (h°ab, Equação 5), indicando a tonalidade da cor em graus; e diferença total de cor (ΔE, Equação 6), correspondente à distância perceptível entre duas cores no espaço de cor. Nesse contexto, a representa o componente de cor que varia do verde (-) ao vermelho (+); b* representa o componente de cor que varia do azul (-) ao amarelo (+); e L* representa a luminosidade, com valores variando de 0 (preto) a 100 (branco) (Uribe-Wandurraga *et al.*, 2021).

$$C^*ab = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

$$h°ab = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (5)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

2.7 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa liofilizada foi utilizada para a determinação de lipídios, seguindo o método descrito por Marsh e Weinstein (Marsh; Weinstein, 1966). Para as determinações de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) e carboidratos (Dubois *et al.*, 1956), foram obtidos extratos da biomassa. Os extratos foram preparados utilizando-se 5 mg de biomassa e 10 mL de água destilada, submetidos à sonicação com sonda ultrassônica (CPX-130, COLE PARMER, Estados Unidos) durante 10 minutos, em ciclos de 59 segundos (On/Off).

2.8 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

A mesma metodologia para obtenção do extrato descrita na Seção 2.7 foi empregada para promover a ruptura da parede celular de *Spirulina* sp. LEB 18. Foram utilizados 10 mL de extrato, os quais foram adicionados 10 mL de solução de cloreto de cálcio 6 g L^{-1}, a mistura foi submetida à agitação magnética por 1 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 × *g* durante 5 minutos (Hitachi, Himac CR-GIII, Tokyo, Japão), resultando em duas frações que foram utilizadas para a determinação de ficocianina, clorofila a e carotenoides (Porra, 2002).

2.8.1 Teor de Ficocianina

O sobrenadante obtido da centrifugação descrita na Seção 2.8 foi utilizado para determinar o teor de ficocianina por meio da medição da densidade óptica (UV 1900, Shimadzu, Japão) nos comprimentos de onda de 615 e 652 nm. A Equação 7 apresenta a correlação proposta por Bennett e Bogorad (1973) para determinar o teor de ficocianina (mg mL^{-1}), em que Abs_{615} e Abs_{652} correspondem às absorbâncias medidas nos respectivos comprimentos de onda indicados pelos subscritos. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de biomassa,

considerando a massa de biomassa utilizada na extração e os respectivos volumes envolvidos na análise.

$$\text{Ficocianina } \left(\text{mg mL}^{-1}\right) = \frac{\text{Abs}_{615} - 0{,}474\ (\text{Abs}_{652})}{5{,}34} \tag{7}$$

2.8.2 Teor de Clorofila e Carotenoides

Utilizando os pellets obtidos da centrifugação descrita na Seção 2.8, foram adicionados 10 mL de acetona a 80% (v/v), seguidos de homogeneização em vórtex. A mistura foi centrifugada (10.000 × *g*, 5 min), e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi repetido até que os pellets apresentassem coloração branca ou acinzentada, indicando a completa extração dos pigmentos. O número de ciclos de extração foi registrado para posterior consideração no cálculo dos teores de clorofila e carotenoides. Ao final do procedimento, os sobrenadantes coletados (extrato concentrado) foram reunidos, e a densidade óptica do extrato concentrado foi determinada nos comprimentos de onda de 470, 646,6 e 663,6 nm (Porra, 2002). Os teores de clorofila *a* e carotenoides (mg mL^{-1}) foram determinados utilizando as correlações estabelecidas por Lichtenthaler (1987), descritas nas Equações 8 e 9, respectivamente. Nas equações, Abs_{470}, $Abs_{646,6}$ e $Abs_{663,6}$ correspondem às absorbâncias obtidas nos respectivos comprimentos de onda indicados pelos subscritos. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de biomassa, considerando a massa de biomassa utilizada na extração e os respectivos volumes envolvidos na análise.

$$\text{Clorofila } a \left(\text{mg mL}^{-1}\right) = \frac{12{,}25\ (\text{Abs}_{663,6}) - 2{,}55\ (\text{Abs}_{646,6})}{1000} \tag{8}$$

$$\text{Carotenoides } \left(\text{mg mL}^{-1}\right) = \frac{1000\ (\text{Abs}_{470}) - 1{,}82\ (\text{Clorofila } a)}{1{,}98 \times 10^{5}} \tag{9}$$

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cultivos foram realizados em duplicata biológica, sendo cada duplicata representada por um cultivo independente sob condições experimentais idênticas. Todas as análises bioquímicas e colorimétricas foram realizadas em triplicata técnica, resultando em seis réplicas analíticas por condição (n = 6). Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão (DP). A significância estatística foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA),

seguida pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7 (StatSoft Inc., Estados Unidos).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os parâmetros de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 estão apresentados na Tabela 1. Os controles autotróficos apresentaram maiores concentrações de biomassa. O controle positivo sob condições de luz (CPL) mostrou crescimento associado à presença de luz e de carbono inorgânico ($NaHCO_3$). No controle negativo sob condições de luz (CNL), foi observado desenvolvimento celular mesmo na ausência de carbono no meio. Nos controles heterotróficos sob ausência de luz, negativo (CNE) e positivo (CPE), os cultivos permaneceram viáveis por até 4 dias.

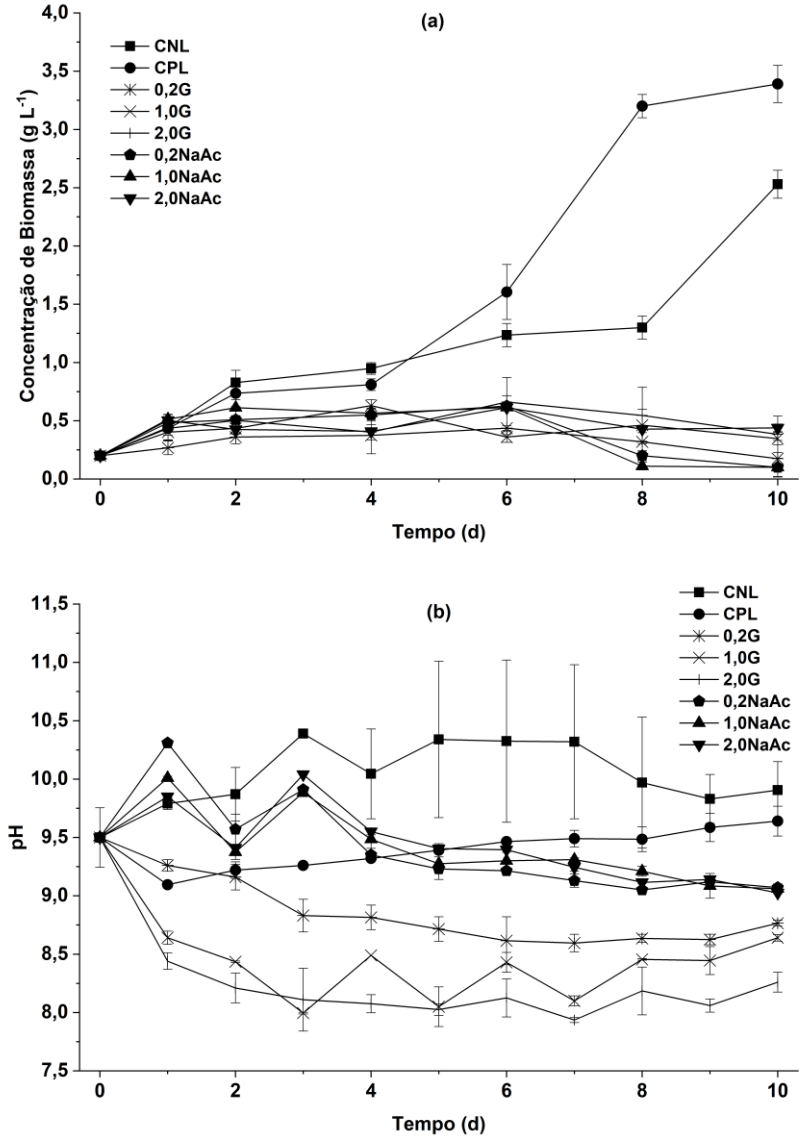
Tabela 1 - Concentração máxima de biomassa (X_{max}) e produtividade máxima de biomassa (P_{max}) de cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 sob condições autotróficas e heterotróficas.

Condições	Parâmetros	
	X_{max} (g L^{-1})	P_{max} (mg L^{-1} d^{-1})
CNL	$2,53^{b}$±0,12	$386,92^{a,b}$±106,49
CPL	$3,39^{a}$±0,16	$447,76^{a}$±75,27
0,2G	$0,44^{d}$±0,07	$160,13^{c}$±58,90
1,0G	$0,53^{c,d}$±0,04	$201,79^{c}$±65,45
2,0G	$0,66^{c}$±0,09	$234,18^{b,c}$±58,90
0,2NaAc	$0,63^{c}$≤0,01	$252,70^{b,c}$±33,01
1,0NaAc	$0,61^{c}$±0,07	$312,86^{b}$±39,27
2,0NaAc	$0,61^{c}$±0,02	$303,60^{b}$±26,18

Notas: (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a resposta.

As maiores P_{max} foram obtidas nos cultivos suplementadas com acetato de sódio (NaAc) e glicose (G) a 2,0 g L^{-1} (2,0G), com valores de X_{max} que não diferiram significativamente entre esses ensaios ($p < 0,05$). Sob todas as condições heterotróficas, as concentrações de biomassa não ultrapassaram 1 g L^{-1}. As curvas de crescimento dos controles CNL e CPL apresentaram fases bem definidas (Figura 1a). O pH variou de acordo com o substrato utilizado (Figura 1). Nos cultivos com glicose, os valores variaram de 7,9 a 9,5, enquanto nos cultivos com NaAc variaram de 9,0 a 10,6. Nos dias sem suplementação, observou-se tendência de aumento do pH.

Figura 1 - Curvas de Crescimento (a) e Perfil de pH (b) de *Spirulina* sp. LEB 18 das condições controle e heterotróficas ao longo de 10 dias de cultivo. (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio, e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio.



Os resultados destacam a influência das condições de cultivo e das fontes de carbono sobre o crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18. A maior produção de biomassa nos controles autotróficos confirma o papel essencial da luz e do carbono inorgânico no metabolismo fotossintético, no qual o $NaHCO_3$ é convertido em CO_2 e assimilado durante a fase de luz. Em contrapartida, a limitação de crescimento observada nos controles heterotróficos sob ausência de luz (CNE e CPE) reforça a dependência da *Spirulina* por fontes energéticas adequadas, sejam luminosas ou orgânicas. No caso do CNL, o crescimento observado pode estar associado à utilização de reservas intracelulares de carbono (Velea; Oancea; Fischer, 2017; Yoshikawa *et*

al., 2015). Embora as produtividades heterotróficas tenham sido inferiores às autotróficas, os valores obtidos foram suficientes para caracterizar a biomassa em termos de composição e cor, que são parâmetros centrais para sua aplicação como ingrediente alimentício.

A maior produtividade obtida nos cultivos heterotróficos suplementados com NaAc e 2,0G indica que a eficiência de assimilação da fonte de carbono depende de suas propriedades físico-químicas e da capacidade metabólica da cepa. Em estudos envolvendo acetato de sódio e cianobactérias, que podem ser associados à *Spirulina*, a dissociação em meio líquido pode ter proporcionado maior disponibilidade para captação celular, enquanto a glicose, que não se dissocia, pode ter dependido mais fortemente das condições de difusão e mistura do meio (Chen; Zhang, 1997; Chen *et al.*, 2006; Thiel *et al.*, 2017). Esse comportamento é consistente com observações de que diferentes fontes de carbono resultam em variações nas concentrações máximas e nos rendimentos em cultivos heterotróficos (Abreu *et al.*, 2022).

As variações de pH observadas refletem diretamente o metabolismo dos substratos utilizados. A glicose pode levar à formação de ácidos orgânicos, promovendo acidificação do meio, enquanto o acetato de sódio atua como agente tamponante, contribuindo para a manutenção de valores alcalinos. Além disso, a formação de ácido carbônico (H_2CO_3) a partir do metabolismo dessas fontes de carbono também pode influenciar o pH do sistema (Abreu *et al.*, 2022; Morales-Sánchez *et al.*, 2015; Tocca *et al.*, 2024). Mesmo sob condições que não são estritamente anaeróbias, pode ocorrer produção e consumo de ácidos orgânicos, como o ácido succínico, contribuindo para as flutuações observadas (Ananyev; Carrieri; Dismukes, 2008; Kassim; Meng, 2017; Lacroux *et al.*, 2023; Marquez *et al.*, 1993; Nematollahi *et al.*, 2020; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Yoshikawa *et al.*, 2015).

O caráter alcalinizante do NaAc, associado à formação de carbonatos e bicarbonatos, explica o aumento do pH nos dias sem suplementação, possivelmente devido à presença de acetato residual ou de produtos metabólicos no meio (Morales-Sánchez *et al.*, 2015). Embora os valores de pH tenham permanecido próximos da faixa ótima para *Spirulina* (9,5–9,8), flutuações diárias podem ter impactado negativamente o crescimento (Costa *et al.*, 2019b). A alimentação a cada dois dias contribuiu para atenuar as oscilações de pH, reduzindo o potencial estresse sobre as células, embora não tenha sido suficiente para eliminá-las completamente.

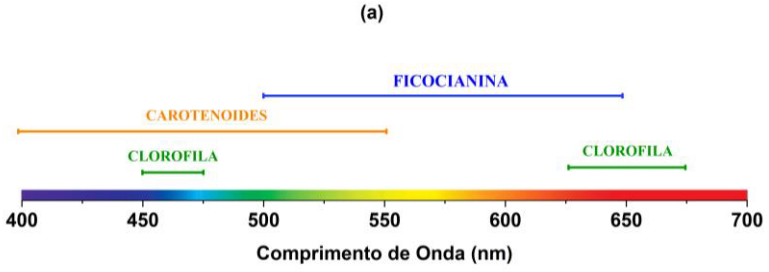
Assim, a limitação das concentrações de biomassa sob condições heterotróficas (<1 g L^{-1}) pode estar relacionada ao estresse causado pelo pH, pela ausência de luz e, possivelmente, pelo consumo de todo o nitrogênio disponível no meio de cultivo. O nitrogênio é um componente essencial de enzimas responsáveis por processos metabólicos (Esteves-Ferreira *et al.*, 2018). Estratégias como a adição de soluções para correção de pH, redução gradual da

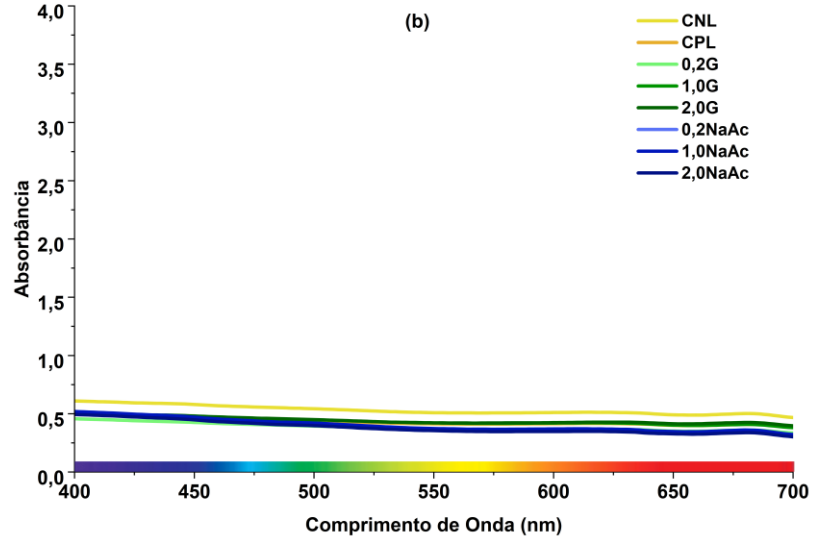
intensidade luminosa e suplementação em batelada alimentada com nitrato de sódio poderiam minimizar o estresse celular e melhorar a conversão de biomassa (Le *et al.*, 2024; Mühling; Belay; Whitton, 2005). Consequentemente, a produtividade seria aumentada, melhorando a viabilidade da produção de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A biomassa caracterizada em termos de dinâmica de pigmentação e composição centesimal, aspectos determinantes para sua aplicação como ingrediente alimentício, será discutida nas seções seguintes.

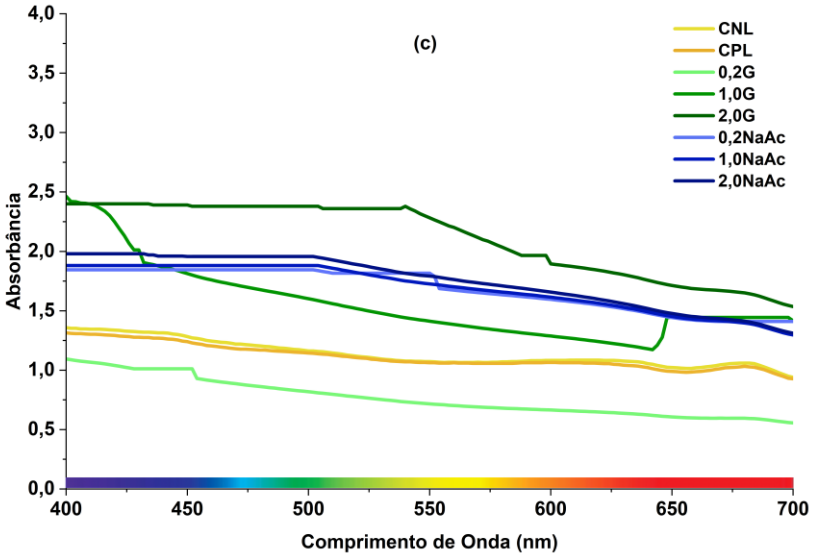
3.2 DINÂMICA DA PIGMENTAÇÃO DURANTE O CULTIVO

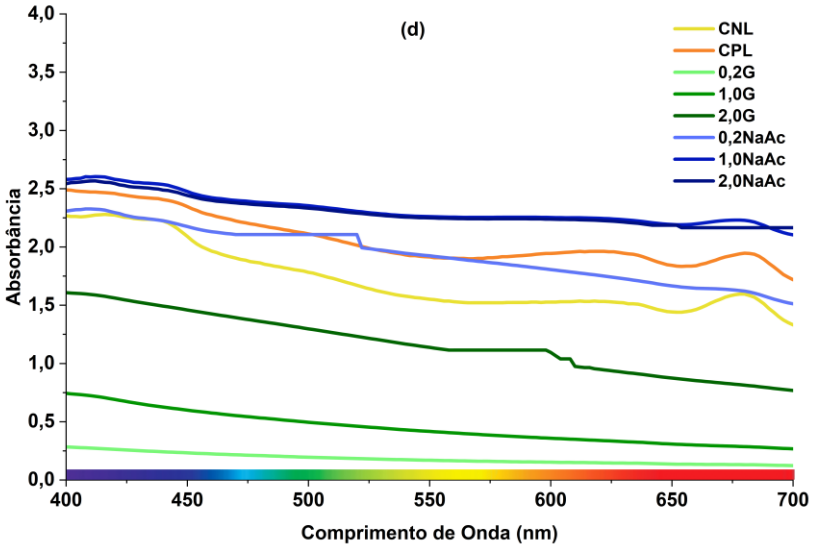
Os resultados das análises de pigmentos ao longo do período experimental estão apresentados na Figura 2. Observou-se que G e NaAc influenciaram distintamente a absorbância, o que pode ser atribuído aos teores de clorofila, ficocianina e carotenoides. A exposição à luz pode ter promovido o acúmulo de pigmentos tanto no CNL quanto no CPL, enquanto as condições heterotróficas resultaram em variações na biossíntese de pigmentos ao longo do cultivo. A suplementação com glicose, particularmente na concentração de 2,0 g L^{-1} (2,0G), favoreceu a síntese antecipada de pigmentos, com aumento observado no quinto dia de cultivo (Figura 2b). Em contrapartida, os tratamentos suplementados com acetato de sódio apresentaram aumento gradual de pigmentos ao longo dos 10 dias experimentais (Figura 2c). Nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, observou-se aumento da absorbância associada a pigmentos no quinto dia sob suplementação com glicose, seguido de declínio subsequente. Por outro lado, os cultivos culturas suplementados com acetato de sódio exibiram aumento progressivo dos níveis de pigmentos ao longo do período de cultivo.

Figura 2 - Varredura de pigmentos ao longo de 10 dias de cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18: (a) Bandas de referência de Pagels *et al.* (2020), (b) Tempo 0, (c) Tempo 5, (d) Tempo 10.




(b)
CNL
CPL
0,2G
1,0G
2,0G
0,2NaAc
1,0NaAc
2,0NaAc
Absorbância
Comprimento de Onda (nm)


(c)
CNL
CPL
0,2G
1,0G
2,0G
0,2NaAc
1,0NaAc
2,0NaAc
Absorbância
Comprimento de Onda (nm)


(d)
CNL
CPL
0,2G
1,0G
2,0G
0,2NaAc
1,0NaAc
2,0NaAc
Absorbância
Comprimento de Onda (nm)

As diferenças observadas na dinâmica de clorofila a e ficocianina indicam que G e NaAc modulam de forma distinta o metabolismo de pigmentos de *Spirulina* sp. LEB 18 em resposta ao balanço intracelular de C/N (Esteves-Ferreira *et al.*, 2018; Gama *et al.*, 2023). A assimilação de glicose sob condições heterotróficas ocorre por meio das vias da pentose fosfato e de Embden–Meyerhof (Rym *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2020). O acetato de sódio é metabolizado pelas cianobactérias por meio de sua conversão em acetil-CoA via acetil-CoA sintetase (Thiel *et al.*, 2017). O início mais precoce da síntese de pigmentos sob suplementação com glicose pode estar relacionado ao aumento na taxa de crescimento celular, que eleva a demanda por nitrogênio para a síntese proteica. Esse aumento na demanda pode levar a um consumo mais rápido do nitrogênio disponível, resultando em limitação nutricional e subsequente redução nos níveis de pigmentos. Em contrapartida, o acetato de sódio, quando metabolizado por meio da formação de acetil-CoA, tende a exercer menor pressão imediata sobre a assimilação de nitrogênio, permitindo uma distribuição mais equilibrada dos fluxos metabólicos e um aumento mais gradual da pigmentação (Esteves-Ferreira *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Tocca *et al.*, 2024).

Além disso, a ausência de luz constitui fator relevante na modulação de pigmentos. Sob condições heterotróficas prolongadas, é frequentemente observada redução no teor de pigmentos fotossintéticos, refletindo a menor demanda funcional por esses compostos (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012; Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Van Stokkum *et al.*, 2025). Nesse contexto, o declínio observado após o pico inicial sob suplementação com glicose pode estar associado tanto à limitação de nitrogênio quanto à menor necessidade de manutenção de um aparato fotossintético ativo. De modo geral, os resultados sugerem que a glicose promove respostas metabólicas mais rápidas e intensas, enquanto o acetato de sódio favorece um comportamento mais estável e progressivo na biossíntese de pigmentos, evidenciando estratégias distintas de adaptação metabólica às fontes de carbono disponíveis. Assim, a modulação temporal dos pigmentos fotossintéticos durante o cultivo heterotrófico indica que é possível obter biomassas com diferentes perfis de pigmentação e, consequentemente, diferentes colorações por meio do ajuste da fonte de carbono e de sua concentração, representando uma estratégia viável para adequar as características visuais da biomassa às exigências de diferentes matrizes alimentares.

3.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA

A composição centesimal da biomassa obtida após 10 dias de cultivo está apresentada na Tabela 2. Em relação às macromoléculas, os maiores teores proteicos foram observados nas condições CPL (38,68%) e heterotrófica 0,2NaAc (32,18%), seguidas por 2,0NaAc (26,87%) e 1,0G (23,38%). Para os carboidratos, as maiores concentrações foram registradas nos controles CPL (17,46%) e CNL (17,36%). Entre as condições heterotróficas, o maior valor foi obtido em 2,0G (14,47%). De modo geral, as condições suplementadas com acetato de sódio apresentaram menores teores de carboidratos, com exceção de 0,2NaAc. Em relação aos lipídeos, os valores não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) dos controles (CPL e CNL), exceto para as condições 0,2G e 2,0NaAc, que apresentaram teores mais elevados.

Tabela 2 - Concentrações de carboidratos, proteínas e lipídeos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada sob fotoperíodo autotrófico claro/escuro (12/12 h) e condições.

Condições	Macromoléculas (% m/m)		
	Proteínas	**Carboidratos**	**Lipídios**
CNL	$16,68^{e}\pm0,99$	$17,46^{a}\pm0,90$	$6,83^{b}\pm0,43$
CPL	$38,68^{a}\pm2,44$	$17,36^{a}\pm1,01$	$7,48^{b}\pm0,56$
0,2G	$20,38^{d,e}\pm0,76$	$5,42^{c,e}\pm0,24$	$13,04^{a}\pm1,28$
1,0G	$23,38^{c,d}\pm1,37$	$6,14^{c,d}\pm0,12$	$6,21^{b}\pm0,48$
2,0G	$20,21^{d,e}\pm0,10$	$14,47^{b}\pm1,16$	$5,31^{b}\pm0,50$
0,2NaAc	$32,18^{a,b}\pm1,33$	$8,33^{d}\pm0,48$	$6,96^{b}\pm0,17$
1,0NaAc	$20,49^{d}\pm1,96$	$3,06^{e,f}\pm0,29$	$6,75^{b}\pm0,24$
2,0NaAc	$26,87^{b,c}\pm0,23$	$1,16^{f}\pm0,02$	$10,97^{a}\pm0,13$

Notas: (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a resposta.

Os resultados indicam que a fonte de carbono exerce influência direta sobre a composição bioquímica da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. O teor proteico obtido no presente estudo para o CPL (38,68%) foi inferior aos valores de 50–70% comumente relatados para *Spirulina* comercial cultivada sob condições fotoautotróficas (Chaudhary *et al.*, 2026; Lafarga *et al.*, 2020). Essa diferença deve ser interpretada com cautela, uma vez que os valores relatados na literatura geralmente se referem à proteína bruta determinada por métodos baseados em nitrogênio, como Kjeldahl ou Dumas, que tendem a gerar valores superestimados devido à aplicação de um fator de conversão fixo (6,25) (Mariotti; Tomé; Mirand, 2008), embora fatores de conversão mais baixos tenham sido especificamente recomendados para biomassa microalgal (Lourenço *et al.*, 2002; Templeton; Laurens, 2015). No presente estudo, o teor proteico foi quantificado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), que se baseia na reação com resíduos de aminoácidos aromáticos e ligações peptídicas, em vez da quantificação

indireta de nitrogênio total, o que pode explicar parte da discrepância observada. Além disso, os cultivos fotoautotróficos foram realizados em frascos *erlenmeyer* sob agitação orbital e baixa intensidade luminosa, condições que podem limitar a transferência de massa e a homogeneidade luminosa em comparação com sistemas de cultivo otimizados (Borowitzka, 1999; Costa *et al.*, 2019a).

O maior teor proteico observado sob condições com acetato de sódio, especialmente em 0,2NaAc, sugere que essa fonte de carbono favorece a biossíntese de aminoácidos. Esse comportamento pode ser explicado pela via metabólica do acetato, na qual o acetato é diretamente convertido em acetil-CoA e integrado ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), gerando intermediários como α-cetoglutarato e oxaloacetato, precursores da síntese de aminoácidos. Em contrapartida, a glicose requer etapas adicionais de conversão pela via glicolítica até piruvato antes de entrar no ciclo do TCA (Hu *et al.*, 2018; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Tocca *et al.*, 2024).

Os maiores teores de carboidratos nos controles iluminados (CPL e CNL) refletem a predominância das vias fotossintéticas na assimilação de carbono, favorecendo a formação de polissacarídeos. Entre as condições heterotróficas, o destaque de 2,0G indica que a glicose, por estar diretamente associada à via glicolítica, fornece precursores imediatos para a síntese de carboidratos estruturais e de reserva, como o glicogênio. Em contrapartida, o menor desempenho do acetato na síntese de carboidratos sugere fluxo metabólico reduzido nessa via sob as condições avaliadas (Aoyama *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2018; Morales-Sánchez *et al.*, 2015; Tocca *et al.*, 2024).

Em relação aos lipídeos, a ausência de diferenças significativas na maioria das condições indica que a via lipídica não foi fortemente favorecida. No entanto, o aumento observado em 0,2G sugere que baixas concentrações de glicose podem estimular o armazenamento de energia na forma de lipídeos. De modo semelhante, o aumento observado em 2,0NaAc pode estar relacionado à maior disponibilidade de acetil-CoA, precursor direto da síntese de ácidos graxos, favorecendo assim a lipogênese (Abreu *et al.*, 2022; Perez-Garcia *et al.*, 2011; Tocca *et al.*, 2024). A ausência de aumento lipídico nas demais condições pode indicar limitações metabólicas ou rápida utilização intracelular dos lipídeos produzidos. Além disso, a possível limitação de nutrientes como nitrogênio e magnésio, associada ao cultivo heterotrófico, pode ter influenciado a conversão lipídica (Silva *et al.*, 2019).

Para que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 seja incorporada em alimentos, ela deve apresentar composição nutricional competitiva em relação à biomassa comercialmente disponível. Segundo AlFadhly *et al.* (2022), a composição comercial varia entre 55–72% de

proteínas, 13–25% de carboidratos e 4–8% de lipídeos (peso seco). Mohammed *et al.* (2024) estudaram biomassa de *Spirulina maxima* incorporada em uma bebida láctea, caracterizada por conter 59,08 ± 1,01% de proteínas, 3,12 ± 0,48% de lipídeos e 19,11 ± 1,24% de carboidratos. Bordulis *et al.* (2025) caracterizaram *Spirulina maxima* comercial para o desenvolvimento de shakes funcionais destinados a idosos, nos quais a biomassa continha 60,3% de proteínas. Paternina *et al.* (2022) utilizaram *Spirulina* sp. LEB 18 como ingrediente para o desenvolvimento de balas de gelatina, nas quais a biomassa continha 58,53 ± 0,73% de proteínas, 15,51 ± 0,32% de lipídeos e 11,13 ± 0,03% de carboidratos. Rasia *et al.* (2024) desenvolveram um leite achocolatado enriquecido com nanocápsulas de *Spirulina* sp. LEB 18, no qual a biomassa utilizada como ingrediente continha 41,37 ± 0,45% de proteínas, 22,80 ± 1,49% de lipídeos e 22,30 ± 1,09% de carboidratos.

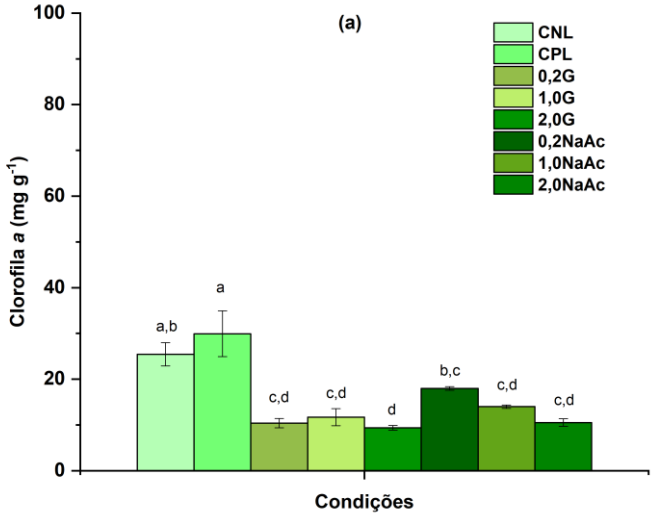
Os resultados descritos acima demonstram que a composição de *Spirulina* sp. LEB 18 resultou em menores teores de macromoléculas quando comparada às biomassas comerciais utilizadas como ingredientes alimentícios obtidas por cultivo autotrófico. Cruz, Rosa e Costa (2023), que realizaram cultivo heterotrófico em batelada alimentada de *Spirulina* sp. LEB 18 suplementado com 0,5 g L^{-1} de glicose, obtiveram 39,8 ± 1,4% de proteínas, 12,0 ± 0,8% de lipídeos e 6,4 ± 0,6% de carboidratos. De forma semelhante a Cruz *et al.* (2023), o presente estudo resultou em produção reduzida de macromoléculas devido à combinação de ausência de luz e suplementação com carbono orgânico. Assim, sob condições heterotróficas, os resultados provavelmente refletem a interação de múltiplos fatores limitantes, incluindo flutuações de pH, menor disponibilidade energética proveniente da fotossíntese e potenciais desequilíbrios nutricionais inerentes ao delineamento do cultivo (Costa *et al.*, 2018). Embora estudos anteriores com *Spirulina* sp. LEB 18 tenham relatado o acúmulo de biopolímeros de reserva, como o polihidroxibutirato (PHB), sob condições heterotróficas (Martins *et al.*, 2014), o presente estudo não avaliou esses compostos. Estudos futuros que incorporem a quantificação de PHB ajudariam a esclarecer se as frações de biomassa não contabilizadas correspondem a esses produtos de reserva, proporcionando uma compreensão metabólica mais completa da partição de carbono sob cultivo heterotrófico.

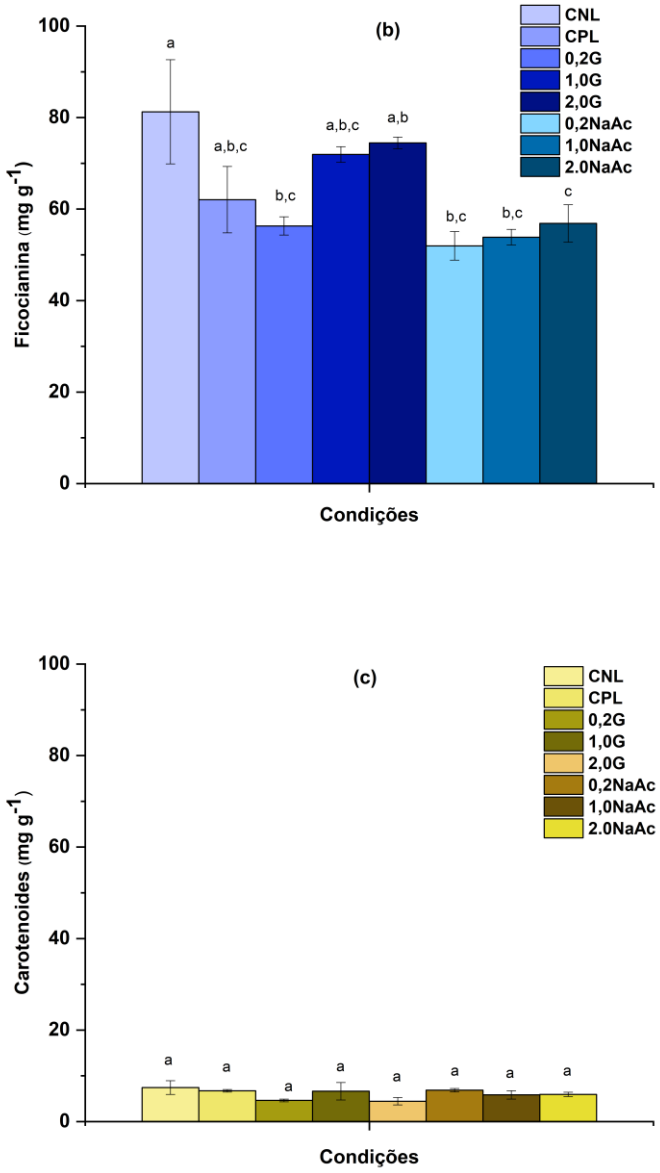
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

Os resultados da quantificação de pigmentos na biomassa final de *Spirulina* sp. LEB 18 após 10 dias de cultivo estão apresentados na Figura 3. O teor de clorofila *a* (Figura 3a) nos cultivos suplementadas com G e NaAc diferiu significativamente ($p < 0,05$) em relação ao

controle CPL (29,1 ± 5,0 mg g^{-1}), com valores variando de 9,4 ± 0,5 mg g^{-1} (2,0G) a 18,0 ± 0,4 mg g^{-1} (0,2NaAc). Em contrapartida, o controle CNL apresentou teores de clorofila *a* semelhantes aos do CPL (25,5 ± 2,5 mg g^{-1}). A concentração de ficocianina (Figura 3b) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação ao CPL (62,0 ± 7,2 mg g^{-1}) para todas as concentrações avaliadas de G e NaAc, que variaram de 52,0 ± 3,1 mg g^{-1} (0,2NaAc) a 74,4 ± 1,2 mg g^{-1} (2,0G); o maior teor de ficocianina entre todas as condições foi observado no CNL (81,3 ± 11,4 mg g^{-1}). A concentração de carotenoides (Figura 3c) manteve-se estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) em todas as condições estudadas, com valores variando de 4,45 ± 0,81 mg g^{-1} (2,0G) a 7,44 ± 1,15 mg g^{-1} (CNL).

Figura 3 - Concentrações de pigmentos: (a) clorofila *a*, (b) ficocianina e (c) carotenoides na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada por 10 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).





A redução no teor de clorofila a sob condições heterotróficas está associada à ausência de luz, que compromete a manutenção da maquinaria fotossintética. A interrupção da síntese de pigmentos, combinada à possível degradação dos fotossistemas ao longo do tempo, explica os menores valores observados sob essas condições (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012; Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Van Stokkum *et al.*, 2025). Em contrapartida, a manutenção dos níveis de clorofila a no controle CNL, semelhante ao CPL, reforça o papel da luz como fator determinante para a estabilidade desse pigmento (Abreu *et al.*, 2022). A redução no teor de clorofila *a* é o principal mecanismo responsável pela atenuação da coloração verde da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, o que será discutido na Seção 3.5.

A estabilidade da ficocianina entre as diferentes condições, incluindo os cultivos heterotróficos, indica que a produção desse pigmento acessório não foi significativamente

afetada pela ausência de luz ou pela fonte de carbono utilizada. Embora a ficocianina atue na captação de fótons em comprimentos de onda não eficientemente absorvidos pela clorofila *a*, sua manutenção sugere que, sob as condições avaliadas, não houve estímulo suficiente para expressão excessiva ou degradação pronunciada. Em cultivos heterotróficos prolongados, pode ocorrer redução do complexo antena, levando à inativação desse pigmento; entretanto, esse efeito não foi significativamente observado no presente estudo (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012; Ismaiel; Piercey-Normore, 2024; Van Stokkum *et al.*, 2025). O pigmento ficocianina é aplicado devido às suas características bioativas, como atividades antioxidante e antibacteriana, em sorvetes (Amarante *et al.*, 2020), vinhos, bebidas isotônicas e tônicos (García; Longo; Bermejo, 2021) e filmes à base de gelatina (Chentir *et al.*, 2019). A preservação do teor de ficocianina garante a manutenção da bioatividade associada a esse pigmento.

Os teores de clorofila *a* e ficocianina obtidos no presente estudo são consistentes com a tendência relatada em estudos anteriores envolvendo o cultivo heterotrófico de espécies de *Spirulina*. Marquez *et al.* (1993) avaliaram o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* NIES-39 suplementado com 2 g L^{-1} de glicose em cultivo em batelada e relataram redução acentuada tanto no teor de clorofila *a* (5,61 mg g^{-1} sob condições heterotróficas vs. 10,84 mg g^{-1} sob condições autotróficas) quanto no teor de ficocianina (57,9 mg g^{-1} vs. 122 mg g^{-1}, respectivamente), corroborando o padrão observado nas condições G e NaAc do presente estudo em relação aos controles CPL e CNL. Resultados semelhantes foram relatados por Marquez *et al.* (1995), que investigaram o cultivo heterotrófico e autotrófico de *Spirulina platensis* NIES-39 em meio SOT suplementado com 2 g L^{-1} de glicose. Durante a fase heterotrófica, os teores de ficocianina e clorofila *a* atingiram 55,2 mg g^{-1} e 5,33 mg g^{-1}, respectivamente, valores substancialmente inferiores aos obtidos durante a fase autotrófica sob 82 µmol fótons m^{-2} s^{-1} (157,2 mg g^{-1} de ficocianina e 29,9 mg g^{-1} de clorofila *a*). Esse comportamento é consistente com o observado no presente estudo, no qual a ausência de luz sob condições heterotróficas resultou em teores de clorofila *a* inferiores aos medidos nos controles CPL e CNL. No entanto, ao contrário da clorofila *a*, o teor de ficocianina no presente estudo permaneceu relativamente estável entre as condições autotróficas e heterotróficas, com valores até superiores aos do controle CPL em algumas concentrações de glicose e acetato de sódio (por exemplo, 74,45 mg g^{-1} em 2,0G), embora permanecendo inferiores ao observado para o controle CNL (81,26 mg g^{-1}), que apresentou o maior teor de ficocianina entre todas as condições avaliadas. Esse padrão difere da redução pronunciada relatada por Marquez *et al.* (1993, 1995) e sugere que a resposta da síntese de ficobiliproteínas ao cultivo heterotrófico

pode variar conforme a cepa, a fonte de carbono e as condições específicas de cultivo. Chen, Zhang e Guo (1996) também demonstraram que a suplementação com glicose e acetato pode promover a produção de ficocianina em *Spirulina platensis* UTEX 1926, reforçando a viabilidade do uso desses substratos orgânicos como estratégia para manter a bioatividade associada a esse pigmento, mesmo sob condições de baixa luminosidade ou ausência de luz.

A semelhança nos teores de carotenoides entre as condições autotróficas e heterotróficas pode ser atribuída à ausência de estresse por alta luminosidade. Uma vez que esses pigmentos desempenham função fotoprotetora, sua síntese tende a ser estimulada sob condições de alta intensidade luminosa. A aplicação de intensidades inferiores a 100 µmol fótons m^{-2} s^{-1} nas condições controle provavelmente foi insuficiente para induzir um aumento na produção de carotenoides, resultando em níveis comparáveis entre os diferentes tratamentos (Chojnacka; Noworyta, 2004; Mohammed; Ruengjitchatchawalya; Paithoonrangsarid, 2023).

Diante do exposto, a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 obtida por cultivo heterotrófico em batelada alimentada pode ser economicamente relevante ao eliminar a demanda por iluminação artificial, reduzindo assim os custos com energia elétrica associados à produção. Como será discutido a seguir (Seção 3.5), essa estratégia pode ser ainda mais favorável do ponto de vista sensorial, uma vez que a atenuação da coloração característica da *Spirulina* sob condições heterotróficas tende a favorecer a aceitação do produto pelo consumidor, podendo compensar a redução no teor proteico observada nesse modo de cultivo.

3.5 MEDIÇÕES DE COR E APARÊNCIA VISUAL DA BIOMASSA

A Tabela 3 apresenta os parâmetros do espaço de cor da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 após 10 dias de cultivo. Para a luminosidade (L*), os ensaios CNL (36,71) e CPL (37,95) resultaram em valores mais baixos, indicando coloração mais escura. A condição 2,0NaAc diferiu significativamente dos controles, apresentando valores mais elevados de L*. O parâmetro a*, relacionado ao eixo vermelho–verde, apresentou valores negativos em todas as condições, indicando predominância de tons verdes. Nos cultivos suplementados com glicose, observou-se tendência a tonalidades de verde mais claras, especialmente na concentração de 1 g L^{-1}. Nos cultivos suplementados com acetato de sódio, o aumento da concentração resultou em células com coloração verde mais clara. Para o parâmetro b*, correspondente ao eixo azul–amarelo, foram observados valores positivos em todas as condições. Os cultivos suplementados com NaAc nas concentrações de 0,2 e 1 g L^{-1} apresentaram valores de b* mais elevados em comparação ao controle, indicando coloração mais amarelada. Em contrapartida, os cultivos

suplementados com glicose exibiram valores de b* reduzidos, particularmente nas concentrações mais elevadas.

Tabela 3 - Percepção de cor para as diferentes biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18.

Condições	L*	a*	b*
CNL	$36,71^{c}$±0,63	$-5,74^{b}$±0,15	$6,99^{d}$±0,12
CPL	$37,95^{c}$±2,02	$-7,16^{a}$±0,31	$5,21^{c}$±0,20
0,2G	$42,71^{a,b,c}$±4,59	$-3,28^{d}$±0,36	$3,54^{e}$±0,36
1,0G	$47,37^{a,b}$±2,00	$-2,14^{e}$±0,10	$4,87^{c}$±0,21
2,0G	$42,82^{a,b,c}$±1,80	$-3,78^{c,d}$±0,16	$2,88^{e}$±0,13
0,2NaAc	$43,15^{a,b,c}$±3,57	$-7,75^{a}$±0,55	$14,78^{a}$±1,00
1,0NaAc	$41,76^{b,c}$±2,19	$-5,74^{b}$±0,28	$15,04^{a}$±0,61
2,0NaAc	$49,12^{a}$±0,81	$-4,23^{c}$±0,10	$9,84^{b}$±0,18

Notas: (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a resposta.

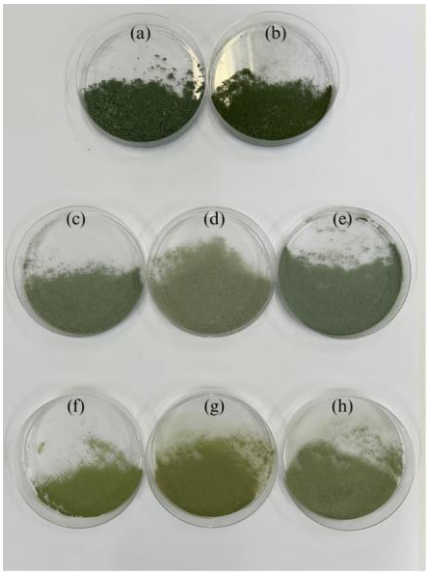
A Tabela 4 apresenta os valores de croma (Cab), ângulo de tonalidade (h°ab) e diferença total de cor (ΔE). Os maiores valores de C*ab foram observados nos cultivos suplementados com NaAc, particularmente nas concentrações de 0,2 e 1 g L^{-1}. Nos cultivos suplementados com glicose, os valores de C*ab foram menores. Os valores de h°ab indicaram variações entre as condições, exceto para os ensaios 1,0G e 2,0NaAc. Nos cultivos suplementados com NaAc, especialmente nas concentrações de 1 e 2 g L^{-1}, foram observados valores associados a tons mais frios. Nos cultivos suplementados com glicose, a concentração de 1 g L^{-1} apresentou maior deslocamento em direção ao verde em comparação às demais concentrações. A diferença total de cor (ΔE), calculada em relação ao controle CPL, apresentou o menor valor para o CNL. As condições NaAc e glicose exibiram diferenças perceptíveis, com o maior valor observado para 2,0NaAc. A Figura 4 apresenta a aparência visual da biomassa, destacando as variações de cor entre as condições estudadas.

Tabela 4 - Croma (C*ab), Ângulo de Tonalidade (h°ab) e Diferença de Cor (ΔE) da biomassa obtida de *Spirulina* sp. LEB 18.

Condições	C*ab	h°ab	ΔE
CPL	8,86c±0,37	-0,63g±0,01	0
CNL	9,04c±0,11	-0,88d±0,02	3,06±0,95
0,2G	4,82d±0,50	-0,82e±0,01	7,79±3,58
1,0G	5,32d±0,23	-1,16b≤0,01	11,46±1,26
2,0G	4,76d±0,20	-0,65f≤0,01	7,67±1,09
0,2NaAc	16,69a±1,14	-1,09c≤0,01	10,33±3,19
1,0NaAc	16,10a±0,66	-1,21a≤0,01	9,58±1,39
2,0NaAc	10,71b±0,20	-1,16b≤0,01	12,83±1,35

Notas: (CNL) Controle Negativo Luz, (CPL) Controle Positivo Luz, (0,2G) 0,2 g L^{-1} Glicose, (1,0G) 1,0 g L^{-1} Glicose, (2,0G) 2,0 g L^{-1} Glicose, (0,2NaAc) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (1,0NaAc) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (2,0NaAc) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a resposta.

Figura 4 - Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 obtida a partir dos controles e dos cultivos heterotróficas com suplementação de glicose e acetato de sódio em diferentes concentrações: (a) Controle Negativo Luz, (b) Controle Positivo Luz, (c) 0,2 g L^{-1} Glicose, (d) 1,0 g L^{-1} Glicose, (e) 2,0 g L^{-1} Glicose, (f) 0,2 g L^{-1} Acetato de Sódio, (g) 1,0 g L^{-1} Acetato de Sódio e (h) 2,0 g L^{-1} Acetato de Sódio.



As variações nos parâmetros de cor refletem alterações na composição de pigmentos da biomassa em resposta às condições de cultivo e às fontes de carbono. Os menores valores de L* observados nos controles autotróficos indicam maior intensidade de cor, associada à maior presença de pigmentos fotossintéticos, especialmente clorofila *a*, cuja síntese é favorecida pela presença de luz. Em contrapartida, o aumento de L* na condição 2,0NaAc sugere redução na densidade de pigmentos, resultando em biomassa mais clara (Macdougall, 2010). A predominância de valores negativos de a* confirma a manutenção de tons verdes em todas as condições, característica típica da *Spirulina*. Contudo, o deslocamento para tons de verde mais claros sob condições heterotróficas, tanto com glicose quanto com acetato, é consistente com a redução observada na concentração de clorofila *a*, indicando menor intensidade da pigmentação fotossintética (Durmus, 2020). Os resultados de b* indicam que o acetato de sódio favoreceu tons mais amarelados, especialmente em concentrações intermediárias, enquanto a glicose reduziu essa característica. Esse comportamento não acompanha diretamente a proporção entre ficocianina e carotenoides, sugerindo que a coloração final da biomassa não depende exclusivamente da concentração de pigmentos, mas também de fatores físicos e estruturais, como o espalhamento de luz, a organização celular e interações ópticas entre os componentes (Choudhury, 2014; Yeh *et al.*, 2023).

A maior saturação de cor (C*ab) observada nos cultivos com NaAc indica maior viveza de cor, possivelmente associada a uma distribuição mais homogênea dos pigmentos ou a

diferenças na composição celular. Em contrapartida, os menores valores observados nos cultivos com glicose indicam coloração mais opaca ou acinzentada, refletindo alterações no equilíbrio entre pigmentos e outros constituintes celulares (Ly *et al.*, 2020). As variações no ângulo de tonalidade (h°ab) reforçam o efeito da fonte de carbono na modulação da cor. O deslocamento para tons mais frios (verde-azulado) nos cultivos com NaAc sugere alterações no perfil relativo de pigmentos ou em sua expressão, enquanto o efeito observado com glicose foi dependente da concentração, sendo mais evidente em 1 g L^{-1} (Durmus, 2020). Os valores de ΔE podem ser associados à escala de percepção humana, na qual valores superiores a 6 indicam diferença de cor evidente (Lindsey; Wee, 2007). Todas as biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18 obtidas por cultivo heterotrófico apresentaram diferenças de cor perceptíveis ao olho humano em comparação ao controle, o que é explicado pela redução no teor de clorofila a discutida anteriormente. A biomassa do cultivo 2,0NaAc apresentou a maior diferença de cor, provavelmente devido à maior contribuição de b* (coloração amarelada). A variação de cor observada em todas as biomassas indica a capacidade das fontes de carbono de modular a aparência visual da biomassa, enquanto a ausência de luz durante o cultivo influenciou de forma mais intensa a expressão e a proporção dos pigmentos celulares.

A cor interfere diretamente na percepção do consumidor sobre os alimentos, uma vez que é a primeira característica visualmente observada (Macdougall, 2010). O impacto visual da cor e da aparência pode influenciar outros atributos sensoriais dos alimentos. A observação visual gera expectativas, tornando a cor um fator decisivo antes da experiência de degustação. Assim, a cor é uma das características dominantes na determinação do consumo de alimentos (Spence; Piqueras-Fiszman, 2016). Hafsa *et al.* (2014) desenvolveram pão enriquecido com *Spirulina* contendo 1 e 3% de biomassa e obtiveram maior aceitação sensorial (~70%) para a formulação com menor concentração de *Spirulina*. O atributo cor apresentou a maior diferença em relação ao controle e foi menos apreciado. Zouari *et al.* (2011) produziram massa alimentícia suplementada com *Spirulina platensis*, contendo 1, 2 e 3 g de biomassa por 100 g de sêmola. O aumento da concentração de *Spirulina* contribuiu para o escurecimento da massa (L* = 78,08 → 52,97) e para coloração verde intensa (a* = −11,12 ± 0,3) na concentração de 3%. Em termos de escore geral de aceitação, considerando uma pontuação máxima de 5,0, as formulações de massa contendo biomassa de *Spirulina* apresentaram escore médio de 3,2.

Lucas *et al.* (2018) desenvolveram snacks extrusados contendo 2,6% de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A incorporação de *Spirulina* como ingrediente escureceu significativamente os *snacks* (L* = 34,13) em comparação ao controle (L* = 63,4), resultando em diferença de cor de 30,5. Nesse estudo, a cor foi o único atributo com diferença significativa

em relação ao controle, com escores de 5,5 (*Spirulina*) e 7,6 (controle) em uma escala hedônica de 9 pontos. Contudo, a intenção de compra não foi negativamente afetada. Paternina *et al.* (2022) produziram balas de gelatina contendo *Spirulina* sp. LEB 18 nas concentrações de 1%, 3% e 5% de biomassa. O aumento da concentração de biomassa na formulação resultou em aumento gradual da intensidade da cor verde (a*: 1% = −0,03; 3% = −0,54; 5% = −1,39) e do ΔE (1% = 30,32; 3% = 65,28; 5% = 66,60). Ainda assim, o atributo cor não interferiu nos escores de aceitação sensorial entre as formulações. Lafarga *et al.* (2019) desenvolveram sopas de brócolis enriquecidas com *Spirulina* sp. nas concentrações de 0,5, 1, 1,5 e 2%. Observou-se que o aumento da concentração de biomassa de *Spirulina* resultou em cores mais escuras da sopa (L* < 39), o que reduziu a aceitação. A aplicação em uma matriz verde favoreceu a incorporação de *Spirulina*. Contudo, o aumento da concentração de *Spirulina* nas sopas resultou em redução dos percentuais de aceitação (80% → 56,7%). Nesse sentido, os parâmetros de cor obtidos sob as diferentes condições de cultivo podem estar diretamente relacionados ao comportamento observado em estudos envolvendo a incorporação de *Spirulina* em alimentos, nos quais a coloração da biomassa desempenhou papel determinante na aceitação sensorial dos produtos desenvolvidos.

Estudos como os de Lucas *et al.* (2018), Lafarga *et al.* (2019), Batista *et al.* (2019), Paternina *et al.* (2022), Zouari *et al.* (2011) e Hafsa *et al.* (2014) demonstraram consistentemente que valores mais baixos de L* e valores mais negativos de a*, característicos de biomassa intensamente verde, tendem a reduzir a aceitação visual e sensorial dos produtos, especialmente em concentrações mais elevadas. Em contrapartida, biomassas com tons mais atenuados, como as obtidas nos cultivos com acetato de sódio, apresentam parâmetros de cor mais próximos aos observados em formulações com maior aceitabilidade relatadas na literatura, com índices de aceitação superiores a 70%. Portanto, a modulação da coloração da biomassa por meio de estratégias de cultivo heterotrófico surge não apenas como um recurso tecnológico, mas também como uma abordagem orientada ao consumidor, contribuindo para superar uma das principais barreiras à incorporação da *Spirulina* como ingrediente funcional na indústria alimentícia.

Do ponto de vista industrial, esses achados demonstram que o cultivo heterotrófico, por meio da seleção adequada da fonte de carbono, pode ser utilizado não apenas para aumentar a produção de biomassa, mas também como estratégia de processo para adequar as características visuais e a composição bioquímica da biomassa de *Spirulina* a aplicações alimentícias específicas. Ao selecionar fontes de carbono apropriadas, é possível obter biomassa com perfis de cor distintos, mantendo uma composição nutricionalmente relevante, ampliando assim seu

uso potencial em produtos alimentícios nos quais a coloração verde intensa característica da *Spirulina* pode limitar a aceitação do consumidor. Além disso, a menor dependência de iluminação artificial sob cultivo heterotrófico tem potencial para aumentar a flexibilidade operacional e reduzir a demanda energética durante o cultivo. De modo geral, esses resultados evidenciam o potencial do cultivo heterotrófico como plataforma versátil e sustentável para a produção de biomassa de *Spirulina* com atributos tecnológicos, nutricionais e visuais sob medida, ampliando sua aplicabilidade como ingrediente de valor agregado para a indústria alimentícia.

4 CONCLUSÃO

O cultivo heterotrófico em batelada alimentada modulou a cor com sucesso e o perfil bioquímico da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 por meio do uso de glicose e acetato de sódio como fontes de carbono orgânico. A privação de luz promoveu redução da clorofila *a*, levando à atenuação da coloração verde característica, enquanto os teores de ficocianina e carotenoides permaneceram estáveis. Entre as condições avaliadas, a suplementação com acetato de sódio, particularmente a 2,0 g L^{-1}, produziu a maior diferença de cor perceptível, enquanto a concentração de 0,2 g L^{-1} de acetato de sódio preservou o teor proteico mais próximo ao do controle autotrófico. A suplementação com glicose favoreceu o acúmulo de carboidratos e lipídeos, demonstrando que a seleção da fonte de carbono influencia diretamente a composição da biomassa e suas características visuais. Embora a produtividade de biomassa sob condições heterotróficas tenha permanecido inferior à do cultivo autotrófico, a eliminação da iluminação artificial e a produção de biomassa com coloração visualmente atenuada representam vantagens promissoras para aplicações alimentícias. De modo geral, os resultados demonstram que o cultivo heterotrófico constitui uma estratégia viável para adequar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 à incorporação em matrizes alimentícias nas quais a coloração verde intensa afeta negativamente a aceitação do consumidor. Estudos futuros devem concentrar-se na otimização do processo e na validação sensorial de produtos alimentícios formulados com a biomassa de coloração modulada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P.; MORAIS, R. C.; TEIXEIRA, J. A.; NUNES, J. A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 159, n. February, 2022.

AHMAD, A.; ASHRAF, S. S. Sustainable food and feed sources from microalgae: Food security and the circular bioeconomy. **Algal Research**, v. 74, n. March, p. 103185, 2023.

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll an phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436–441, 1 maio 2012.

ALFADHLY, N. K. Z.; ALHELFI, N.; ALTEMIMI, A. B.; VERMA, D. K.; CACCIOLA, F. Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus *Spirulina*: An Investigative Review on Current Trends. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3063, 11 nov. 2022.

AMARANTE, M. C. A. DE; BRAGA, A. R. C.; SALA, L.; KALIL, S. J. Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109602, 1 nov. 2020.

ANANYEV, G.; CARRIERI, D.; DISMUKES, G. C. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the Cyanobacterium "*Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima*". **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6102–6113, 2008.

AOYAMA, K.; UEMURA, I.; MIYAKE, J.; ASADA, Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 17–20, 1997.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 1 ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; BURSIC, I.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers. **Foods**, v. 8, n. 12, 2019.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1973.

BORDULIS, C. B. T.; MORAES, L.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of functional shakes for the Elderly: Utilization of *Spirulina* biomass and açaí fruit components. **Food Bioscience**, v. 71, p. 107117, 1 set. 2025.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 30 abr. 1999.

CHAUDHARY, S.; SINGH, R.; MISHRA, S.; TALWAR, B. *Spirulina*: a superfood – nutritional insights, advancement in food applications and mitigation strategies for enhanced palatability. **Discover Food 2026 6:1**, v. 6, n. 1, p. 140-, 25 fev. 2026.
CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme**, v. 0229, n. 96, p. 221–224, 1997.

CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 5, p. 603–608, 1996.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 103–107, 2006.

CHENTIR, I.; KCHAOU, H.; HAMDI, M.; JRIDI, M.; LI, S.; DOUMANDJI, A.; NASRI, M. Biofunctional gelatin-based films incorporated with food grade phycocyanin extracted from the Saharian cyanobacterium *Arthrospira* sp. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 715–725, 1 abr. 2019.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461–465, 2004.

CHOUDHURY, A. K. R. Colour measurement instruments. *Em*: **Principles of Colour and Appearance Measurement**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 221–269.

COSTA, J. A.; MOREIRA, J. B.; LUCAS, F.; BRAGA, S.; PAULA, A.; CASSURIAGA, A.; MORAIS, M. G. Recent Advances and Future Perspectives of PHB Production by Cyanobacteria. **Industrial Biotechnology,** v. 14, n. 5, p. 249–256, 2018.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, BARBARA CATARINA BASTOS; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, n. July, p. 121946, 2019.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, BÁRBARA CATARINA BASTOS; SANTOS, T. D.; MITCHELL, B. G.; MORAIS, M. G. Open pond systems for microalgal culture. *Em*: **Biofuels from Algae**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. p. 199–223.

COSTA, J. A. V.; MOREIRA, J. B.; FANKA, L. S.; KOSINSKI, R. DA C.; MORAIS, M. G. DE. Microalgal biotechnology applied in biomedicine. *Em*: **Handbook of Algal Science, Technology and Medicine**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 429–439.

CRUZ, C. G.; ROSA, A. P. C. DA; COSTA, J. A. V. Identification of the phytohormones indole-3-acetic acid and trans-zeatin in microalgae. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1048–1056, 2023.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DURMUS, D. CIELAB color space boundaries under theoretical spectra and 99 test color samples. **Color Research and Application**, v. 45, n. 5, p. 796–802, 2020.

ESTEVES-FERREIRA, A. A.; INABA, M.; FORT, A.; ARAÚJO, W. L.; SULPICE, R. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 541–560, 3 set. 2018.

GAMA, R. C. N. DA; ASSEMANY, P. P.; ASSIS, L. R. DE; OLIVEIRA, L. V.; CECON, P. R.; CALIJURI, M. L. Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101516, 1 set. 2023.

GARCÍA, A. B.; LONGO, E.; BERMEJO, R. The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. **Journal of Applied Phycology 2021 33:5**, v. 33, n. 5, p. 3059–3070, 21 jul. 2021.

GARCÍA-VAQUERO, M.; BRUNTON, N.; LAFARGA, T. Microalgae as a source of pigments for food applications. *Em*: **Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications**. [s.l: s.n.]. p. 177–198.

HAFSA, Y. A.; AMEL, D.; SAMIA, S.; SIDAHMED, S. Evaluation of nutritional sensory properties of read enriched with *Spirulina*. **Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, 2014.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 54–67, 2018.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 298–304, 1 abr. 2016.

ISMAIEL, M. M. S.; PIERCEY-NORMORE, M. D. Cooperative antioxidative defense of the blue-green alga *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under oxidative stress imposed by exogenous application of hydrogen peroxide. **Environmental Pollution**, v. 341, p. 123002, 15 jan. 2024.

IVUŠIĆ, F.; REZIĆ, T.; ŠANTEK, B. Heterotrophic Cultivation of *Euglena gracilis* in Stirred Tank Bioreactor: A Promising Bioprocess for Sustainable Paramylon Production. **Molecules**, v. 27, n. 18, 1 set. 2022.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO2) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

LACROUX, J.; LLAMAS, M.; DAUPTAIN, K.; AVILA, R.; STEYER, J. P.; LIS, R. VAN; TRABLY, E. Dark fermentation and microalgae cultivation coupled systems: Outlook and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 865, n. December 2022, p. 161136, 2023.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, n. May, p. 101566, 2019.

LAFARGA, T.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; CASTELLARI, M.; VILLARÓ, S.; BOBO, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **LWT**, v. 111, p. 167–174, 1 ago. 2019.

LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109356, 2020.

LE, T. T.; CORATO, A.; GERARDS, T.; GÉRIN, S.; REMACLE, C.; FRANCK, F. Heterotrophy Compared to Photoautotrophy for Growth Characteristics and Pigment Compositions in Batch Cultures of Four Green Microalgae. **Plants**, v. 13, n. 9, 2024.

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

LINDSEY, D. T.; WEE, A. G. Perceptibility and acceptability of CIELAB color differences in computer-simulated teeth. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 7, p. 593–599, 1 jul. 2007.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J. C.; PEREIRA, L. O. D. S.; LANFER MARQUEZ, U. M. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, n. 3, p. 233–241, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent Chemistry. **The Journal of Biological**, v. 93, p. 265–275, 1951.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. DE; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **Lwt**, v. 90, n. August 2017, p. 270–276, 2018.

LY, B. C. K.; DYER, E. B.; FEIG, J. L.; CHIEN, A. L.; BINO, S. DEL. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 3- 12.e1, 2020.

MACDOUGALL, D. B. Colour measurement of food: principles and practice. *Em*: **Colour Measurement: Principles, Advances and Industrial Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 312–342.

MARIOTTI, F.; TOMÉ, D.; MIRAND, P. P. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 177–184, fev. 2008.

MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 159–164, 1995.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth Characteristics of *Spirulina platensis* in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 408–410, 1993.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

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

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **American Chemical Society**, n. lll, p. 426–428, 1959.

MOHAMMED, I. A.; RUENGJITCHATCHAWALYA, M.; PAITHOONRANGSARID, K. Cultivation manipulating zeaxanthin-carotenoid production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under light and temperature stress. **Algal Research**, v. 76, n. 1, p. 103315, 1 nov. 2023.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F. ; DURANTE, A. J. ; MARINS, L. F. ; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 144–150, 2008.

MORALES-SÁNCHEZ, D.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, O. A.; KYNDT, J.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 2015.

MOSTAFA MOHAMMED, D.; EL-MESSERY, T. M.; BARANENKO, D. A.; HASHIM, M. A.; TYUTKOV, N.; MARREZ, D. A.; ELMESSERY, W. M.; EL-SAID, M. M. Effect of *Spirulina maxima* microcapsules to mitigate testicular toxicity induced by cadmium in rats: Optimization of in vitro release behavior in the milk beverage. **Journal of Functional Foods**, v. 112, p. 105938, 1 jan. 2024.

MÜHLING, M.; BELAY, A.; WHITTON, B. A. Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 2, p. 129–135, 2005.

NEMATOLLAHI, M. A.; LAIRD, D. W.; HUGHES, L. J.; RAEISOSSADATI, M.; MOHEIMANI, N. R. Effect of organic carbon source and nutrient depletion on the simultaneous production of a high value bioplastic and a specialty pigment by *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 47, n. February, p. 101844, 2020.

PAGELS, F.; SALVATERRA, D.; AMARO, H. M.; GUEDES, A. C. Pigments from microalgae. *Em*: **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 465–492.

PATERNINA, L. P. R.; MORAES, L.; SANTOS, T. D.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. *Spirulina* and açai as innovative ingredients in the development of gummy candies. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 12, 1 dez. 2022.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 149–156, 2002.

RANGEL-YAGUI, C. D. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M. DE; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133–141, 2004.

RASIA, T. A.; SILVA VAZ, B. DA; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Nanoencapsulation of *Spirulina* sp. LEB 18 microalgae biomass using electrospray technique and application in chocolate milk. **Food and Bioproducts Processing**, v. 148, p. 491–506, 1 dez. 2024.

RODRÍGUEZ DE MARCO, E.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of *spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 102–108, 1 set. 2014.

RYM, B. D.; NEJEH, G.; LAMIA, T.; ALI, Y.; RAFIKA, C.; KHEMISSA, G.; JIHENE, A.; HELA, O.; HATEM, B. O. Modeling growth and photosynthetic response *in Arthrospira platensis* as function of light intensity and glucose concentration using factorial design. **Journal of Applied Phycology 2010 22:6**, v. 22, n. 6, p. 745–752, 24 mar. 2010.

SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; NAGARAJAN, D.; CHANG, J. S. Exploitation and biorefinery of microalgae. *Em*: **Waste Biorefinery**[s.l.] Elsevier B.V., 2018, p. 571- 601.

SCHWARZ, A.; WALTHER, J.; GEIB, D.; WITTHOHN, M.; STRIETH, D.; ULBER, R.; MUFFLER, K. Influence of heterotrophic and mixotrophic cultivation on growth behaviour of terrestrial cyanobacteria. **Algal Research**, v. 52, n. July, p. 102125, 2020.

SILVA, T. L.; MONIZ, P.; SILVA, C.; REIS, A. The dark side of microalgae biotechnology: A heterotrophic biorefinery platform directed to ω-3 rich lipid production. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 1–21, 2019.

SPENCE, C.; PIQUERAS-FISZMAN, B. Food Color and Its Impact on Taste/Flavor Perception. *Em*: **Multisensory Flavor Perception: From Fundamental Neuroscience Through to the Marketplace**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. p. 107–132.

VAN STOKKUM, I. ; NIEDZWIEDZKI, D. M.; AKHTAR, P.; BISWAS, A.; LAMBREV, P. H.; LIU, H. Cyanobacteria dynamically regulate phycobilisome-to-photosystem excitation energy transfer . **iScience**, v. 28, n. 6, p. 112610, 2025.

SUTHERLAND, D. L.; MCCAULEY, J.; LABEEUW, L.; RAY, P.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; HALL, C.; DOBLIN, M.; NGUYEN, L. N.; RALPH, P. J. How microalgal biotechnology can assist with the UN Sustainable Development Goals for natural resource management. **Current Research in Environmental Sustainability**, v. 3, p. 100050, 2021.

TEMPLETON, D. W.; LAURENS, L. M. L. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. **Algal Research**, v. 11, p. 359–367, 1 set. 2015.

THIEL, K.; VUORIO, E.; ARO, E. M.; KALLIO, P. T. The effect of enhanced acetate influx on *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. **Microbial Cell Factories 2017 16:1**, v. 16, n. 1, p. 21-, 2 fev. 2017.

TOCCA, G. P.; AGOSTINO, V.; MENIN, B.; TOMMASI, T.; FINO, D.; CAPRIO, F. DI. Mixotrophic and heterotrophic growth of microalgae using acetate from different production processes. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 93–132, 2024.

TRABELSI, L.; OUADA, H. BEN; ZILI, F.; MAZHOUD, N.; AMMAR, J. Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 1, p. 39–45, 2013.

URIBE-WANDURRAGA, Z. N.; BRAVO-VILLAR, M.; IGUAL, M.; SAVALL, C.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Sugar and no sugar added fruit microalgae-enriched jams: a study about their physicochemical, rheological, and textural properties. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 10, p. 2565–2578, 2021.

VELEA, S.; OANCEA, F.; FISCHER, F. Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. *Em*: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 45–65.

VENKATA MOHAN, S.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH, B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 169–178, 2015.

VERMA, R.; KUMARI, K. V. L. K.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, A. Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104149, 2020.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

WITHANA, T. N.; RANASINGHE, Y. S.; RATHNAYAKE, A. I.; BAMUNUARACHCHIGE, T. C.; ZOYSA, H. K. S. DE. Applications of *Spirulina* in the food industry: Scientometric and systematic review. **Food and Humanity**, v. 5, p. 100644, 1 dez. 2025.

YAN, Y.; MA, D.; LI, C.; HU, C.; DENG, P.; CHANG, R.; LI, K. Under the sustainable development goals: A research on the coupling coordination relationship of water- energy-food globally. **Energy Economics**, v. 150, p. 108873, 1 out. 2025.

YEH, Y. C.; EBBING, T.; FRICK, K.; SCHMID-STAIGER, U.; HAASDONK, B.; TOVAR, G. E. M. Improving Determination of Pigment Contents in Microalgae Suspension with

Absorption Spectroscopy: Light Scattering Effect and Bouguer–Lambert–Beer Law. **Marine Drugs**, v. 21, n. 12, p. 619, 29 nov. 2023.

YOSHIKAWA, K.; AIKAWA, S.; KOJIMA, Y.; TOYA, Y.; FURUSAWA, C.; KONDO, A.; SHIMIZU, H. Construction of a Genome-Scale Metabolic Model of *Arthrospira platensis* NIES-39 and Metabolic Design for Cyanobacterial Bioproduction. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144430, 1 dez. 2015.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima***. 1966. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - University of Paris, Paris, 1966.

ZOUARI, N.; ABID, M.; FAKHFAKH, N.; AYADI, M. A.; ZORGUI, L.; AYADI, M.; ATTIA, H. Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 811–813, dez. 2011

ARTIGO II

REDUÇÃO GRADUAL DA LUZ EM CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA MODULA A COMPOSIÇÃO DE PIGMENTOS E A COLORAÇÃO DA BIOMASSA DE *SPIRULINA PLATENSIS* LEB 52

BRITO, G.M.K.; COSTA, J.A.V.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; MORAIS, M.G. **Fed-batch cultivation under gradual light reduction modulates pigment composition and biomass color in *Spirulina platensis* LEB 52**. *Process Biochemistry*, v. 171, p. 277-287, 2026.

REDUÇÃO GRADUAL DA LUZ EM CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA MODULA A COMPOSIÇÃO DE PIGMENTOS E A COLORAÇÃO DA BIOMASSA DE *SPIRULINA PLATENSIS* LEB 52

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito combinado da redução gradual da intensidade luminosa e do cultivo em batelada alimentada com glicose (G) e nitrato de sódio ($NaNO_3$) sobre a modulação da cor e da pigmentação de culturas de *Spirulina platensis* LEB 52. Os ensaios em batelada alimentada (MixoHet-RGL) apresentaram os melhores resultados cinéticos, com concentração máxima de biomassa (X_{max}) de 3,0 g L^{-1} e produtividade máxima (P_{max}) de 96,9 mg L^{-1} d^{-1}, superiores ao controle autotrófico (AutoCtrl-RGL), que apresentou 1,8 g L^{-1} e 62,5 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente. O aumento de 55% na P_{max} ocorreu durante a fase mixotrófica, enquanto a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) manteve-se estatisticamente igual entre ambos os ensaios. A glicose e o nitrato fornecidos por batelada alimentada foram completamente consumidos ao longo dos 95 dias de cultivo. A composição pigmentar variou ao longo do cultivo, com maiores teores de clorofila a e ficocianina observados no MixoHet-RGL, ao passo que as diferenças nos carotenoides foram observadas principalmente em tempos intermediários de cultivo. As coordenadas CIELAB indicaram modulação da cor, evidenciando a atenuação da coloração verde em direção a tons de verde-claro e amarelo-acinzentado. De modo geral, a aplicação combinada da redução gradual da luz e da suplementação de nutrientes em batelada alimentada modulou o crescimento, o perfil pigmentar e a cor da biomassa de S. platensis, fornecendo uma base inicial para a obtenção de diferentes perfis de cor.

Palavras-Chave: Cianobactéria. Glicose. Heterotrófico. Mixotrófico. Nitrato.

1 INTRODUÇÃO

A demanda dos consumidores por fontes nutricionais que desempenhem um papel funcional e substituam alimentos de origem animal tem incentivado a busca por opções alimentares alternativas. A *Spirulina*, uma microalga fotossintética, representa uma possibilidade viável para essa finalidade, pois contém elevadas quantidades de compostos essenciais para a nutrição humana, como aminoácidos essenciais, vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados. Considerada um superalimento, seu valor biotecnológico está principalmente

relacionado ao seu teor proteico e aos seus pigmentos fotossintéticos, como a ficocianina (Franco Lucas e Brunner, 2024; Iñiguez-Moreno *et al.*, 2025)..

Os pigmentos desempenham papel fundamental durante o processo de fotossíntese e são responsáveis por conferir a coloração característica da biomassa. No caso da *Spirulina*, sob condições padrão de crescimento, a biomassa exibe coloração verde-azulada. Nesse contexto, a cor da biomassa frequentemente se torna um fator limitante para sua incorporação em alimentos, uma vez que pode resultar em colorações que se desviam daquelas tipicamente associadas a uma determinada categoria de alimento. Isso pode afetar as preferências dos consumidores e levar a uma maior rejeição de alimentos contendo *Spirulina*. Portanto, compreender como modular os pigmentos é de interesse para a obtenção de diferentes tonalidades de biomassa e para a ampliação da gama de alimentos aos quais ela pode ser aplicada (Sun *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2024).

A *Spirulina* contém clorofila *a*, carotenoides e ficocianina como pigmentos responsáveis pela captação de energia luminosa e sua conversão em moléculas energéticas utilizadas para seu crescimento. Cada um desses pigmentos absorve luz dentro de uma faixa específica do espectro visível. Além disso, sob excesso ou ausência de luz, a proporção desses pigmentos é modificada como forma de proteger a célula contra o estresse oxidativo. Assim, a modulação da intensidade luminosa pode levar a alterações na cor da biomassa (García-Vaquero; Brunton; Lafarga, 2021; Ismaiel; El-Ayouty; Piercey-Normore, 2016a; Lafarga *et al.*, 2020).

No entanto, para que a modulação de pigmentos ocorra, é necessária a fotoadaptação, definida como a capacidade de ajustar o sistema fotossintético a variações na luz. A fotoadaptação é necessária para evitar processos como a degradação de pigmentos, a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a fotoinibição (Chojnacka; Noworyta, 2004). A exposição repentina a alta ou baixa intensidade luminosa pode resultar em redução da produção de biomassa ou até mesmo em morte celular. Assim, a adaptação gradual às variações de intensidade luminosa pode ser uma alternativa para evitar tais problemas (Bukhov, 2004; Latifi; Ruiz; Zhang, 2009).

A compreensão de como a *Spirulina* regula a síntese de pigmentos durante a transição de alta intensidade luminosa para a ausência de luz pode ser facilitada pela avaliação de diferentes condições de cultivo. O cultivo mixotrófico, que utiliza tanto a energia proveniente da luz quanto uma fonte de carbono, pode ser empregado como estratégia para proteger as células contra o estresse oxidativo causado pela alta intensidade luminosa e facilitar a transição para o cultivo heterotrófico, uma vez que ambos dependem do carbono orgânico para o desenvolvimento celular. Entretanto, a redução gradual da intensidade luminosa diminui a

energia fornecida pela fotossíntese, aumentando a demanda celular por carbono orgânico e nitrogênio para sustentar o crescimento e a síntese de pigmentos. Nesse cenário, o cultivo em batelada alimentada pode garantir a disponibilidade contínua de nutrientes para a renovação celular, evitar a limitação ou a inibição por substratos e contribuir para a manutenção das funções metabólicas ao longo da redução da intensidade luminosa (Andrade; Costa, 2007; Costa *et al.*, 2019, 2020; Morais *et al.*, 2015).

Embora os efeitos da intensidade luminosa e do fornecimento de nutrientes sobre os pigmentos da *Spirulina* tenham sido estudados separadamente, seu efeito combinado ainda é pouco compreendido (Grossman *et al.*, 1994; Luimstra *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2022; Vonshak, Cheung e Chen, 2000). A redução da intensidade luminosa e a alimentação em batelada alimentada atuam sobre as mesmas vias metabólicas, uma vez que ambas influenciam o equilíbrio entre o metabolismo fotossintético e o heterotrófico e, consequentemente, a síntese, a degradação e a proporção de clorofila, carotenoides e ficocianina. Dessa forma, sua interação pode produzir respostas que não podem ser previstas pela avaliação de cada fator isoladamente. Portanto, o comportamento metabólico da *Spirulina* em resposta a estímulos combinados, como intensidade luminosa e fornecimento de nutrientes, pode resultar em interações celulares que possibilitam maior variabilidade nas tonalidades de cor do cultivo e, consequentemente, da biomassa (Rym *et al.*, 2010) . A compreensão desse efeito conjunto é essencial para prever e controlar a coloração do cultivo e, consequentemente, da biomassa, o que afeta diretamente sua aceitação e aplicabilidade em diferentes produtos alimentícios. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito combinado da redução gradual da intensidade luminosa e do cultivo em batelada alimentada com glicose e nitrato de sódio sobre a modulação da coloração e da pigmentação de cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA E MEIO DE CULTURA

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 foi utilizada para o desenvolvimento do presente estudo, isolada do Lago Chade, África. Essa cepa é mantida em meio Zarrouk (Zarrouk, 1966) e pertence à coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os experimentos foram iniciados com uma concentração-padrão de *Spirulina platensis* LEB 52 de 0,2 g L^{-1} e conduzidos em fotobiorreatores do tipo frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, com volume útil de 400 mL. As culturas foram mantidas a 30 ± 2 °C e aeradas por injeção de ar estéril. A iluminação foi fornecida por lâmpadas de LED (diodo emissor de luz) brancas (6500 K), sob fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro. O fluxo de fótons foi medido com um luxímetro digital (*Light Meter*, ULM-500, Effeltrich, Alemanha).

Duas condições de cultivo foram avaliadas sob redução gradual da luz (RGL) ao longo de um período de 130 dias, partindo de um fluxo de fótons de 100 μmol fótons m^{-2} s^{-1}: controle autotrófico (AutoCtrl-GLR), utilizando meio Zarrouk padrão (Zarrouk, 1966); e uma condição mixotrófica/heterotrófica (MixoHet-GLR), utilizando meio Zarrouk sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose ($C_6H_{12}O_6$) e nitrato de sódio ($NaNO_3$) em regime de batelada alimentada (Figura 1). Ambas as condições foram iniciadas com a mesma concentração de nitrato de sódio do meio Zarrouk padrão. A cultura MixoHet-GLR foi inicialmente suplementada com 0,5 g L^{-1} de glicose. A Tabela 1 apresenta as concentrações de glicose e nitrato de sódio fornecidas em cada pulso de alimentação, calculadas com base no volume útil da cultura MixoHet-GLR. Ao longo do período de cultivo do MixoHet-GLR, a glicose foi fornecida a cada dois dias, enquanto o nitrato de sódio foi fornecido a cada três dias. A quantidade de glicose adicionada foi ajustada semanalmente, ao passo que a quantidade de nitrato de sódio adicionada foi modificada semanalmente a partir do dia 21 (Tabela 1).

O pH foi monitorado com fitas indicadoras de pH (MQuant®, faixa 0–14, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e mantido em aproximadamente 9,5 por meio de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. As perdas por evaporação foram compensadas com água destilada estéril e consideradas nos respectivos cálculos de concentração.

A cada 20 dias, metade da cultura foi removida e substituída por meio de cultivo fresco, a fim de repor os demais nutrientes consumidos durante o cultivo. Na condição AutoCtrl-GLR, foi adicionado meio Zarrouk padrão, enquanto na condição MixoHet-GLR foi adicionado meio Zarrouk modificado, sem bicarbonato de sódio e sem nitrato de sódio. As culturas foram monitoradas ao longo de todo o período de cultivo por microscopia óptica (DM6B, Leica, Wetzlar, Alemanha), para avaliar seu estado geral e acompanhar visualmente possível contaminação bacteriana.

Figura 1 - Organograma das condições de cultivo aplicadas a *Spirulina platensis* LEB 52.

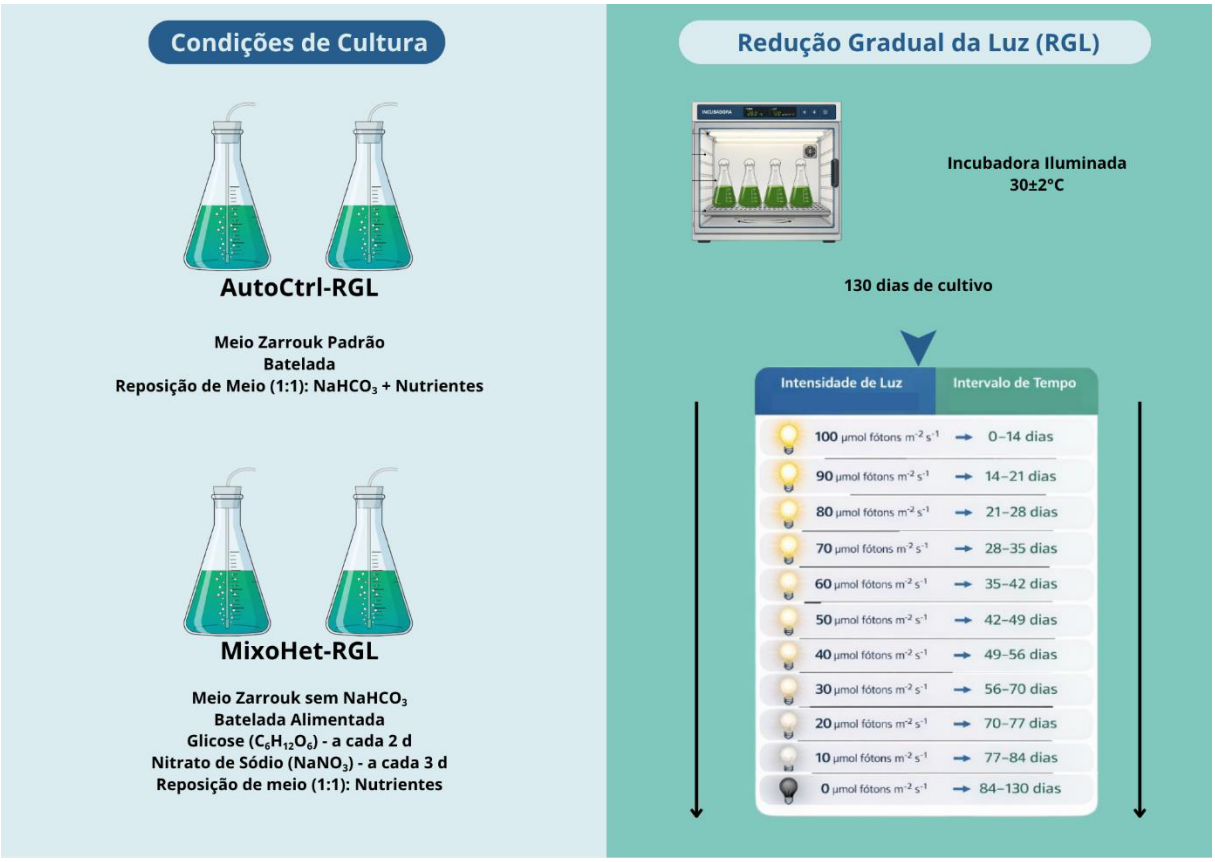


Tabela 1 - Intensidades luminosas e respectivos pulsos de alimentação para o cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz (MixoHet-RGL).

Intensidade Luminosa (µmol fóton m^{-2} s^{-1})	**Tempo (d)**	**Suplementação com Nitrato (g L^{-1})**	**Suplementação com Glicose (g L^{-1})**
100	0-14	2,5	0,5
90	14-21	-	0,5
80	21-28	1,0	1,0
70	28-35	1,0	1,0
60	35-42	1,0	2,0
50	42-49	2,0	2,0
40	49-56	2,0	4,0
30	56-70	2,0	6,0
20	70-77	3,0	8,0
10	77-84	3,0	8,0
0	84-130	3,0	10,0

2.3 CONSUMO DE GLICOSE E NITRATO

O consumo de glicose foi avaliado a cada dois dias pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). O consumo de nitrato foi avaliado a cada 3 dias utilizando a metodologia proposta por Armstrong (2002).

2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

As culturas foram avaliadas a cada dois dias por meio da contagem celular em câmara de Neubauer (Neubauer-Bright Line, BOECO, Alemanha), para determinar a concentração celular (X_{cel}, células mL^{-1}). A concentração máxima de biomassa (X_{max}, g L^{-1}) e a produtividade máxima de biomassa (P_{max}, mg L^{-1} d^{-1}) (Equação 3) foram determinadas a partir da correlação entre X_{cel}, a densidade óptica (DO, 670 nm) e o peso seco da cultura (X, g L^{-1}) (Equações 1 e 2). A taxa máxima de crescimento específico (μmax, d^{-1}) foi determinada por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento exponencial (Bailey; Ollis, 1986).

$$DO = 4 \times 10^{6} X_{cell} + 0{,}0829 \quad (R^2 = 0{,}99) \tag{1}$$

$$X = 0{,}4526\ DO - 0{,}0217 \quad (R^2 = 0{,}99) \tag{2}$$

$$P_{max} = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \tag{3}$$

2.5 BALANÇO TOTAL DE C/N

O balanço de carbono e nitrogênio totais adicionados aos cultivos foi calculado com base nas massas totais das fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) fornecidas. A Equação 4 segue abordagem semelhante à de Barros *et al.* (2017), na qual todas as entradas de C e N são quantificadas para estimar a condição nutricional dos cultivos. Na equação, C (g de carbono) corresponde à massa total de carbono fornecida; N (g de nitrogênio) corresponde à massa total de nitrogênio fornecida; $C_{inicial}$ corresponde à massa de carbono fornecida no tempo 0 de cultivo; $C_{alimentação}$ corresponde à massa de carbono fornecida ao longo do cultivo; $N_{inicial}$ corresponde à massa de nitrogênio fornecida no tempo 0 de cultivo; e $N_{alimentação}$ corresponde à massa de nitrogênio fornecida ao longo do cultivo.

$$\frac{C}{N} = \frac{(C_{inicial} - C_{alimentação})}{(N_{inicial} - N_{alimentação})} \tag{4}$$

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

A quantificação de pigmentos foi realizada aos 0, 60, 80, 100 e 130 dias de cultivo. Esferas de vidro foram adicionadas a alíquotas de 0,5 mL de cultivo, e as amostras foram submetidas a homogeneizador de esferas (Retsch, MM400, Hann, Alemanha) para ruptura celular. Em seguida, os extratos obtidos foram colocados sob agitação magnética por 1h, com adição de 0,5 mL de cloreto de cálcio na concentração de 6 g L^{-1} para extração. As amostras foram centrifugadas a 10.000 × *g* por 10 minutos, resultando em duas frações que foram utilizadas para a determinação de ficocianina, clorofilas e carotenoides (Bennet; Bogorad, 1973; Lichtenthaler, 1987; Porra, 2002).

2.6.1 Teor de Ficocianina

O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação de ficocianina por meio da medição das densidades ópticas nos comprimentos de onda de 615 e 652 nm. A Equação 5 apresenta a correlação utilizada para determinar a concentração de ficocianina (mg mL^{-1}), proposta por Bennet e Bogorad (1973), em que Abs_{615} e Abs_{652} correspondem às absorbâncias medidas nos respectivos comprimentos de onda indicados nos subíndices. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de biomassa, considerando a concentração de biomassa obtida nos respectivos dias de determinação.

$$\text{Ficocianina}\left(\text{mg mL}^{-1}\right)= \frac{Abs_{615}\text{-}0{,}474\ (Abs_{652})}{5{,}34} \tag{5}$$

2.6.2 Clorofila *a* e Carotenoides

Os pellets obtidos pela centrifugação descrita na Seção 2.6 foram extraídos com 1,5 mL de acetona 80% (v/v) em homogeneizador de esferas (Retsch, MM400, Hann, Alemanha). As misturas foram agitadas e centrifugadas (10.000 × *g* por 5 min), o sobrenadante foi coletado, e o processo foi repetido até que os pellets apresentassem coloração branca. A densidade óptica do extrato foi determinada nos comprimentos de onda de 470, 646,6 e 663,6 nm (Porra, 2002). A concentração de clorofila *a* e carotenoides (mg mL^{-1}) foi determinada utilizando as correlações descritas por Lichtenthaler (1987), apresentadas nas Equações 6 e 7, respectivamente. Nas equações, Abs_{470}, $Abs_{646,6}$ e $Abs_{663,6}$ correspondem às absorbâncias obtidas nos respectivos comprimentos de onda indicados nos subíndices. Os resultados foram

expressos em mg g^{-1} de biomassa, considerando a concentração de biomassa obtida nos respectivos dias de determinação.

$$\text{Clorofila } a \left(\text{mg mL}^{-1}\right) = \frac{12{,}25\ (\text{Abs}_{663{,}6} - 2{,}55\ (\text{Abs}_{646{,}6})}{1000} \quad (6)$$

$$\text{Carotenoides} \left(\text{mg mL}^{-1}\right) = \frac{1000\ (\text{Abs}_{470}) - 1{,}82\ (\text{Clorofila } a)}{1{,}98 \times 10^{5}} \quad (7)$$

2.7 CARACTERÍSTICAS DE COR DOS CULTIVOS

As características de cor dos cultivos foram avaliadas aos 0, 60, 80, 100 e 130 dias de cultivo. Os cultivos foram observados em microscópio óptico (DM6B, Leica, Wetzlar, Alemanha), com aumento de 40×, para identificar possíveis alterações qualitativas na coloração celular. Para a quantificação da diferença de cor entre os ensaios, o tempo 0 de cada respectivo cultivo foi utilizado como referência. Alíquotas de 5 mL foram coletadas dos cultivos e distribuídas individualmente sobre suportes de vidro circulares, com 35 mm de diâmetro e 10 mm de altura. As amostras foram analisadas em três pontos equidistantes, utilizando um colorímetro digital (CR-400, Konica Minolta, Tóquio, Japão), com iluminante D65 e ângulo do observador de 10°. A cor foi medida diretamente nas alíquotas dos cultivos, sem normalização prévia pela concentração de biomassa. Foram determinadas diferentes coordenadas de cor: a* representa o componente de cor variando de verde (−) a vermelho (+); b* representa o componente de cor variando de azul (−) a amarelo (+); e L* corresponde a luminosidade, com valores variando de 0 (preto) a 100 (branco). Com base nos componentes L*, a* e b*, foram determinados: croma (C*ab), representando a intensidade da cor (Equação 8); ângulo de tonalidade (h°ab), indicando a qualidade tonal da cor em graus (Equação 9); e diferença total de cor (ΔE), correspondendo à distância perceptual entre duas cores dentro do espaço de cor (Equação 10) (Uribe-Wandurraga *et al.*, 2021).

$$C^*ab = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (8)$$

$$h°ab = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (9)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (10)$$

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cultivos foram realizados em duplicatas biológicas, sendo cada duplicata correspondente a um cultivo independente conduzido sob condições experimentais idênticas. Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica, resultando em seis réplicas analíticas por condição (n = 6). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP). Para os resultados nos quais foram realizadas comparações entre os cultivos, aplicou-se o teste t de Student, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para as comparações entre os diferentes dias dentro de um mesmo cultivo, foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO MICROALGAL E CONSUMO DE SUBSTRATO

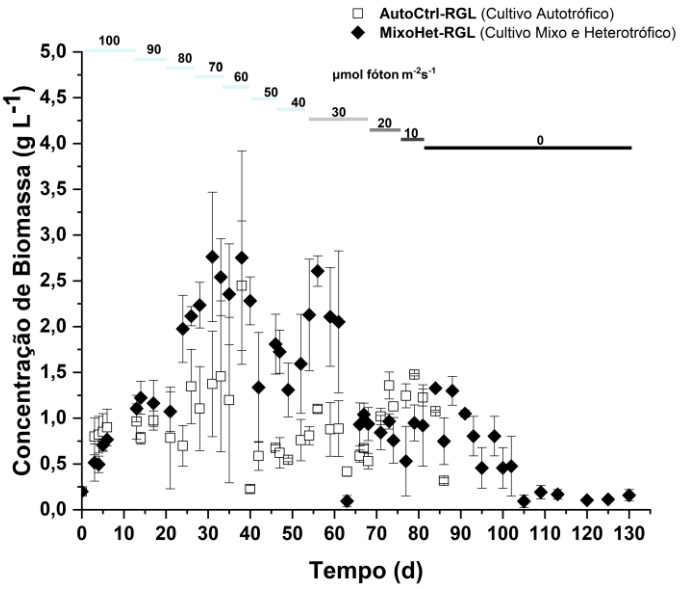
Os parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento de *Spirulina platensis* LEB 52 estão apresentados na Tabela 2. As maiores concentrações de biomassa, quando comparadas ao controle autotrófico com redução gradual de luz (AutoCtrl-RGL), ocorreram aos 38 dias de cultivo sob intensidade luminosa de 60 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, com suplementação de 2 g L^{-1} de glicose e 1 g L^{-1} de nitrato de sódio ($NaNO_3$) (Figura 2). A produtividade do cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual de luz (MixoHet-RGL) apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) de 55% em relação ao AutoCtrl-RGL, o qual ocorreu especificiamente na fase mixotrófica. Além disso, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) do MixoHet-RGL não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao AutoCtrl-RGL. Isso indica que a velocidade de crescimento não foi estimulada nem inibida pelo modo de cultivo e pela alimentação de substrato. Do ponto de vista metabólico, a disponibilidade de nitrogênio, a facilidade de assimilação da glicose e a operação em batelada alimentada podem ter contribuído para a manutenção da velocidade específica de crescimento (Chen; Zhang, 1997; Inabe *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2025).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 sob redução gradual da luz.

Parâmetros	Condições	
	AutoCtrl-RGL	**MixoHet-RGL**
X_{max} (g L^{-1})	$1,8^{b}$±0,4	$3,0^{a}$±0,8
P_{max} (mg L^{-1} d^{-1})	$62,5^{b}$±9,6	$96,9^{a}$±8,4
μ_{max} (d^{-1})	$0,40^{a}$≤0,01	$0,50^{a}$≤0,01
R^{2*}	0,95±0,1	0,96±0,1
Δt^{**}	0-33	0-38

Notas: **AutoCtrl-RGL**= Controle autotrófico com redução gradual de luz; **MixoHet-RGL**= Cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual de luz. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a mesma resposta. $^{*}R^{2}$: coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento. $^{**}\Delta t$: tempo inicial–tempo final da fase exponencial de crescimento.

Figura 2 - Curva de crescimento dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 sob redução gradual da luz.

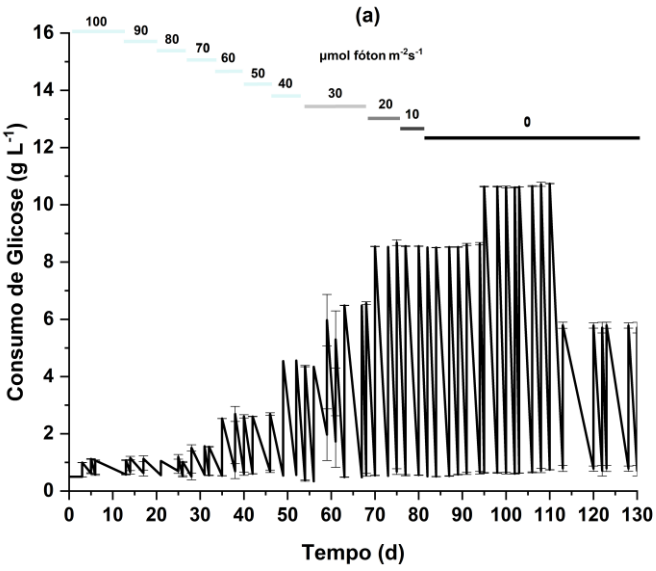


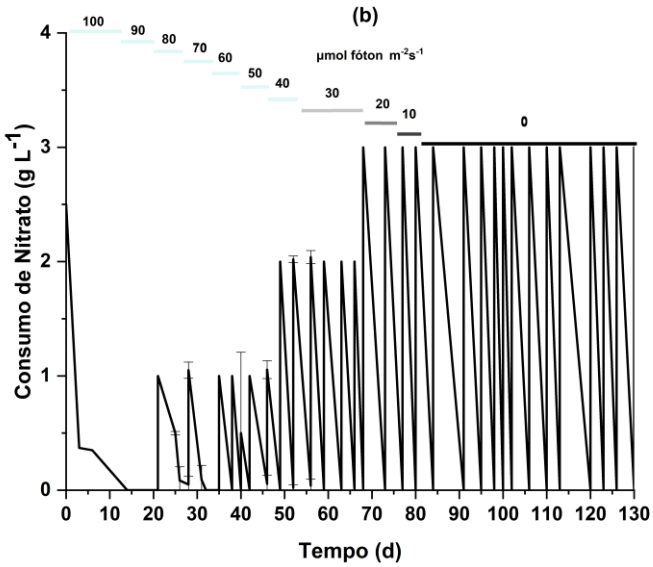
Chen e Zhang (1997) avaliaram o cultivo mixotrófico de *Spirulina* platensis UTEX 1926 em batelada alimentada com glicose em meio Zarrouk sob diferentes intensidades luminosas (80–120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e 80–160 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) ao longo de um período de 300 h (12,3 d). Uma concentração máxima de biomassa (X_{max}) de 10,2 g L^{-1} foi obtida com 1 g L^{-1} de glicose sob intensidade luminosa de 160 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, enquanto a 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} o X_{max} foi de 4,1 g L^{-1}. Em contraste com Chen e Zhang (1997), o presente estudo empregou meio de cultivo mixotrófico sem bicarbonato como fonte alternativa de carbono. O

que em conjunto com a alimentação nitrato de sódio, e as intensidade luminosa pode ter resultado a concentrações inferiores de biomassa, quando comparado às de Chen e Zhang (1997).

Chen *et al.* (2006) estudaram o cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis* em meio Zarrouk com adição em batelada alimentada de glicose e acetato de sódio. A alimentação com 2 g L^{-1} de glicose e 4 g L^{-1} de acetato de sódio resultou em valores de X_{max} de 2,57 g L^{-1} e 1,65 g L^{-1}, respectivamente, mostrando que a glicose é mais facilmente assimilada que o acetato. Conforme discutido por Verma *et al.* (2020), a assimilação de glicose ocorre devido à sua disponibilidade metabólica e à facilidade de assimilação do carbono orgânico nessa forma. A metabolização da glicose pelas microalgas ocorre pelas vias da pentose fosfato (PP) e de Embden–Meyerhof (EM), as quais são ativadas sob escuridão completa (heterotrofia) ou iluminação (mixotrofia). Como mostrado na Figura 3a, toda a glicose fornecida foi consumida ao longo dos 130 dias de cultivo de *Spirulina platensis* LEB 52. O cultivo mixotrófico pode ter produzido energia de forma contínua por meio do catabolismo da glicose, contribuindo para o aumento da produtividade em relação ao AutoCtrl-RGL (Rym *et al.*, 2010).

Figura 3 – Consumo de (a) glicose e (b) nitrato de sódio de *Spirulina platensis* LEB 52 durante o cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz (MixoHet-RGL).





De acordo com a Figura 2, nos tempos de cultivo em que as intensidades luminosas estavam entre 100 e 80 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, não resultaram em aumento do crescimento da biomassa, mesmo com o consumo total de nutrientes alimentados. Isso pode ser explicado pelo fato de a intensidade luminosa ter sido um fator limitante para o cultivo, em contraste com o relatado por Maquez *et al.* (1995) e Chen e Zhang (1997) para *Spirulina platensis*. Nesses estudos, faixas de intensidade luminosa semelhantes não limitaram o crescimento microbiano, resultando em aumento da concentração de biomassa. A faixa de intensidade luminosa entre 100 e 80 μmol fótons m^{-2} s^{-1} pode ter sido excessiva para *Spirulina platensis* LEB 52, podendo ter causado estresse celular devido à superexcitação dos fotossistemas e à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Latifi; Ruiz; Zhang, 2009). No presente trabalho a faixa ideal de intensidade luminosa para a produção de biomassa sob cultivo autotrófico e mixotrófico situou-se entre 70 e 60 μmol fótons m^{-2} s^{-1} e entre 70 e 50 μmol fótons m^{-2} s^{-1}, respectivamente.

O consumo de nitrato (Figura 3b), combinado com a alta intensidade luminosa mencionada anteriormente, também pode ter sido um fator limitante para a produção de biomassa até os 20 dias de cultivo (Figura 2). Quando suplementado em modo batelada alimentada, contribuiu para o consumo de glicose e o desenvolvimento celular. Isso ocorre porque o nitrogênio é um componente fundamental da expressão enzimática, responsável pela ocorrência da maioria dos processos metabólicos (Esteves-Ferreira *et al.*, 2018). Segundo Verma *et al.* (2020), o aumento da concentração de nitrato leva a um aumento correspondente da concentração de biomassa em cultivos mixotróficos em batelada alimentada de *Spirulina platensis*. Isso é consistente com Li *et al.* (2018), que estudaram o cultivo autotrófico e mixotrófico de *Spirulina platensis* FACHB-431 em meio Zarrouk suplementado com 2 g L^{-1} de

glicose, e observaram que o conteúdo intracelular de nitrogênio diminui com a redução da concentração de nitrogênio no meio de cultura, sugerindo uma limitação gradual de ambos os modos de cultivo devido à depleção de nitrogênio. Assim, a eficiência metabólica de *Spirulina platensis* LEB 52 pode ter sido influenciada pelo balanço total de carbono/nitrogênio (C/N). Esse balanço reflete-se no comportamento metabólico da formação de 2-oxoglutarato (2-OG) e 2-fosfoglicolato (2-PG), que atuam, respectivamente, como esqueleto de carbono para a assimilação de nitrogênio no ciclo de Krebs e como intermediário da fotorrespiração, indicando limitação de carbono inorgânico (Forchhammer; Selim, 2020; Zhang *et al.*, 2018). Entretanto, a especiação do carbono inorgânico e a química do carbonato não foram monitoradas diretamente no presente estudo, e sua contribuição para as respostas observadas não pode ser quantificada.

Os cultivos AutoCtrl-RGL e MixoHet-RGL apresentaram balanços de C/N de 5,9 e 9,6 (g de carbono disponível/g de nitrogênio disponível), respectivamente, considerados balanços globais intermediários na literatura ($5 \leq C/N \leq 10$) (Gama *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2024). Isso indica que ambos os cultivos estavam metabolicamente equilibrados, sem excesso de carbono ou nitrogênio, o que favorece a produção de biomassa. Entretanto, o balanço do MixoHet-RGL apresentou tendência a intermediário-alto (<10), o que pode ter contribuído para a similaridade estatística do μ_{max} devido a uma possível desaceleração do crescimento (Zhang *et al.*, 2018). Essa tendência também pode estar relacionada à redução progressiva da intensidade luminosa, onde à medida que a fixação fotossintética de carbono diminuiu, a assimilação da glicose tornou-se proporcionalmente mais importante para o balanço global de carbono, alterando a contribuição metabólica da razão C/N ao longo do cultivo.

A partir do 80º dia de cultivo, quando os cultivos estavam em baixa luminosidade, o AutoCtrl-RGL apresentou declínio da curva de crescimento, sobrevivendo apenas até o 84º dia (Figura 2). Como esperado, a baixa intensidade luminosa (10 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) e a ausência de fonte de carbono orgânico resultaram na limitação do crescimento celular. Sob condições de baixa luminosidade, o consumo de bicarbonato de sódio fica prejudicado, pois a célula não dispõe de energia suficiente para sustentar o transporte ativo de carbono inorgânico. O bicarbonato (HCO_3^-), uma vez internalizado, é convertido em dióxido de carbono (CO_2) dentro do carboxissomo, processo essencial para o fornecimento de CO_2 à Rubisco. Consequentemente, a limitação energética decorrente da baixa intensidade luminosa reduz a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), comprometendo o ciclo de Calvin, a fixação de carbono e, por fim, o crescimento celular (Ma *et al.*, 2025; Yamaoka *et al.*, 2025; Yoshida *et al.*, 2023).

Em contraste com o controle (AutoCtrl-RGL), o MixoHet-RGL sobreviveu ao longo dos 130 dias de cultivo devido à presença de glicose (Figuras 2 e 3), indicando que a estratégia de redução gradual da luz foi sustentada somente quando combinada com a suplementação de glicose. Desta forma, o desempenho do cultivo sob redução gradual de luz está associado à disponibilidade de carbono orgânico. Sob condições heterotróficas, a glicose permeia a membrana celular com o auxílio de transportadores de carboidratos (Klanchui *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento celular ocorre mesmo com a redução da atividade fotossintética, uma vez que o crescimento depende da concentração de glicose no meio de cultura (Marquez *et al.*, 1995). Embora o cultivo heterotrófico seja facilitado pela fonte de carbono orgânico, ele não atinge as mesmas concentrações de biomassa que o cultivo mixotrófico (Marquez *et al.*, 1993).

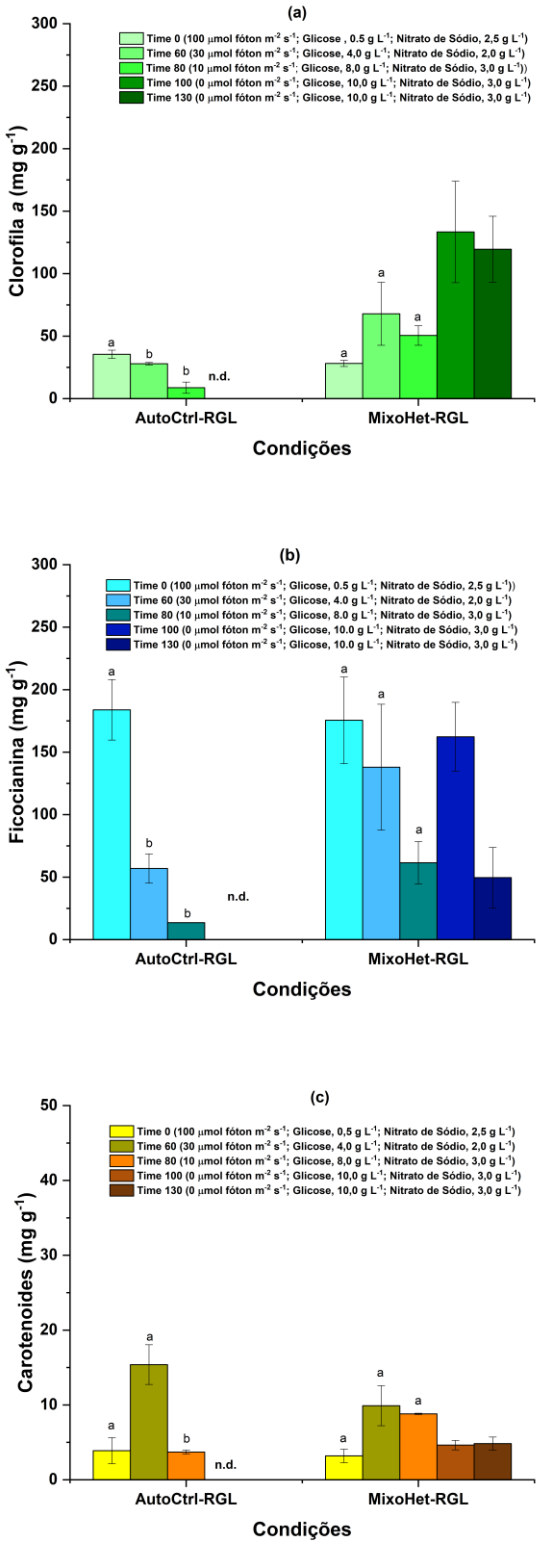
Os pigmentos envolvidos no processo fotossintético podem se degradar na ausência de luz devido à redução da atividade fotossintética e à regulação negativa de sua síntese, diminuindo assim sua manutenção metabólica. Nesses casos, a suplementação de glicose pode ser empregada como estratégia para sustentar o metabolismo celular, promover a renovação de nutrientes e, consequentemente, aumentar a produtividade do cultivo (Klanchui *et al.*, 2012; Thajuddin *et al.*, 2025). Marquez *et al.* (1993) realizaram cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* NIES-39 em modo batelada com 2 g L^{-1} de glicose por 12 dias, obtendo um X_{max} de 0,83 g L^{-1}. Da mesma forma, Marquez *et al.* (1995), estudando *Spirulina platensis* NIES-39 sob condições heterotróficas em modo batelada com 9 g L^{-1} de glicose por 18 dias, relataram um X_{max} de 4,14 g L^{-1}. No presente estudo, durante a fase heterotrófica (84 a 130 dias), sob operação em batelada alimentada com 10 g L^{-1} de glicose e 3 g L^{-1} de nitrato de sódio, obteve-se um X_{max} de 1,37 ± 0,06 g L^{-1} e P_{max} de 13,07±1,04 mg L^{-1} d^{-1}. Com o uso do modo batelada alimentada e as concentrações de fontes de carbono e nitrogênio aplicadas, seria esperado um aumento do X_{max} quando comparado aos estudos citados. Entretanto, as condições favoreceram a proliferação bacteriana devido à maior disponibilidade de glicose, combinada com temperatura elevada e ausência de luz. s cultivos permaneceram sem contaminação bacteriana detectável durante o período inicial de cultivo. Entretanto, a contaminação bacteriana foi detectada por microscopia óptica no 95º dia, após os cultivos terem atingido a condição de ausência total de luz. Portanto, o consumo de nutrientes durante o período subsequente de cultivo não pode ser atribuído exclusivamente à *Spirulina platensis* LEB 52, uma vez que a atividade bacteriana também pode ter contribuído para o consumo de glicose e nitrato. Isso provavelmente levou à competição por glicose e nitrato de sódio, o que pode ter afetado negativamente o crescimento de *Spirulina platensis* LEB 52 sob condições heterotróficas.

A adaptação gradual do cultivo de *Spirulina platensis* LEB 52 pode ter sido benéfica do ponto de vista metabólico. A redução lenta da intensidade luminosa (100 a 0 μmol fótons m^{-2} s^{-1}) pode ter resultado na mitigação do estresse foto-oxidativo. Além disso, a operação em batelada alimentada e, consequentemente, o aumento gradual das concentrações de alimentação de glicose (0,5 a 10 g L^{-1}) e de nitrogênio (1 a 3 g L^{-1}) podem ter promovido estabilidade metabólica ao evitar mudanças abruptas na disponibilidade de substrato. A reposição do meio de cultura a cada 20 dias também foi um fator-chave para restabelecer os demais nutrientes consumidos e permitir o desenvolvimento da *Spirulina* ao longo de um período tão extenso. Com base nessas observações, estratégias como a otimização da taxa de redução da intensidade luminosa e o ajuste dos intervalos de alimentação em modo de batelada alimentada podem melhorar o desempenho do processo. Além disso, a manutenção de cultivos axênicos ou a implementação de medidas de controle de contaminação seriam benéficas para minimizar a contaminação bacteriana durante a ausência total de luz. Espera-se que esses ajustes metabólicos no crescimento e no consumo de substratos, impulsionados pelo efeito combinado da redução gradual da luz e da alimentação com glicose/nitrato, também se reflitam no perfil de pigmentos de *Spirulina platensis* LEB 52, conforme discutido na seção seguinte.

3.2 MODULAÇÃO DE PIGMENTOS SOB REDUÇÃO COMBINADA DE LUZ E ALIMENTAÇÃO COM NUTRIENTES

Os pigmentos são os principais responsáveis pelo processo de fotossíntese, pois captam energia luminosa para conversão em energia na forma de ATP e de moléculas transportadoras de energia, como o $NADP^+$ (Henderson *et al.*, 1990). A *Spirulina platensis* contém clorofila *a*, ficocianina e carotenoides em sua composição (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012). Os resultados da quantificação obtidos no presente estudo para esses pigmentos estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 - Concentrações de pigmentos de *Spirulina platensis* LEB 52: (a) clorofila *a*, (b) ficocianina e (c) carotenoides.



Legenda: Letras diferentes entre as condições indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) no mesmo tempo de cultivo. nd.= não detectado.

A concentração de clorofila *a* foi significativamente maior ($p < 0,05$) no ensaio MixoHet-RGL em comparação ao AutoCtrl-RGL ao longo do cultivo (Figura 4a). O mesmo comportamento foi observado para a concentração de ficocianina (Figura 4b). Para o AutoCtrl-RGL, ocorreu diminuição da concentração de pigmentos à medida que a intensidade luminosa diminuiu. Para os carotenoides, diferenças significativas foram observadas apenas entre os ensaios no dia 80 (Figura 4c) ($p < 0,05$).

A clorofila é o pigmento primário da fotossíntese, e, com a diminuição da intensidade luminosa, sua produção geralmente aumenta devido à necessidade de captar mais fótons. Além disso, a ficocianina e os carotenoides são pigmentos secundários, atuando como pigmentos acessórios na fotossíntese, com o papel de auxiliar a assimilação de fótons em comprimentos de onda em que as clorofilas não conseguem absorver (Lafarga; Clemente; Garcia-Vaquero, 2019; Lichtenthaler, 1987; Van Stokkum *et al.*, 2025).

Segundo Li *et al.* (2018), a *Spirulina platensis* pode apresentar redução gradual de clorofila e ficocianina devido à limitação de nitrogênio no meio de cultura. Isso ocorre porque o nitrogênio compõe a estrutura do anel tetrapirrólico da clorofila *a*, bem como a apoproteína e os grupos ficocianobilina da ficocianina (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012; Stadnichuk; Kusnetsov, 2023. Assim, o AutoCtrl-RGL pode ter apresentado diminuição principalmente devido à limitação de nitrogênio no meio (Figura 3b). O ensaio MixoHet-RGL pode ter apresentado maior síntese de clorofila e ficocianina devido à estratégia de cultivo em batelada alimentada com suplementação de glicose e nitrogênio.

Aos 100 e 130 dias, não foi observada incidência de luz nos cultivos. Segundo Marquez *et al.* (1995), a ausência de luz reduz a atividade fotossintética, levando a menor conversão metabólica em pigmentos sob condições heterotróficas. No entanto, no presente estudo, maiores teores de clorofila e ficocianina ($mg \cdot g^{-1}$) foram observados no MixoHet-RGL em comparação ao controle (AutoCtrl-RGL) aos 100 e 130 dias ($p < 0,05$). Esse comportamento pode estar associado a um efeito de normalização decorrente da redução da concentração de biomassa, e não a um aumento real na síntese de pigmentos. Ao longo do tempo, é esperada a degradação da clorofila devido à ausência de necessidade do aparato fotossintético, levando a danos nos fotossistemas. Além disso, a ficocianina também pode diminuir, uma vez que o complexo antena, no caso da *Spirulina platensis*, os ficobilissomos, pode reduzir de tamanho até a inativação (Ajayan; Selvaraju; Thirugnanamoorthy, 2012; Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Van Stokkum *et al.*, 2025).

Por sua vez, os carotenoides no cultivo de *Spirulina platensis* podem apresentar aumento de concentração quando os cultivos são expostos a alta intensidade luminosa (> 100 μmol

fótons m^{-2} s^{-1}). Isso ocorre porque os carotenoides atuam como pigmentos fotoprotetores devido à sua atividade antioxidante, prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sob essas condições, ocorre redução das clorofilas devido à saturação das membranas tilacóidais, bem como diminuição dos ficobilissomos como resultado do estresse oxidativo (Chojnacka; Noworyta, 2004; Ismaiel; El-Ayouty; Piercey-Normore, 2016b; Mohammed; Ruengjitchatchawalya; Paithoonrangsarid, 2023). Isso explica a ausência de aumento na concentração de carotenoides (Figura 3c), uma vez que a maior intensidade luminosa aplicada foi de 100 µmol fótons m^{-2} s^{-1}. Considerando todas as concentrações de pigmentos observadas, ocorreu modulação na produção, influenciada principalmente pela intensidade luminosa e pelo modo de cultivo. Essas alterações no perfil de pigmentos podem se refletir na cor da biomassa resultante dos cultivos, em conjunto com outros fatores.

Em conjunto, esses resultados indicam que a modulação do perfil de pigmentos de *Spirulina platensis* LEB 52 não resultou da atuação isolada da intensidade luminosa ou do fornecimento de substratos, mas sim da interação combinada e progressiva desses fatores ao longo do cultivo. A redução gradual da intensidade luminosa promove alterações nas proporções relativas de clorofila a, ficocianina e carotenoides, enquanto o fornecimento de glicose e nitrato em batelada alimentada sustentou a síntese de pigmentos e a viabilidade celular mesmo sob condições de baixa luminosidade e ausência de luz, evitando o colapso dos pigmentos observado no AutoCtrl-GLR. Essas alterações nos níveis de pigmentos se refletem na coloração da biomassa, conforme discutido na seção seguinte.

3.3 MODULAÇÃO DA COR PELA COMBINAÇÃO DE LUZ E ALIMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

As coordenadas de cor CIELAB para os ensaios AutoCtrl-RGL e MixoHet-RGL estão apresentadas na Tabela 3. As coordenadas L*, a* e b* representam a localização das cores em um espaço de cor uniforme. Assim, L* representa a luminosidade ($0 \leq L^* \leq 100$), em que 0 corresponde ao preto absoluto e 100 ao branco ideal. A coordenada a* corresponde ao eixo horizontal, em que valores negativos indicam tendência ao verde e valores positivos ao vermelho. A coordenada b* representa o eixo vertical, em que valores positivos indicam tonalidade mais amarelada, enquanto valores negativos indicam tonalidade mais azulada (Macdougall, 2010).

No presente estudo, para o AutoCtrl-RGL, foi observada variação no parâmetro L* ao longo do período de cultivo, com o maior valor registrado no dia 80 ($29,3 \pm 0,1$; $p < 0,05$). Para

o MixoHet-RGL, tendência semelhante foi observada, com o maior valor também ocorrendo no dia 80 (46,0 ± 2,6; $p < 0,05$), seguido de estabilização aos 100 e 130 dias de cultivo. Esses resultados indicam que a redução da intensidade luminosa com a estratégia de alimentação contribuem para valores mais altos de L*. Sob condições heterotróficas, observou-se estabilização de L*, provavelmente devido à ausência de luz. De modo geral, a tendência de L* deslocou-se para tons mais escuros no AutoCtrl-RGL (~25) e para tons mais claros no MixoHet-RGL (~50).

Tabela 3 - Coordenadas L*, a* e b* e percepção da cor dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em diferentes intervalos de tempo.

Tempo (d)	**Condições**							
	AutoCtrl-RGL				**MixoHet-RGL**			
	L*	a*	b*	Cor Simulada	L*	a*	b*	Cor Simulada
0	$24,8^{c} \leq 0,01$	$-10,6^{c} \pm 0,1$	$1,8^{a} \leq 0,01$		$24,3^{c} \pm 0,03$	$-10,9^{c} \pm 0,4$	$1,6^{b} \pm 0,1$	
60	$25,9^{b} \pm 0,1$	$-1,5^{a} \pm 0,1$	$0,2^{b} \pm 0,1$		$38,3^{b} \pm 2,1$	$-10,2^{c} \pm 0,9$	$8,8^{a} \pm 1,1$	
80	$29,3^{a} \pm 0,1$	$-2,0^{b} \pm 0,4$	$1,5^{a} \pm 0,1$		$46,0^{a} \pm 2,6$	$-8,2^{c} \pm 1,5$	$10,4^{a} \pm 0,6$	
100	n.d.	n.d.	n.d.	-	$44,1^{a,b} \pm 2,0$	$0,8^{b} \pm 0,03$	$9,8^{a} \pm 2,8$	
130	n.d.	n.d.	n.d.	-	$45,3^{a,b} \pm 0,1$	$2,1^{a} \pm 0,03$	$13,0^{a} \pm 0,1$	

Notas: **AutoCtrl-RGL** = controle autotrófico com redução gradual da luz; **MixoHet-RGL** = cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para a mesma resposta. As cores foram simuladas utilizando o software Nix Color Sense, disponível em www.nixsensor.com.

A coordenada a* foi maior aos 60 e 80 dias de cultivo ($p < 0,05$), com ambos os valores abaixo de zero, indicando coloração no eixo verde. No MixoHet-RGL, valores maiores e positivos foram observados aos 100 e 130 dias, indicando tendência a cores vermelhas, o que não é típico para *Spirulina platensis*. Isso pode ser explicado pela ausência de luz, que pode ter causado estresse celular e degradação parcial de pigmentos verdes (clorofila *a*), de forma semelhante aos achados de Benucci, Flore e Esti (2023), que também relataram valores positivos de a*. Para o eixo b*, o ensaio AutoCtrl-RGL no dia 80 não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo 0, com valores positivos indicando que, ao longo do tempo, o cultivo tende ao eixo amarelo. No MixoHet-RGL, com a diminuição da intensidade luminosa, observou-se aumento gradual de b*, indicando que a redução de luz intensifica os valores positivos de amarelo.

Conforme discutido anteriormente na Seção 3.2, a redução da intensidade luminosa levou à diminuição dos teores de clorofila *a* e ficocianina, enquanto os carotenoides permaneceram inalterados, exceto no dia 80. Aos 100 e 130 dias, apesar da ausência de luz, teores mais elevados de clorofila a e ficocianina ($mg \cdot g^{-1}$) foram observados no MixoHet-RGL em comparação ao controle ($p < 0,05$), possivelmente devido a um efeito de normalização decorrente da menor concentração de biomassa. Além disso, o balanço de cor dos cultivos de *Spirulina platensis* não é determinado exclusivamente pelas concentrações de pigmentos, sendo também influenciado por fatores como o espalhamento de luz pelas estruturas celulares, a organização celular e interações entre cores, de modo que não há necessariamente uma relação direta com as coordenadas a* e b* (Choudhury, 2014; Yeh *et al.*, 2023).

A Tabela 4 apresenta o croma (C*ab) e a diferença total de cor (ΔE) das amostras de biomassa. C*ab representa a saturação, intensidade ou pureza da cor, correspondendo à distância do centro neutro (cinza) no plano a* b* (Durmos, 2020). O AutoCtrl-RGL apresentou valores de C*ab próximos de zero, indicando intensidade acinzentada, considerada de baixa saturação de cor. O MixoHet-RGL apresentou valores de C*ab mais vibrantes em todos os tempos de cultivo, embora ainda considerados acinzentados. Isso ocorre porque os valores dos eixos a* e b* estavam próximos de zero. Segundo Muratbekova *et al.* (2025), o h°ab perde seu significado quando as cores das amostras apresentam baixa saturação ou intensidade, levando a uma representação imprecisa da cor. Esse foi o caso das amostras do presente estudo.

Tabela 4 - Croma (C*ab), ângulo de tonalidade (h°ab) e diferença total de cor (ΔE) dos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em diferentes intervalos de tempo.

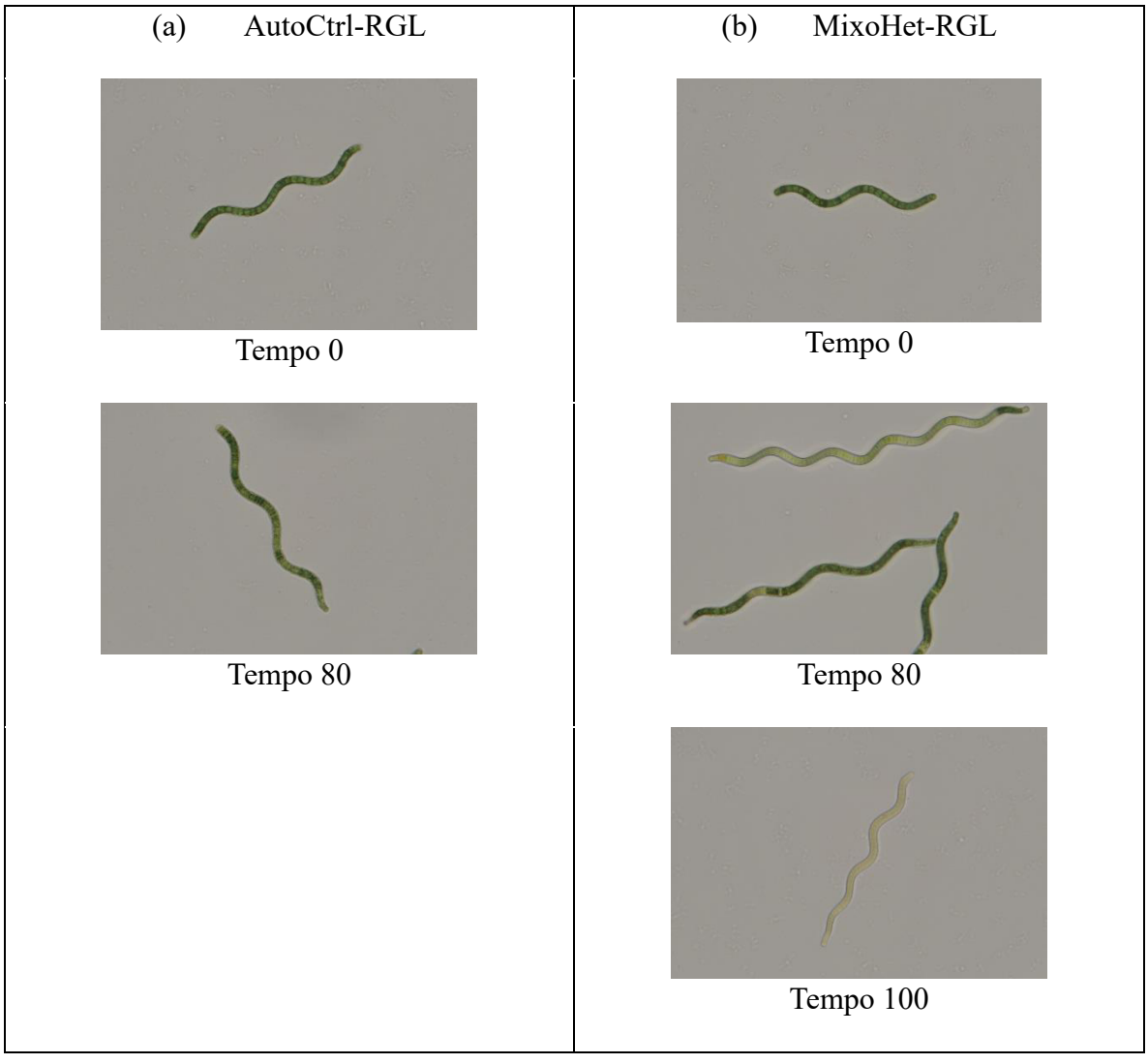
Tempo (d)	Condições					
	AutoCtrl-RGL			MixoHet-RGL		
	C*ab	h°ab	ΔE	C*ab	h°ab	ΔE
0	$10,8^{a}\pm0,1$	$-1,4^{b}\leq0,01$	-	$11,0^{a}\pm0,5$	$-1,4^{c}\leq0,01$	-
60	$1,6^{c}\pm0,1$	$-1,5^{b}\pm0,1$	9,3±0,3	$13,5^{a}\pm0,1$	$-0,9^{b}\pm0,1$	15,8±2,4
80	$2,5^{b}\pm0,3$	$-1,0^{a}\pm0,2$	9,8±0,5	$13,3^{a}\pm0,5$	$-0,7^{b}\pm0,1$	23,7±2,8
100	n.d.	n.d.	n.d.	$9,8^{a}\pm2,8$	$0,1^{a}\pm0,02$	24,5±0,5
130	n.d.	n.d.	n.d.	$13,2^{a}\pm0,9$	$0,2^{a}\leq0,01$	27,2±0,1

Notas: **AutoCtrl-RGL** = controle autotrófico com redução gradual da luz; **MixoHet-RGL** = cultivo mixotrófico/heterotrófico com redução gradual da luz.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para a mesma resposta.

O ΔE expressa a diferença tridimensional entre duas cores com base nos valores de L*, a* e b* (Ly *et al.*, 2020). O MixoHet-RGL apresentou as maiores diferenças aos 100 e 130 dias em comparação ao tempo 0, com todos os resultados considerados alterações de cor claramente perceptíveis (ΔE > 5). Para o AutoCtrl-RGL, ambos os tempos também resultaram em diferenças perceptíveis. A Figura 5 apresenta imagens microscópicas de células de *Spirulina platensis* LEB 52, que confirmam alterações na composição de pigmentos ao longo do período de cultivo. De modo geral, a estratégia de alimentação e as variações de intensidade luminosa nos cultivos de *Spirulina* platensis LEB 52 influenciaram a percepção de cor, levando a tons verde-amarelados diferentes dos típicos, com atenuação da coloração verde intensa característica.

Figura 5 - Imagens de microscopia óptica (40×) de células de *Spirulina platensis* LEB 52 cultivadas sob redução gradual da luz: (a) cultivo autotrófico (AutoCtrl-RGL) e (b) cultivo mixotrófico/heterotrófico (MixoHet-RGL).



A modulação combinada da intensidade luminosa e do fornecimento de nutrientes, portanto, esteve associada às alterações de cor observadas na biomassa de *Spirulina platensis* LEB 52. Esse comportamento possibilita a seleção de períodos específicos de colheita para a obtenção de biomassa com um perfil de cor desejado. A cor é um atributo sensorial fundamental que influencia a aceitação dos consumidores em relação aos produtos alimentícios, frequentemente atuando como um indicador visual de frescor, naturalidade e qualidade nutricional percebida (Silva *et al*., 2025; Spence; Piqueras-Fiszman, 2016). Nesse contexto, a diversidade cromática obtida por meio da estratégia de cultivo proposta pode contribuir para o desenvolvimento de ingredientes à base de *Spirulina* com apelo visual direcionado, oferecendo uma alternativa natural aos corantes sintéticos, que são cada vez mais vistos de forma desfavorável pelos consumidores. Embora sua aplicação ainda dependa da composição centesimal da biomassa obtida em cada condição, o processo investigado neste estudo pode ser considerado uma estratégia promissora para a produção de biomassa de Spirulina platensis com diferentes perfis de cor, potencialmente aumentando o interesse dos consumidores e favorecendo sua incorporação em produtos alimentícios.

4 CONCLUSÃO

A aplicação combinada da redução gradual da luz e da suplementação em batelada alimentada com glicose e nitrato de sódio modulou o crescimento, a pigmentação e a coloração de *Spirulina platensis* LEB 52. A produtividade dos cultivos mixotróficos/heterotróficos (MixoHet-GLR) aumentou 55% (X_{max}, 3,0 g L^{-1}; P_{max}, 96,9 mg L^{-1} d^{-1}) em comparação ao controle autotrófico (X_{max}, 1,8 g L^{-1}; P_{max}, 62,5 mg L^{-1} d^{-1}). Esse aumento ocorreu durante a fase mixotrófica, enquanto a taxa máxima de crescimento específico não diferiu significativamente entre as condições. Ao final do processo de redução da luz, os cultivos permaneceram viáveis sob condições heterotróficas até o 95º dia. A estratégia de cultivo combinada também afetou os teores de clorofila *a*, ficocianina e carotenoides e modificou as coordenadas de cor CIELAB, resultando na atenuação da coloração verde intensa característica e no desenvolvimento de tonalidades mais claras e acinzentadas-amareladas. Entretanto, as contribuições individuais da redução da luz, da glicose, do nitrato de sódio e da remoção do bicarbonato não puderam ser distinguidas no delineamento experimental empregado. De modo geral, os resultados demonstram o potencial da combinação da redução gradual da luz e da suplementação de nutrientes em batelada alimentada como estratégia para modular o perfil de cor da biomassa de *Spirulina platensis* LEB 52. A diversidade de cores obtida fornece uma base

inicial para a investigação de potenciais aplicações relacionadas a alimentos. No entanto, avaliações adicionais da composição, das características microbiológicas e dos aspectos sensoriais são necessárias para determinar a adequação da biomassa obtida para produtos alimentícios específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll an phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436–441, 1 maio 2012.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.

ARMSTRONG, F. A. J. Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 9, p. 1292–1294, 1 ago. 2002.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hil ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BARROS, A.; GUERRA, L. T.; SIMÕES, M.; SANTOS, E.; FONSECA, D.; SILVA, J.; COSTA, L.; NAVALHO, J. Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures. **Algal Research**, v. 21, n. 3, p. 35–41, 1 jan. 2017.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1973.

BENUCCI, I.; FLORE, M.; ESTI, M. Partitioning Recovery of Natural Pigments from Spirulina platensis. **Plant Foods for Human Nutrition 2023 78:3**, v. 78, n. 3, p. 557–565, 25 jul. 2023.

BUKHOV, N. G. Dynamic light regulation of photosynthesis (a review). **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 6, p. 742–753, nov. 2004.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic cultureof *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme**, v. 0229, n. 96, p. 221–224, 1997.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 103–107, 2006.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461–465, 2004.

CHOUDHURY, A. K. R. Colour measurement instruments. *Em*: **Principles of Colour and Appearance Measurement**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 221–269.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MITCHELL, B. G.; MORAIS, M. G. Open pond systems for microalgal culture. *Em*: **Biofuels from Algae**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. p. 199–223.

COSTA, J. A. V.; MOREIRA, J. B.; FANKA, L. S.; KOSINSKI, R. DA C.; MORAIS, M. G. DE. Microalgal biotechnology applied in biomedicine. *Em*: **Handbook of Algal Science, Technology and Medicine**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 429–439.

DURMUS, D. CIELAB color space boundaries under theoretical spectra and 99 test color samples. **Color Research and Application**, v. 45, n. 5, p. 796–802, 2020.

ESTEVES-FERREIRA, A. A.; INABA, M.; FORT, A.; ARAÚJO, W. L.; SULPICE, R. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 541–560, 3 set. 2018.

FORCHHAMMER, K.; SELIM, K. A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 33–53, 1 jan. 2020.

FRANCO LUCAS, B.; BRUNNER, T. A. Factors influencing the willingness to purchase and consume microalgae-based foods: An exploratory consumer study. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 37, n. January, p. 1–6, 2024.

GAMA, R. C. N. DA; ASSEMANY, P. P.; ASSIS, L. R. DE; OLIVEIRA, L. V.; CECON, P. R.; CALIJURI, M. L. Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101516, 1 set. 2023.

GARCÍA-VAQUERO, M.; BRUNTON, N.; LAFARGA, T. Microalgae as a source of pigments for food applications. **Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications**, p. 177–198, 2021.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The Responses of Cyanobacteria to Environmental Conditions: Light and Nutrients. **The Molecular Biology of Cyanobacteria**, p. 641–675, 1994.

HENDERSON, R. J.; MACKINLAY, E. E.; HODGSON, P.; HARWOOD, J. L. Differential effects of the substituted pyridazinone herbicide sandoz 9785 on lipid composition and biosynthesis in photosynthetic and non-photosynthetic marine microalgae: I. Lipid class composition. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 6, p. 723–728, 1990.

INABE, K.; MIICHI, A.; MATSUDA, M.; YOSHIDA, T.; KATO, Y.; HIDESE, R.; KONDO, A.; HASUNUMA, T. Nitrogen availability affects the metabolic profile in cyanobacteria. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 867, 1 dez. 2021.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GONZÁLEZ-MEZA, G. M.; ARAÚJO, R. G.; FLORES-CONTRERAS, E. A.; LA ROSA, O. DE. Microalgae biomass as a sustainable solution for

food security: Advances in biotechnology and their role in achieving Sustainable Development Goals. **Bioresource Technology Reports**, v. 31, p. 102183, 1 set. 2025.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 298–304, 1 abr. 2016.

ISMAIEL, M. M. S.; PIERCEY-NORMORE, M. D. Cooperative antioxidative defense of the blue-green alga *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under oxidative stress imposed by exogenous application of hydrogen peroxide. **Environmental Pollution**, v. 341, p. 123002, 15 jan. 2024.

KLANCHUI, A.; KHANNAPHO, C.; PHODEE, A.; CHEEVADHANARAK, S.; MEECHAI, A. i AK692: A genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. **BMC Systems Biology 2012 6:1**, v. 6, n. 1, p. 71-, 15 jun. 2012.

LAFARGA, T.; CLEMENTE, I.; GARCIA-VAQUERO, M. Carotenoids from microalgae. *Em*: **Carotenoids: Properties, Processing and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 149–187.

LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109356, 2020.

LATIFI, A.; RUIZ, M.; ZHANG, C. C. Oxidative stress in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 258–278, 1 mar. 2009.

LI, X.; LI, W.; ZHAI, J.; WEI, H. Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 263, n. May, p. 555–561, 2018.

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

LUIMSTRA, V. M.; SCHUURMANS, J. M.; VERSCHOOR, A. M.; HELLINGWERF, K. J.; HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P. Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. **Photosynthesis Research**, v. 138, n. 2, p. 177–189, 2018.

LY, B. C. K.; DYER, E. B.; FEIG, J. L.; CHIEN, A. L.; BINO, S. DEL. Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 3- 12.e1, 2020.

MA, G.; GAO, Q.; YUAN, L.; CHEN, Y.; CAI, Z.; ZHANG, L.; HU, J.; WANG, Y.; WU, S.; SUN, Y. *Spirulina* (*Arthrospira*) cultivation in photobioreactors: From biochemistry and physiology to scale up engineering. **Bioresource Technology**, v. 423, p. 132259, 1 maio 2025.

MACDOUGALL, D. B. Colour measurement of food: principles and practice. *Em*: **Colour Measurement: Principles, Advances and Industrial Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 312–342.

MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 159–164, 1995.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth Characteristics of *Spirulina platensis* in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 408–410, 1993.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **American Chemical Society**, n. lll, p. 426–428, 1959.

MOHAMMED, I. A.; RUENGJITCHATCHAWALYA, M.; PAITHOONRANGSARID, K. Cultivation manipulating zeaxanthin-carotenoid production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under light and temperature stress. **Algal Research**, v. 76, n. 1, p. 103315, 1 nov. 2023.

MORAIS, M. G. DE; VAZ, B. D. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MURATBEKOVA, M.; TOGANAS, N.; IGALI, A.; SHAGYROV, M.; KADYRGALI, E.; YERKIN, A.; SHAMOI, P. Color Models in Image Processing: A Review and Experimental Comparison. 1 out. 2025. Disponíve1 em: https://arxiv.org/abs/2510.00584. Acesso em 15 jul. 2026.

PEREIRA, A. S. A. DE P.; MAGALHÃES, I. B.; SILVA, T. A.; REIS, A. J. D. DOS; COUTO, E. DE A. DO; CALIJURI, M. L. Municipal and industrial wastewater blending: Effect of the carbon/nitrogen ratio on microalgae productivity and biocompound accumulation. **Journal of Environmental Management**, v. 370, p. 122760, 1 nov. 2024.

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 149–156, 2002.

RANGEL-YAGUI, C. D. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M. DE; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133–141, 2004.

RUIZ, J.; WIJFFELS, R. H.; DOMINGUEZ, M.; BARBOSA, M. J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. **Algal Research**, v. 64, p. 102698, 1 maio 2022.

RYM, B. D.; NEJEH, G.; LAMIA, T.; ALI, Y.; RAFIKA, C.; KHEMISSA, G.; JIHENE, A.; HELA, O.; HATEM, B. O. Modeling growth and photosynthetic response in *Arthrospira platensis* as function of light intensity and glucose concentration using factorial design. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 6, p. 745–752, 24 mar. 2010.

SILVA, J.; LIMA, F. E.; SOUZA, C.; MOREIRA-LEITE, B.; SOUSA, P. The Influence of Food Colors on Emotional Perception and Consumer Acceptance: A Sensory and Emotional Profiling Approach in Gastronomy. **Foods**, v. 14, n. 22, p. 3818, 7 nov. 2025.

SPENCE, C.; PIQUERAS-FISZMAN, B. Food Color and Its Impact on Taste/Flavor Perception. *Em*: **Multisensory Flavor Perception: From Fundamental Neuroscience Through to the Marketplace**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. p. 107–132.

STADNICHUK, I. N.; KUSNETSOV, V. V. Phycobilisomes and Phycobiliproteins in the Pigment Apparatus of Oxygenic Photosynthetics: From Cyanobacteria to Tertiary Endosymbiosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2290, 24 jan. 2023.

VAN STOKKUM, I. ; NIEDZWIEDZKI, D. M.; AKHTAR, P.; BISWAS, A.; LAMBREV, P. H.; LIU, H. Cyanobacteria dynamically regulate phycobilisome-to-photosystem excitation energy transfer . **iScience**, v. 28, n. 6, p. 112610, 2025.

SUN, H.; WANG, Y.; HE, Y.; LIU, B.; MOU, H.; CHEN, F.; YANG, S. Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. **Marine Drugs 2023**, v. 21, n. 2, p. 82, 25 jan. 2023.

THAJUDDIN, F.; RASHEED, A. S.; PALANIVEL, P.; THAJUDDIN, S. F.; NOORUDDIN, T.; DHARUMADURAI, D. Evolutionary adaptations of cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis and metabolic pathways in *Spirulina*, *Arthrospira*, and *Limnospira* spp. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 24497-, 8 jul. 2025.

URIBE-WANDURRAGA, Z. N.; BRAVO-VILLAR, M.; IGUAL, M.; SAVALL, C.; GARCÍA-SEGOVIA, P.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Sugar and no sugar added fruit microalgae-enriched jams: a study about their physicochemical, rheological, and textural properties. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 10, p. 2565–2578, 2021.

VERMA, R.; KUMARI, K. V. L. K.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, A. Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104149, 2020.

VONSHAK, A.; CHEUNG, S. M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 4, p. 675–679, 2000.

YAMAOKA, Y.; PETROUTSOS, D.; JE, S.; YAMANO, T.; LI-BEISSON, Y. Light, CO2, and carbon storage in microalgae. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 84, p. 102696, 1 abr. 2025.

YEH, Y. C.; EBBING, T.; FRICK, K.; SCHMID-STAIGER, U.; HAASDONK, B.; TOVAR, G. E. M. Improving Determination of Pigment Contents in Microalgae Suspension with Absorption Spectroscopy: Light Scattering Effect and Bouguer–Lambert–Beer Law. **Marine Drugs**, v. 21, n. 12, p. 619, 29 nov. 2023.

YOSHIDA, H.; OOSSANEN, S. VAN; BARBOSA, M. J.; JANSSEN, M. Light and carbon limited photosynthesis of *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 69, n. 7, p. 102934, 1 jan. 2023.

YU, Z.; ZHAO, W.; SUN, H.; MOU, H.; LIU, J.; YU, H.; DAI, L.; KONG, Q.; YANG, S. Phycocyanin from microalgae: A comprehensive review covering microalgal culture,

phycocyanin sources and stability. **Food Research International**, v. 186, p. 114362, 1 jun. 2024.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima***. 1966. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - University of Paris, Paris, 1966.

ZHANG, C. C.; ZHOU, C. Z.; BURNAP, R. L.; PENG, L. Carbon/Nitrogen Metabolic Balance: Lessons from Cyanobacteria. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 12, p. 1116–1130, 1 dez. 2018.

ARTIGO III

PLATAFORMA NÃO-OGM DE MUTAGÊNESE QUÍMICA E SELEÇÃO PARA DIVERSIFICAÇÃO DE PIGMENTOS EM *SPIRULINA PLATENSIS* LEB 52

PLATAFORMA NÃO-OGM DE MUTAGÊNESE QUÍMICA E SELEÇÃO PARA DIVERSIFICAÇÃO DE PIGMENTOS EM *SPIRULINA PLATENSIS* LEB 52

RESUMO

A intensa pigmentação verde-azulada da *Spirulina platensis* limita sua incorporação em uma ampla variedade de produtos alimentícios, tornando a diversificação de pigmentos uma estratégia promissora para expandir suas aplicações industriais. No entanto, metodologias não-OGM (organismo geneticamente modificado) que integrem mutagênese química com seleção eficiente de variantes de pigmentação ainda são escassas. Este estudo estabeleceu uma plataforma não-OGM baseada na integração de mutagênese química e pressão seletiva para a geração e a triagem inicial de variantes de pigmentação em *Spirulina platensis* LEB 52. Concentrações de metanossulfonato de etila (EMS) variando de 100 a 400 mM e os inibidores de biossíntese de pigmentos norflurazon e oxifluorfen, em concentrações entre 200 e 1200 μM, foram avaliados sob cultivo heterotrófico. Uma concentração de EMS de 300 mM atingiu a taxa de sobrevivência-alvo de 5–10%, enquanto 1200 μM dos inibidores proporcionou pressão seletiva eficaz. O norflurazon apresentou maior compatibilidade com o cultivo heterotrófico, mantendo uma população celular viável ao longo do processo de seleção. Entre os parâmetros avaliados, a fluorescência da ficocianina foi o marcador fenotípico mais sensível para discriminar entre os tratamentos e monitorar a triagem inicial de variantes de pigmentação. Esses resultados estabelecem um fluxo metodológico reprodutível para a integração de mutagênese química e pressão seletiva em *Spirulina platensis*, fornecendo uma base para futuros programas de melhoramento não-OGM voltados ao desenvolvimento de cepas com perfis distintos de pigmentação.

Palavras-Chave: Cianobactéria. Inibidores de biossíntese de pigmentos. Mutagênese aleatória. Metanossulfonato de etila. Triagem fenotípica.

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de proteína para a nutrição humana tem se intensificado em resposta à necessidade de sistemas alimentares mais sustentáveis. Nesse contexto, ingredientes capazes de substituir fontes proteicas convencionais têm potencial para reduzir o uso de terra e água, bem como as emissões de gases de efeito estufa, ao mesmo tempo em que

atendem à crescente demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e funcionais (Ang *et al.*, 2025; Malila *et al.*, 2024). Nesse cenário, a *Spirulina* tem se destacado como um dos microrganismos mais promissores como fonte alternativa de proteína para a nutrição humana devido ao seu elevado teor proteico e ao seu perfil nutricional, rico em aminoácidos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), vitaminas, minerais e pigmentos bioativos (Ketu *et al.*, 2026).

Apesar dessas vantagens, a aplicação da *Spirulina* em produtos alimentícios ainda é limitada por suas características sensoriais, particularmente sua intensa pigmentação verde-azulada (Migliore *et al.*, 2025). A cor é um dos principais fatores que influenciam a aceitação do consumidor. Embora a cor não determine o sabor, ela é frequentemente associada a perfis de sabor intensos e menos atrativos. Além disso, a intensa pigmentação verde-azulada da *Spirulina* resulta em produtos cuja aparência se desvia das expectativas sensoriais dos consumidores para categorias convencionais de alimentos, reduzindo assim a aceitação do consumidor e limitando sua incorporação em pães, massas, produtos lácteos e bebidas (Batista *et al.*, 2017, 2019; García *et al.*, 2021; Lafarga *et al.*, 2019; Rasia *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021). Uma vez que a intensidade da cor está diretamente relacionada ao teor de pigmentos fotossintéticos, a geração e a seleção de variantes com pigmentação modificada representam uma estratégia promissora para ampliar sua aplicação como ingrediente alimentício (Cao *et al.*, 2023; Chaudhary *et al.*, 2026).

A modulação das condições de cultivo pode alterar temporariamente a composição de pigmentos da biomassa. Alterações em fatores como intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes geralmente produzem respostas reversíveis (Lafarga *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2025). Nesse contexto, a mutagênese aleatória tem se destacado como alternativa para a obtenção de modificações genéticas permanentes e estáveis, possibilitando a geração de novas cepas sem a inserção de DNA exógeno e, portanto, sendo considerada uma abordagem não-OGM (organismos geneticamente modificados) (Bleisch *et al.*, 2022; Trovão *et al.*, 2022). Neste estudo, a diversificação de pigmentos refere-se à geração de variabilidade fenotípica em pigmentos fotossintéticos por meio de mutagênese química e à seleção de mutantes obtidos utilizando uma abordagem não-OGM.

Entre os mutagênicos químicos, o metanossulfonato de etila (EMS) é amplamente utilizado devido à sua elevada eficiência na indução de mutações pontuais distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma (Bleisch *et al.*, 2022; Trovão *et al.*, 2022). Em microalgas e cianobactérias, o EMS tem sido empregado para a obtenção de mutantes com maior acúmulo lipídico, tolerância aprimorada a estresses ambientais e características metabólicas alteradas,

incluindo vias relacionadas à biossíntese de pigmentos (Doan ; Obbard, 2012; Kawaroe *et al.*, 2015; Nojima *et al.*, 2017; Rumin *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2020). No entanto, embora alguns estudos tenham investigado alterações na pigmentação de *Spirulina platensis*, são ainda escassas as pesquisas especificamente direcionadas à modulação da coloração da biomassa, e, até o momento, não foram relatados estudos com o objetivo de obter e selecionar mutantes de Spirulina com coloração distinta daquela apresentada pela linhagem selvagem (*wild type*) (Cao *et al.*, 2013; Lanfaloni *et al.*, 1991; Pan-Utai *et al.*, 2022; Ruengjitchatchawalya *et al.*, 2002).

A eficiência da seleção de mutantes pode ser aprimorada por meio do uso de inibidores específicos da biossíntese de pigmentos como agentes seletivos. Entre eles, os herbicidas oxifluorfen e norflurazon inibem etapas distintas da biossíntese de clorofila e carotenoides, respectivamente. Em concentrações subletais, esses compostos reduzem o crescimento e alteram a pigmentação de células do tipo selvagem, facilitando assim a identificação e a seleção de variantes que apresentem modificações nas vias metabólicas-alvo ou maior tolerância aos efeitos dos inibidores (Breitenbach *et al.*, 2001; Schüler *et al.*, 2020; Trovão *et al.*, 2022, 2024). Assim, a combinação de mutagênese química e pressão seletiva mediada por inibidores representa uma estratégia promissora para melhorar a eficiência na obtenção de variantes com pigmentação alterada.

Embora protocolos de mutagênese para *Spirulina* e estratégias de seleção baseadas em inibidores de biossíntese de pigmentos tenham sido relatados para outras microalgas, não foram identificados estudos que combinem essas abordagens em uma plataforma voltada ao aprimoramento não-OGM de *Spirulina platensis*. Essa lacuna limita o desenvolvimento de estratégias sistemáticas para a diversificação de pigmentos da biomassa, com potenciais aplicações na indústria alimentícia (Aizpuru; González-Sánchez, 2024; Bleisch *et al.*, 2022; Ketu *et al.*, 2026; Trovão *et al.*, 2022). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer uma plataforma não-OGM baseada na integração de mutagênese química e pressão seletiva para a geração e a triagem inicial de variantes de pigmentação em *Spirulina platensis* LEB 52.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem parental da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 foi utilizada no presente estudo. Esta linhagem foi isolada do Lago Chade, África e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Spirulina foi mantida em meio Zarrouk modificado (Zarrouk, 1966), sem bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e suplementado com 1 g L^{-1} de glicose. A etapa de pré-adaptação ao cultivo heterotrófico foi realizada sob baixa intensidade luminosa (10 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) por 5 dias (Mühling; Belay; Whitton, 2005). Essa etapa teve como objetivo promover uma transição metabólica gradual do crescimento fotoautotrófico para condições dependentes de carbono orgânico, minimizando o estresse fisiológico associado à redução da atividade fotossintética e facilitando a adaptação celular à utilização de glicose.

2.2 PRESSÃO SELETIVA UTILIZANDO INIBIDORES DE BIOSSÍNTESE DE PIGMENTOS

Para estabelecer condições de pressão seletiva para a seleção de variantes com pigmentação alterada, foram conduzidos experimentos de cultivo utilizando os herbicidas oxifluorfen (OXI) e norflurazon (NFZ). A *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada em reatores tipo tubo de ensaio com volume útil de 50 mL, aerados por injeção de ar estéril, e mantidos a 30 ± 2 °C por 14 dias sob condições heterotróficas. Os cultivos foram conduzidos em modo batelada alimentada, com suplementação de glicose a cada 2 dias, em uma concentração correspondente a 1 g L^{-1}, calculada com base no volume de trabalho de cada cultivo. A concentração celular do inóculo foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (*Neubauer Bright-Line*, BOECO, Alemanha), sendo os ensaios iniciados com uma concentração de 10^5 células mL^{-1}. OXI (Merck, Darmstadt, Alemanha) e NFZ (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram avaliados separadamente nas concentrações de 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 µM, com os inibidores adicionados no início do cultivo. Cultivos controle foram conduzidas sob duas condições: meio Zarrouk modificado (CZ) e meio Zarrouk modificado suplementado com acetona (CZA) (7,4% v/v), utilizada como solvente para dissolver os inibidores (Schüler *et al.*, 2020; Trovão *et al.*, 2024).

2.3 SOBREVIVÊNCIA AO EMS E MUTAGÊNESE QUÍMICA

Para determinar a concentração subletal do agente mutagênico, foi estabelecida uma curva de sobrevivência para o metanossulfonato de etila (EMS; Merck, Darmstadt, Alemanha), com base na metodologia descrita por Schüler *et al.* (2020). Cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 em fase de crescimento exponencial (10^5 células mL^{-1}) foram fracionadas em alíquotas de 1 mL em tubos de microcentrífuga. As células foram então tratadas com concentrações de

EMS de 100, 200, 300, 350 e 400 mM e incubadas por 1 h na ausência de luz sob agitação. Após o período de exposição, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de tiossulfato de sódio a 5%. As amostras foram centrifugadas a 1000 × *g* por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas duas vezes com meio Zarrouk, centrifugadas (1000 × *g* por 10 min), ressuspensas em 1 mL de meio Zarrouk, transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL e incubadas por 24 h a 30 °C no escuro.

Para determinar a taxa de sobrevivência celular, os cultivos previamente incubadas foram inoculadas em meio Zarrouk modificado suplementado com 1 g L^{-1} de glicose em frascos *Erlenmeyer* com volume útil de 10 mL e cultivadas a 30 ± 2 °C sob agitação orbital a 100 rpm no escuro por 10 dias. Concentrações de EMS que resultaram em taxas de sobrevivência entre 5% e 10% foram consideradas adequadas para as etapas experimentais subsequentes. A taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a Equação 1, em que: X_{trat}, corresponde à concentração celular do cultivo tratado com determinada concentração de EMS, e X_{ctrl}, corresponde à concentração celular do cultivo controle não tratada com EMS.

$$\text{Taxa de Sobrevivência Celular (\%)} = \frac{X_{trat}}{X_{ctrl}} \text{ x } 100 \quad (1)$$

Após a determinação da concentração ideal de EMS, o procedimento de mutagênese foi repetido. Em seguida, os cultivos foram submetidas à pressão seletiva utilizando as concentrações de OXI e NFZ previamente estabelecidas, conforme descrito na Seção 2.2. Os cultivos foram mantidas por 10 dias sob agitação orbital a 100 rpm e 30 ± 2 °C na ausência de luz.

2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR, FLUORESCÊNCIA E CONSUMO DE GLICOSE

Os cultivos foram monitoradas por meio da avaliação da concentração celular, densidade óptica, fluorescência e consumo de glicose. A concentração celular (X_{cel}, células mL^{-1}) foi determinada por contagem direta utilizando câmara de Neubauer (*Neubauer Bright-Line*, BOECO, Alemanha). A densidade óptica foi medida em 680 e 750 nm, comprimentos de onda representativos da absorção de clorofila *a* e da biomassa total (turbidez celular), respectivamente (Myers; Kratz, 1955; Ritchie, 2006). A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/686 nm e 620/653 nm em leitor de microplacas (Agilent BioTek H1, Estados Unidos), correspondentes à fluorescência de clorofila

a e de ficocianina, respectivamente. O consumo de glicose foi determinado a cada 2 dias pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959) e expresso como percentual total de glicose consumida (%).

2.5 ANÁLISE DE DADOS

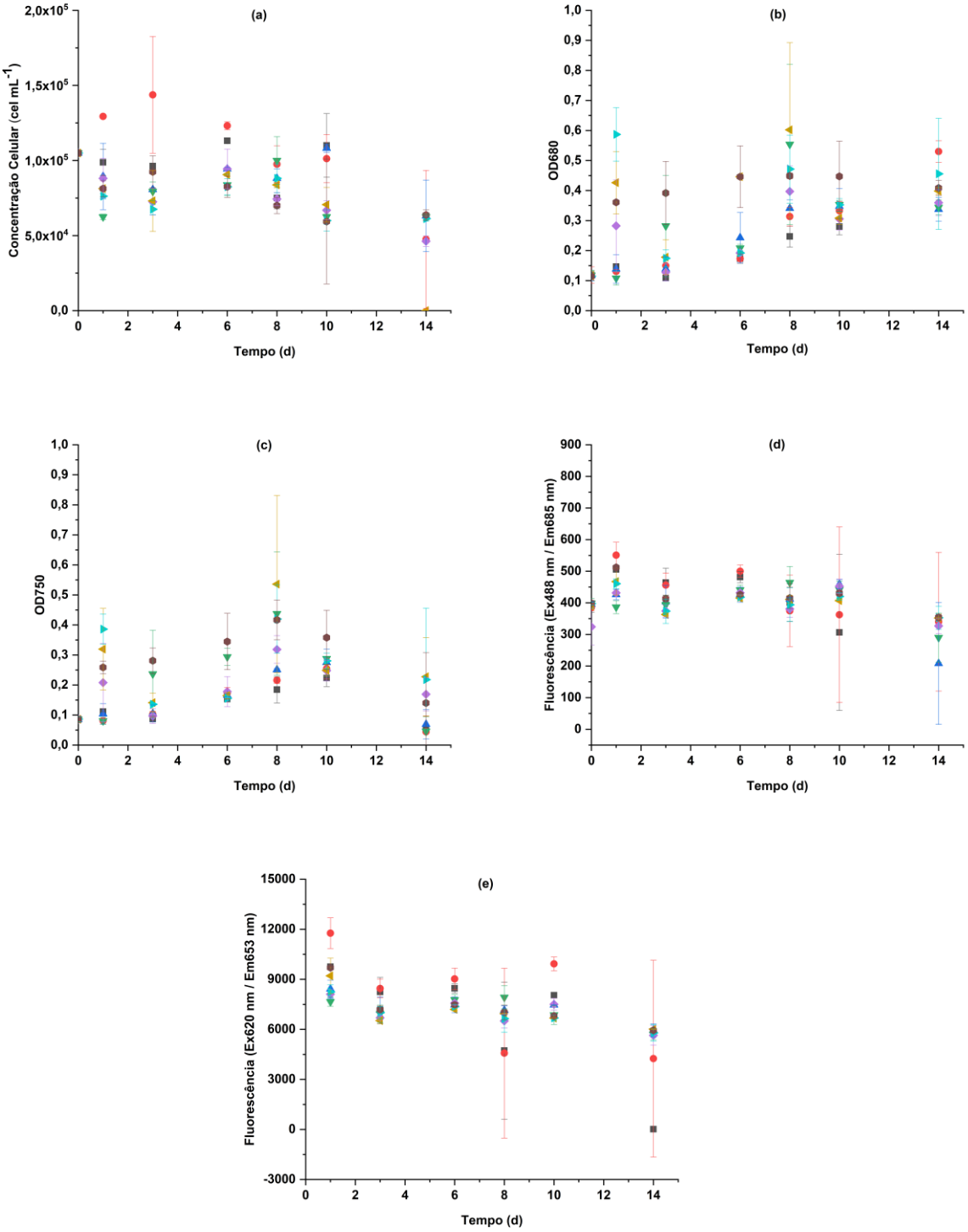
Os experimentos foram realizados com duas réplicas biológicas e três réplicas técnicas. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Os gráficos foram gerados utilizando o software OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES DE BIOSSÍNTESE DE PIGMENTOS

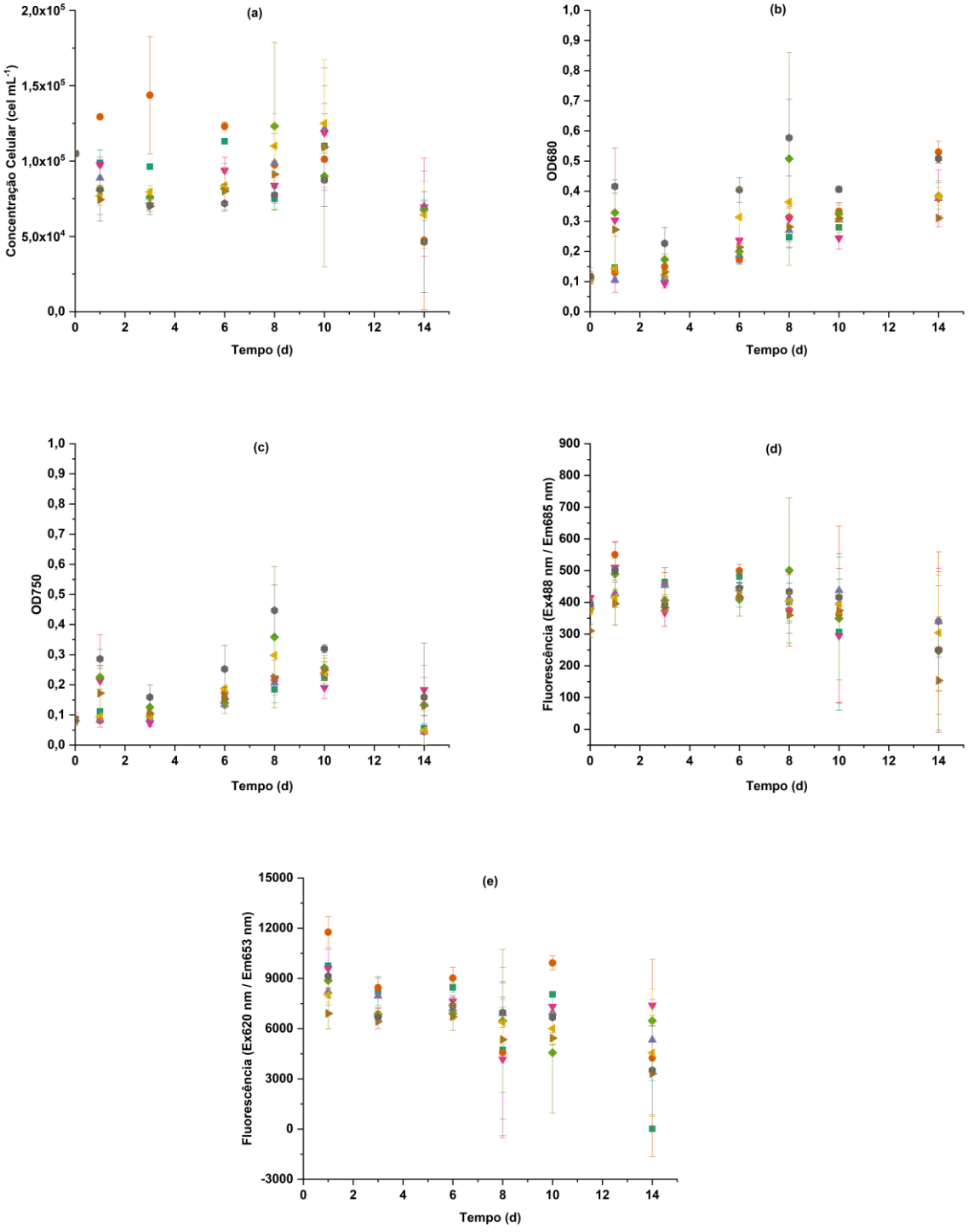
As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados de crescimento celular, biomassa e fluorescência de cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 expostas a diferentes concentrações de oxifluorfen (OXI) e norflurazon (NFZ), respectivamente. Os controles Zarrouk (CZ) e Zarrouk suplementado com acetona (CZA) permaneceram relativamente estáveis ao longo do período de cultivo (Figuras 1a e 2a), com leve redução do crescimento observada no dia 14. Esses achados são corroborados pela OD750 (Figuras 1c e 2c), indicando que, sob cultivo heterotrófico, a biomassa permaneceu relativamente constante, conforme esperado para essa condição metabólica (Abreu *et al.*, 2022). Embora o crescimento celular tenha sido limitado, os valores de OD680 (Figuras 1b e 2b) demonstraram que as células mantiveram parte de seu aparato fotossintético funcional ao longo do período experimental, sugerindo manutenção da biossíntese de clorofila. É importante destacar que, em todos os experimentos conduzidos no presente estudo, o consumo de glicose atingiu 98±2%, demonstrando que o metabolismo heterotrófico permaneceu ativo independentemente da presença dos inibidores, garantindo que as diferenças observadas resultassem predominantemente dos tratamentos aplicados, e não de limitações na utilização da fonte de carbono.

Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de oxifluorfen (OXI) sobre o crescimento celular, a densidade óptica e a fluorescência de pigmentos fotossintéticos durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm).



Legenda: (■)CZ (Zarrouk), (●)CZA (Zarrouk e Acetona), (▲)200 µM OXI, (▼)400 µM OXI, (◆)600 µM OXI , (◀) 800 µM OXI, (▶) 1000 µM OXI, (⬢)1200 µM OXI.

Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de norflurazon (NFZ) sobre o crescimento celular, a densidade óptica e a fluorescência de pigmentos fotossintéticos durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm).



Legenda: ( )CZ (Zarrouk), ( )CZA (Zarrouk e Acetona), ( )200 µM NFZ, ( )400 µM NFZ , ( )600 µM NFZ , ( ) 800 µM NFZ, ( ) 1000 µM NFZ, ( )1200 µM NFZ.

Em concentrações variando de 200 a 600 μM, tanto o oxifluorfen quanto o norflurazon exerceram baixa pressão seletiva sobre *Spirulina platensis* LEB 52. Sob essas condições, não foram observadas alterações substanciais no crescimento celular, com valores permanecendo próximos aos dos controles. A biomassa total aumentou moderadamente até o dia 8, seguida de estabilização ou leve declínio posterior. Ao mesmo tempo, a atividade fotossintética e a provável produção de clorofila *a* foram mantidas até o dia 14, exibindo padrões semelhantes aos observados nos cultivos controle.

Em contrapartida, as concentrações mais elevadas testadas (800 e 1200 μM) resultaram em redução da concentração celular, particularmente no dia 14 de cultivo, indicando que essas concentrações de herbicida inibiram o crescimento ou causaram morte celular em *Spirulina platensis* LEB 52. Sob as condições de 1200 μM de NFZ e 800 μM de OXI, a biomassa total aumentou apesar do menor número de células nos cultivos (Figuras 1c e 2c). De forma semelhante, a OD680 apresentou leve aumento sob 1200 μM de NFZ no dia 8 e 1000 μM de OXI no dia 1. Esse desacoplamento entre o crescimento celular e a produção de biomassa/clorofila levanta a hipótese de que, em resposta ao estresse induzido por altas concentrações de herbicida, as células possam ter aumentado de tamanho, acumulado clorofila e formado agregados celulares (Costa *et al.*, 2019; Zuccaro *et al.*, 2019). Esse estresse metabólico, sem morte imediata do cultivo, é relevante para a seleção de concentrações adequadas de inibidor (Trovão *et al.*, 2022).

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, a fluorescência associada à clorofila *a* (Ex/Em 488/686 nm), apresentada nas Figuras 1d e 2d para oxifluorfen e norflurazon, respectivamente, permaneceu relativamente estável até o dia 10, seguida de tendência de declínio no dia 14. Esse resultado sugere que o aparato fotossintético permaneceu parcialmente funcional ao longo do período de cultivo, mesmo sob exposição ao herbicida. A fluorescência associada à ficocianina (Ex/Em 620/653 nm), apresentada nas Figuras 1e e 2e, exibiu respostas distintas de acordo com a concentração do inibidor. Nos cultivos controle (CZ e CZA), a fluorescência de ficocianina declinou progressivamente, atingindo valores próximos de zero até o dia 14, sugerindo que a depleção de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos inibitórios durante o cultivo levou à degradação da ficocianina (Collier & Grossman, 1992; Grossman *et al.*, 1993). Em concentrações baixas e intermediárias (200–600 μM), a fluorescência de ficocianina permaneceu relativamente estável, possivelmente associada a um estado metabólico de atividade celular reduzida, o que diminuiria a renovação e a degradação do pigmento, preservando sua integridade por período mais prolongado. Nas concentrações mais elevadas (1000–1200 μM), particularmente para o norflurazon, observou-se maior variabilidade e

declínio mais acentuado no dia 14, o que pode indicar inibição parcial da síntese de ficocianina ou degradação intensificada do pigmento.

Para o presente estudo, deve-se ressaltar que o próprio cultivo heterotrófico tende a promover a degradação de clorofila *a* devido à ausência de demanda fisiológica pelo aparato fotossintético (Hu *et al.*, 2018; Marquez *et al.*, 1995). Como mecanismo de sobrevivência, as células podem aumentar a produção de pigmentos acessórios (ficocianina e carotenoides) na tentativa de captar mais luz e manter processos bioquímicos essenciais. Após esse período adaptativo, as concentrações de pigmentos tendem a declinar, com o metabolismo celular sendo redirecionado para a síntese de compostos de reserva (Klanchui *et al.*, 2012; Thajuddin *et al.*, 2025).

Para a seleção de mutantes, uma estratégia amplamente empregada consiste no uso de inibidores da biossíntese de compostos-alvo, capazes de induzir alterações fenotípicas específicas em microalgas. No presente estudo, foram selecionados inibidores que promovem a degradação ou reduzem a concentração de pigmentos envolvidos na fotossíntese (Bleisch *et al.*, 2022; Trovão *et al.*, 2022). O oxifluorfen (OXI) atua inibindo a enzima protoporfirinogênio oxidase (PPO), envolvida na biossíntese de clorofila, interrompendo assim a via biossintética dos tetrapirróis e reduzindo o teor de clorofila a. Esse efeito também pode impactar a ficocianina, resultando em despigmentação ou descoloração da biomassa microalgal (Trovão *et al.*, 2024). O norflurazon (NFZ), por sua vez, inibe a enzima fitoeno dessaturase (PDS), enzima-chave na via biossintética de carotenoides, fazendo com que as células exibam fenótipos verde-claro, verde-amarelado ou amarelo (Breitenbach *et al.*, 2001; Schüler *et al.*, 2020; Tschiersch *et al.*, 2002).

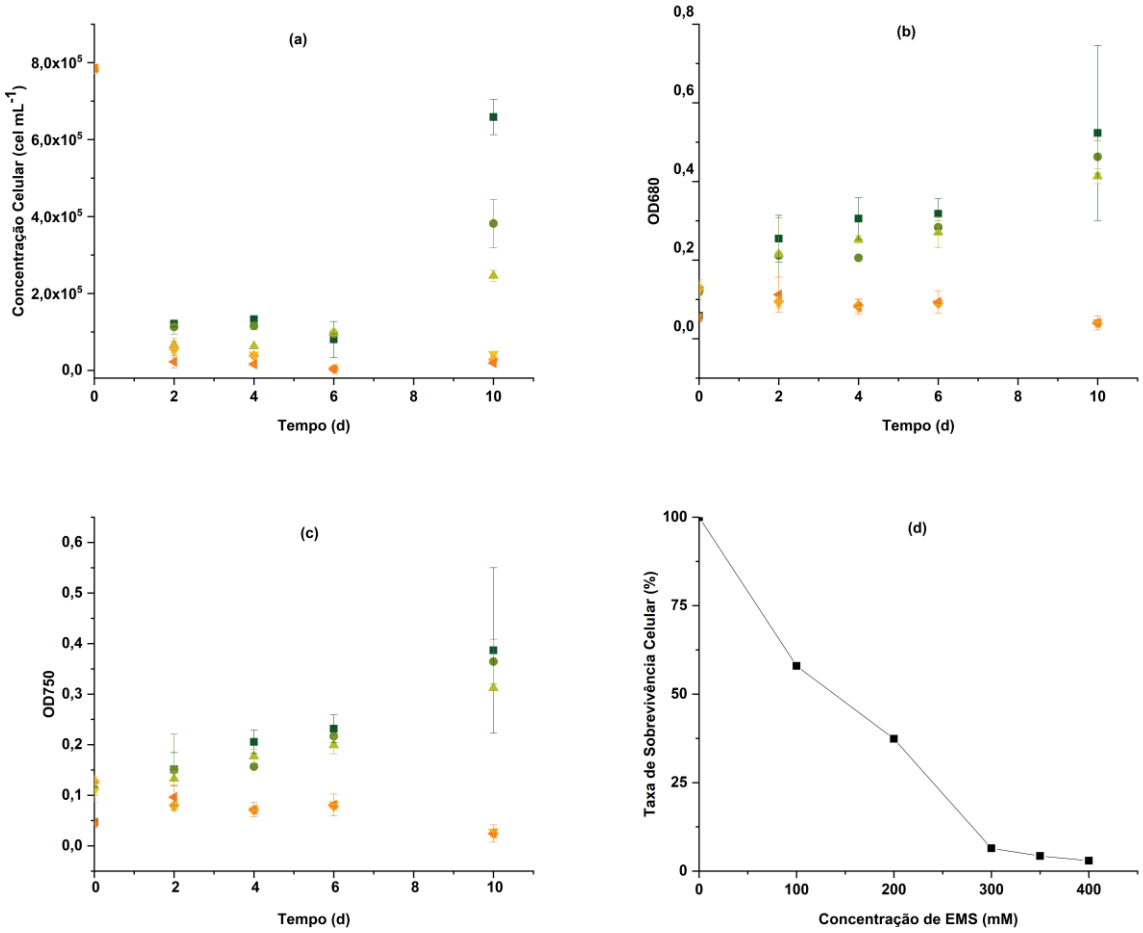
Cabe destacar que o oxifluorfen interrompe efetivamente a via biossintética da clorofila apenas na presença de luz, uma vez que sua atividade depende da excitação da protoporfirina para que a reação ocorra. Na ausência de luz, seu efeito é atenuado, atuando como modulador de pigmentos e contribuindo para a redução da concentração de clorofila, porém de maneira menos letal (Dayan *et al.*, 2018; Duke *et al.*, 1991; Trovão *et al.*, 2024). O norflurazon, por outro lado, não depende de luz para sua atividade, embora sua ação possa ser retardada sob condições de escuridão devido à menor demanda por carotenoides nesse ambiente, mantendo, ainda assim, sua atividade no escuro (Brausemann *et al.*, 2017; Dayan *et al.*, 2014; Sandmann; Böger, 1983). Com base nos resultados obtidos, as concentrações de 1200 μM de oxifluorfen e de norflurazon foram selecionadas para a continuidade do estudo. Embora ambas as concentrações tenham promovido redução da concentração celular ao longo do cultivo, as células sobreviventes mantiveram atividade metabólica, evidenciada pela preservação parcial

dos pigmentos fotossintéticos. Ainda que as concentrações de 1000 e 1200 μM tenham produzido respostas semelhantes em diversos parâmetros fisiológicos, a concentração de 1200 μM foi selecionada por exercer a maior pressão seletiva sem comprometer completamente a viabilidade celular, característica considerada desejável para a etapa de seleção em uma plataforma de mutagênese não-OGM. Nessa abordagem, o objetivo da pressão seletiva não é maximizar a mortalidade celular, mas sim favorecer a sobrevivência de variantes potencialmente portadoras de alterações nas vias de biossíntese de pigmentos. Assim, as concentrações selecionadas estabelecem as condições de pressão seletiva da plataforma metodológica proposta, constituindo o primeiro passo em direção a futuros programas de mutagênese química e seleção não-OGM voltados à diversificação de pigmentos em *Spirulina platensis*.

3.2 RESPOSTA CELULAR À MUTAGÊNESE QUÍMICA INDUZIDA POR EMS

A definição de uma concentração adequada de metanossulfonato de etila (EMS) constitui etapa crítica nos protocolos de mutagênese química, pois determina o equilíbrio entre a geração de diversidade genética e a manutenção de uma população celular viável para as etapas subsequentes de seleção. Os resultados apresentados na Figura 3 mostram o perfil de crescimento e a densidade óptica de *Spirulina platensis* LEB 52 sob diferentes concentrações do agente mutagênico EMS. Em todas as condições avaliadas, observou-se diminuição da concentração celular entre o início do cultivo e o dia 2, incluindo o controle (0 mM de EMS). Esse comportamento no cultivo controle é atribuído à adaptação celular às condições heterotróficas e aos tratamentos térmico e de agitação aos quais os cultivos foram submetidas durante o protocolo de mutagênese. Assim, os efeitos específicos do EMS sobre o crescimento celular tornam-se evidentes apenas após o segundo dia de cultivo, quando o período inicial de adaptação dos cultivos já havia sido superado.

Figura 3 - Curvas de crescimento e densidade óptica de *Spirulina platensis* LEB 52 sob diferentes concentrações de EMS. (a) Concentração celular (células mL^{-1}); (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) taxa de sobrevivência (%) em função da concentração de EMS após 10 dias de cultivo.



Legenda: (■) 0 mM EMS, (●) 100 mM EMS, (▲) 200 mM EMS, (▼) 300 mM EMS, (◆) 350 mM EMS, e (◀) 400 mM EMS.

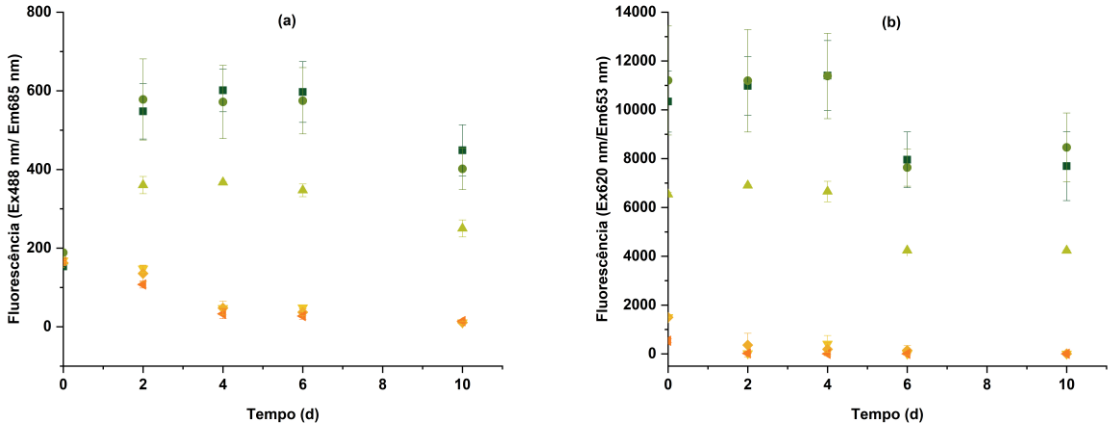
Quando a concentração celular (Figura 3a) e as densidades ópticas a 680 nm (OD680, Figura 3b) e 750 nm (OD750, Figura 3c) são analisadas em conjunto, observa-se que o aumento da concentração do agente mutagênico promoveu redução progressiva das populações celulares. A OD680 reflete tanto a biomassa quanto a pigmentação e, como apresentou comportamento semelhante ao observado para a OD750, a redução na absorbância nas concentrações mais elevadas pode ser predominantemente atribuída à diminuição da viabilidade celular, e não exclusivamente à degradação de pigmentos fotossintéticos. Esse comportamento demonstra um efeito citotóxico dose-dependente do EMS, comprometendo progressivamente o crescimento populacional.

O cultivo controle (0 mM de EMS) e os cultivos tratados com 100 mM e 200 mM de EMS apresentaram crescimento progressivo do segundo ao décimo dia. Em contrapartida, nas

concentrações iguais ou superiores a 300 mM, observou-se estagnação do crescimento ou declínio pronunciado ao longo dos 10 dias de cultivo. As taxas de sobrevivência celular (Figura 3d) demonstraram ausência de crescimento líquido e lise celular progressiva, com taxas de sobrevivência de 6%, 4% e 3% observadas para 300 mM, 350 mM e 400 mM, respectivamente, enquanto os tratamentos com 100 mM e 200 mM apresentaram 58% e 37% de sobrevivência em relação ao controle. Embora as concentrações de 350 e 400 mM tenham promovido maior mortalidade celular, a concentração de 300 mM foi selecionada por manter uma população residual viável dentro da faixa de sobrevivência (5–10%) recomendada para protocolos de mutagênese química. Essa condição é amplamente adotada por representar um equilíbrio entre a indução de mutações e a preservação de células suficientes para as etapas subsequentes de seleção.

Os ensaios de fluorescência associados à clorofila e à ficocianina (Figura 4) foram realizados utilizando os pares de comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/686 nm e 620/653 nm, respectivamente. Os tratamentos com 0 mM e 100 mM de EMS mantiveram valores de fluorescência elevados e estáveis para ambos os pigmentos ao longo dos 10 dias de cultivo. O tratamento com 200 mM de EMS apresentou redução gradual da fluorescência associada à clorofila e à ficocianina, embora as células tenham permanecido metabolicamente ativas. Para 300, 350 e 400 mM de EMS, a fluorescência de clorofila apresentou declínio acentuado a partir do segundo dia, indicando degradação progressiva do aparato fotossintético e redução da viabilidade celular. Sob essas mesmas concentrações, a fluorescência associada à ficocianina também sofreu redução quase completa. Além de refletir o comprometimento do aparato fotossintético, os resultados de fluorescência demonstraram elevada sensibilidade na discriminação dos efeitos das diferentes doses de EMS. Esse comportamento evidencia o potencial da fluorescência como ferramenta de triagem para as etapas subsequentes da plataforma de mutagênese e seleção proposta.

Figura 4 - Medições de fluorescência de *Spirulina platensis* LEB 52 sob diferentes concentrações de EMS. (a) Fluorescência de clorofila (Ex488 nm / Em685 nm); (b) Fluorescência de ficocianina (Ex620 nm / Em653 nm).



Legenda: (■) 0 mM EMS, (●) 100 mM EMS, (▲) 200 mM EMS, (▼) 300 mM EMS, (◆) 350 mM EMS, e (◀) 400 mM EMS.

A mutagênese química tem sido amplamente empregada para a obtenção de mutações induzidas visando ao melhoramento de microalgas com o objetivo de alcançar características desejadas e produtos de alto valor agregado. Essa técnica utiliza agentes alquilantes como a N-metil-N′-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG ou NTG), o sulfato de dietila (DES) e o metanossulfonato de etila (EMS). A seleção de um agente mutagênico adequado depende de aspectos metodológicos, como o objetivo fenotípico desejado, a especificidade, a aplicabilidade ao organismo-alvo e o tipo e a extensão da mutação desejada (Bleisch *et al.*, 2022; Sega, 1984; Trovão *et al.*, 2022).

A aplicação desses agentes em diferentes cepas de *Arthrospira* ou *Spirulina* tem demonstrado seu potencial para gerar variantes com características fisiológicas, bioquímicas e produtivas desejáveis. Shirnalli *et al.* (2018) utilizaram NTG para explorar melhorias nutricionais em *Arthrospira platensis* ARM 730, obtendo mutantes com maior produção de biomassa e ficocianina em comparação ao controle. Pan-Utai *et al.* (2022) realizaram mutagênese aleatória em *Arthrospira platensis* IFRPD 1182 utilizando diferentes concentrações de DES (0,02 a 1 M) para aumentar o teor de C-ficocianina, o que foi confirmado pela identificação de 1.152 peptídeos. Ruengjitchatchawalya *et al.* (2002) investigaram o perfil de ácidos graxos e as características fotossintéticas do mutante I22 obtido de *Spirulina platensis* PCC 9438 utilizando 400 mM de EMS, resultando em cepas altamente sensíveis à luz, com redução de 58% na atividade fotossintética em comparação à cepa selvagem. Em conjunto,

esses estudos demonstram que a dose mutagênica deve ser determinada individualmente para cada cepa, uma vez que a extrapolação direta entre cepas não é apropriada.

Ao comparar o presente estudo com Ruengjitchatchawalya *et al.* (2002), observa-se que *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou maior sensibilidade ao EMS (doses iguais ou superiores a 400 mM). A taxa de sobrevivência (Figura 3d) de apenas 3% observada em 400 mM sugere que essa concentração pode ter causado dano extenso ao material genético, comprometendo drasticamente a probabilidade de sobrevivência celular. De modo geral, o aumento da concentração de EMS resultou em declínio progressivo da concentração celular, da OD680 (Figura 3b) e da OD750 (Figura 3c), consistente com citotoxicidade dose-dependente, refletindo a crescente extensão das alterações no DNA de *Spirulina platensis* LEB 52. Esses resultados reforçam a necessidade de ajuste individualizado da dose mutagênica para cada cepa antes da implementação dos protocolos de seleção.

O EMS atua principalmente por meio da etilação da guanina, induzindo mutações pontuais que promovem a transição de pares de bases G:C (guanina:citosina) para A:T (adenina:timina) (Lai *et al.*, 2004; Sega, 1984). A eficiência mutagênica depende do equilíbrio entre o ganho em diversidade genética e a taxa de mortalidade na população. O uso de taxas de sobrevivência inferiores a 5% aumenta o risco de acúmulo de mutações deletérias e letais, podendo resultar em lise celular completa, como observado em E400 (Bleisch *et al.*, 2022; Trovão *et al.*, 2022).

O EMS induz mutações pontuais que podem alterar a expressão ou a funcionalidade de proteínas essenciais para o metabolismo celular. Consequentemente, processos como fotossíntese, metabolismo de carboidratos e respostas ao estresse oxidativo podem ser comprometidos, explicando a redução observada na fluorescência de clorofila e ficocianina nas concentrações mais elevadas avaliadas (Ruengjitchatchawalya *et al.*, 2002; Sega, 1984).

Em *Spirulina platensis*, mutações induzidas por EMS podem comprometer genes envolvidos na organização, montagem e funcionamento do aparato fotossintético, resultando na síntese de proteínas alteradas ou não funcionais e, consequentemente, reduzindo a eficiência do transporte de elétrons e a atividade fotossintética (Bleisch *et al.*, 2022; Ruengjitchatchawalya *et al.*, 2002). Esses danos genéticos podem desencadear um desequilíbrio no metabolismo celular e favorecer o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO). No presente estudo, esse efeito pode ter sido intensificado pelas condições de cultivo heterotrófico na ausência de luz, que impedem a ação da fotorreativação mediada por fotoliase, importante mecanismo de reparo do DNA dependente de luz, reduzindo assim a capacidade de recuperação celular (Sinha; Häder, 2002, 2008).

Os resultados obtidos para concentrações acima de 300 mM são consistentes com dano ao aparato fotossintético decorrente do estresse oxidativo induzido pelo EMS. Mutações em genes relacionados à organização e ao funcionamento dos complexos fotossintéticos podem prejudicar o transporte de elétrons, favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a degradação de pigmentos fotossintéticos (Bleisch *et al.*, 2022; Ruengjitchatchawalya *et al.*, 2002). Nesse contexto, a redução na fluorescência associada à clorofila sugere comprometimento da integridade do aparato fotossintético, enquanto a degradação mais pronunciada da ficocianina pode ser explicada por sua localização nos ficobilissomos, estruturas reconhecidamente mais suscetíveis ao estresse oxidativo (Grossman *et al.*, 1994; Pagels *et al.*, 2020). Assim, a maior redução na fluorescência de ficocianina em comparação à clorofila reforça seu potencial como marcador fenotípico para a triagem de variantes relacionadas à pigmentação.

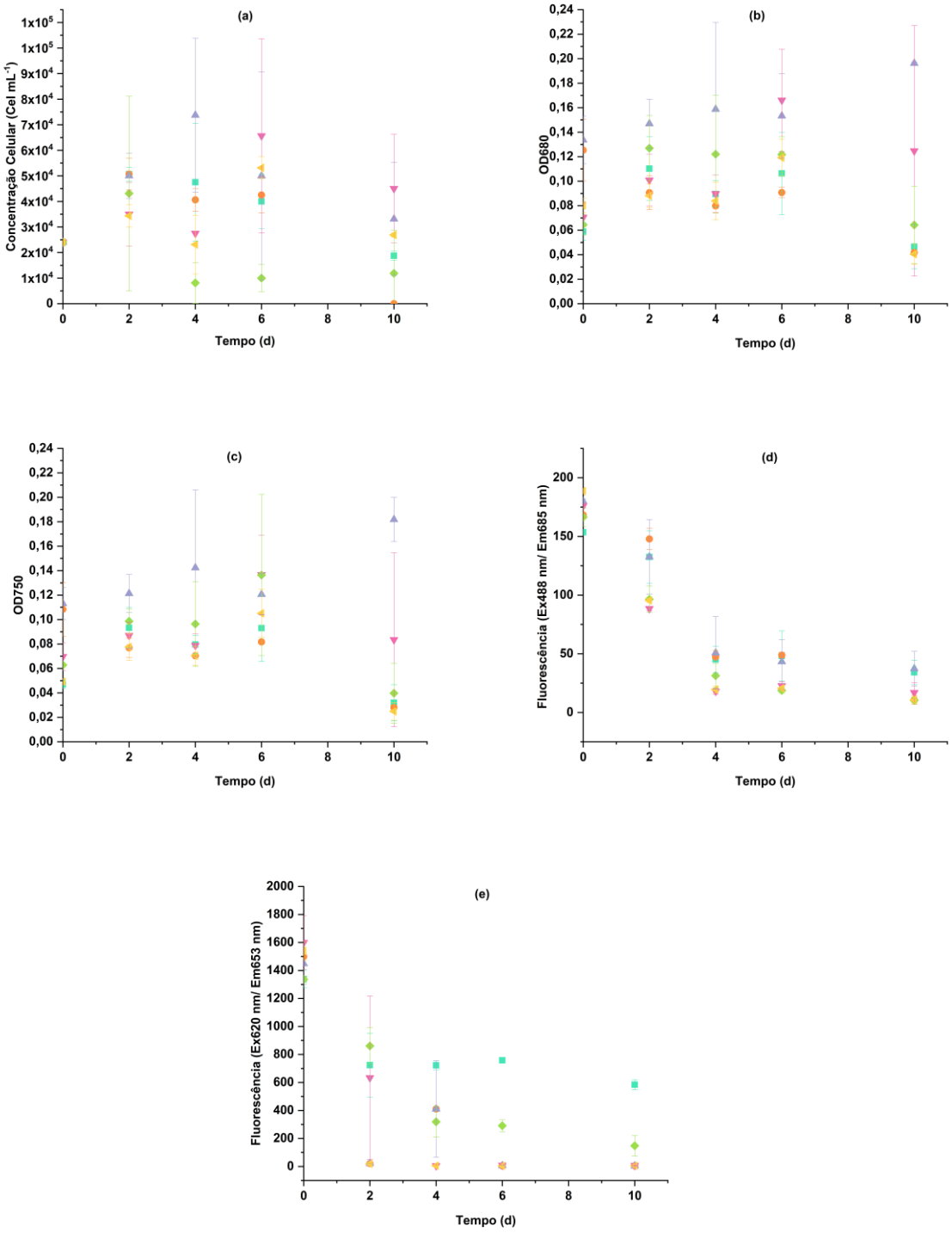
Com base nesses resultados, a concentração de 300 mM de EMS foi selecionada para os experimentos subsequentes por atender ao critério metodológico de 5–10% de sobrevivência celular recomendado para protocolos de mutagênese química. Essa concentração foi a única dentro da faixa estabelecida, representando a maior pressão mutagênica sem comprometer completamente a viabilidade da população. Além disso, a elevada sensibilidade da fluorescência associada à ficocianina observada sob essa condição indica que esse parâmetro pode ser utilizado como marcador fenotípico para a triagem de variantes relacionadas à pigmentação. Portanto, a definição da dose de EMS completa a segunda etapa da plataforma metodológica proposta, estabelecendo as condições de mutagênese que serão integradas à pressão seletiva com inibidores de biossíntese de pigmentos nas etapas subsequentes.

3.3 INTEGRAÇÃO DE MUTAGÊNESE QUÍMICA E PRESSÃO SELETIVA

Os resultados obtidos a partir da aplicação integrada de mutagênese química e seleção utilizando inibidores de biossíntese de pigmentos estão apresentados na Figura 5. Após o tratamento com EMS, os cultivos foram inoculados na mesma concentração inicial ($2{,}4 \times 10^4$ células mL^{-1}). Os controles (E0 e E300) apresentaram crescimento até o 4º e o 6º dias de cultivo, respectivamente, seguido de redução progressiva da concentração celular (Figura 5a). Esse perfil era esperado para cultivos heterotróficas de *Spirulina platensis* devido à depleção de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos associados ao cultivo (Abreu *et al.*, 2022; Marquez *et al.*, 1993; Mühling *et al.*, 2005). Os tratamentos com norflurazon (NFZ) mantiveram concentrações celulares intermediárias ao longo do cultivo, enquanto os ensaios com

oxifluorfen (OXI) apresentaram redução acentuada da população, atingindo concentrações próximas de zero ao final do experimento. Esses resultados demonstram que os dois inibidores exerceram efeitos distintos sobre a viabilidade celular quando combinados com a mutagênese química, indicando diferenças importantes em seu potencial como agentes de pressão seletiva.

Figura 5 - Efeito do EMS e dos herbicidas durante o cultivo heterotrófico de *Spirulina platensis* LEB 52. (a) Concentração celular; (b) densidade óptica a 680 nm (OD680); (c) densidade óptica a 750 nm (OD750); (d) fluorescência de clorofila (Ex 488 nm/Em 686 nm); e (e) fluorescência de ficocianina (Ex 620 nm/Em 653 nm).



Legenda: ( )0 mM EMS (E0), ( )300 mM EMS (E300), ( )0 mM EMS e 1200 µM NFZ (E0NFZ), ( )300 mM EMS e 1200 µM NFZ (E300NFZ), ( )0 mM EMS e 1200 µM OXI (E0OXI), e ( )300 mM EMS e 1200 µM OXI (E300OXI).

Os diferentes comportamentos observados entre norflurazon e oxifluorfen podem ser explicados por seus mecanismos de ação. Como abordado anteriormente, o oxifluorfen inibe a protoporfirinogênio oxidase (PPO), desta forma, seus efeitos se estendem além da fotossíntese, comprometendo processos metabólicos fundamentais mesmo sob condições heterotróficas (Mesquita *et al.*, 2023; Veaudor *et al.*, 2020). Em contrapartida, o norflurazon atua bloqueando a biossíntese de carotenoides. Embora essa inibição ocorra independentemente da presença de luz, seus efeitos fisiológicos se tornam mais pronunciados sob condições fotossintéticas, nas quais os carotenoides desempenham papel central na fotoproteção. Assim, durante o cultivo heterotrófico no escuro, a menor demanda por esses pigmentos reduz o impacto fisiológico da inibição da PDS, tornando o norflurazon um agente seletivo menos drástico para *Spirulina platensis* (Brausemann *et al.*, 2017; Breitenbach *et al.*, 2001; Sandmann *et al.*, 1991).

A exposição ao EMS promove mutações aleatórias acompanhadas de mortalidade celular inicial. Contudo, as células sobreviventes tendem a recuperar sua capacidade proliferativa ao longo do cultivo (Sega, 1984). Esse comportamento foi observado nos tratamentos contendo norflurazon, nos quais o E300NFZ apresentou menor crescimento que o E0NFZ, indicando que a mutagênese química impôs estresse fisiológico adicional à população sem comprometer completamente sua recuperação. Em contrapartida, a combinação de EMS e oxifluorfen (E300OXI) resultou em redução quase completa da população celular, sugerindo que a elevada citotoxicidade do oxifluorfen foi potencializada pelo dano ao DNA induzido pelo EMS. Esses resultados indicam que o norflurazon apresentou maior compatibilidade com uma estratégia de mutagênese seguida de pressão seletiva, preservando uma população celular viável para as etapas subsequentes de triagem.

A análise combinada de OD680 (Figura 5b) e OD750 (Figura 5c) corroborou os efeitos observados sobre o crescimento celular. Os tratamentos com oxifluorfen exibiram redução acentuada tanto em OD680 quanto em OD750, consistente com a elevada citotoxicidade observada para esse herbicida. Em contrapartida, os tratamentos com norflurazon mantiveram valores relativamente mais elevados para ambas as densidades ópticas ao longo do cultivo. A interpretação combinada dessas medições demonstra que a OD680 não deve ser analisada isoladamente, pois é influenciada tanto por alterações associadas aos pigmentos fotossintéticos quanto pela biomassa celular. Esses resultados reforçam ainda mais as diferenças fisiológicas observadas entre os dois agentes seletivos.

A fluorescência associada à clorofila *a* (Figura 5d) apresentou declínio progressivo em todos os tratamentos, incluindo os controles, comportamento esperado em cultivos

heterotróficas cultivadas no escuro, nas quais há menor demanda pela manutenção do aparato fotossintético (Marquez *et al.*, 1995; Nagarajan *et al.*, 2018; Velea *et al.*, 2017). Portanto, a redução na fluorescência não pode ser atribuída exclusivamente ao EMS ou aos herbicidas, refletindo predominantemente a adaptação metabólica ao cultivo heterotrófico. Consequentemente, esse parâmetro apresentou capacidade limitada de discriminar entre os diferentes tratamentos empregados na plataforma de seleção.

A fluorescência associada à ficocianina (Figura 5e) foi o parâmetro com maior capacidade de discriminar entre os tratamentos avaliados. Nos controles (E0 e E300) e nos tratamentos com oxifluorfen (E0OXI e E300OXI), observou-se rápido colapso do sinal de fluorescência a partir do segundo dia de cultivo. Esse comportamento é consistente com a mobilização das ficobiliproteínas como reserva de nitrogênio para sustentar o metabolismo heterotrófico no escuro (Grossman *et al.*, 1993). Em cianobactérias, os ficobilissomos funcionam não apenas como complexos antena de captação de luz fotossintética, mas também como importantes reservas de aminoácidos, sendo degradados quando as células redirecionam seu metabolismo para a utilização de fontes externas de carbono (Grossman *et al.*, 1993; Pagels *et al.*, 2020). Em contrapartida, os tratamentos com norflurazon, particularmente o E0NFZ, mantiveram fluorescência elevada ao longo de todo o experimento, sugerindo maior preservação das ficobiliproteínas sob essas condições. A redução observada no E300NFZ indica que a mutagênese química impôs estresse fisiológico adicional, o que pode ter acelerado parcialmente a degradação da ficocianina sem eliminar completamente o padrão observado no tratamento sem EMS. Esse comportamento diferencial demonstra que a fluorescência associada à ficocianina se estabeleceu como o principal marcador fenotípico da plataforma de seleção proposta.

A capacidade discriminatória superior da fluorescência de ficocianina apresenta implicações importantes para a plataforma metodológica proposta. Diferentemente da fluorescência de clorofila, que exibiu padrão semelhante entre os tratamentos devido à adaptação generalizada ao cultivo heterotrófico, a fluorescência de ficocianina distinguiu claramente os efeitos da mutagênese química e das diferentes estratégias de seleção. Além disso, ao contrário da avaliação visual da coloração do cultivo, fortemente influenciada pela concentração celular, pela densidade da suspensão e pela percepção subjetiva do observador, a fluorescência fornece uma medida quantitativa, sensível e reprodutível do fenótipo pigmentar. Embora esse parâmetro não permita a identificação direta de eventos mutacionais, ele possibilita a detecção rápida de alterações fenotípicas potencialmente associadas à biossíntese

de pigmentos. Essa característica torna a fluorescência de ficocianina uma ferramenta particularmente útil para o monitoramento das etapas iniciais da plataforma de mutagênese e seleção proposta, permitindo a priorização de populações com maior potencial para a subsequente isolação e caracterização de variantes de pigmentação.

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria filamentosa multicelular cujas células se organizam em tricomas helicoidais tipicamente compostos por 5 a 10 células dispostas em série (Vonshak, 1997). No presente estudo, observações microscópicas realizadas ao final do cultivo indicaram que o tratamento com EMS promoveu a dissociação desses tricomas em células individuais. Esse efeito pode estar relacionado ao dano estrutural causado pelo agente mutagênico às junções intercelulares e à integridade da membrana (Bleisch *et al.*, 2022; Sega, 1984). A fragmentação dos tricomas aumenta a diversidade geneticamente acessível em nível de célula única, mas também representa um desafio para a seleção fenotípica. Alterações na biossíntese de pigmentos podem ocorrer de forma heterogênea ao longo do tricoma, fazendo com que sua coloração deixe de representar com precisão o fenótipo de cada célula mutante. Assim, a triagem visual pode se tornar menos eficiente, reforçando a importância de combinar observações microscópicas com marcadores fenotípicos, como a fluorescência de ficocianina, durante a isolação e a seleção de variantes de pigmentação.

De modo geral, os resultados demonstram que a integração da mutagênese química induzida por EMS com a seleção utilizando inibidores de biossíntese de pigmentos constitui uma estratégia viável para a geração e a triagem inicial de variantes de pigmentação em *Spirulina platensis* LEB 52. Entre os parâmetros avaliados, a fluorescência associada à ficocianina emergiu como o marcador fenotípico mais sensível para o monitoramento desse processo. Embora a organização multicelular dessa espécie represente desafios adicionais para a isolação de mutantes, o fluxo metodológico estabelecido neste estudo fornece uma base reprodutível para etapas futuras de seleção, isolação e caracterização de variantes de pigmentação obtidas por meio de uma abordagem não-OGM.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo estabeleceu uma plataforma não-OGM baseada na integração da mutagênese química induzida por metanossulfonato de etila (EMS) com a seleção utilizando inibidores de biossíntese de pigmentos para *Spirulina platensis* LEB 52. Foram estabelecidas condições reprodutíveis para as principais etapas da metodologia, incluindo 300 mM de EMS

e 1200 μM de norflurazon e oxifluorfen como condições adequadas para a indução de mutações e a aplicação de pressão seletiva, respectivamente. Entre os inibidores avaliados, o norflurazon apresentou maior compatibilidade com o cultivo heterotrófico. A fluorescência associada à ficocianina emergiu como o marcador fenotípico mais sensível para o monitoramento e a triagem inicial de variantes de pigmentação. Esses resultados estabelecem um fluxo metodológico reprodutível para programas de mutagênese e seleção não-OGM em *Spirulina*, fornecendo uma base para o desenvolvimento futuro de cepas com perfis distintos de pigmentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P.; MORAIS, R. C.; TEIXEIRA, J. A.; NUNES, J. A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 159, n. February, 2022.

AIZPURU, A.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A. Traditional and new trend strategies to enhance pigment contents in microalgae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 9, p. 272-, 20 jul. 2024.

ANG, W. S.; KEE, P. E.; LAN, J. C. W.; CHEN, W. H.; CHANG, J. S.; KHOO, K. S. Unveiling the rise of microalgae-based foods in the global market: Perspective views and way forward. **Food Bioscience**, v. 66, p. 105390, 1 abr. 2025.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; BURSIC, I.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers. **Foods**, v. 8, n. 12, 2019.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161–171, 1 set. 2017.

BLEISCH, R.; FREITAG, L.; IHADJADENE, Y.; SPRENGER, U.; STEINGRÖWER, J.; WALTHER, T.; KRUJATZ, F. Strain Development in Microalgal Biotechnology—Random Mutagenesis Techniques. **Life**, v. 12, n. 7, p. 961, 27 jun. 2022.

BRAUSEMANN, A.; GEMMECKER, S.; KOSCHMIEDER, J.; GHISLA, S.; BEYER, P.; EINSLE, O. Structure of Phytoene Desaturase Provides Insights into Herbicide Binding and Reaction Mechanisms Involved in Carotene Desaturation. **Structure**, v. 25, n. 8, p. 1222-1232.e3, 1 ago. 2017.

BREITENBACH, J.; ZHU, C.; SANDMANN, G. Bleaching Herbicide Norflurazon Inhibits Phytoene Desaturase by Competition with the Cofactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5270–5272, 2001.

CAO, K.; CUI, Y.; SUN, F.; ZHANG, H.; FAN, J.; GE, B.; CAO, Y.; WANG, X.; ZHU, X.; WEI, Z.; YAO, Q.; MA, J.; WANG, Y.; MENG, C.; GAO, Z. Metabolic engineering and synthetic biology strategies for producing high-value natural pigments in Microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 68, n. April, p. 108236, 2023.

CAO, Y.; XIA, R.; CHEN, X.; SUN, L.; TANG, X. Breeding and characterization of amino acid-analogue-resistant mutants of *Arthrospira platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 423–428, 24 ago. 2013.

CHAUDHARY, S.; SINGH, R.; MISHRA, S.; TALWAR, B. *Spirulina*: a superfood – nutritional insights, advancement in food applications and mitigation strategies for enhanced palatability. **Discover Food**, v. 6, n. 1, p. 140-, 25 fev. 2026.

COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4718–4726, 1992.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, n. July, p. 121946, 2019.

DAYAN, F. E.; BARKER, A.; TRANEL, P. J. Origins and structure of chloroplastic and mitochondrial plant protoporphyrinogen oxidases: implications for the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v. 74, n. 10, p. 2226–2234, 1 out. 2018.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; TRANEL, P. J.; PRESTON, C.; DUKE, S. O. Evolution of resistance to phytoene desaturase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors - state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1358–1366, 1 set. 2014.

DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. **Algal Research**, v. 1, n. 1, p. 17–21, 1 maio 2012.

DUKE, S. O.; LYDON, J.; BECERRIL, J. M.; SHERMAN, T. D.; JR., L. P. L.; MATSUMOTO, H. Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. **Weed Science**, v. 39, n. 3, p. 465–473, set. 1991.

GARCÍA, A. B.; LONGO, E.; BERMEJO, R. The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 5, p. 3059–3070, 21 jul. 2021.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 725–740, 1993.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 54–67, 2018.

KAWAROE, M.; SUDRAJAT, A. O.; HWANGBO, J.; AUGUSTINE, D. Chemical Mutagenesis of Microalgae *Nannochloropsis* sp. Using EMS (Ethyl Methanesulfonate). **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 8, n. 5, p. 494–505, 27 abr. 2015.

KETU, K. V.; AKWO, A. U.; INNOCENT, M.; APHRODITE, C. T. Recent updates on the pharmacological and nutritional properties of *Spirulina platensis*: A comprehensive review. **Food Chemistry Advances**, v. 10, p. 101235, 1 mar. 2026.

KLANCHUI, A.; KHANNAPHO, C.; PHODEE, A.; CHEEVADHANARAK, S.; MEECHAI, A. i AK692: A genome-scale metabolic model of *Spirulina platensis* C1. **BMC Systems Biology**, v. 6, n. 1, p. 71-, 15 jun. 2012.

LAFARGA, T.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; CASTELLARI, M.; VILLARÓ, S.; BOBO, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **LWT**, v. 111, p. 167–174, 1 ago. 2019.

LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109356, 2020.

LAI, Y. P.; HUANG, J.; WANG, L. F.; LI, J.; WU, Z. R. A new approach to random mutagenesis in vitro. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 622–627, 20 jun. 2004.

LANFALONI, L.; TRINEI, M.; RUSSO, M.; GUALERZI, C. O. Mutagenesis of the cyanobacterium *Spirulina platensis* by UV and nitrosoguanidine treatment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, n. 1, p. 85–90, 1 set. 1991.

MA, G.; GAO, Q.; YUAN, L.; CHEN, Y.; CAI, Z.; ZHANG, L.; HU, J.; WANG, Y.; WU, S.; SUN, Y. *Spirulina* (*Arthrospira*) cultivation in photobioreactors: From biochemistry and physiology to scale up engineering. **Bioresource Technology**, v. 423, p. 132259, 1 maio 2025.

MALILA, Y.; OWOLABI, I. O.; CHOTANAPHUTI, T.; SAKDIBHORNSSUP, N.; ELLIOTT, C. T.; VISESSANGUAN, W.; KAROONUTHAISIRI, N.; PETCHKONGKAEW, A. Current challenges of alternative proteins as future foods. **Science of Food**, v. 8, n. 1, p. 53-, 15 ago. 2024.

MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 159–164, 1995.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth Characteristics of *Spirulina platensis* in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 408–410, 1993.

MIGLIORE, G.; DAPPOZZO, A.; RIZZO, G.; HONG, D. D.; NASPETTI, S.; GALATI, A.; HA, N. C.; THOM, L. T.; ZANOLI, R. Consumer attitudes and preferences of *Spirulina* (*Limnospira platensis*): a systematic scoping review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 24, p. 102429, 1 dez. 2025.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **American Chemical Society**, n. lll, p. 426–428, 1959.

MÜHLING, M.; BELAY, A.; WHITTON, B. A. Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 2, p. 129–135, 2005.

MYERS, J.; KRATZ, W. A. Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. **The Journal of General Physiology**, v. 39, n. 1, p. 11–22, 1955.

NAGARAJAN, D.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Heterotrophic microalgal cultivation. Em: **Green Energy and Technology**. [s.l.] Springer Singapore, 2018. v. 0p. 117–160.

NOJIMA, D.; ISHIZUKA, Y.; MUTO, M.; UJIRO, A.; KODAMA, F.; YOSHINO, T.; MAEDA, Y.; MATSUNAGA, T.; TANAKA, T. Enhancement of Biomass and Lipid Productivities of Water Surface-Floating Microalgae by Chemical Mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 151, 27 maio 2017.

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S.; ROYTRAKUL, S.; SETTACHAIMONGKON, S.; WATTANASIRITHAM, L. S.; BOONBUMRUNG, S.; MOOKDASANIT, J.; SITHTISARN, S. *Arthrospira platensis* Mutagenesis for Protein and C-Phycocyanin Improvement and Proteomics Approaches. **Life**, v. 12, n. 6, p. 911, 1 jun. 2022.

RASIA, T. A.; SILVA VAZ, B. DA; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Nanoencapsulation of *Spirulina* sp. LEB 18 microalgae biomass using electrospray technique and application in chocolate milk. **Food and Bioproducts Processing**, v. 148, p. 491–506, 1 dez. 2024.

RITCHIE, R. J. Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. **Photosynthesis Research**, v. 89, n. 1, p. 27–41, 9 jun. 2006.

RUENGJITCHATCHAWALYA, M.; CHIRASUWAN, N.; CHAIKLAHAN, R.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M.; DESHNIUM, P. Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 2, p. 71–76, 2002.

RUMIN, J.; CARRIER, G.; ROUXEL, C.; CHARRIER, A.; RAIMBAULT, V.; CADORET, J. P.; BOUGARAN, G.; SAINT-JEAN, B. Towards the optimization of genetic polymorphism with EMS-induced mutagenesis in *Phaeodactylum tricornutum*. **Algal Research**, v. 74, p. 103148, 1 jul. 2023.

SANDMANN, G.; BÖGER, P. Comparison of the Bleaching Activity of Norflurazon and Oxyfluorfen. **Weed Science**, v. 31, n. 3, p. 338–341, maio 1983.

SCHÜLER, L.; MORAIS, E. G.; TROVÃO, M.; MACHADO, A.; CARVALHO, B.; CARNEIRO, M.; MAIA, I.; SOARES, M.; DUARTE, P.; BARROS, A.; PEREIRA, H.; SILVA, J. Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–10, 2020.

SEGA, G. A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 134, n. 2–3, p. 113–142, 1 set. 1984.

SHIRNALLI, G. G.; KAUSHIK, M. S.; KUMAR, A.; ABRAHAM, G.; SINGH, P. K. Isolation and characterization of high protein and phycocyanin producing mutants of *Arthrospira platensis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 162–171, 1 fev. 2018.

SILVA, S. P. DA; VALLE, A. F. DO; PERRONE, D. Microencapsulated *Spirulina maxima* biomass as an ingredient for the production of nutritionally enriched and sensorially well-accepted vegan biscuits. **Lwt**, v. 142, n. December 2020, p. 110997, 2021.

SINHA, R. P.; HÄDER, D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 225–236, 13 mar. 2002.

SINHA, R. P.; HÄDER, D. UV-protectants in cyanobacteria. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 278–289, 1 mar. 2008.

THAJUDDIN, F.; RASHEED, A. S.; PALANIVEL, P.; THAJUDDIN, S. F.; NOORUDDIN, T.; DHARUMADURAI, D. Evolutionary adaptations of cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis and metabolic pathways in *Spirulina*, Arthrospira, and *Limnospira* spp. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 24497-, 8 jul. 2025.

TROVÃO, M.; CARDOSO, L. SCHÜLER, L.; MACHADO, A.; SANTO, G. E.; PEDROSO, H.; REIS, A.; BARROS, A.; CORREIA, N.; COSTA, M.; FERREIRA, S.; CARDOSO, H.; MATEUS, M.; SILVA, J.; PEREIRA, H.; FREITAS, F.; VARELA, J. Oxyfluorfen: a novel metabolic inhibitor to select microalgal chlorophyll-deficient mutant strains for nutritional applications. **Algal Research**, v. 81, p. 103572, 1 jul. 2024.

TROVÃO, M.; SCHÜLER, L. M.; MACHADO, A.; BOMBO, G.; NAVALHO, S.; BARROS, A.; PEREIRA, H.; SILVA, J.; FREITAS, F.; VARELA, J. Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. **Marine Drugs**, v. 20, n. 7, 1 jul. 2022.

TSCHIERSCH, H.; OHMANN, E.; DOEGE, M. Modification of the thylakoid structure of *Euglena gracilis* by norflurazon-treatment: consequences for fluorescence quenching. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 3, p. 259–270, 1 maio 2002.

VELEA, S.; OANCEA, F.; FISCHER, F. Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. *Em*: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 45–65.

YU, Q.; LI, Y.; WU, B.; HU, W.; HE, M.; HU, G. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: advances and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1517-1531, 1 fev. 2020.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina máxima***. 1966. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - University of Paris, Paris, 1966.

ZUCCARO, G.; YOUSUF, A.; POLLIO, A.; STEYER, J. P. Microalgae cultivation systems. *Em*: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 11–29.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho demonstrou que estratégias biotecnológicas baseadas na modificação das condições de cultivo e na mutagênese aleatória podem modular a coloração da biomassa de *Spirulina*, contribuindo para minimizar uma das principais limitações de sua utilização como ingrediente alimentício: a intensa coloração verde. Foram avaliadas duas linhagens de *Spirulina* sob diferentes estratégias de cultivo e melhoramento, evidenciando que a modulação da coloração pode ser obtida por mecanismos distintos e complementares.

O cultivo heterotrófico em batelada alimentada, com glicose e acetato de sódio como fontes de carbono, alterou a coloração e a composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A ausência de luz reduziu a clorofila a de 29,1 para 9,4-18,0 mg g^{-1}, atenuando a cor verde, com ficocianina e carotenoides preservados. O acetato de sódio gerou maior diferença de cor (ΔE até 12,83), a glicose favoreceu carboidratos e lipídios, e o acetato a 0,2 g L^{-1} apresentou teor proteico de 32,18%, mais próximo do controle (38,68%). Dessa forma, a seleção da condição de cultivo mais adequada deve considerar a aplicação da biomassa.

A redução gradual da intensidade luminosa, associada ao cultivo em batelada alimentada de *Spirulina platensis* LEB 52, também modulou a coloração e favoreceu o crescimento: o cultivo mixotrófico/heterotrófico atingiu 3,0 g L^{-1} de biomassa e produtividade de 96,9 mg L^{-1} d^{-1}, aumento de cerca de 55% frente ao controle autotrófico (1,8 g L^{-1}; 62,5 mg L^{-1} d^{-1}). Ao longo dos 130 dias de cultivo, a biomassa evoluiu de verde intenso a tonalidades mais claras e amareladas.

A mutagênese aleatória estabeleceu uma plataforma não-OGM para geração e seleção de variantes de pigmentação em *Spirulina platensis* LEB 52. A concentração de 300 mM de EMS resultou em 6% de sobrevivência celular, dentro da faixa recomendada (5-10%), frente a 58% e 37% em 100 e 200 mM. As concentrações de 1200 µM de norflurazon e oxifluorfen foram definidas como pressão seletiva, com maior compatibilidade do norflurazon ao cultivo heterotrófico, e a fluorescência da ficocianina como marcador mais sensível na triagem inicial. Embora linhagens estáveis ainda exijam isolamento e validação posteriores, foi estabelecido um fluxo metodológico reprodutível para melhoramento não-OGM.

Em conjunto, os resultados mostram que a coloração da *Spirulina* pode ser modulada por estratégias complementares. O cultivo direciona o metabolismo de forma reversível, enquanto a mutagênese amplia a variabilidade genética, reduzindo a barreira associada à coloração e favorecendo sua aplicação em alimentos.

CAPÍTULO V

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do presente trabalho foram constituídos principalmente por agentes mutagênicos químicos e solventes utilizados, respectivamente, nas etapas de mutagênese e na caracterização da biomassa microalgal. Após a realização das análises, os resíduos foram acondicionados em frascos âmbar devidamente identificados e segregados de acordo com o tipo de resíduo e solvente. Posteriormente, os recipientes foram encaminhados para destinação adequada, em conformidade com as normas e procedimentos institucionais vigentes da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e da Universidade do Algarve (UAlg), onde parte das atividades experimentais foram realizadas.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. P.; MORAIS, R. C.; TEIXEIRA, J. A.; NUNES, J. A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 159, n. February, 2022.

ACQUAH, C.; TIBBETTS, S. M.; PAN, S.; UDENIGWE, C. Nutritional quality and bioactive properties of proteins and peptides from microalgae. *Em*: **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 493–531.

AHMAD, A.; ASHRAF, S. S. Sustainable food and feed sources from microalgae: Food security and the circular bioeconomy. **Algal Research**, v. 74, n. March, p. 103185, 2023.

ALFADHLY, N. K. Z.; ALHELFI, N.; ALTEMIMI, A. B.; VERMA, D. K.; CACCIOLA, F. Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus *Spirulina*: An Investigative Review on Current Trends. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 3063, 11 nov. 2022.

AMARANTE, M. C. A. DE; BRAGA, A. R. C.; SALA, L.; KALIL, S. J. Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109602, 1 nov. 2020.

ANDRADE, M. DA R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551–1556, 2008.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme South of Brazil. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 85–90, 1 fev. 2008.

ANG, W. S.; KEE, P. E.; LAN, J. C. W.; CHEN, W. H.; CHANG, J. S.; KHOO, K. S. Unveiling the rise of microalgae-based foods in the global market: Perspective views and way forward. **Food Bioscience**, v. 66, p. 105390, 1 abr. 2025.

ASSUNÇÃO, L. S.; BEZERRA, P. Q. M.; POLETTO, V. S. H.; RIOS, A. DE O.; RAMOS, I. G.; RIBEIRO, C. D. F.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L. Combination of carotenoids from *Spirulina* and PLA/PLGA or PHB: New options to obtain bioactive nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 346, n. October 2020, 2021.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; BURSIC, I.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Microalgae as functional ingredients in savory food products: Application to wheat crackers. **Foods**, v. 8, n. 12, 2019.

BEACHAM, T. A.; MACIA, V. M.; ROOKS, P.; WHITE, D. A.; ALI, S. T. Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 87–94, 2015.

BEZERRA, P. Q. M.; MORAES, L.; CARDOSO, L. G.; DRUZIAN, J. I.; MORAIS, M. G.; NUNES, I. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in seawater and reduced nutrients: Bioprocess strategy for increasing carbohydrates in biomass. **Bioresource Technology**, v. 316, p. 123883, 1 nov. 2020.

BLEISCH, R.; FREITAG, L.; IHADJADENE, Y.; SPRENGER, U.; STEINGRÖWER, J.; WALTHER, T.; KRUJATZ, F. Strain Development in Microalgal Biotechnology—Random Mutagenesis Techniques. **Life**, v. 12, n. 7, p. 961, 27 jun. 2022.

BOMBO, G. C. **Isolation of two novel Chlorella vulgaris and Tetra-selmis chui mutants with improved protein contents and pigments for food applications**. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro, 2021.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 30 abr. 1999.

BUKHOV, N. G. Dynamic light regulation of photosynthesis (a review). **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 6, p. 742–753, nov. 2004.

CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE, M.; CAVALCANTE BRAGA, A. R.; SALA, L.; JULIANO KALIL, S. Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109602, 1 nov. 2020.

CAO, K.; CUI, Y.; SUN, F.; ZHANG, H.; FAN, J.; GE, B.; CAO, Y.; WANG, X.; ZHU, X.; WEI, Z.; YAO, Q.; MA, J.; WANG, Y.; MENG, C.; GAO, Z. Metabolic engineering and synthetic biology strategies for producing high-value natural pigments in Microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 68, n. April, p. 108236, 2023.

CARDOSO, L. G.; DUARTE, J. H.; ANDRADE, B. B.; LEMOS, P. V. F.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I.; CHINALIA, F. A. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: High biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production. **Aquaculture**, v. 525, p. 735272, 30 ago. 2020.

CASSURIAGA, A. P. A.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Polyhydroxybutyrate production and increased macromolecule content in *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated with xylose and reduced nitrogen levels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 875–883, 2020.

CHAUDHARY, S.; SINGH, R.; MISHRA, S.; TALWAR, B. *Spirulina*: a superfood – nutritional insights, advancement in food applications and mitigation strategies for enhanced palatability. **Discover Food**, v. 6, n. 1, p. 140-, 25 fev. 2026.

CHEN, C.; TANG, T.; SHI, Q.; ZHOU, Z.; FAN, J. The potential and challenge of microalgae as promising future food sources. **Trends in Food Science and Technology**, v. 126, n. July, p. 99–112, 2022.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme**, v. 0229, n. 96, p. 221–224, 1997.

CHEN, T.; ZHENG, W.; WONG, Y. S.; YANG, F.; BAI, Y. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2260–2265, 2006.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; FLOROU-PANERI, P. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. *Em*: **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 223–243.

CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C. S.; CHIATTONI, L. M.; MACHADO, A. R.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Capacidade Antioxidante De Compostos Fenólicos Extraídos De *Spirulina*. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 3**, p. 367–376, 2021.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J.; MCGEHEE, M. R. Mutations and Repair. *Em*: **Molecular Biology**. [s.l] Elsevier Inc., 2016. p. 832–879.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; MITCHELL, B. G. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 292, n. July, p. 121946, 2019.

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; SANTOS, T. D.; MITCHELL, B. G.; MORAIS, M. G. Open pond systems for microalgal culture. *Em*: **Biofuels from Algae**. 2. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. p. 199–223.

CRUZ, C. G.; ROSA, A. P. C. DA; COSTA, J. A. V. Identification of the phytohormones indole-3-acetic acid and trans-zeatin in microalgae. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1048–1056, 2023.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832–841, 2016.

DAMODARAM, S. ; PARKIN, K. L. ;; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4º ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANESHVAR, E.; SIK OK, Y.; TAVAKOLI, S.; SARKAR, B.; SHAHEEN, S. M.; HONG, H.; LUO, Y.; RINKLEBE, J.; SONG, H.; BHATNAGAR, A. Insights into upstream processing of microalgae: A review. **Bioresource Technology,** Elsevier Ltd, 1 jun. 2021.

DUFOSSÉ, L. Microbial pigments from bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries. *Em*: **Natural and Artifiial Flavoring Agents and Food Dyes: Handbook of Food Bioengineering**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 7p. 113–132.

FAO. **Mais 122 milhões de pessoas foram empurradas para a fome desde 2019 devido a múltiplas crises, revela relatório da ONU**. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1644602/#:~:text=A situação da segurança alimentar,insegurança alimentar moderada ou grave.>. Acesso em: 10 out. 2024.

FAO; IFAD; UNICEF; WFPP;; WHO; The State of Food Security and Nutrition in the World 2024. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2024**, 23 jul. 2024.

FATHY, W. A.; TECHEN, N.; ELSAYED, K. N. M.; ESSAWY, E. A.; TAWFIK, E.; ABDELHAMEED, M. S.; HAMMOUDA, O.; ROSS, S. A. Insights into random mutagenesis

techniques to enhance biomolecule production in microalgae: Implications for economically viable bioprocesses. **International Aquatic Research**, v. 15, n. 2, p. 85–102, 1 jun. 2023.

FRANCO LUCAS, B.; BRUNNER, T. A. Factors influencing the willingness to purchase and consume microalgae-based foods: An exploratory consumer study. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 37, n. January, p. 1–6, 2024.

GALLEGO, R.; VALDÉS, A.; SUÁREZ-MONTENEGRO, Z. J.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Anti-inflammatory and neuroprotective evaluation of diverse microalgae extracts enriched in carotenoids. **Algal Research**, v. 67, n. August, 2022.

GARCÍA-VAQUERO, M.; BRUNTON, N.; LAFARGA, T. Microalgae as a source of pigments for food applications. *Em*: **Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications**. [s.l: s.n.]. p. 177–198.

GERLAI, R. T. Spontaneous versus induced mutations: Conceptual and methodological considerations for the neurobehavioral geneticist. *Em*: GELEI, R. T. (Ed.). . **Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2018. p. 153–164.

GLOBAL GROWTH INSIGHTS. **Microalgae-Based Products Market**. 2025. Disponível em: https://www.globalgrowthinsights.com/market-reports/microalgae-based-products-market-108917. Acesso em: 07 out. 2026.

GOHARA-BEIRIGO, A. K.; MATSUDO, M. C.; CEZARE-GOMES, E. A.; CARVALHO, J. C. M. DE; DANESI, E. D. G. Microalgae trends toward functional staple food incorporation: Sustainable alternative for human health improvement. **Trends in Food Science and Technology**, v. 125, n. April, p. 185–199, 2022.

GRIFFTHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, JOHN. **An introduction to genetic analysis**. 11. ed. New York: W. H. Freeman & Company., 2015.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The Responses of Cyanobacteria to Environmental Conditions: Light and Nutrients. **The Molecular Biology of Cyanobacteria**, p. 641–675, 1994.

GULERIA, S.; CHAWLA, P.; RELHAN, A.; KUMAR, A.; BHASIN, A.; ZHOU, J. L. Antibacterial and photocatalytic potential of bioactive compounds extracted from freshwater microalgae species (*Spirogyra* and *Ocillatoria*): A comparative analysis. **Science of the Total Environment**, v. 912, n. December 2023, p. 169224, 2024.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 54–67, 2018.

HUTCHINGS, J. B. Colour in food. *Em*: **Colour Design: Theories and Applications: Second Edition**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2012. p. 157–168.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GONZÁLEZ-MEZA, G. M.; ARAÚJO, R. G.; FLORES-CONTRERAS, E. A.; LA ROSA, O. DE. Microalgae biomass as a sustainable solution for food security: Advances in biotechnology and their role in achieving Sustainable Development Goals. **Bioresource Technology Reports**, v. 31, p. 102183, 1 set. 2025.

JAESCHKE, D. P.; TEIXEIRA, I. R.; MARCZAK, L. D. F.; MERCALI, G. D. Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. **Food Research International**, v. 143, n. March, 2021.

JI, L.; QIU, S.; WANG, Z.; ZHAO, C.; TANG, B.; GAO, Z.; FAN, J. Phycobiliproteins from algae: Current updates in sustainable production and applications in food and health. **Food Research International**, v. 167, n. March, p. 112737, 2023.

LACROUX, J.; LLAMAS, M.; DAUPTAIN, K.; AVILA, R.; STEYER, J. P.; LIS, R. VAN; TRABLY, E. Dark fermentation and microalgae cultivation coupled systems: Outlook and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 865, n. December 2022, p. 161136, 2023.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, n. May, p. 101566, 2019.

LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 109356, 2020.

LE, T. T.; CORATO, A.; GERARDS, T.; GÉRIN, S.; REMACLE, C.; FRANCK, F. Heterotrophy Compared to Photoautotrophy for Growth Characteristics and Pigment Compositions in Batch Cultures of Four Green Microalgae. **Plants**, v. 13, n. 9, 2024.

LEÓN-VAZ, A.; LEÓN, R.; VIGARA, J.; FUNK, C. Exploring Nordic microalgae as a potential novel source of antioxidant and bioactive compounds. **New Biotechnology**, v. 73, n. December 2022, p. 1–8, 2023.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, v. 41, n. March, p. 107545, 2020.

LI, S.; GUO, W.; ZHANG, M.; ZENG, M.; WU, H. Microalgae polysaccharides exert antioxidant and anti-inflammatory protective effects on human intestinal epithelial cells in vitro and dextran sodium sulfate-induced mouse colitis in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, n. P1, p. 127811, 2024.

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

LIMA, É. C.; PINTO, D.; SCHADECK NETTO, M.; REIS, G. S. DOS; SILVA, L. F. O.; DOTTO, G. L. Biosorption of Neodymium (Nd) from Aqueous Solutions Using *Spirulina platensis* sp. Strains. **Polymers**, v. 14, n. 21, p. 4585, 1 nov. 2022.

LINDEN, H.; SANDMANN, G.; CHAMOVITZ, D.; HIRSCHBERG, J.; BÖGER, P. Biochemical characterization of *Synechococcus* mutants selected against the bleaching

herbicide norflurazon. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 36, n. 1, p. 46–51, 1 jan. 1990.

LU, X.; ZHAO, W.; WANG, J.; HE, Y.; YANG, S.; SUN, H. A comprehensive review on the heterotrophic production of bioactive compounds by microalgae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 7, 2024.

LUCAS, B. F.; GÖTZE, F.; VIEIRA COSTA, J. A.; BRUNNER, T. A. Consumer Perception Toward "Superfoods": A Segmentation Study. **Journal of International Food and Agribusiness Marketing**, v. 0, n. 0, p. 1–19, 2022.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. DE; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT**, v. 90, p. 270–276, 1 abr. 2018.

LUIMSTRA, V. M.; SCHUURMANS, J. M.; VERSCHOOR, A. M.; HELLINGWERF, K. J.; HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P. Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. **Photosynthesis Research**, v. 138, n. 2, p. 177–189, 2018.

LUPATINI, A. L. Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica. p. 118, 2016.

MACDOUGALL, D. B. Colour measurement of food: principles and practice. *Em*: **Colour Measurement: Principles, Advances and Industrial Applications**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 312–342.

MACHADO, A. R.; GRAÇA, C. DA S.; MACHADO, M. I. R.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Antioxidant Capacity of Phenolic Acids Extracted From the Biomass From *Spirulina* Sp.Leb-18. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 25956–25970, 2021.

MADJI, S.; ANTIH, J.; TABIB, M.; SILVESTRE, C.; GHENNAI, A.; WARNERY, A.; VAILLANT, F.; BICHON, F.; ECHALIER, A.; POUCHERET, P. Extraction, Purification, Bioactivity and Pharmacological Effects of Phycobiliproteins (PBPs): A Review. **Analytica 2025**, v. 6, n. 4, p. 44, 30 out. 2025.

MARGARITES, A. C.; VOLPATO, N.; ARAÚJO, E.; CARDOSO, L. G.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. **Environmental Technology**, v. 38, n. 17, p. 2209–2216, 2 set. 2017.

MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 159–164, 1995.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth Characteristics of *Spirulina platensis* in Mixotrophic and Heterotrophic Conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 408–410, 1993.

MARZZOCO, A. ;; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 4º ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MATA, S. N.; SOUZA SANTOS, T. DE; CARDOSO, L. G.; ANDRADE, B. B.; DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V.; OLIVEIRA DE SOUZA, C.; DRUZIAN, J. I. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123495, 1 set. 2020.

MAXWELL1, K.; JOHNSON2, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, abr. 2000.

MORAIS, M. G. DE; VAZ, B. D. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, n. 835761, p. 1-15, 2015.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F. ; DURANTE, A. J. ; MARINS, L. F. ;; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 144–150, 2008.

MORAIS, M. G.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; ALVARENGA, A. G. P.; SILVA, J. L. V. DA; COSTA, J. A. V. Microalgae Polysaccharides with Potential Biomedical Application. *Em*: **Polysaccharides of Microbial Origin**. [s.l: s.n.].2022, p. 363–380.

MORALES-SÁNCHEZ, D.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, O. A.; KYNDT, J.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 2015.

MOREIRA, J. B.; CARVALHO, L.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for development of energy gel in sports. **International Food Research Journal**, n. 25, p. 1942–1947, 2018.

MOREIRA, J. B.; MORAIS, E. G. DE; ALMEIDA, A. C. A. DE; PONTES, J. F.; GRENHA, A.; BARREIRA, L.; VARELA, J.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Microalgal Applications in Nanotechnology: An Outstanding Tool for Nanocompounds Synthesis and Bioproducts Obtention. *Em*: **Nanotechnology in the Life Sciences**. [s.l: s.n.]. p. 95–116.

MOSTAFA, H. S.; HASHEM, M. M. Microalgae as a source of carotenoids in foods, obstacles and solutions. **Phytochemistry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 4295–4337, 28 nov. 2024.

MÜHLING, M.; BELAY, A.; WHITTON, B. A. Screening *Arthrospira* (*Spirulina*) strains for heterotrophy. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 2, p. 129–135, 2005.

NAGARAJAN, D.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Heterotrophic microalgal cultivation. *Em*: **Green Energy and Technology**. [s.l.] Springer Singapore, 2018. v. 0p. 117–160.

NASCIMENTO, R. Q.; DEAMICI, K. M.; TAVARES, P. P. L. G.; ANDRADE, R. B. DE; GUIMARÃES, L. C.; COSTA, J. A. V.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O. DE. Improving water kefir nutritional quality via addition of viable *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100914, 1 fev. 2022.

NAZLOO, E. K.; MOHEIMANI, N. R.; ENNACERI, H. Biodiesel production from wet microalgae: Progress and challenges. **Algal Research**, v. 68, n. May, p. 102902, 2022.

NITSOS, C.; FILALI, R.; TAIDI, B.; LEMAIRE, J. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review**. Biotechnology Advances**, v. 45, p. 107650 1 dez. 2020.

OLIVEIRA, A. P. F. DE; BRAGOTTO, A. P. A. Microalgae-based products: Food and public health. **Future Foods**, v. 6, n. June, 2022.

OLIVEIRA, T. T. B.; REIS, I. M.; SOUZA, M. B.; BISPO, E. S.; MACIEL, L. F.; DRUZIAN, J. I.; TAVAREZ, P. P. L. G.; CERQUEIRA, A. O.; MORTE, E. S. B.; GLÓRIA, M. B. A.; DEUS, V. L.; SANTANA, L. R. R. Microencapsulation of *Spirulina* sp. LEB-18 and its incorporation in chocolate milk: Properties and functional potential. **Lwt**, v. 148, n. March, p. 4–11, 2021.

OLSEN, M. L.; OLSEN, K.; JENSEN, P. E. Consumer acceptance of microalgae as a novel food - Where are we now? And how to get further. **Physiologia Plantarum**, v. 176, n. 3, p. e14337, 1 maio 2024.

PAGELS, F.; SALVATERRA, D.; AMARO, H. M.; GUEDES, A. C. Pigments from microalgae. *Em*: **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 465–492.

PATERNINA, L. P. R.; MORAES, L.; SANTOS, T. D.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. *Spirulina* and açai as innovative ingredients in the development of gummy candies. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 12, 1 dez. 2022.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

RASIA, T. A.; SILVA VAZ, B. DA; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Nanoencapsulation of *Spirulina* sp. LEB 18 microalgae biomass using electrospray technique and application in chocolate milk. **Food and Bioproducts Processing**, v. 148, p. 491–506, 1 dez. 2024.

RAZZAK, S. A.; BAHAR, K.; ISLAM, K. M. O.; HANIFFA, A. K.; FARUQUE, M. O.; HOSSAIN, S. M. Z.; HOSSAIN, M. M. Microalgae cultivation in photobioreactors: Sustainable solutions for a greener future. **Green Chemical Engineering**, 2023.

ROCA, M.; CHEN, K.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Chlorophylls. *Em*: **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 125–158.

ROSA, G. M. DA; MORAES, L.; SOUZA, M. DA R. A. Z. DE; COSTA, J. A. V. Spirulina cultivation with a CO2 absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

RUIZ, J.; WIJFFELS, R. H.; DOMINGUEZ, M.; BARBOSA, M. J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. **Algal Research**, v. 64, p. 102698, 1 maio 2022.

RYM, B. D.; NEJEH, G.; LAMIA, T.; ALI, Y.; RAFIKA, C.; KHEMISSA, G.; JIHENE, A.; HELA, O.; HATEM, B. O. Modeling growth and photosynthetic response in *Arthrospira platensis* as function of light intensity and glucose concentration using factorial design. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 6, p. 745–752, 24 mar. 2010.

SALA, L. **Obtenção simultânea de ficobiliproteínas e anidrase carbônica, e extração seletiva de C-ficocianina**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; NAGARAJAN, D.; CHANG, J. S. Exploitation and biorefinery of microalgae. *Em*: **Waste Biorefinery**[s.l.] Elsevier B.V., 2018, p. 571- 601.

SANTHAKUMARAN, P.; AYYAPPAN, S. M.; RAY, J. G. Nutraceutical applications of twenty-five species of rapid-growing green-microalgae as indicated by their antibacterial, antioxidant and mineral content. **Algal Research**, v. 47, n. March, p. 101878, 2020.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B. DE; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216–220, 2016.

SCHMID, B.; COELHO, L.; SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H.; SANTOS, T.; MAIA, I. B.; REIS, M.; VARELA, J. Antifungal properties of aqueous microalgal extracts. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, n. March, 2022.

SCHUELTER, A. R.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; FIORINI, A.; TRIGUEROS, D. E. G.; VENDRUSCOLO, E. G.; ZAHARIEVA, M. M.; MÓDENES, A. N. Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, n. November 2018, p. 28–39, 2019.

SCHÜLER, L.; MORAIS, E. G.; TROVÃO, M.; MACHADO, A.; CARVALHO, B.; CARNEIRO, M.; MAIA, I.; SOARES, M.; DUARTE, P.; BARROS, A.; PEREIRA, H.; SILVA, J. Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–10, 2020.

SCHÜLER, L. M.; BOMBO, G.; DUARTE, P.; SANTOS, T. F.; MAIA, I. B.; PINHEIRO, F.; MARQUES, J.; JACINTO, R.; SCHULZE, P. S. C.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; VARELA, J. C. S. Carotenoid biosynthetic gene expression, pigment and n-3 fatty acid contents in carotenoid-rich *Tetraselmis striata* CTP4 strains under heat stress combined with high light. **Bioresource Technology**, v. 337, n. June, p. 125385, 2021.

SELLAOUI, L.; GERHARDT, R.; DHAOUDI. F.; CHEBAANE, S.; MANAI, L.; AZHARY, A.; SAEDOON, H.; FARIAS, B. S.; DOTTO, G. L.; CADAVAL JR, T. R. S.; PINTO, L. A.

A.; PETRICIOLET, A. B. Novel films prepared from *spirulina* and chitosan for textile pollutant removal: Experiments and theoretical study of adsorption equilibrium via an advanced theoretical approach. **Separation and Purification Technology**, v. 329, n. September 2023, p. 125158, 2024.

SILVA, J.; LIMA, F. E.; SOUZA, C.; MOREIRA-LEITE, B.; SOUSA, P. The Influence of Food Colors on Emotional Perception and Consumer Acceptance: A Sensory and Emotional Profiling Approach in Gastronomy. **Foods**, v. 14, n. 22, p. 3818, 7 nov. 2025.

SILVA, S. P. DA; VALLE, A. F. DO; PERRONE, D. Microencapsulated *Spirulina maxima* biomass as an ingredient for the production of nutritionally enriched and sensorially well-accepted vegan biscuits. **Lwt**, v. 142, n. December 2020, p. 110997, 2021.
SPENCE, C.; PIQUERAS-FISZMAN, B. Food Color and Its Impact on Taste/Flavor Perception. *Em*: **Multisensory Flavor Perception: From Fundamental Neuroscience Through to the Marketplace**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. p. 107–132.

SPENCER-LOPES, M. M.; JANKULOSKI, L.; GHANIM, M. A.; MATIJEVIC, M.; KODYM, A. Physical Mutagenesis. *Em*: **Manual of Mutation Breeding**[s.l: s.n.], 2018.

SRIVASTAVA, A.; KALWANI, M.; CHAKDAR, H.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Biosynthesis and biotechnological interventions for commercial production of microalgal pigments: A review. **Bioresource Technology**, v. 352, p. 127071, 1 maio 2022.

VAN STOKKUM, I. ; NIEDZWIEDZKI, D. M.; AKHTAR, P.; BISWAS, A.; LAMBREV, P. H.; LIU, H. Cyanobacteria dynamically regulate phycobilisome-to-photosystem excitation energy transfer . **iScience**, v. 28, n. 6, p. 112610, 2025.

SUN, H.; WANG, Y.; HE, Y.; LIU, B.; MOU, H.; CHEN, F.; YANG, S. Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. **Marine Drugs**, v. 21, n. 2, p. 82, 25 jan. 2023.

TOMASSELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). *Em*: ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*)Physiology, cell-biology and biotechnology**. [s.l.] Taylor & Francis, 1997. p. 1–16.

TOSHKOVA-YOTOVA, T.; GEORGIEVA, A.; ILIEV, I.; ALEXANDROV, S.; IVANOVA, A.; PILARSKI, P.; TOSHKOVA, R. Antitumor and antimicrobial activity of fatty acids from green microalga *Coelastrella* sp. BGV. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 394–402, 2022.

TROVÃO, M.; CARDOSO, L. SCHÜLER, L.; MACHADO, A.; SANTO, G. E.; PEDROSO, H.; REIS, A.; BARROS, A.; CORREIA, N.; COSTA, M.; FERREIRA, S.; CARDOSO, H.; MATEUS, M.; SILVA, J.; PEREIRA, H.; FREITAS, F.; VARELA, J. Oxyfluorfen: a novel metabolic inhibitor to select microalgal chlorophyll-deficient mutant strains for nutritional applications. **Algal Research**, v. 81, p. 103572, 1 jul. 2024.

TROVÃO, M.; SCHÜLER, L. M.; MACHADO, A.; BOMBO, G.; NAVALHO, S.; BARROS, A.; PEREIRA, H.; SILVA, J.; FREITAS, F.; VARELA, J. Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. **Marine Drugs**, v. 20, n. 7, p. 440, 1 jul. 2022.

UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. A/RES/70/1.** Disponível em: <https://sdgs.un.org/2030agenda>. Acesso em: 14 ago. 2026.

VELEA, S.; OANCEA, F.; FISCHER, F. Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. *Em*: **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 45–65.

VIEIRA COSTA, J. A.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 237–241, 1 maio 2004.

VILLAR-NAVARRO, E.; RUIZ, J.; GARRIDO-PÉREZ, C.; PERALES, J. A. Microalgae biotechnology for simultaneous water treatment and feed ingredient production in aquaculture. **Journal of Water Process Engineering**, v. 49, n. August, 2022.

VONSHAK, A.; CHEUNG, S. M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 4, p. 675–679, 2000.

WANG, J.; QIN, S.; LIN, J.; WANG, Q.; LI, W.; GAO, Y. Phycobiliproteins from microalgae: research progress in sustainable production and extraction processes. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, p. 170-, 8 nov. 2023.

YOUSUF, A. Fundamentals of microalgae cultivation. *Em*: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–9.

YU, Z.; ZHAO, W.; SUN, H.; MOU, H.; LIU, J.; YU, H.; DAI, L.; KONG, Q.; YANG, S. Phycocyanin from microalgae: A comprehensive review covering microalgal culture, phycocyanin sources and stability. **Food Research International**, v. 186, p. 114362, 1 jun. 2024.

ZAYADI, R. A.; BAKAR, F. A. Comparative study on stability, antioxidant and catalytic activities of bio-stabilized colloidal gold nanoparticles using microalgae and cyanobacteria. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, p. 103843, 2020.

ZEIGLER, D. Genetics Basics & Mutations. *Em*: ZEIGLER, D. (Ed.). **Evolution**. 1. ed. Boston, United States: Elsevier, 2014. v. 1p. 39–53.

ZOUARI, N.; ABID, M.; FAKHFAKH, N.; AYADI, M. A.; ZORGUI, L.; AYADI, M.; ATTIA, H. Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 811–813, dez. 2011.