

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
Gestão e Tecnologia Ambiental

VALÉRIA LOUZADA LEAL BUTZKE

**EXPLORANDO O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Euglena gracilis*
COMO ESTRATÉGIA PARA INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS
E SOLUÇÕES AMBIENTAIS SUSTENTÁVEIS**

Santa Cruz do Sul
Dezembro/2024

Valéria Louzada Leal Butzke

**Explorando o potencial biotecnológico de *Euglena gracilis*
como estratégia para inovações na produção de bioprodutos
e soluções ambientais sustentáveis**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia Ambiental – Doutorado,
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC,
como requisito parcial para o título de Doutora em
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio
Corbellini

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Rosana de Cássia de
Souza Schneider

Santa Cruz do Sul

Dezembro/2024

RESUMO

As microalgas, como um grupo de organismos altamente diversos, têm sido amplamente reconhecidas por suas inúmeras aplicações, que vão desde o tratamento de efluentes até a biotecnologia e o desenvolvimento de bioprodutos. No entanto, a vasta biodiversidade dessas espécies ainda é subexplorada, com poucas sendo investigadas em profundidade, o que limita o aproveitamento total de seu potencial. *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) é uma espécie com um impressionante histórico evolutivo, refletido em sua resistência e adaptabilidade a condições ambientais extremas, além de seu metabolismo sofisticado e versátil, que permite a síntese de uma ampla gama de biomoléculas bioativas de alto valor agregado, como ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos, vitaminas (C e E) e biomoléculas exclusivas, como o β -1,3-D-glucano (paramilo) e euglenatídeos. Neste contexto, o principal objetivo desta pesquisa foi investigar o potencial biotecnológico de *E. gracilis*, por meio de sua caracterização bioquímica e avaliação de suas atividades biológicas, com ênfase no potencial antioxidante e bioestimulante, ao mesmo tempo em que se explora seu uso em soluções ambientais sustentáveis, como o tratamento de efluentes. A metodologia envolveu o cultivo da microalga em condições foto e mixotróficas, utilizando diferentes meios e condições de cultivo: BG11 convencional, BG11 modificado enriquecido com fertilizante mineral NPK (BG11NPK), Meio Efluente Urbano Sintético (MEUS), além de águas residuais naturais provenientes de suinocultura diluídas a 25% (P25) e pré-tratadas com foto-Fenton (PF). Foram avaliados parâmetros de crescimento e produtividade e a composição bioquímica foi analisada por meio de técnicas convencionais e alternativas, como cromatografia e espectroscopia FTIR. O potencial antioxidante e bioestimulante foi avaliado através do índice de germinação e ensaios de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC). Além disso, foram utilizados métodos padrão para análise de efluentes, com foco na eficiência de *E. gracilis* na remoção de nutrientes das águas residuais de suinocultura. Os resultados demonstraram crescimento e produtividade consistentes nos meios alternativos e águas residuais, com destaque para sua viabilidade em águas residuais de suinocultura, promovendo a redução de nutrientes e a produção de biomassa rica em compostos bioativos, especialmente com atividade bioestimulante. A utilização de espectroscopia FTIR, combinada com análises multivariadas, forneceu *insights* sobre como as condições de cultivo influenciam o metabolismo e a capacidade antioxidante da microalga, permitindo a otimização da produção de compostos de interesse. Essa abordagem se mostrou eficaz para uma avaliação preliminar da composição celular de *E. gracilis* de maneira sustentável, minimizando o uso de reagentes químicos e reduzindo o tempo de análise. Os resultados demonstram o potencial da microalga para a produção de bioprodutos de alto valor

agregado, simultaneamente ao seu uso como ferramenta no tratamento de efluentes. Esse estudo reflete não apenas os benefícios ambientais, como a remoção de nutrientes de águas residuais, mas também os ganhos biotecnológicos, com a produção de compostos bioativos de interesse industrial. Este trabalho estabelece as bases para a aplicação de *E. gracilis* em processos industriais, com impacto na sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: Microalga; Fotoautotrófico; Mixotrófico; Caracterização bioquímica; Tratamento de efluente; Antioxidante, Bioestimulante.

ABSTRACT

Exploring the biotechnological potential of *Euglena gracilis* as a strategy for innovations in bioproduct production and sustainable environmental solutions

Microalgae, as a group of highly diverse organisms, have been widely recognized for their numerous applications, ranging from wastewater treatment to biotechnology and the development of bioproducts. However, the vast biodiversity of these species remains underexplored, limiting the full potential of this group. *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) is a species with an impressive evolutionary history, reflected in its resistance and adaptability to extreme environmental conditions, as well as its sophisticated and versatile metabolism, which allows for the synthesis of a wide range of high-value bioactive biomolecules, such as polyunsaturated fatty acids, amino acids, vitamins (C and E), and exclusive biomolecules, such as β -1,3-D-glucan (paramylon) and euglenatides. In this context, the main objective of this research was to investigate the biotechnological potential of *E. gracilis* through its biochemical characterization and evaluation of its biological activities, with an emphasis on antioxidant and biostimulant potential, while also exploring its use in sustainable environmental solutions, such as wastewater treatment. The methodology involved culturing the microalga under photo- and mixotrophic conditions, using different media and cultivation conditions: conventional BG11, modified BG11 enriched with mineral fertilizer NPK (BG11NPK), Synthetic Urban Effluent (SUE), as well as natural wastewater from pig farming diluted to 25% (P25) and pre-treated with photo-Fenton (PF). Growth and productivity parameters were assessed, and the biochemical composition was analyzed through conventional and alternative techniques, such as chromatography and FTIR spectroscopy. The antioxidant and biostimulant potential were evaluated through germination index and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays. Additionally, standard methods for effluent analysis were used, focusing on the efficiency of *E. gracilis* in nutrient removal from piggery wastewater. The results demonstrated consistent growth and productivity in alternative media and wastewater, emphasizing its viability in piggery wastewater, promoting nutrient reduction and producing biomass rich in bioactive compounds, especially with biostimulant activity. FTIR spectroscopy, combined with multivariate analyses, provided insights into how cultivation conditions influence the metabolism and antioxidant capacity of the microalga, allowing for the optimization of the production of target compounds. This approach proved effective for a preliminary evaluation of the cellular composition of *E. gracilis* in a sustainable manner, minimizing the use of chemical reagents and reducing analysis time. The results demonstrate the

potential of the microalga to produce high-value bioproducts, simultaneously with its use as a tool in wastewater treatment. This study reflects not only environmental benefits, such as removing nutrients from wastewater but also biotechnological gains, with the production of bioactive compounds of industrial interest. This work establishes the foundation for applying *E. gracilis* in industrial processes, with an impact on environmental sustainability.

Keywords: Microalga; Photoautotrophic; Mixotrophic; Biochemical characterization; Effluent treatment; Antioxidant; Biostimulant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Histórico das primeiras descrições do gênero <i>Euglena</i>	19
Figura 1.2	Resumo da organização taxonômica do gênero <i>Euglena</i>	20
Figura 1.3	Representações morfológicas e anatômicas da microalga <i>E. gracilis</i>	22
Figura 1.4	Formas de reprodução assexuada em <i>E. gracilis</i>	23
Figura 1.5	Paramilo de <i>E. gracilis</i>	25
Figura 1.6	Estruturas dos euglenatídeos	27
Figura 1.7	Estratégia "5Fs of Biomass", indicando as cinco utilizações principais da biomassa de <i>Euglena</i>	29
Figura 1.8	Ilustração das principais aplicações e potencialidades atribuídas à <i>E. gracilis</i>	32
Figura 1.9	Representação do vínculo entre as pesquisas e as aplicações baseadas em microalgas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)	33
Figura 2.1	Imagens microscópicas da microalga <i>E. gracilis</i>	38
Figura 2.2	Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (MV) ...	39
Figura 2.3	Cultivos de <i>E. gracilis</i> nos meios sintéticos BG11, BG11NPK e MEUS	41
Figura 2.4	Cultivos de <i>E. gracilis</i> nas águas residuais da suinocultura (P25 e PF), realizados em fotobiorreatores em coluna de vidro com sistema de aeração do tipo airlifts	44
Figura 2.5	Fluxograma com os principais procedimentos e metodologias utilizadas	47
Figura 3.1	Resumo gráfico do artigo 1	50
Figura 3.2	Resumo gráfico do artigo 2	51
Figura 4.1	Quadro-resumo com atividades curriculares realizadas para a obtenção do título de doutora, conforme os requisitos estabelecidos pelo Regimento do PPGTA	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição dos meios de cultivo sintéticos BG11, BG11NPK e MEUS (mg L ⁻¹)	40
Tabela 2.2	Análise inicial da água residuária de suinocultura, incluindo demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal (NH ₃ /NH ₄ ⁺), fosfato (PO ₄ ³⁻), cor e valores de pH	43
Tabela 2.3	Meios de cultivo e variáveis ambientais aplicadas no cultivo de <i>E. gracilis</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Amino Acids
ARS	Água Residual da Suinocultura
ATR-FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada (do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared spectroscopy</i>)
BAP	6-BenzylAminoPurine (controle positivo para efeitos semelhantes à citocinina)
BG11	Meio de cultivo convencional Blue Green 11
BG11NPK	Meio de cultivo BG11 adaptado com fertilizante mineral NPK
CB	Commercial Biostimulant
CD	Cell Density
COD	Chemical Oxygen Demand
DW	Dry Weight
EAA	Essential Amino Acids
FA	Fatty Acid
FAME	Fatty Acid Methyl Esters
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared spectroscopy</i>)
GA	Gibberellic Acid (controle positivo para efeito semelhante à giberelina)
GI	Germination Index
IBA	Indole-3-Butyric Acid
MEUS	Meio Efluente Urbano Sintético
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids
NEAA	Non-Essential Amino Acids
NPK	Fertilizante mineral NPK
OD	Optical Density
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity assay
P25	25% de ARS bruta:75% de água da torneira, volume/volume)
PBR-AL	Fotobiorreator com direcionador de fluxo de ar tipo airlifts (do inglês, <i>Photobioreactor</i>)
PC1	Principal Component 1
PC2	Principal Component 2
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PF	ARS pré-tratada pelo processo de oxidação avançada foto-Fenton (do inglês, <i>Photo-Fenton</i>)
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
PWW	Piggery Wastewater
SFA	Saturated Fatty Acids
SUE	Synthetic Urban Effluent
SVI	Seedling Vigor Index
UFA	Unsaturated Fatty Acids

δ	Deformação de curvatura simétrica
δ_{as}	Deformação de curvatura assimétrica
v	Estiramento simétrico
v_{as}	Estiramento assimétrico

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 <i>Euglena gracilis</i>	18
3.1.1 Histórico e taxonomia	18
3.1.2 Características gerais.....	21
3.1.3 Compostos bioativos e suas aplicações biotecnológicas.....	25
3.1.4 Outras aplicações	30
3.2 Microalgas e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)	32
3.3 Oportunidades na exploração biotecnológica de <i>E. gracilis</i>	34

CAPÍTULO II

4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Microalga.....	38
4.2 Meios e condições de cultivo	39
4.2.1 Meios de cultivo sintéticos.....	40
4.2.2 Efluentes naturais	42
4.3 Aclimação.....	45
4.4 Procedimentos experimentais e analíticos	46

CAPÍTULO III

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
-------------------------------	----

CAPÍTULO IV

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 TRABALHOS FUTUROS	59
8 ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	60
9 REFERÊNCIAS.....	66



CAPÍTULO I

Introdução
Fundamentação teórica
Objetivos



1 INTRODUÇÃO

As microalgas compõem um grupo diversificado de microrganismos, com cerca de 1.000.000 de espécies estimadas, das quais 35.000 apresentam algum registro na literatura, e algumas centenas exploradas em relação a seus aspectos bioquímicos, fisiológicos e atividades biológicas (Pina-Pérez *et al.*, 2017; Rumin *et al.*, 2020; Sehgal *et al.*, 2019). Essa diversidade de espécies ainda inexplorada, aliada à notável capacidade de adaptação das microalgas às mais variadas condições ambientais, representa uma fonte inesgotável para a exploração de metabólitos biologicamente ativos e aplicações biotecnológicas. Entre os compostos mais estudados, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, especialmente os da classe dos β -glucanos, aminoácidos, peptídeos e pigmentos, os quais têm demonstrado aplicações promissoras, especialmente na área farmacêutica, devido a atividades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, neuroprotetoras e antiproliferativas (Bilal *et al.*, 2017; Bule *et al.*, 2018; Hassan *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2018; Khavari *et al.*, 2021; Kiran e Venkata Mohan, 2021).

Além dessas aplicações mais nobres, as microalgas são amplamente reconhecidas por seu potencial na geração de bioenergia, com produção de biodiesel, bioetanol e biogás, e vêm recebendo grande atenção como uma solução promissora para enfrentar simultaneamente os desafios no gerenciamento de águas residuais e na promoção da agricultura sustentável (Acién Fernández *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2021; De Souza *et al.*, 2018). O aproveitamento da biomassa residual das microalgas, previamente utilizada na remoção de nutrientes, tem se mostrado promissor em aplicações como biofertilizantes, bioestimulantes e biopesticidas (Alavianghavanini *et al.*, 2024; Amaya-Santos *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2021; Morillas-Espana *et al.*, 2022). Dessa forma, as microalgas ganham reconhecimento como componentes-chave no contexto da bioeconomia circular, contribuindo para a redução de resíduos e a promoção de práticas sustentáveis em diferentes setores econômicos.

Apesar do crescente interesse científico, tecnológico e comercial, bem como do consenso sobre a importância das microalgas nos contextos de sustentabilidade, biorrefinaria e bioeconomia circular, o grupo ainda permanece subutilizado em comparação às algas marinhas e às plantas terrestres, com pesquisas e patentes focadas predominantemente nas espécies mais conhecidas, como *Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp. e *Spirulina* spp. (Braun e Colla, 2022; Fu *et al.*, 2017; Murata *et al.*, 2021). Além disso, o grupo ainda enfrenta desafios associados aos custos de cultivo, escalabilidade de produção, viabilidade comercial, além de barreiras regulatórias (Araújo *et al.*,

2021). Esse cenário reforça a necessidade de explorar e compreender melhor a vasta biodiversidade e o potencial biotecnológico das microalgas, especialmente considerando sua potencialidade no contexto dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU). Pesquisadores apontam as microalgas como alternativa inovadora e estratégica na gestão sustentável de recursos hídricos (ODS 6), promoção de fontes de energia renováveis (ODS 7), enfrentamento das mudanças climáticas e seus impactos (ODS 13), além de contribuir para a segurança alimentar e apoiar a agricultura sustentável (ODS 2), entre outras ODS (Olabi *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023).

Neste cenário, *Euglena gracilis* (Euglenaceae), uma microalga unicelular flagelada de água doce, emerge como um modelo promissor para biotecnologia baseada em microalgas. Desde a primeira observação de um representante do gênero, feita por Antonie van Leeuwenhoek em 1674, até os dias atuais, *E. gracilis* tem sido objeto de estudos que, inicialmente focados em morfologia e taxonomia, evoluíram para investigações genéticas, aplicações biotecnológicas e desenvolvimento de bioprodutos.

Seus versáteis modos de nutrição — fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico — e sua notável resistência a condições extremas, como alta acidez, radiação ionizante e concentrações elevadas de nutrientes e metais, conferem à espécie uma rede metabólica complexa, comparável à de organismos multicelulares (Bedard *et al.*, 2024; Ebenezer *et al.*, 2022). Isso possibilita sua adaptação ao cultivo em meios não convencionais, como efluentes, o que não apenas reduz os custos de produção, mas também aumenta a viabilidade econômica em larga escala. Além disso, seu diversificado perfil fisiológico e metabólico permite a síntese e o acúmulo de uma ampla gama de metabólitos valiosos, como aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas como ácido ascórbico e α -tocoferol, ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), pigmentos, além da síntese de compostos únicos, como um tipo específico de β -1,3-D-glucano chamado paramilo, e a molécula bioativa euglenatídeo (Aldholmi *et al.*, 2022; Bedard *et al.*, 2024; Gissibl *et al.*, 2019; Hasan *et al.*, 2017; Kottuparambil *et al.*, 2019). Ainda, *E. gracilis* possui a vantagem adicional de ser não patogênica, resultando em sua certificação como aditivo alimentar geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) em 2017, bem como na obtenção do *status* de novo alimento na União Europeia em 2020 (ESFA, 2023; FDA, 2017), com empresas como *Euglena Co. Ltd.* já explorando sua produção em larga escala para aditivos alimentares, com a expansão da produção para itens não alimentares como cosméticos (Suzuki, 2017).

Essas descobertas refletem os avanços de 350 anos de pesquisa, destacando a relevância científica e biotecnológica de *E. gracilis* como um organismo-chave para o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis

Considerando o exposto, este estudo investiga o crescimento, a produtividade e a composição bioquímica de *E. gracilis* sob diferentes condições e meios de cultivo, incluindo o uso de efluentes, além das atividades biológicas associadas às biomassas produzidas. Com esta abordagem, busca-se preencher lacunas no conhecimento sobre essa espécie e explorar seu potencial biotecnológico em aplicações como biorremediação e produção de bioprodutos. Assim, pretende-se contribuir para o aprimoramento de processos biotecnológicos baseados em microalgas, tornando-os mais eficientes e sustentáveis, em consonância com os princípios de biorrefinaria, bioeconomia circular e aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

A tese está organizada em quatro capítulos, que buscam oferecer uma visão clara e sequencial do desenvolvimento e contribuições da pesquisa. O **Capítulo I** abrange a *introdução*, a *fundamentação teórica* e os *objetivos* do estudo, oferecendo uma visão geral e uma retrospectiva científica do campo da biotecnologia de microalgas, com ênfase nos tópicos centrais abordados nesta tese, além de apresentar os objetivos delineados para avançar nas fronteiras do conhecimento sobre a temática. O **Capítulo II** descreve os *materiais e métodos* utilizados, com destaque para o processo de aclimação da microalga aos diferentes meios de cultivo empregados, essencial para o andamento dos estudos subsequentes. Este capítulo também inclui um fluxograma ilustrativo das principais etapas metodológicas do trabalho. O **Capítulo III** é dedicado à apresentação dos *resultados e discussões*, apresentando integralmente os *artigos* produzidos durante a pesquisa. Cada artigo inclui seus respectivos materiais e métodos, resultados, discussões e conclusões. Por fim, o **Capítulo IV** apresenta as *considerações finais*, sintetizando as principais conclusões alcançadas ao longo do estudo. São também sugeridos *trabalhos futuros*, apontando possíveis novas linhas de investigação derivadas deste estudo, com o objetivo de aprimorar e aprofundar os conhecimentos na área. Adicionalmente, o capítulo oferece um resumo das *atividades realizadas durante o doutorado*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Explorar o potencial biotecnológico da microalga *Euglena gracilis* na recuperação de nutrientes e biorremediação de efluentes, avaliando sua composição bioquímica e as atividades biológicas associadas, com foco na valoração da biomassa para o desenvolvimento de soluções ambientais sustentáveis e bioprodutos de valor agregado.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a adaptação de *E. gracilis* em condições fotoautotróficas (meio convencional e adaptado) e mixotróficas (efluente sintético e águas residuais), analisando os parâmetros de crescimento, produtividade e qualidade da biomassa;
2. Avaliar a eficiência da microalga em reduzir nitrogênio, fósforo e carbono orgânico presentes nas águas residuais da suinocultura, quando utilizadas como meio de cultivo;
3. Caracterizar sua biomassa por meio da determinação do teor de carboidratos (totais e perfil), lipídios (totais e perfil), proteínas e aminoácidos, utilizando métodos tradicionais de química analítica;
4. Determinar o potencial bioestimulante e antioxidante das biomassas, investigando seus efeitos semelhantes aos fitormônios e sua capacidade de proteção contra o estresse oxidativo;
5. Caracterizar e identificar padrões na composição bioquímica da biomassa de *E. gracilis* em resposta a variáveis ambientais e nutricionais, utilizando espectroscopia FTIR e a análise multivariada dos dados (Análise dos Componentes Principais, PCA) como ferramentas ambiental e economicamente mais sustentáveis para a otimização dos cultivos e o desenvolvimento de bioprodutos de valor agregado;
6. Demonstrar o alinhamento do estudo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).

Os objetivos do estudo alinham-se à *linha de pesquisa número 4, Microbiologia Aplicada à Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da UNISC*, atendendo aos quatro principais pilares que a orientam:

- **Estratégias para biorremediação ambiental:** O estudo avalia a microalga *E. gracilis* no tratamento de águas residuais da suinocultura, explorando seu potencial biotecnológico para a remediação de ambientes contaminados. Ao integrar as microalgas ao manejo das áreas residuais,

a pesquisa propõe alternativas mais sustentáveis que não apenas mitigam os impactos ambientais, mas também valorizam os recursos utilizados. Assim, busca-se transformar desafios ambientais em oportunidades de valorização ecológica e econômica, promovendo tanto a recuperação de ambientes quanto a geração de ativos a partir de passivos ambientais;

- **Bioprospecção e caracterização de microrganismos:** O estudo caracteriza a microalga, aprofundando a compreensão de sua dinâmica metabólica em diferentes meios de cultivo e condições ambientais. Essa abordagem visa identificar novas aplicações biotecnológicas, maximizando o aproveitamento desse recurso natural e expandindo suas possibilidades de uso sustentável. Além disso, a pesquisa contribui para o avanço das fronteiras do conhecimento científico e aplicado, fortalecendo o campo da biotecnologia de microalgas e diversificando suas aplicações em diferentes contextos;

- **Desenvolvimento de processos e produtos biotecnológicos:** A análise da composição bioquímica da biomassa sob diferentes condições de cultivo e a investigação de atividades bioestimulantes e antioxidantes, contribuem para o desenvolvimento de bioprodutos e aplicações biotecnológicas.

- **Avaliação e otimização de processos biotecnológicos:** A aplicação de ferramentas da química analítica verde, como a espectroscopia FTIR, aliada a métodos inovadores de processamento de biomassa, como a homogeneização de alta pressão para ruptura celular, e ao uso de análises estatísticas multivariadas, reforça o compromisso com práticas mais sustentáveis ao longo do processo investigativo. Além disso, a pesquisa de meios alternativos de cultivo busca otimizar processos para a produção de biomassa enriquecida com moléculas bioativas de alto valor agregado, consolidando uma abordagem sustentável e economicamente viável para o setor produtivo.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Euglena gracilis*

3.1.1 *Histórico e taxonomia*

As primeiras observações e registros de microrganismos hoje conhecidos como *Euglena* remontam ao século XVII, e foram realizadas pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek (**Figura 1.1 a**), um comerciante de tecidos que, graças à sua curiosidade e habilidades autodidatas, realizou importantes contribuições científicas (Clifford Dobell, 1932). Inspirado pelo trabalho do cientista inglês Robert Hooke, van Leeuwenhoek desenvolveu lentes artesanais para microscópios simples, iniciando suas observações biológicas. Entre suas observações estavam bactérias e protozoários, que ele chamou de “animálculos”, consolidando seu reconhecimento como o pai da protozoologia e da bacteriologia (Clifford Dobell, 1932).

Em 1674, em uma de suas 190 cartas endereçadas à Royal Society de Londres, van Leeuwenhoek descreveu a presença de organismos microscópicos encontrados na água do lago Berkelse Mere, em Delft, Holanda “*Alguns desses animálculos eram esbranquiçados e transparentes; outros tinham escamas verdes e muito brilhantes; outros ainda eram verdes no meio e brancos nas extremidades [...]. O movimento da maioria desses animálculos na água era tão rápido e variado — para cima, para baixo e ao redor — que era maravilhoso de ver!*” (em tradução livre, Clifford Dobell, 1932). Essa descrição foi associada à espécie *Euglena viridis* pelo biólogo inglês Clifford Dobell, em sua obra *Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals"* (1932), dedicada à tradução e análise das cartas de van Leeuwenhoek.

Observações posteriores ampliaram as descrições iniciais, alinhando-se gradualmente às características modernas atribuídas ao gênero *Euglena*. Em 1696, o cientista inglês John Harris relatou organismos microscópicos com formato oval, centro verde intenso, extremidades transparentes e movimentos rápidos e contráteis (Harris, 1997) (**Figura 1.1 b**). Já em 1786, o naturalista dinamarquês e ilustrador científico Otto Friedrich Müller descreveu e ilustrou organismos com características semelhantes, ressaltando sua coloração verde, forma corporal mutável e movimentos ondulantes e contráteis, aos quais atribuiu o nome de *Cercaria viridis* (Müller, 1786) (**Figura 1.1 c**).

Foi no ano de 1830, a partir das observações do zoólogo e médico alemão Christian Gottfried Ehrenberg (**Figura 1.1 d**), que *Euglena* recebeu sua denominação científica atual. O nome deriva dos termos gregos *eu* ("bom" ou "belo") e *glene* ("olho"), em referência à estrutura formada por grânulos ricos em carotenoides, localizada em uma das extremidades da célula, que funciona como

um sensor rudimentar de luz (Zoltner e Field, 2022). Ehrenberg ainda agrupou quatro táxons previamente descritos — *Euglena viridis* (= *Cercaria viridis* Müller), *E. sanguinea* (= *Enchelys sanguinea* Ness e Golgfufs), *E. acus* (= *Vibrio acus* Müller) e *E. pleuronectes* (= *C. pleuronectes* Müller) — com duas novas espécies identificadas por ele: *E. pyrum* e *E. longicauda* (Zakryś et al., 2017) (**Figura 1.1 e**). Esse trabalho formalizou a nomenclatura do gênero e estabeleceu uma base taxonômica mais estruturada para o grupo



Figura 1.1 Histórico das primeiras descrições do gênero *Euglena*. **(a)** Antonie van Leeuwenhoek (Fonte: Clifford Dobell, 1932); **(b)** Relato de John Harris (Fonte: The Royal Society, Harris, 1997); **(c)** Ilustrações de Otto Friedrich Müller (Fonte: Müller, 1786); **(d)** Christian Gottfried Ehrenberg (Fonte: Lazarus e Jahn, 1998); **(e)** Registros de Ehrenberg (Fonte: Microscope Clarity).

Desde então, *Euglena* tem sido amplamente estudada, e os avanços tecnológicos, especialmente nas técnicas de biologia molecular, revelaram um genoma notavelmente quimérico.

Composto por sequências nucleares, plastidiais e mitocondriais, esse genoma é resultado de múltiplos eventos endossimbióticos, envolvendo contribuições de um protozoário ancestral, algas verdes, vermelhas e marrons, e uma proteobactéria (mitocôndria) (Ebenezer *et al.*, 2017; O'Neill, 2020; Zakryś *et al.*, 2017). Desta forma, sua árvore filogenética e classificação taxonômica têm sido frequentemente revisadas e reorganizadas para incorporar novas descobertas. Atualmente, o banco de dados *AlgaBase* (Guiry e Guiry, 2024) reconhece 178 espécies taxonomicamente válidas no gênero *Euglena*, organizadas da seguinte forma: Domínio: Eukaryota; Reino: Protozoa; Subreino: Eozoa; Infrarreino: Euglenozoa; Filo: Euglenophyta; Subfilo: Euglenida; Infracilo: Dipilida; Classe: Euglenophyceae; Subclasse: Euglenophycidae; Ordem: Euglenales; Família: Euglenaceae; Subfamília: Euglenoideae; e, Gênero: *Euglena* (**Figura 1.2**).

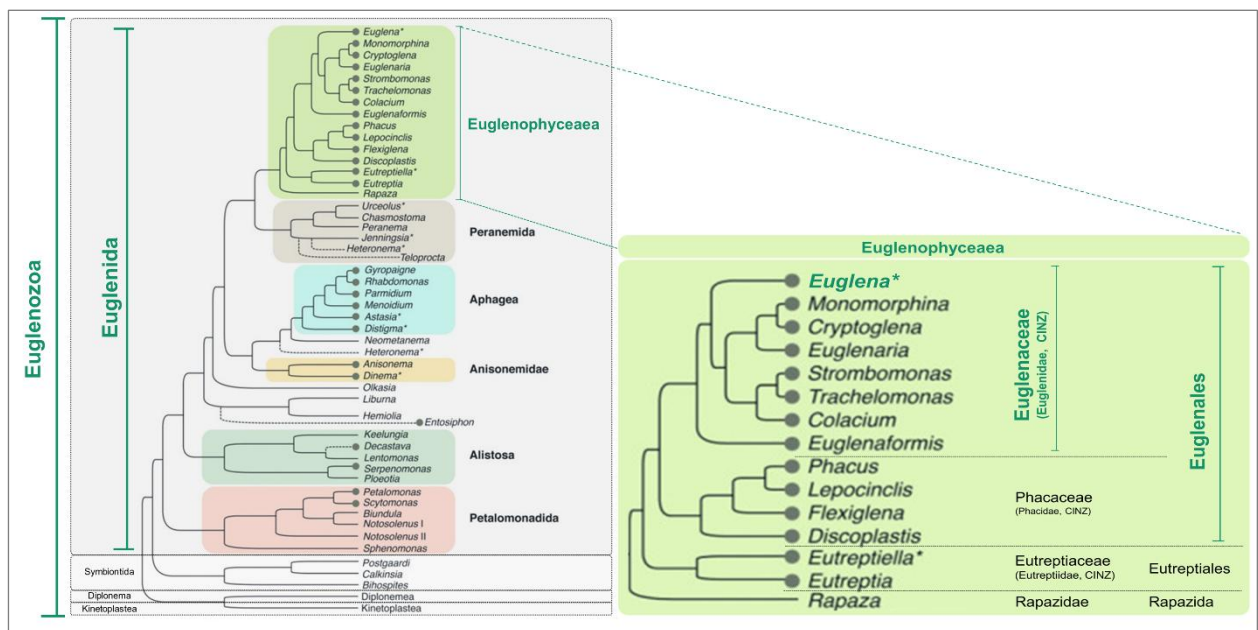


Figura 1.2 Resumo da organização taxonômica do gênero *Euglena*. (Fonte: adaptado de Kostygov *et al.* (2021). CINZ: Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Asterisco (*) indica gêneros polifiléticos.

Entretanto, *Euglena*, o oitavo gênero da família Euglenaceae, permanece classificado como um grupo polifilético (Kostygov *et al.*, 2021). Isso indica que suas espécies derivam de múltiplas linhagens ancestrais distintas, sem um ancestral comum único, refletindo assim a complexidade do seu processo evolutivo.

Essa complexidade evolutiva e taxonômica torna ainda mais necessária a adoção de abordagens modernas e colaborativas para aprofundar o conhecimento sobre o grupo e explorar

seu potencial biotecnológico. Em 2020, por exemplo, um grupo internacional de pesquisadores fundou a *Euglena International Network (EIN)*, reunindo cientistas, profissionais da indústria e parceiros com o objetivo de impulsionar as pesquisas sobre os euglenoides. Entre as principais iniciativas do grupo destaca-se o *Euglenoid Genomes Project (EGP)*, que visa sequenciar os genomas de quase 1000 espécies, promovendo uma compreensão mais ampla da biologia e evolução desses organismos, além de potencializar suas aplicações no manejo ecológico, no desenvolvimento ambiental e na exploração comercial de produtos derivados (Ebenezer *et al.*, 2022). Vale ressaltar que, embora não utilize técnicas moleculares, a presente pesquisa de doutorado também se alinha a essas abordagens, contribuindo para o avanço do conhecimento e das aplicações do grupo *Euglena*.

3.1.2 Características gerais

E. gracilis se destaca como um dos representantes mais estudados do grupo, sendo muito popular sua utilização no ensino da biologia e genética de protistas. Além disso, é considerada uma espécie-modelo em diversas pesquisas científicas e aplicações práticas, consolidando sua relevância no campo da biologia e ciências aplicadas.

A origem endossimbiótica e a diversidade genética conferem a esse eucarioto unicelular de vida livre notável plasticidade fisiológica e metabólica, o que possibilita sua ampla distribuição ecológica e geográfica. *E. gracilis* é reconhecida por sua excepcional resiliência a diversos estressores externos, incluindo condições de crescimento ácidas, elevados níveis de nitrogênio e fosfato, carbono orgânico e metais pesados, além de condições anóxicas e óxicas, frequentemente letais para outros organismos aquáticos (Bernard e Guéguen, 2022; Butzke *et al.*, 2024; Ebenezer *et al.*, 2022; Farjallah *et al.*, 2024; Gissibl *et al.*, 2019; Khatiwada *et al.*, 2020a). Sua distribuição geográfica abrange nichos aquáticos e terrestres, com predominância em ambientes de água doce e registros em todos os cinco continentes, conforme o banco de dados *AlgaBase* (Guiry e Guiry, 2024).

Suas características morfológicas e anatômicas incluem células cilíndricas ou fusiformes, variando entre 40-100 µm de comprimento e 5-15 µm de largura, que apresentam como principais estruturas dois flagelos, um reservatório (vacúolo contrátil), um fotorreceptor e um estigma (*eyespot*) (Barsanti e Gualtieri, 2020; Kim *et al.*, 1998). Além disso, possui uma peculiar arquitetura de superfície celular chamada película (*pellicle*) (Barsanti e Gualtieri, 2020; Kim *et al.*, 1998). A **Figura 1.3** ilustra essas principais estruturas características de *E. gracilis*.

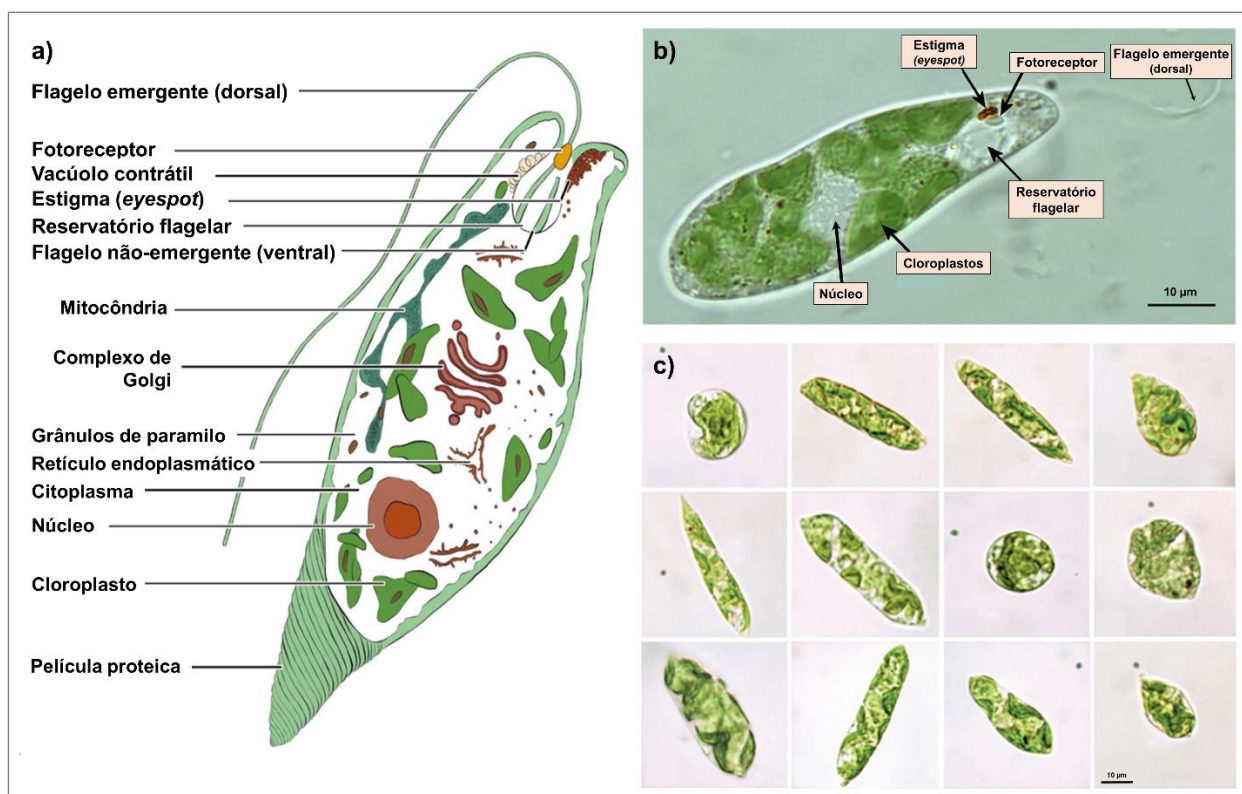


Figura 1.3 Representações morfológicas e anatômicas da microalga *E. gracilis* **(a)** Ilustração destacando a morfologia e principais estruturas celulares (Fonte: adaptado de Ebenezer *et al.*, 2022); **(b)** Imagem obtida por microscopia óptica, evidenciando detalhes estruturais característicos (Fonte: adaptado de Barsanti e Gualtieri, 2020); e, **(c)** Variedade de morfologias celulares (Fonte: adaptado de Noble *et al.*, 2014).

O aparelho flagelar de *E. gracilis* é composto por dois flagelos de diferentes comprimentos e estruturas: um ventral e outro dorsal. O flagelo ventral encontra-se confinado na região do reservatório, enquanto o flagelo dorsal, responsável pela locomoção da célula, é o único que emerge do corpo celular e possui comprimento aproximadamente igual ao do corpo celular. Dentro da membrana do flagelo dorsal, encontra-se o fotoreceptor, uma organela formada por cristais de proteínas fotorreceptivas (Barsanti e Gualtieri, 2020). O estigma, composto por grânulos ricos em β -caroteno, diatoxantina e diadinoxantina, localiza-se no reservatório, à frente do fotoreceptor (Barsanti e Gualtieri, 2020). A organização e dinâmica entre essas três estruturas (flagelo dorsal, fotoreceptor e estigma) constituem o aparato locomotor da espécie, alterando a orientação e a posição da célula no espaço por meio de movimentos helicoidais e rotação local (Barsanti e Gualtieri, 2020).

Outra característica marcante de *E. gracilis* é a ausência de parede celular, sendo substituída por uma complexa estrutura composta pela membrana plasmática e por estruturas proteicas flexíveis e elásticas, que surgem no canal flagelar e se estendem até a parte posterior da célula

(*pellicle*) (Barsanti e Gualtieri, 2020; Leander e Farmer, 2000). Essas estruturas deslizam umas sobre as outras, permitindo uma série de deformações coordenadas da célula, conhecidas como movimento euglenoide (Barsanti e Gualtieri, 2020). A película de *E. gracilis* apresenta uma das estriações mais finas entre as espécies de *Euglena*, densamente estriada em espiral, possibilitando movimentos e variações na forma da célula, como movimento peristáltico, curvamento, torção, arredondamento e alongamento (Barsanti e Gualtieri, 2020; Kim *et al.*, 1998). Essas mudanças de forma poder estar associadas ao seu relógio biológico, fotossíntese, respiração, ciclo celular e fatores ambientais. Por exemplo, *E. gracilis* assume forma cilíndrica durante o período de luz e esférica no final do ciclo escuro. Além disso, fatores como luz, temperatura, pH e concentração de cátions podem influenciar essas variações de forma (Li *et al.*, 2017).

Não há evidências consistentes de reprodução sexuada em *Euglena*, e a ausência desse tipo de reprodução é considerada uma característica própria dos euglenoides (Moestrup e Enevoldsen, 2019). A reprodução em *Euglena* ocorre de forma assexuada, predominantemente por fissão binária, na qual a célula se divide longitudinalmente, começando pela região do reservatório, originando dois indivíduos-filhos (Lukáčová *et al.*, 2023; Moestrup e Enevoldsen, 2019). Ainda, há o registro de uma forma atípica de divisão celular em *E. gracilis*, na qual três ou mais células se originam de uma única célula, permanecendo conectadas pelas extremidades posteriores e formando uma estrutura em forma de "estrela" (Lukáčová *et al.*, 2023) (**Figura 1.4**).

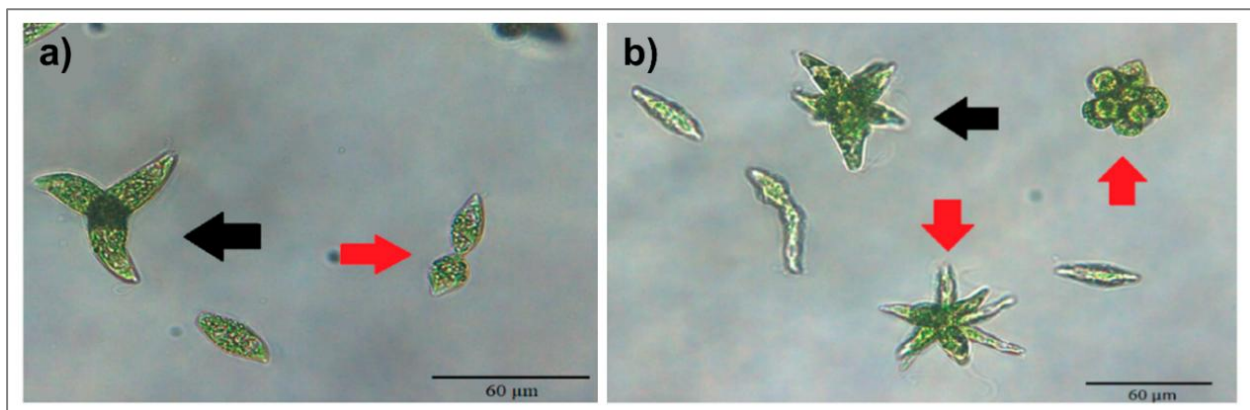


Figura 1.4 Formas de reprodução assexuada em *E. gracilis*. **(a)** Divisão celular normal (seta vermelha), divisão celular atípica, com três células-filhas surgindo de uma célula-mãe (seta preta), e células em fase de não divisão (sem seta); e, **(b)** Sete células-filhas (seta preta) e oito células-filhas (setas vermelhas) surgindo de uma célula-mãe (Fonte: Lukáčová *et al.*, 2023).

Cada uma dessas células apresenta um flagelo visível na extremidade anterior e um estigma durante o processo de divisão. Essa divisão parece ser essencialmente semelhante à fissão binária longitudinal, onde o número de núcleos na célula em divisão corresponde ao número de células-

filhas formadas. Essa divisão atípica foi registrada quando *E. gracilis* foi tratada com fenol, resultando em células viáveis e móveis (Lukáčová *et al.*, 2023). Essas observações contribuem para a ampliação das possibilidades de aplicação da espécie, como em estudos de toxicidade ambiental.

A maioria dos euglenozoários não possui plastídios; no entanto, a maior parte dos euglenídeos, incluindo *E. gracilis*, apresenta cloroplastos complexos, originados de um processo de endossimbiose secundária relativamente recente com uma alga verde (Lukáčová *et al.*, 2023). Essa característica, combinada a traços fagotróficos presumivelmente herdados de seu ancestral protista, permite que *E. gracilis* apresente modos de nutrição característicos tanto de plantas quanto de animais, abrangendo fotoautotrófico, heterotrófico e, adicionalmente, mixotrófico, que integra ambos os processos (Ebenezer *et al.*, 2017; Ebenezer *et al.*, 2022).

Como em outras microalgas fotossintetizantes, seu principal modo de nutrição é fotoautotrófico, no qual a luz solar e o dióxido de carbono são essenciais para produzir energia e moléculas orgânicas através da fotossíntese. No modo mixotrófico, ocorre a utilização tanto de carbono inorgânico quanto de carbono orgânico para a produção de biomassa e metabolitos, por meio das vias fotossintética e respiratória (Verma *et al.*, 2020). Alguns autores sugerem que a absorção de carbono orgânico do ambiente ocorre via osmose ou até mesmo pela ingestão de material orgânico por fagocitose (Barsanti e Gualtieri, 2020; Ebenezer *et al.*, 2017; Ebenezer *et al.*, 2022; Lukáčová *et al.*, 2023), embora não tenha sido encontrado trabalho que evidenciasse consistentemente essa característica.

Interessantemente, a presença de plastídios funcionais não é crucial para a sobrevivência de *E. gracilis*. Por exemplo, quando cultivada em uma fonte de carbono orgânico e no escuro, ela reduz seus cloroplastos a proplastídeos (formas imaturas ou iniciais dos plastídios), os quais, após exposição à luz, tornam-se cloroplastos fotossinteticamente competentes (Schwartzbach, 2017; Shao *et al.*, 2019). Esse processo é evidenciado por mutantes branqueados, como a cepa mutante não fotossintetizante *E. gracilis* WZSL, que perdeu a maior parte, senão todo, do seu genoma plastidial, mas ainda cresce de forma estável em condições heterotróficas (Schwartzbach, 2017). Além disso, quando exposta à radiação ultravioleta, substâncias químicas ou antibióticos, *E. gracilis* pode perder permanentemente seus cloroplastos, gerando mutantes branqueados capazes de crescer de forma consistente sob diversas fontes de carbono orgânico, como glicose, melão, etanol e extrato de levedura (Kuhne *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2018).

Os modos tróficos de cultivo são frequentemente estudados em relação ao metabolismo e à produtividade de *E. gracilis*, especialmente com o objetivo de encontrar meios de cultivo mais

econômicos e sustentáveis, capazes de suportar e maximizar a síntese de moléculas de interesse. Este tópico constitui um dos principais objetivos desta tese.

3.1.3 Compostos bioativos e suas aplicações biotecnológicas

A notável plasticidade fisiológica e metabólica de *E. gracilis*, reflexo de seu processo evolutivo, torna essa microalga uma fonte promissora de compostos bioativos, que incluem ácidos graxos saturados, mono- e poli-insaturados, aminoácidos, vitaminas (como as vitaminas C e E), além de biomoléculas exclusivas das espécies de *Euglena*, como o β -1,3-D-glucano (paramilo) e outras moléculas bioativas, como a euglenatídeo (Aldholmi *et al.*, 2022; Bedard *et al.*, 2024; Gissibl *et al.*, 2019; Hasan *et al.*, 2017; Kottuparambil *et al.*, 2019).

O conteúdo de carboidratos em *E. gracilis*, que varia de 8,8% a 66,5% (Alves *et al.*, 2023; Yan *et al.*, 2023), inclui monossacarídeos como xilose, manose, ramnose, glicose, fucose e galactose, os quais estão presentes na superfície celular (Bedard *et al.*, 2024). No entanto, o carboidrato de particular interesse é um polímero de alto peso molecular, composto por um β -1,3-D-glucano, encontrado associado aos pirenoídeos nos cloroplastos ou disperso no citoplasma (Barsanti e Gualtieri, 2020; Barsanti *et al.*, 2011; Monfils *et al.*, 2011) (**Figura 1.5**).

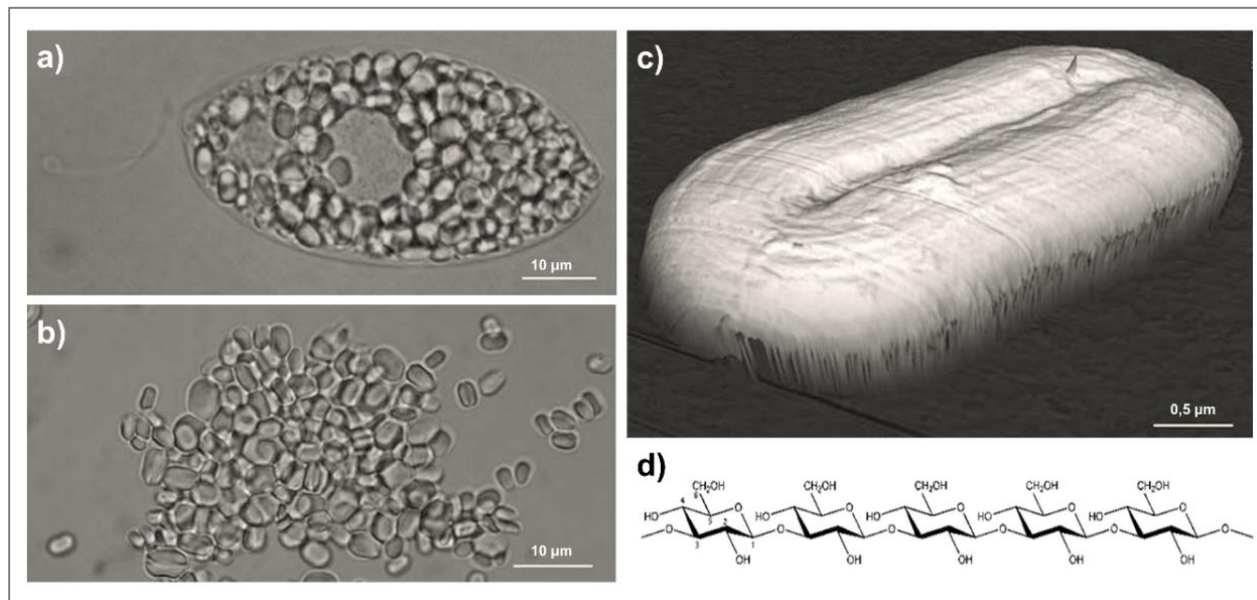


Figura 1.5 Paramilo de *E. gracilis*. a) Célula completamente preenchida com grânulos de paramilo; b) Grânulos isolados; c) Micrografia eletrônica de varredura de um grânulo mostrando a estrutura altamente ordenada de camadas concêntricas; e, d) Estrutura molecular (Fonte: Barsanti *et al.*, 2011).

Chamado de paramilo, esse polissacarídeo cristalino é a principal reserva energética da microalga, representando até 95% da massa celular quando cultivada na presença de fontes adequadas de carbono (Barsanti e Gualtieri, 2020; Barsanti *et al.*, 2011). O paramilo tem ganhado crescente interesse devido às suas propriedades biológicas, como ação antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de proteção em lesões hepáticas e de pele, atividade anti-inflamatória e imunomodulatória (Barsanti e Gualtieri, 2019; Sugiyama *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2018). Além disso, tem sido sugerida sua função como elicitador, alterando as reações fisiológicas e os níveis hormonais nas plantas, o que melhora sua resistência a estresses bióticos e abióticos (Naaz *et al.*, 2024).

O conteúdo lipídico varia de 6,8% a 29,5% (Alves *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2023). Especialmente sob condições anaeróbicas, *E. gracilis* sintetiza compostos formados por ácidos graxos saturados com cadeias de 10 a 18 carbonos, sugerindo seu potencial como candidato para biocombustíveis (Inui *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2023; Tucci *et al.*, 2010). Em 2021, a empresa Euglena Co., Ltd. anunciou o primeiro voo de um jato que utilizou um combustível renovável chamado SUSTEO (“Sustainable Oil”), derivado de óleos de cozinha usados e de lipídios extraídos de *Euglena*. O uso desse biocombustível está sendo expandido gradualmente para ônibus, balsas e aviões no Japão (Euglena Co., Ltd., 2024). Já em condições aeróbicas, *E. gracilis* é reconhecida por apresentar um perfil de ácidos graxos ricos em ômega-3, especialmente ácido docosa-hexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA), moléculas amplamente reconhecidas pela atividade antioxidante (Banskota *et al.*, 2019; Conde *et al.*, 2021).

A espécie também é conhecida por produzir uma biomassa com significativo teor proteico, variando de 23,3% a 53%, e contemplando todos os nove aminoácidos essenciais (Alves *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2023). Os aminoácidos derivados de microalgas, além de seu potencial antioxidante, têm sido identificados como a principal categoria associada às propriedades bioestimulantes de plantas (Kapoore *et al.*, 2021; Santini *et al.*, 2021; Terriente-Palacios *et al.*, 2022).

E. gracilis é um dos poucos microrganismos capazes de acumular vitaminas e moléculas como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e β -caroteno. Essas moléculas, que fazem parte do metabolismo secundário da microalga, são responsáveis por proteger os cloroplastos e outras estruturas fotossintéticas dos danos causados por espécies reativas de oxigênio. Além disso, elas constituem rotas bioquímicas e são precursores de outras moléculas importantes à microalga. Vitaminas são amplamente utilizadas na prevenção de várias doenças e promoção da saúde humana. A vitamina C, por exemplo, desempenha um papel vital na prevenção

do escorbuto, sendo especialmente importante, já que os humanos não conseguem produzi-la diretamente (Gallie, 2013). O β -caroteno atua como agente antioxidante, sendo importante para a manutenção da saúde ocular, regulação do sistema imunológico e integridade da pele, além de também ser precursor da vitamina A (retinol) (Huang *et al.*, 2023). A vitamina E também apresenta um efeito antioxidante e é vital para reduzir o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, além de ter propriedades anti-inflamatórias e auxiliar na prevenção da doença de Alzheimer (Saldeen e Saldeen, 2005).

Recentemente, em culturas de *E. gracilis* mantidas em meio sintético e sob condições controladas, como exposição à luz, limitação de nitrogênio e adição de ácido glutâmico, foram descritas cinco novas biomoléculas, denominadas euglenatídeos A-E (Aldholmi, 2020) (**Figura 1.6**).

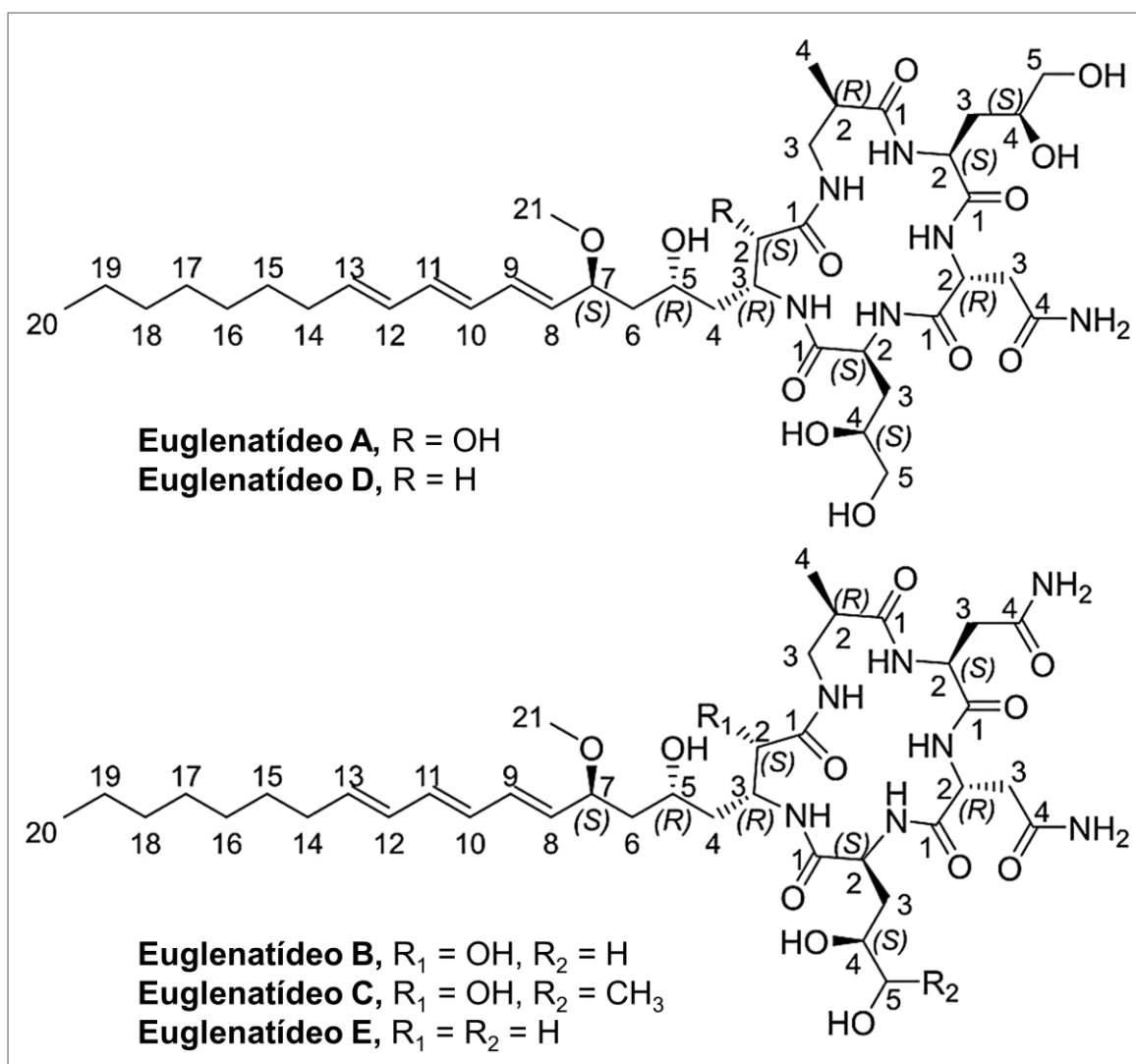


Figura 1.6 Estruturas químicas e configurações propostas para os euglenatídeos A-E (Fonte: adaptado de Aldholmi, 2020).

Esses metabólitos apresentaram semelhanças estruturais com compostos isolados do nematoide *Caenorhabditis elegans* (Aldholmi, 2020); no entanto, devido a características distintas, como a presença de pelo menos um resíduo de asparagina (Asn) e resíduos de aminoácidos incomuns – incluindo ácido β -aminoisobutírico (BAIBA), ácido β -amino-2,5-diidroxi-7-metoxi-8,10,12-eicosatrienoico (gracilina – Gra), ácido β -amino-5-hidroxi-7-metoxi-8,10,12-eicosatrienoico (DeoxyGra), 4,5-diidroxinorvalina (Dnv) e 4,5-diidroxinorleucina (Dnl) –, os euglenatídeos são, até então, descritos como exclusivos de *E. gracilis*. Por se tratar de uma descoberta recente, a função específica dos euglenatídeos ainda não foi completamente elucidada. No entanto, peptídeos estruturalmente semelhantes já demonstraram importantes atividades biológicas, como citotoxicidade contra células de câncer de mama, atividade antifúngica contra *Aspergillus sp.* e ação anti-helmíntica (Aldholmi, 2020; Aldholmi et al., 2022). Esses achados reforçam o potencial de *E. gracilis* como uma fonte promissora de novos produtos naturais, ampliando suas aplicações em biotecnologia e abrindo caminhos para o desenvolvimento de novas soluções terapêuticas e industriais.

Pesquisas sobre as propriedades de *E. gracilis* não são recentes, tendo iniciado na década de 1970 e gerando, desde então, um crescente interesse comercial por esta microalga (Suzuki, 2017). Em 2005, Euglena Co., Ltd., localizada na ilha de Ishigaki, Japão, tornou-se a primeira empresa a explorar a produção em larga escala de *E. gracilis*, inicialmente para bioprodutos alimentícios e, mais recentemente, para o desenvolvimento de cosméticos. A Euglena Co., Ltd. se destaca como líder na produção e comercialização de bioprodutos à base dessa microalga, utilizando uma estratégia conhecida como “*5Fs of Biomass*”, que descreve cinco formas de utilização da biomassa, classificadas por ordem de valor comercial (do maior para o menor): alimentos, fibras, ração animal, fertilizantes e combustível (*‘5Fs’ do inglês Food, Fiber, Feed, Fertilizer e Fuel*) (Suzuki, 2017) (**Figura 1.7**). Essa abordagem visa maximizar o valor dos produtos derivados de *Euglena*.

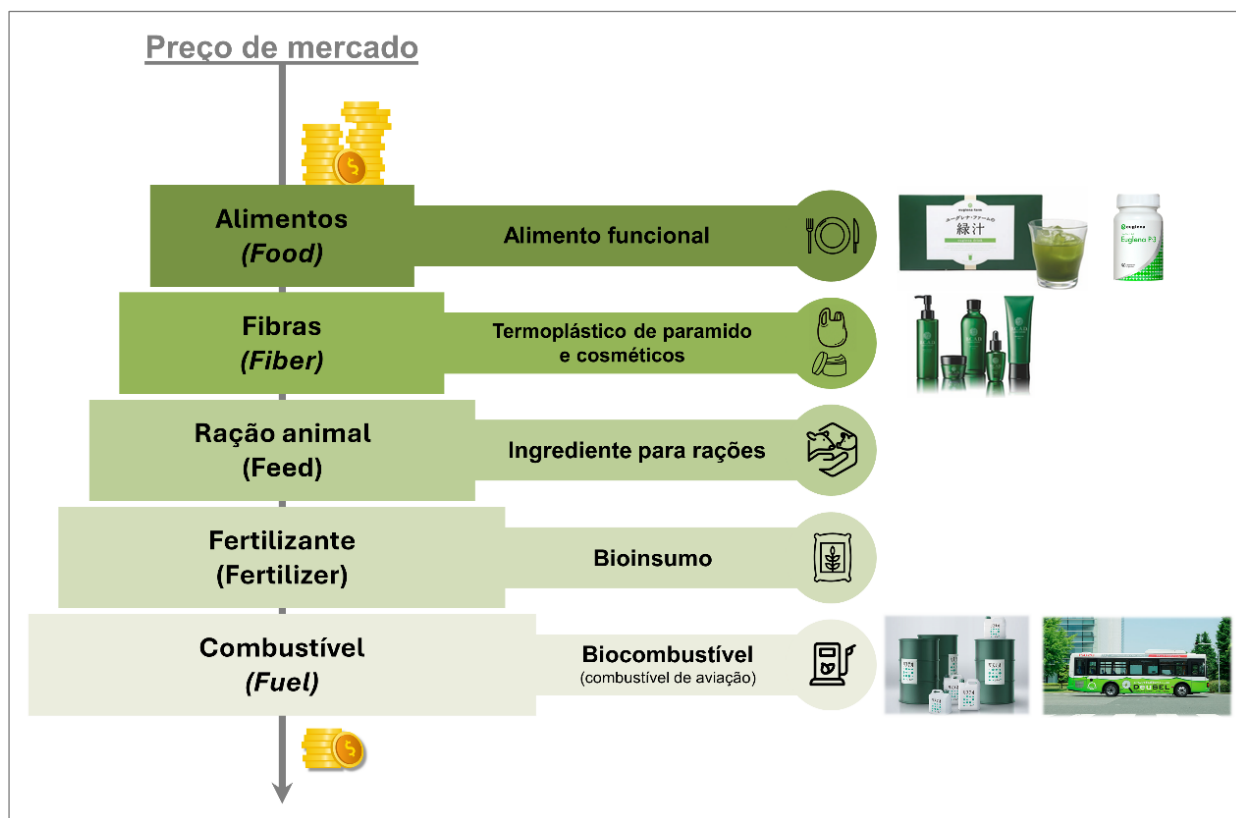


Figura 1.7 Estratégia "5Fs of Biomass", indicando as cinco utilizações principais da biomassa de *Euglena*: alimentos (*food*), fibras (*fiber*), ração animal (*feed*), fertilizante (*fertilizer*) e combustível (*fuel*) (Fonte: adaptado de Suzuki, 2017).

Os avanços científicos em torno de *E. gracilis* levaram à sua certificação como aditivo alimentar "*Generally Recognized as Safe*" (GRAS) pela Food and Drug Administration (2017) dos Estados Unidos em 2017. Além disso, em 2023, a microalga recebeu o status de "*novel food*" na União Europeia, conforme o Regulamento 2015/2283, com aprovação da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (ESFA, 2023). Esse reconhecimento e regulamentação internacional possibilitaram a diversificação de produtos comerciais derivados de *E. gracilis*. A Euglena Co., Ltd. lidera a produção e comercialização desses produtos, incorporando o pó de *E. gracilis* em uma ampla variedade de alimentos e bebidas.

A ausência de parede celular tem sido apontada como uma vantagem adicional para o desenvolvimento desses bioprodutos, facilitando a digestibilidade dos derivados. Estudos indicam que o consumo do pó de *Euglena*, originado de seus bioprodutos comerciais, apresenta respostas relacionadas ao fortalecimento da função imunológica e à melhora da saúde intestinal humana (Nakashima *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2023). Ademais, bioprodutos comerciais de *E. gracilis* demonstram potencial como suplementos proteicos nas dietas de ruminantes, promovendo a melhoria da fermentação no rúmen (Aemiro *et al.*, 2017).

3.1.4 Outras aplicações

Além da síntese de biomoléculas bioativas, as características genéticas e a plasticidade metabólica de *E. gracilis* estendem sua aplicação para bioensaios ecotoxicológicos, estudos de agentes mutagênicos e antimutagênicos, bem como na biorremediação de ambientes contaminados. Tais aplicações conferem valor à sua biomassa viva e íntegra, expandindo significativamente o leque de possibilidades para seu uso em diferentes contextos científicos e industriais.

No monitoramento ambiental, *E. gracilis* destaca-se em bioensaios ecotoxicológicos devido ao seu modo de reprodução, sensibilidade e rápida resposta a estressores ambientais, como poluentes. Essas propriedades a tornam uma ferramenta eficaz para avaliar a qualidade de águas superficiais e subterrâneas, bem como para investigar a toxicidade de diversos compostos, incluindo metais pesados, pesticidas, herbicidas e outras substâncias naturais ou sintéticas (Khatiwada *et al.*, 2020b; Lukáčová *et al.*, 2023).

Outra importante aplicação da microalga está relacionada a estudos de agentes mutagênicos e antimutagênicos. O genoma plastidial de *E. gracilis* é altamente sensível a fatores físicos, como radiação ultravioleta e calor, e químicos, como antibacterianos. Sob exposição a esses estressores, observa-se a perda seletiva de genes plastidiais e a inibição da fotossíntese, embora seu crescimento celular e viabilidade permaneçam inalterados, especialmente na presença de carbono orgânico disponível (Schwartzbach, 2017; Shao *et al.*, 2019). Essa peculiaridade posiciona *E. gracilis* como uma ferramenta valiosa para a triagem de compostos naturais e sintéticos de características mutagênicas e antimutagênicas (Lukáčová *et al.*, 2023).

No âmbito da biorremediação, o uso de microalgas em processos de tratamento de efluentes residuais já está bem estabelecido, com diversas espécies demonstrando eficiência em escalas industriais. Estudos laboratoriais vêm demonstrando o potencial de *E. gracilis* para a remoção de nutrientes. Kuroda *et al.* (2018) observaram uma redução de até 55% no carbono orgânico dissolvido em águas residuais tratadas com essa microalga. Kim *et al.* (2021) reportaram remoções de demanda química de oxigênio (DQO) variando entre 23-39% em águas residuais do processamento de tomate. Nezbrytska *et al.* (2022) demonstraram remoções de 63% de amônio e 96-100% de fosfato em águas residuais sintéticas domésticas utilizando a cepa *E. gracilis* Klebs HPDP-114. Adicionalmente, Mahapatra *et al.* (2013) relataram remoções de 98% de amônio e 85% de fosfato ao cultivarem uma cepa selvagem de *Euglena sp.* em águas residuais domésticas.

Além da remoção de nutrientes e poluentes orgânicos, estudos vêm sendo conduzidos demonstrando que *E. gracilis* apresenta mecanismos eficientes para a remediação de metais

pesados. *E. gracilis* demonstrou tolerância a Pb^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} , com destaque para sua elevada tolerância ao Cd^{2+} , sendo classificada como uma hiper-acumuladora desse metal (Khatiwada *et al.*, 2020a). Foi observado ainda um aumento na abundância de proteínas contendo tiol, glutatona e γ -glutamilcisteína durante a exposição a esses metais, sugerindo que essa espécie é capaz de orquestrar proteção celular contra íons metálicos por meio de quelantes. Isso não só contribui para a descontaminação de ambientes, mas também representa a possibilidade da recuperação de metais de interesse industrial.

Desta forma, o uso de águas residuais no cultivo de *E. gracilis* insere-se na bioeconomia circular, transformando resíduos em biomassa rica em compostos valiosos e bioativos. Essa abordagem sustentável reduz custos, amplia o potencial econômico da biomassa e promove uma cadeia produtiva mais competitiva e eficiente.

Ainda, a potencialidade de *E. gracilis* tem sido explorada até mesmo em missões espaciais. Em dezembro de 2018, o Centro Aeroespacial Alemão (DLR) lançou o satélite Eu:CROPIS (*Euglena and Combined Regenerative Organic-Food Production in Space*), com o objetivo de desenvolver um sistema autossustentável de suporte à vida no espaço, capaz de reciclar resíduos biológicos para cultivar alimentos frescos. Esse sistema não só beneficiaria astronautas em missões de longa duração, mas também pessoas em habitats terrestres extremos. O satélite foi equipado com duas estufas, cada uma contendo um sistema simbiótico composto por bactérias em um biofiltro, *E. gracilis*, urina sintética e sementes de tomate. A microalga foi avaliada em dois aspectos principais: primeiro, sua capacidade de fornecer oxigênio, especialmente enquanto as plantas ainda não realizavam fotossíntese; e, em segundo lugar, sua habilidade em desintoxicar o sistema, quebrando os altos níveis de amônia provenientes da urina, protegendo o ambiente e convertendo o excesso de amônia em formas de nitrogênio assimiláveis pelas plantas. O experimento, realizado sob condições de gravidade lunar e marciana, visava preparar o terreno para o fornecimento de alimentos a astronautas em missões espaciais de longa duração. A missão Eu:CROPIS foi concluída em dezembro de 2019, e a microalga manteve-se ativa sob condições de gravidade lunar e marciana (Hauslage *et al.*, 2018).

A **Figura 1.8** resume as principais aplicações e potencialidades industriais já descritas para *E. gracilis*.

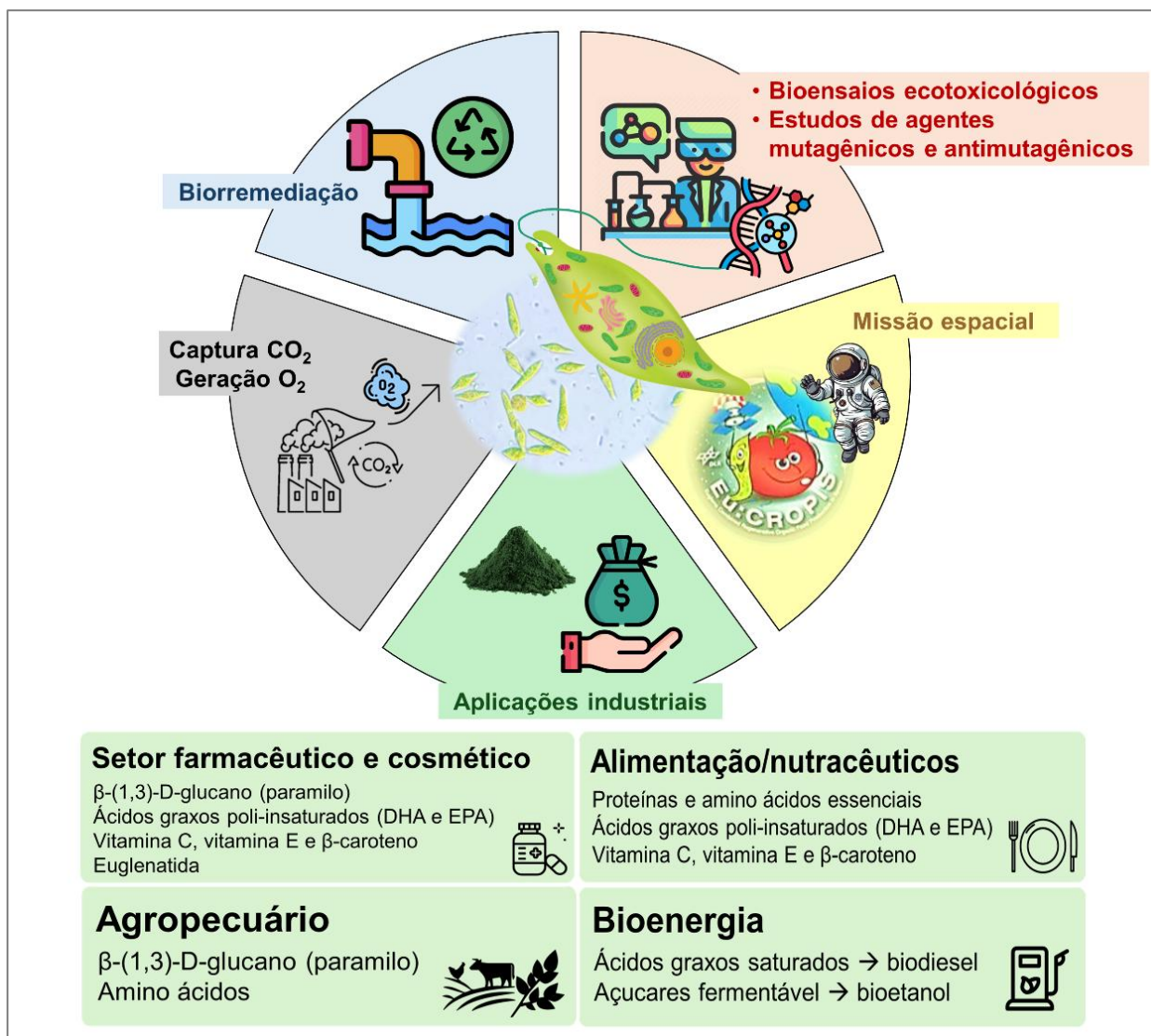


Figura 1.8 Ilustração das principais aplicações e potencialidades atribuídas à *E. gracilis*.

3.2 Microalgas e os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) formam uma agenda global composta por 17 metas interconectadas, com o propósito de promover um desenvolvimento equilibrado nas esferas social, econômica e ambiental. Esses objetivos abordam questões urgentes, como a erradicação da pobreza, a redução das desigualdades, a promoção de práticas de consumo e produção sustentáveis, a ação contra as mudanças climáticas e a preservação dos ecossistemas (Organização das Nações Unidas no Brasil, 2024).

As microalgas se destacam em diversas frentes, sendo relevantes (I) do ponto de vista ecológico, por sua função como produtoras primárias de energia e suas elevadas taxas de fotossíntese, contribuindo para a fixação de CO₂ e a mitigação dos gases de efeito estufa, além de sua importância na cadeia trófica; (II) na manutenção e melhoria da qualidade ambiental,

aplicando-se em processos de biorremediação e tratamento de águas residuais; e (III) no potencial biotecnológico, com sua biomassa servindo como matéria-prima para o desenvolvimento de bioprodutos e aplicações industriais.

Observa-se uma tendência crescente de pesquisas que associam as microalgas aos ODS, sendo frequentemente apontadas por diversos estudiosos como uma estratégia promissora para contribuir, direta ou indiretamente, para o alcance dessas metas (Bourgougnon *et al.*, 2021; Harada *et al.*, 2020; Olabi *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023) (**Figura 1.9**).



Figura 1.9 Representação do vínculo entre as pesquisas e as aplicações baseadas em microalgas com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Fonte: adaptado de Singh *et al.*, 2023).

Neste contexto, ao investigar o cultivo de *E. gracilis* em meios alternativos e naturais, o tratamento de efluentes e a recuperação de biomassa para aplicações biológicas, este trabalho visa não apenas expandir o conhecimento sobre a biotecnologia de microalgas, mas também promover soluções inovadoras que se mantenham alinhadas aos ODS.

A pesquisa contribui para o **ODS 2, "Fome Zero e Agricultura Sustentável"**, ao fornecer uma base para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis, integrando microalgas como bioestimulantes em sistemas agrícolas. Além disso, sendo uma biomassa rica em proteínas,

aminoácidos essenciais e outros compostos, a pesquisa busca fornecer uma base científica para o desenvolvimento de suplementos alimentares capazes de substituir fontes de proteína animal, contribuindo assim para o fortalecimento da segurança alimentar. Conectando-se ao **ODS 6, "Água Potável e Saneamento"**, a proposta do uso de microalgas no tratamento de efluentes não apenas melhora a qualidade da água, mas também contribui para a gestão sustentável dos recursos hídricos. O uso de microalgas no tratamento de efluentes também está relacionado ao **ODS 11, "Cidades e Comunidades Sustentáveis"**, que visa tornar as cidades mais inclusivas, seguras, resilientes e sustentáveis. Essa aplicação possibilita a reutilização de águas residuais urbanas como alternativa para o cultivo de biomassa, promovendo soluções sustentáveis para o manejo de recursos hídricos urbanos. No âmbito do **ODS 12, "Consumo e Produção Responsáveis"**, o estudo busca contribuir para o desenvolvimento e diversificação de bioprodutos por meio de uma gestão mais sustentável dos recursos naturais. O ODS 12 também trata do *“manejo ambientalmente responsável de produtos químicos e resíduos; da redução significativa de poluentes no ar, na água e no solo; redução na geração de resíduos por meio da prevenção, reciclagem e reuso”*. Neste sentido, adoção de tecnologias analíticas, como a espectroscopia FTIR, reforça o compromisso com processos investigativos que priorizam a redução de resíduos de forma significativa e sustentável. Além disso, pesquisas com microalgas de modo geral alinham-se ao **ODS 13, "Ação Contra a Mudança Global do Clima"**, ao reconhecer o papel das microalgas na captura de CO₂ e na mitigação de gases de efeito estufa. Ela também contribui para o **ODS 14, "Vida na Água"**, ao promover a proteção e o uso sustentável de ecossistemas aquáticos, e para o **ODS 15, "Vida Terrestre"**, incentivando práticas que favorecem a preservação de ecossistemas terrestres e a biodiversidade.

3.3 Oportunidades na exploração biotecnológica de *E. gracilis*

Diante do exposto, é inegável o vasto potencial biotecnológico de *E. gracilis*. No entanto, ainda existem lacunas que podem ser mais bem exploradas para maximizar as aplicações dessa biomassa, sendo essas lacunas o ponto de partida para o desenvolvimento da presente tese.

Para ilustrar esse panorama, realizou-se uma busca na base de dados Scopus utilizando os termos *"microalgae" OR "microalga" AND "biostimulant" AND "agriculture"*. Foram encontrados 66 documentos, com um aumento significativo no número de publicações a partir de 2022. Ao incluir os termos *"Chlorella" OR "Arthrospira"*, foram identificados 23 documentos, com destaque para o crescimento expressivo das publicações: de 1 em 2022, para 7 em 2023 e 9 em 2024.

Contudo, ao refinar a pesquisa especificamente para *Euglena*, apenas 5 documentos foram encontrados, evidenciando que esse campo ainda está em estágio inicial de exploração científica.

Entretanto, esses estudos concentram-se predominantemente no paramilo. Por exemplo, Scartazza *et al.* (2017) demonstraram os efeitos dose-dependentes do paramilo no conteúdo hormonal da seiva do xilema, no desempenho fotossintético e na tolerância à desidratação de tomates (*Solanum lycopersicum*). Barsanti *et al.* (2019) investigaram o impacto do paramilo purificado de *E. gracilis* na resistência à seca e na qualidade dos frutos, confirmando sua eficácia como bioestimulante ao aumentar a capacidade adaptativa das plantas a estresses abióticos. Mais recentemente, Naaz *et al.* (2024) destacou as “*maravilhas do paramilo*” em um capítulo de livro, evidenciando sua aplicação como bioestimulante para melhorar a resistência das plantas a condições adversas, como salinidade, seca, deficiência de nutrientes e altas temperaturas. Os outros dois estudos não abordam diretamente a aplicação como bioestimulante, explorando temas como o tratamento de águas residuais e o papel de *E. gracilis* no contexto dos ODS (Harada *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2024). Além disso, fora da base Scopus, foram identificadas patentes relacionadas ao uso de *E. gracilis* ou paramilo como bioestimulantes para o crescimento e proteção de plantas (Fuerst, 2018; Levine *et al.*, 2018). Um estudo também investigou os efeitos bioestimulantes de *Euglena sp.* cultivada em soro de leite microfiltrado na germinação de sementes de agrião (Foglio *et al.*, 2022). Contudo, esses documentos não aprofundam os possíveis mecanismos de ação, reforçando a necessidade de maior investigação científica.

Esses dados demonstram o crescente interesse no uso de microalgas como bioprodutos agrícolas. Contudo, enquanto espécies como *Chlorella* e *Arthrospira* recebem ampla atenção, ainda existe uma lacuna em estudos que explorem outras biomassas, particularmente *E. gracilis*.

O presente trabalho, ao integrar a obtenção de bioprodutos a partir de biomassa cultivada em águas residuais, representa uma oportunidade de agregar valor aos recursos utilizados. Essa abordagem está alinhada aos princípios da bioeconomia circular, que busca maximizar o uso de recursos biológicos, promover a reutilização de resíduos e criar sistemas produtivos mais eficientes e sustentáveis. No contexto da agricultura, isso implica não apenas em reduzir a dependência de insumos químicos tradicionais, mas também em adotar práticas que fechem ciclos de matéria e energia, tornando o setor mais resiliente e adaptado às demandas ambientais.

No contexto brasileiro, essa perspectiva ganha ainda mais relevância com a criação do Programa Nacional de Bioinsumos (PNB), instituído pelo Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 (Brasil, 2020). O PNB representa um marco importante na promoção e regulamentação do uso de bioinsumos — produtos biológicos derivados de organismos vivos, como microalgas,

fungos, bactérias, entre outros. O objetivo do programa é substituir os insumos químicos tradicionais, fomentando uma agricultura mais sustentável e alinhada a sistemas agrícolas de baixo impacto ambiental. Portanto, aprofundar o conhecimento sobre as propriedades de *E. gracilis* e superar os desafios relacionados à sua produção e aplicação pode abrir caminhos para práticas agrícolas inovadoras e sustentáveis, atendendo às demandas globais e nacionais por uma agricultura mais verde.

Ao integrar o tratamento de efluentes à geração de biomassa com potencial para aplicações biotecnológicas, buscamos promover a reutilização de recursos e a valorização de subprodutos, alinhando-nos às exigências de sustentabilidade ambiental e econômica. No entanto, para que essa abordagem seja plenamente eficiente e sustentável, é fundamental que as técnicas e metodologias utilizadas durante a análise da biomassa também reflitam os mesmos princípios ecológicos e de baixo impacto. Neste sentido, a escolha de ferramentas analíticas adequadas se torna crucial para garantir que o processo como um todo seja ambientalmente responsável e eficaz. Neste contexto, esta tese propõe a espectroscopia no infravermelho (FTIR) como uma técnica analítica verde, destacando sua aplicação na caracterização da biomassa de *E. gracilis*. A espectroscopia FTIR oferece análises rápidas, precisas e não destrutivas, permitindo a obtenção de informações detalhadas sobre a composição química e as propriedades da biomassa antes da aplicação de métodos tradicionais, frequentemente mais complexos ou dispendiosos. Essa abordagem não só otimiza o uso de recursos, reduzindo custos com reagentes, energia e insumos, mas também minimiza o impacto ambiental ao evitar a geração de resíduos desnecessários. Mais do que uma ferramenta prática, esta pesquisa propõe uma reflexão mais ampla sobre como a sustentabilidade pode ser incorporada não só nas aplicações de microalgas, mas também nos métodos científicos utilizados para estudá-las. Ao adotar técnicas como a FTIR, promovemos uma prática científica que alia inovação tecnológica à responsabilidade ambiental, essencial para o avanço de uma ciência comprometida com a bioeconomia circular e o desenvolvimento sustentável.



CAPÍTULO II

Materiais e métodos



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microalga

A microalga *Euglena gracilis* (Euglenaceae), originalmente coletada e isolada de uma lagoa localizada na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil (29° 43' 16.88"S - 53° 42' 55.71"W), foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Ficologia da mesma Universidade (**Figura 2.1**).

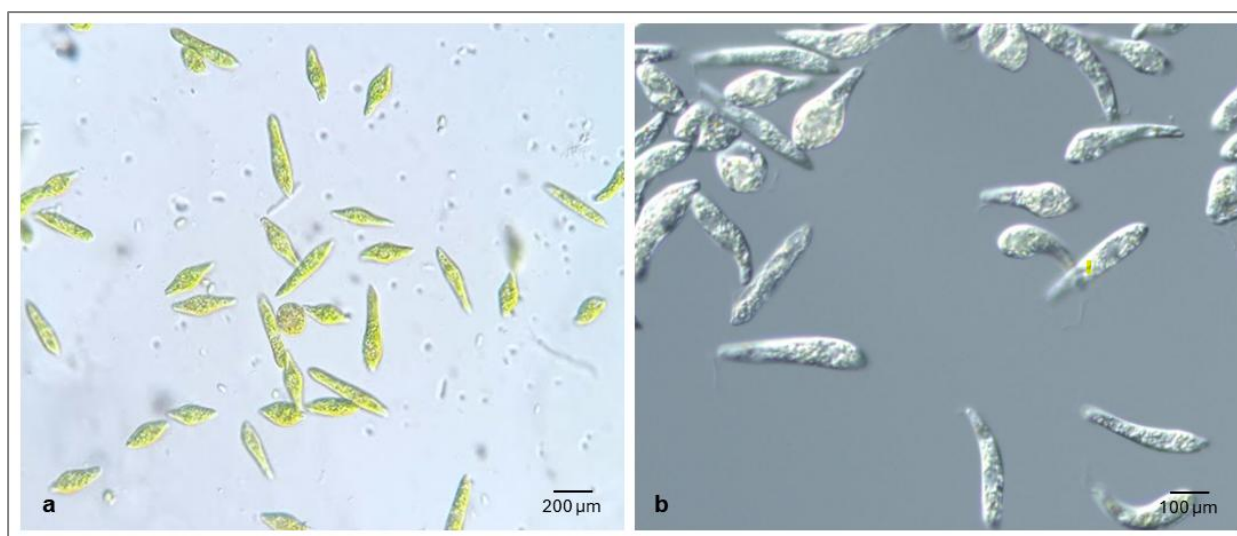


Figura 2.1 Imagens microscópicas da microalga *E. gracilis* obtidas através de **(a)** microscopia óptica com aumento de 400x; e, **(b)** microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

Este isolado apresenta certificado de acesso ao patrimônio genético brasileiro, emitido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número A863DC8. A confirmação de sua identificação foi realizada por sequenciamento genético da região 18S do rDNA, em colaboração com o Laboratório Colaborativo Green Ocean Technologies and Products (GreenCoLab), em Faro, Portugal (**Figura 2.2**).

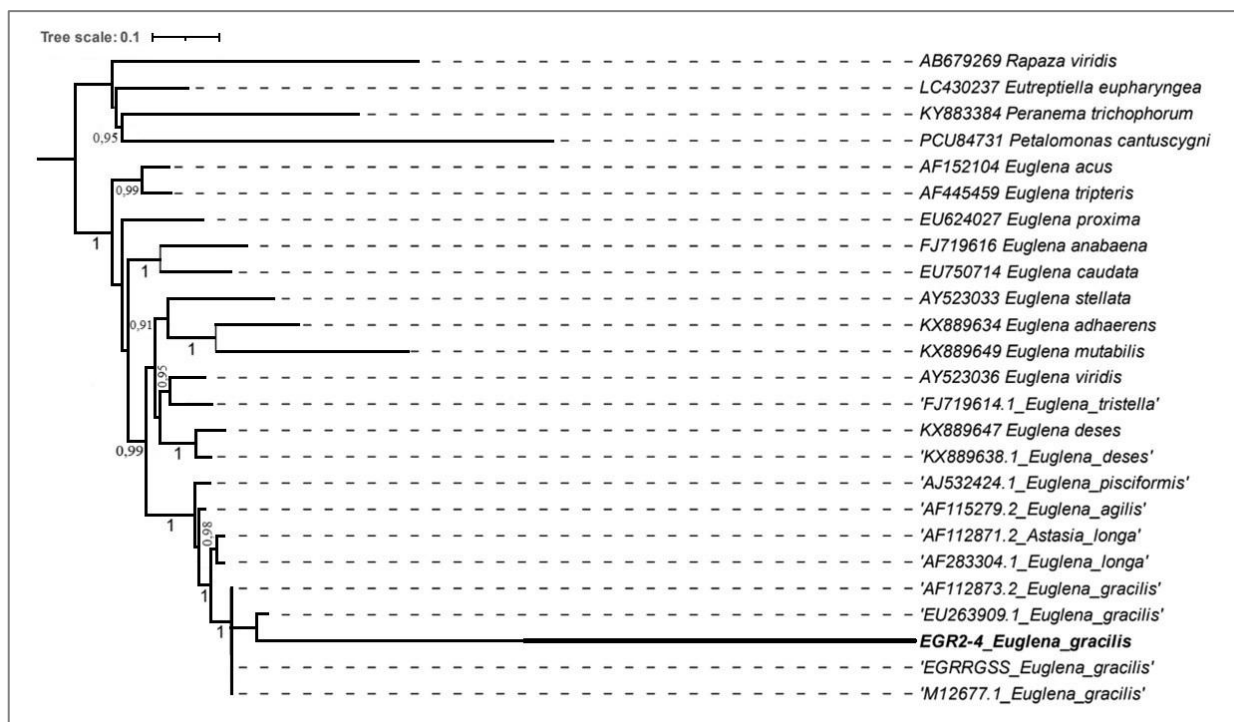


Figura 2.2 Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança (MV), onde o isolado EGR aparece em cluster junto com *E. gracilis*.

Os ensaios foram conduzidos no Parque Científico e Tecnológico da Universidade de Santa Cruz do Sul - Centro de Excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos (TecnoUnisc - CEPPOB), Rio Grande do Sul, Brasil, e no Laboratório Nacional de Energia e Geologia - Unidade de Bioenergia e Biorrefinaria (LNEG - UBB), Lisboa, Portugal.

4.2 Meios e condições de cultivo

Ao longo desta tese, *E. gracilis* foi cultivada e avaliada sob oito diferentes condições experimentais, utilizando meios de cultivo sintéticos e naturais.

Antes da condução dos ensaios, culturas-estoque foram mantidas em condições padronizadas para garantir a viabilidade e a saúde metabólica das células. Essas culturas foram mantidas em condições fotoautotróficas, em meio BG11 convencional, 21-23 °C, sob iluminação branca-fluorescente a 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e agitação suave (60 rpm), sendo subcultivadas a cada duas semanas para garantir uma população metabolicamente ativa e saudável. Para atender à preferência da *E. gracilis* por ambientes ácidos (Olaveson e Nalewajko, 2000), o pH das culturas-estoque foi ajustado para pH 4,5 utilizando uma solução aquosa de ácido fosfórico a 1% (H_3PO_4).

4.2.1 Meios de cultivo sintéticos

Os experimentos iniciais, que resultaram no artigo 1, foram conduzidos com o cultivo de *E. gracilis* em condições fotoautotróficas e mixotróficas, empregando três formulações distintas de meios sintéticos: (i) meio BG11 convencional (BG11) (Rippka *et al.*, 1979), (ii) meio BG11 adaptado e enriquecido com fertilizante mineral NPK (BG11NPK) (Gross, 2019), ambos destinados a apoiar o metabolismo fotoautotrófico, e (iii) o Meio Efluente Urbano Sintético (MEUS) (Ribeiro *et al.*, 2022), formulado para favorecer o metabolismo mixotrófico. A composição detalhada desses meios é apresentada na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 Composição dos meios de cultivo sintéticos BG11, BG11NPK e MEUS (mg L⁻¹).

Componente	BG11	BG11NPK	MEUS
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	1500	--	--
Fosfato de Potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	30	--	--
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	75	--	3
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	35	--	5
Carbonato de Sódio (Na ₂ CO ₃)	20	--	--
Na ₂ EDTA	1	--	--
Fertilizante mineral NPK*	--	480	--
Ácido cítrico	0,006	--	--
Citrato férrico de amônia	0,006	--	--
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	2,86	--	--
Cloreto de Manganês (II) (MnCl ₂ .4H ₂ O)	1,81	--	--
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,222	--	--
Molibdato de sódio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,39	--	--
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,079	--	--
Nitrato de cobalto (Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O)	0,0494	--	--
Solução de vitaminas **	Cloridrato de tiamina	100 µg	--
	Cloridrato de piridoxina	100 µg	--
	Cianocobalamina	5 µg	--
Fosfato de Potássio monobásico (KHPO ₄ .H ₂ O)	--	--	112
Ureia (NH ₂ CONH ₂)	--	--	30
Cloreto de Sódio (NaCl)	--	--	8
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	--	--	1,5
Cloreto de Cobre (CuCl ₂ .2H ₂ O)	--	--	0,05
Caseína Peptona	--	--	320
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	--	--	250
Extrato de Carne	--	--	220

BG11: meio BG11 convencional; BG11NPK: meio BG11 adaptado com fertilizante mineral NPK; e, MEUS: meio efluente urbano sintético. *Fertilizante mineral NPK contendo nitrogênio, fósforo e potássio nas concentrações de 12%, 11% e 18%, respectivamente (Yara Iberian S.A., Spain). **Solução de vitaminas obtida do medicamento Citoneurin® 5000.

Os componentes de cada meio foram dissolvidos em água deionizada (dH₂O) e esterilizados em autoclave (15 minutos, 121 °C, a 1 atm). Para prevenir contaminações fúngicas no MEUS, favorecidas pela presença de carbono, preparou-se uma solução-estoque de fluconazol a 1500 mg

L⁻¹ em água destilada (dH₂O). A solução foi esterilizada por filtração e adicionada às culturas para concentração final de 5 mg L⁻¹ (Luche, 2020).

Essa etapa experimental foi realizada em frascos de vidro estéreis de 50 mL de capacidade, com um volume de trabalho de 30 mL, organizados em alíquotas individuais para cada dia de coleta (triplicatas; **Figura 2.3**). O inóculo foi ajustado para uma densidade óptica inicial de 0,2 de absorvância (680 nm) e pH inicial de 4,5. Os experimentos foram monitorados durante 14 dias, com coletas realizadas sistematicamente a cada dois dias.



Figura 2.3 Cultivos de *E. gracilis* nos meios sintéticos BG11, BG11NPK e MEUS, incluindo (a) preparo das alíquotas; (b) incubação; e, (c-f) coletas para monitoramento.

4.2.2 Efluentes naturais

O estudo ainda avaliou a adaptação e a produtividade de *E. gracilis* em meios de cultivo naturais (efluentes), também investigando a eficiência da microalga na remoção de nutrientes — nitrogênio, fósforo e carbono orgânico — e na redução da coloração. Adicionalmente, foi explorado o potencial de aproveitamento da biomassa gerada em aplicações biológicas, com ênfase em seu uso como bioestimulante do crescimento vegetal (artigo 2). Essa etapa foi conduzida na Unidade de Bioenergia e Biorrefinaria do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG-UBB), Lisboa, Portugal, durante o período de doutorado-sanduíche (PDSE 01/2022).

Em virtude das pesquisas realizadas pelo grupo de pesquisa parceiro, empregou-se água residuária de suinocultura (ARS) como substrato natural para o cultivo de *E. gracilis*. A ARS utilizada foi coletada em uma lagoa de estabilização localizada na Valorgado, uma fazenda de suínos situada na Herdade do Pessegueiro, em Glória do Ribatejo, Portugal. Esse efluente é composto pela fração líquida dos dejetos suínos, formada a partir de uma mistura de fezes de suínos com a água utilizada para higienização das instalações, após a separação primária do material sólido.

No entanto, sabe-se que ARS apresenta elevados níveis de amônia, de sólidos suspensos, e elevada turbidez, fatores que representam desafios para o cultivo de microalgas. Assim, com frequência, empregam-se estratégias baseadas na diluição dos efluentes, com o objetivo de reduzir as concentrações de nutrientes tóxicos a níveis não inibitórios e de aumentar a disponibilidade de luz para as microalgas. Além disso, a integração com outros processos de pré-tratamento também é utilizada como estratégia para minimizar a toxicidade dos efluentes e garantir o crescimento ideal das microalgas. Neste sentido, o presente estudo utilizou duas formulações de ARS no cultivo de *E. gracilis*: (i) 25% de ARS bruta diluída em 75% de água de torneira (v:v), designada neste estudo como P25; e (ii) ARS bruta pré-tratada pelo processo oxidativo avançado foto-Fenton, conforme protocolo previamente estabelecido por Ferreira *et al.* (2022), designada como PF.

O processo foto-Fenton foi aplicado como etapa de pré-tratamento antes do cultivo com a microalga, com base em estudo anterior também conduzido pelo grupo de pesquisa parceiro. Nesse estudo, foram avaliados e comparados os processos de eletrocoagulação, desgaseificação de amônia, foto-Fenton e *wetlands* construídos como métodos de pré-tratamento para reduzir amônia, demanda química de oxigênio (DQO), cor e sólidos suspensos totais na ARS (Ferreira *et al.*, 2022). Esse estudo revelou que o processo foto-Fenton apresentou os melhores resultados entre os pré-tratamentos testados, especialmente quanto à oxidação das substâncias orgânicas, o que também

possibilitou um crescimento consistente e aumento na produtividade da microalga *Tetrademus obliquus* (Ferreira et al., 2022).

Como os meios naturais não apresentam uma composição definida, a composição química inicial das ARS utilizadas, em termos de demanda química de oxigênio, nitrogênio, fosfato, cor e pH, são apresentadas na **Tabela 2.2**. A tabela também fornece uma visão geral da composição da ARS bruta (não diluída e não tratada).

Tabela 2.2 Análise inicial da água residuária de suinocultura, incluindo demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), fosfato (PO_4^{3-}), cor e valores de pH.

	DQO (mg L ⁻¹)	NH ₃ /NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	Coloração (Abs 440nm)	pH
ARS Bruta	3101,27 (±89,21)	1113,00 (±29,70)	114,50 (±2,12)	3,681 (±0,038)	8,5 (±0,2)
P25	462,96 (±26,19)	241,50 (±23,91)	917,50 (±49,92)	0,209 (±0,003)	4,51 (±0,1)
PF	247,69 (±15,81)	798,00 (±25,56)	717,50 (±47,17)	0,087 (±0,003)	4,55 (±0,1)

ARS: água residual da suinocultura; P25: ARS diluída a 25%; e PF: ARS pré-tratada com o foto-Fenton. Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3).

É importante ressaltar que as concentrações de fosfato em P25 e PF estão consideravelmente mais altas do que na ARS bruta devido à adição de solução aquosa de H_3PO_4 1%, utilizada para ajustar o pH. Embora essa modificação não reflita os valores naturais de fosfato nas ARS, ainda foi possível determinar a eficácia de *E. gracilis* na absorção de fosfato em condições controladas, o que possibilitou avaliar seu potencial em processos de tratamento de água.

Essa etapa foi conduzida em fotobiorreatores em coluna de vidro de 1 L, com sistema de aeração do tipo *airlift* (PBR-AL), operados em duplicata e volume de trabalho de 900 mL (**Figura 2.4**). O inóculo foi ajustado para uma densidade óptica inicial de 0,4 de absorvância (680 nm) e pH inicial de 4,5. No presente estudo, o meio sintético BG11NPK foi utilizado como controle para crescimento e produtividade de biomassa. O experimento foi monitorado ao longo de 18 dias, com amostras coletadas a cada dois dias para avaliar os parâmetros da microalga, enquanto a caracterização do efluente foi realizada antes (dia 0) e após (dia 18) o cultivo de *E. gracilis*.

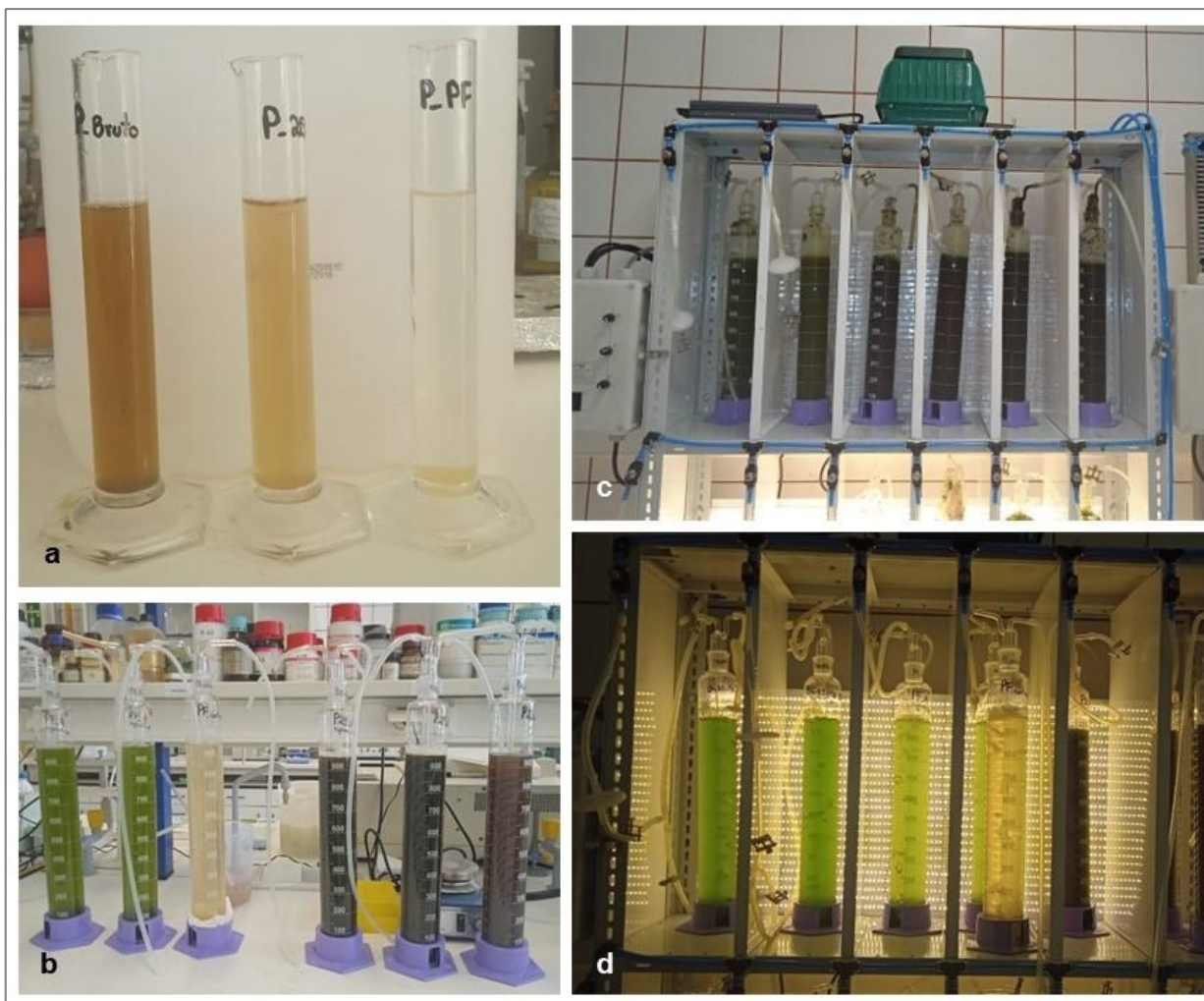


Figura 2.4 Cultivos de *E. gracilis* nas águas residuais da suinocultura (P25 e PF), realizados em fotobiorreatores em coluna de vidro com sistema de aeração do tipo *airlifts*. **(a)** características visuais das ARS; **(b)** preparo dos PBR-AL e inóculo; e, **(c-d)** incubação.

A **Tabela 2.3** apresenta um resumo dos meios e das condições de cultivo empregadas durante o estudo.

Tabela 2.3 Meios de cultivo e variáveis ambientais aplicadas no cultivo de *E. gracilis*.

	Modo de cultivo	Meio de cultivo	Fotoperíodo	Agitação	Iluminação
Sintéticos	Fotoautotrófico	BG11	24:0	AO (120 rpm)	LFB (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Fotoautotrófico	BG11	16:8	AO (120 rpm)	LFB (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Fotoautotrófico	BG11NPK	24:0	AO (120 rpm)	LFB (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Fotoautotrófico	BG11NPK	16:8	AO (120 rpm)	LFB (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Mixotrófico	MEUS	16:8	AO (120 rpm)	LFB (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Naturais	Fotoautotrófico	BG11NPK	24:0	PBR-AL (1.0 vvm)	LED-Branco (58 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Mixotrófico	P25	24:0	PBR-AL (1.0 vvm)	LED-Branco (58 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
	Mixotrófico	PF	24:0	PBR-AL (1.0 vvm)	LED-Branco (58 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

BG11: meio BG11 convencional; BG11NPK: meio BG11 adaptado com fertilizante mineral NPK; MEUS: meio efluente urbano sintético; P25: ARS diluída a 25%; e PF: ARS pré-tratada por foto-Fenton; AO: agitação orbital; PBR-AL: fotobiorreator *airlift*; e, LFB: lâmpada fluorescente branca.

4.3 Aclimação

A aclimação gradual das microalgas a novos meios de cultivo é considerada uma etapa crucial para minimizar estresses fisiológicos e metabólicos, especialmente quando cultivadas em meios com altas concentrações de nutrientes, como em efluentes. Esse processo não só favorece um crescimento mais saudável e estável, mas também melhora a eficiência na remoção de nutrientes (Li *et al.*, 2022; Rezaei *et al.*, 2019). Portanto, este estudo dedicou atenção ao processo de aclimação de *E. gracilis* aos diferentes meios testados.

Como mencionado anteriormente, até o início dos experimentos, culturas-estoque foram mantidas sob condições fotoautotróficas no meio BG11 convencional, e, a partir deste, a aclimação aos meios BG11NPK e MEUS seguiu os seguintes passos:

- Em meio BG11NPK: inoculação de 20% da cultura-estoque em um meio contendo 50% de BG11NPK, mantida por 10 dias. Posteriormente, foi realizada uma subcultura em 100% de BG11NPK, utilizando um inóculo de 20% da cultura anterior;
- Em MEUS: exigiu um período mais longo e começou com a inoculação de 20% da cultura estoque em um meio contendo 5% de MEUS por 10 dias. Em seguida, concentrações gradualmente crescentes de MEUS foram introduzidas, com subculturas semanais em concentrações de 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80% e finalmente 100% de MEUS, cada uma utilizando um inóculo de 20% da cultura anterior.

Considerando a boa adaptação de *E. gracilis* às condições fotoautotróficas em meio BG11NPK, essas culturas foram utilizadas como estoque para a aclimação aos efluentes suínos, P25 e PF, conforme descrito a seguir

- Em P25: inoculação inicial de 20% da cultura-estoque em um meio contendo 2,5% de ARS bruta (não estéril). Incrementos graduais na concentração de ARS foram realizados a cada duas semanas até atingir 25% de ARS bruto. Devido à observação de inibição do crescimento da microalga em concentrações mais altas, optou-se por manter a concentração final de trabalho em 25%;

- Em PF: o processo de aclimação seguiu uma abordagem similar à de P25. No entanto, considerando a menor carga orgânica e coloração desta ARS em comparação ao bruto, iniciou-se com a inoculação de 20% da cultura-estoque em 25% de PF diluído em água da torneira. Subculturas quinzenais foram realizadas em concentrações progressivas de 50%, 75% e, finalmente, 100% de PF, sempre utilizando um inóculo de 20% da cultura anterior.

Todos os processos de aclimação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 200 mL de cultura, mantidos a uma temperatura de 21-23 °C, agitação constante de 150 rpm e iluminação fluorescente branca de $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob respectivos ciclos de fotoperíodo. O pH foi ajustado para 4,5 com solução aquosa de H_3PO_4 a 1%. Durante todo o processo, a morfologia e a densidade celular das culturas foram monitoradas continuamente.

4.4 Procedimentos experimentais e analíticos

Os cultivos, devidamente aclimatados e mantidos por 15 dias nos respectivos meios e condições de cultivo, foram utilizados como pré-inóculo nos experimentos e avaliações subsequentes. Para isso, foi realizada uma série de protocolos com o objetivo de monitorar o crescimento e a produtividade das microalgas, caracterizar a biomassa, avaliar a remoção de nutrientes e investigar as atividades biológicas de interesse. A **Figura 2.5** apresenta um fluxograma que resume as etapas, procedimentos e metodologias adotadas para cada uma dessas avaliações.

Todos os procedimentos seguiram as metodologias científicas estabelecidas e estão detalhados em seus respectivos artigos científicos, dentro da seção de *Resultados e Discussão* da tese.

Explorando o potencial biotecnológico de *Euglena gracilis* como estratégia para inovações na produção de bioprodutos e soluções ambientais sustentáveis

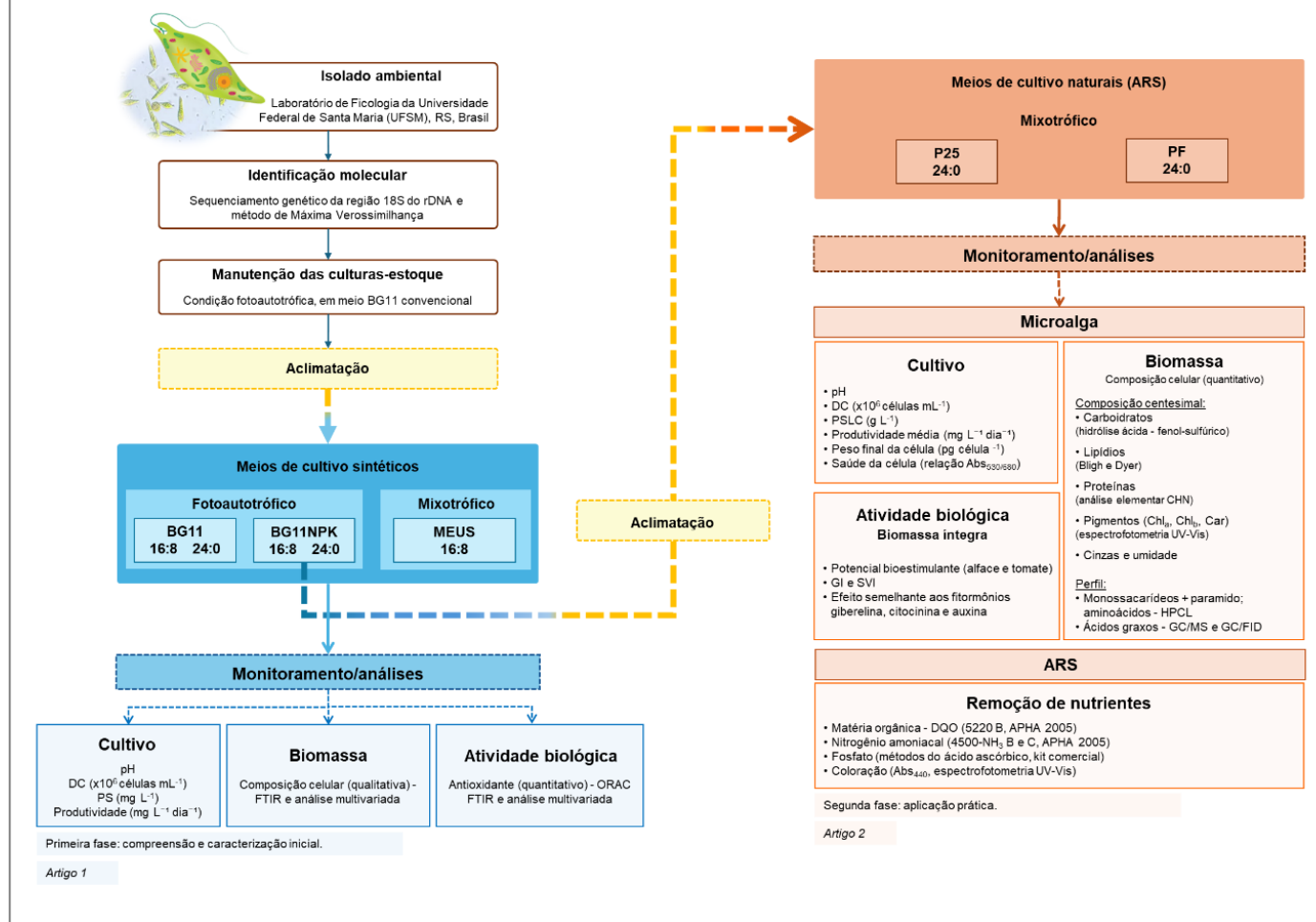


Figura 2.5 Fluxograma com os principais procedimentos e metodologias utilizados.



CAPÍTULO III

Resultados e discussões



Os resultados e discussões da tese estão organizados em forma de artigos científicos. A estrutura apresentada segue a lógica de construção do conhecimento, desde a caracterização inicial da biomassa até sua aplicação prática.

Artigo 1 - FTIR spectroscopy on exploratory analysis of biomass composition and antioxidant potential of *Euglena gracilis* (Euglenophyceae): an eco-friendly approach using green analytical methods: Este estudo teve como objetivo explorar a adaptabilidade de *Euglena gracilis* em diferentes meios e condições de cultivo, utilizando a espectroscopia FTIR para investigar como os diferentes regimes metabólicos e estágios de crescimento influenciam a síntese de compostos bioativos com propriedades antioxidantes. Além disso, buscou-se estabelecer a espectroscopia FTIR, combinada com análises multivariadas, como uma abordagem rápida, ambientalmente correta e econômica para a avaliação da composição celular de microalgas, promovendo práticas mais sustentáveis tanto na indústria quanto na pesquisa científica. Este trabalho foi fundamental para entender as características da microalga, suas necessidades de crescimento e comportamento em diferentes ambientes, estabelecendo bases teóricas e analíticas sólidas para o estudo da biomassa e orientando estudos futuros.

Artigo 2 - Unlocking the potential of *Euglena gracilis* cultivated in piggery wastewater: biomass production, nutrient removal, and biostimulant potential in lettuce and tomato plants: Com base no potencial de *E. gracilis* para sintetizar moléculas bioativas, este estudo investigou seu crescimento e composição quando cultivada em águas residuárias da suinocultura. Também foi avaliada a capacidade da microalga de recuperar nutrientes desses efluentes, utilizando-os como meio de cultivo alternativo para a produção de biomassa rica em compostos de interesse biotecnológico, especialmente fitormônios. O trabalho destaca ainda a pouca exploração de *E. gracilis* na produção de bioprodutos agrícolas, mostrando seu potencial para agregar valor à biomassa cultivada em resíduos. Este estudo permitiu a avaliação da aplicação prática da microalga.

As **Figuras 3.1 e 3.2** fornecem um resumo visual dos artigos elaborados, sintetizando os principais conceitos, resultados e metodologias abordados em cada estudo. Os artigos encontram-se na íntegra, redigidos de acordo com as diretrizes das revistas científicas correspondentes, e incluem informações sobre a classificação no Qualis Capes, o fator de impacto e o *status* de publicação ou submissão no momento da defesa da tese.

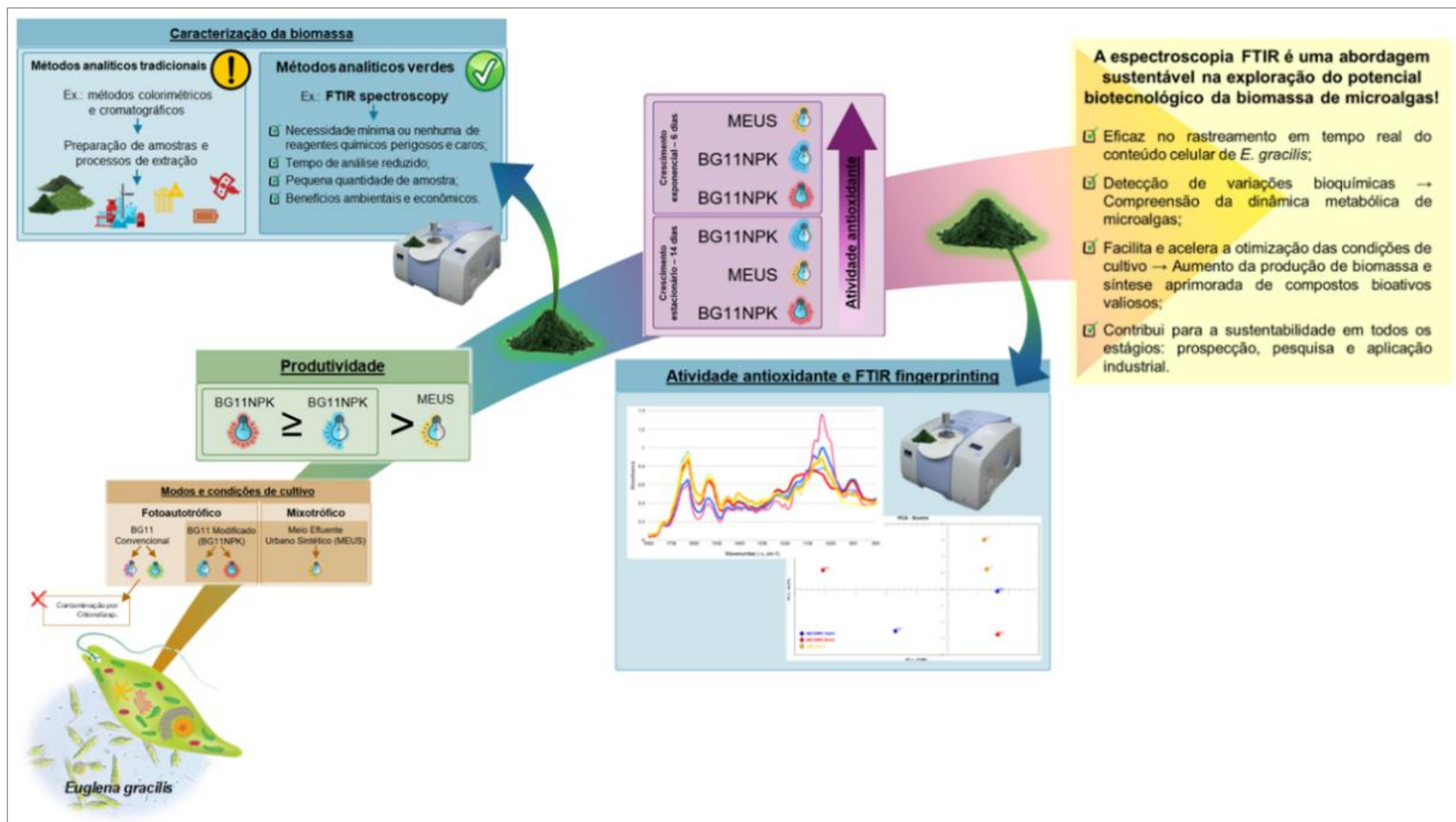


Figura 3.1 Resumo gráfico do artigo 1.

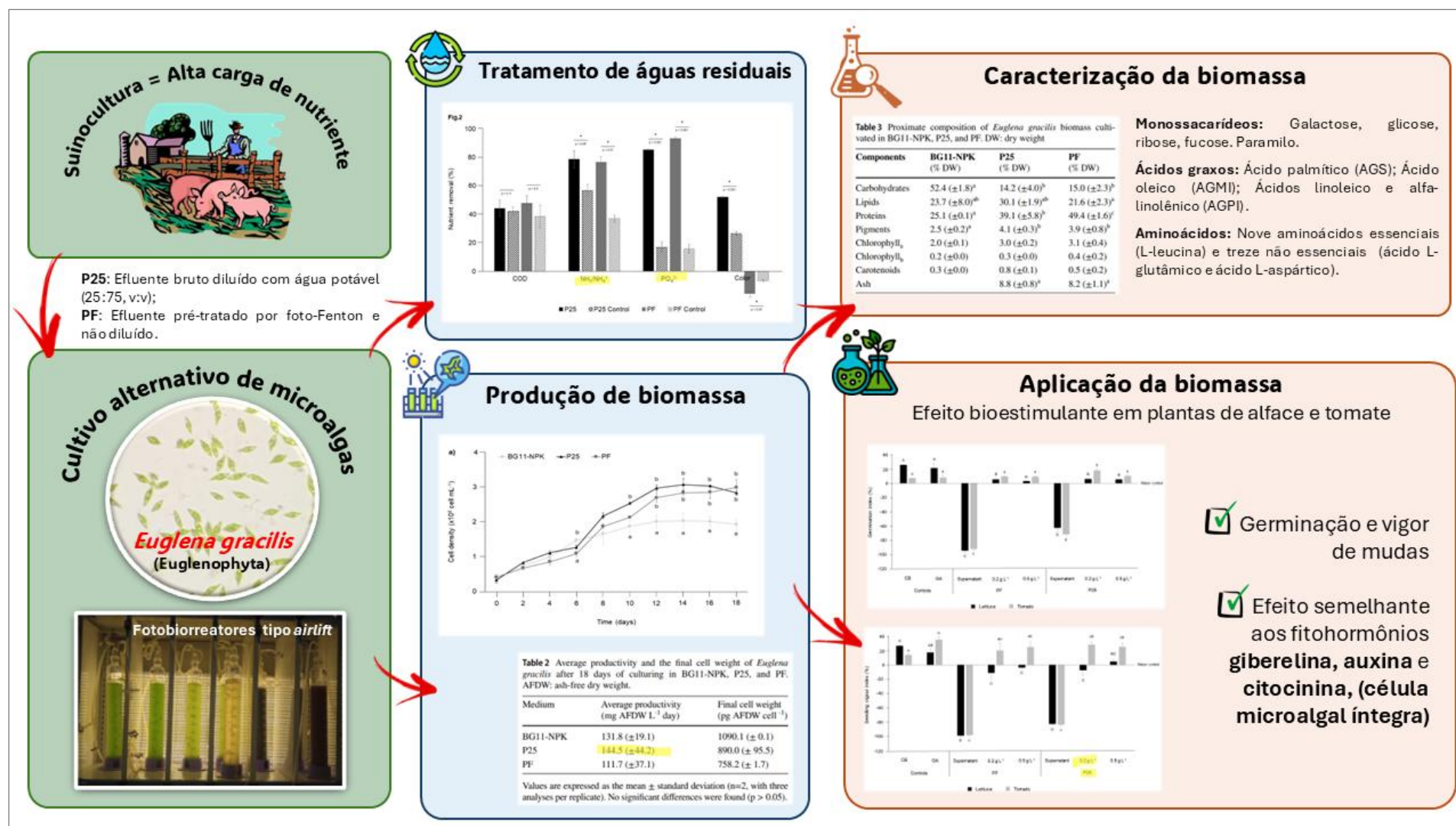


Figura 3.2 Resumo gráfico do artigo 2.

5.1 Artigo 1. FTIR spectroscopy on exploratory analysis of biomass composition and antioxidant potential of *Euglena gracilis* (Euglenophyceae): an eco-friendly approach using green analytical methods

Revista: Current Research in Green and Sustainable Chemistry

Qualis Capes: A1 **Fator de Impacto:** 7.11 (2023)

Situação: Submetido em 16/Dez/2024

Disponível em (SSRN preprint): <https://ssrn.com/abstract=5030915>

FTIR spectroscopy on exploratory analysis of biomass composition and antioxidant potential of *Euglena gracilis* (Euglenophyceae): an eco-friendly approach using green analytical methods

Valéria Louzada Leal Butzke^{a,b}, Camila Rafaela Rathke^{a,b}, Silvio Augusto Ortolan^c,
Marco Flôres Ferrão^d, Rosana de Cássia de Souza Schneider^{a,b,*}
and Valeriano Antonio Corbellini^{a,b}

^a Postgraduate Program in Environmental Technology, University of Santa Cruz do Sul (UNISC). Av. Independência 2293, building 53. Santa Cruz do Sul, 96815900, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Regional Science and Technology Park of the University of Santa Cruz do Sul (UNISC). Av. Independência 2293, building 55. Santa Cruz do Sul, 96815900, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Postgraduate Program in Health Promotion, University of Santa Cruz do Sul (UNISC). Av. Independência 2293, building 42. Santa Cruz do Sul, 96815900, Rio Grande do Sul, Brazil.

^d Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500, building 43121. Porto Alegre, 91501970, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author.

5.2 Artigo 2. Unlocking the potential of *Euglena gracilis* cultivated in piggery wastewater: biomass production, nutrient removal, and biostimulant potential in lettuce and tomato plants

Revista: Journal of Applied Phycology

Qualis Capes: A1

Fator de Impacto: 2.8 (2023)

Situação: Publicado em 19/Jun/2024

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03286-y>

Unlocking the potential of *Euglena gracilis* cultivated in piggery wastewater: biomass production, nutrient removal, and biostimulant potential in lettuce and tomato plants

Valéria Louzada Leal Butzke^a, Alice Ferreira^{b,c}, Diego de Oliveira Corrêa^b,
Júnior Mendes Furlan^d, Luisa Gouveia^{b,e}, Rosana de Cássia de Souza Schneider^a
and Valeriano Antonio Corbellini^{a*}

^a Postgraduate Program in Environmental Technology, University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b National Laboratory of Energy and Geology I.P - Bioenergy and Biorefineries Unit (LNEG – UBB), Lisbon, Portugal.

^c Forest Research Centre, Associate Laboratory TERRA, School of Agriculture, University of Lisbon, Lisboa, Portugal.

^d Research Group in Chromatography and Food Analysis, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Itaqui, Rio Grande do Sul, Brazil.

^e GreenCoLab - Green Ocean Technologies and Products Collaborative Laboratory, CCMAR, Algarve University, Faro, Portugal.

* Corresponding author.

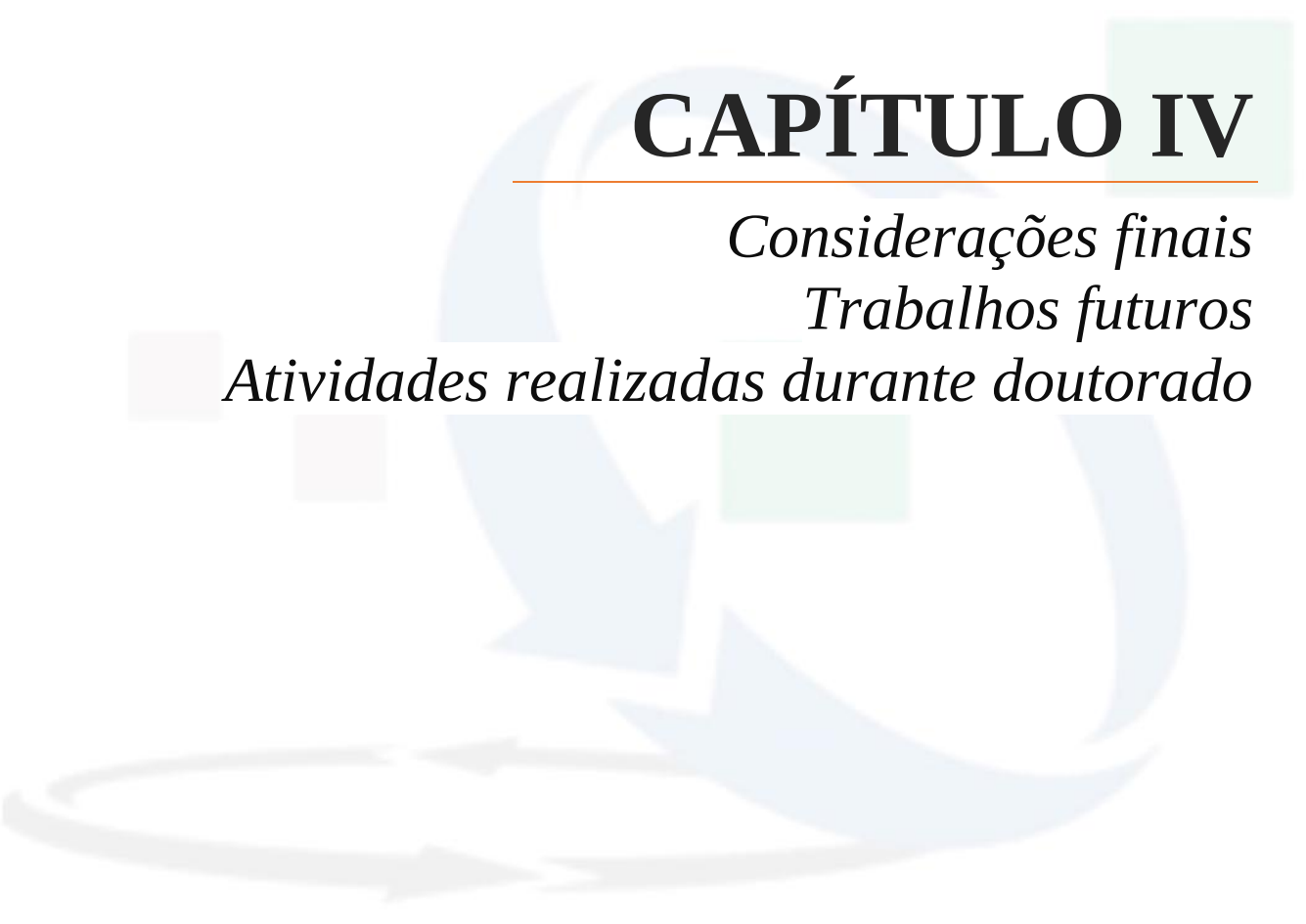


CAPÍTULO IV

Considerações finais

Trabalhos futuros

Atividades realizadas durante doutorado



A pesquisa sobre o potencial biotecnológico da microalga *Euglena gracilis* apresentou avanços importantes no entendimento de suas capacidades metabólicas, com foco no desenvolvimento de bioprodutos sustentáveis e soluções ambientais inovadoras. Os resultados obtidos, alinhados aos objetivos propostos, demonstram de forma consistente o potencial bioestimulante e antioxidante da biomassa de *E. gracilis* quando cultivada em meios alternativos e águas residuais. Esses achados representam uma significativa contribuição para a expansão do uso da microalga em diversas aplicações biotecnológicas, evidenciando seu valor não apenas como fonte de compostos bioativos, mas também seu potencial em processos sustentáveis, como o reaproveitamento de efluentes para a produção de biomassa de alto valor agregado.

A seguir, são apresentados os principais achados relacionados a cada objetivo específico da pesquisa:

(1) Avaliar a adaptação de *E. gracilis* em condições fotoautotróficas (meio convencional e adaptado) e mixotróficas (efluente sintético e águas residuais), analisando os parâmetros de crescimento, produtividade e qualidade da biomassa:

- O cultivo de *E. gracilis* no meio adaptado BG11NPK demonstrou consistente crescimento e produtividade de biomassa, mostrando-se com uma alternativa viável e de baixo custo para o cultivo da microalga;
- A ausência de diferenças significativas na produtividade de biomassa entre o cultivo com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuridão) e o cultivo sob iluminação constante (24 horas) revela uma oportunidade para otimizar os custos de energia, sem comprometer a eficiência do cultivo, contribuindo para um processo mais sustentável.

(2) Avaliar a eficiência da microalga em reduzir nitrogênio, fósforo e carbono orgânico presentes nas águas residuais da suinocultura, quando utilizadas como meio de cultivo:

- O crescimento bem-sucedido de *E. gracilis* em efluentes de suinocultura não esterilizados ou não filtrados a 25% representa um avanço notável em comparação com estudos anteriores, reafirmando a plasticidade metabólica da espécie e sua capacidade de lidar com altas cargas de nutrientes;
- A microalga mostrou-se eficaz na redução dos nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, presentes no efluente, abrindo caminho para futuras explorações no desenvolvimento de soluções sustentáveis para o tratamento de efluentes;

- Os achados destacaram ainda as interações complexas entre *E. gracilis* e as condições ambientais nos processos de remoção de nutrientes, ressaltando a importância de compreender as preferências metabólicas da microalga para otimizar o seu uso no tratamento de efluentes.

(3) Caracterizar sua biomassa por meio da determinação do teor de carboidratos (totais e perfil), lipídios (totais e perfil), proteínas e aminoácidos, utilizando métodos tradicionais de química analítica:

- A caracterização bioquímica da biomassa de *E. gracilis* demonstrou seu alto conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas, com perfis nutricionais que evidenciam seu potencial como matéria-prima para bioprodutos;
- Destaca-se a presença de paramilo, um perfil de ácidos graxos rico em poli-insaturados, e a descrição do perfil de aminoácidos, sendo este último com poucos registros encontrados. Assim, o presente trabalho corrobora as bases de conhecimento sobre o perfil bioquímico da espécie, especialmente quando cultivada em águas residuais, o que é importante também para uma melhor compreensão de seu papel bioativo.

(4) Determinar o potencial bioestimulante e antioxidante das biomassas, investigando seus efeitos semelhantes aos fitormônios e sua capacidade de proteção contra o estresse oxidativo;

- Um dos principais objetivos da tese foi investigar a atividade bioestimulante de *E. gracilis*, uma área ainda pouco explorada e elucidada para a espécie;
- Até onde se sabe, este estudo representa a primeira investigação sobre o potencial de *E. gracilis* (células íntegras) cultivada em águas residuais de suinocultura para atividade bioestimulante, demonstrando efeitos semelhantes aos das auxinas, giberelinas e citocininas, o que sugere seu grande potencial para aplicações agrícolas sustentáveis.

Esse achado abre novas perspectivas para o manejo de efluentes da suinocultura, especialmente na região do Vale do Taquari, uma das maiores produtoras de suínos do Rio Grande do Sul. Em 2023, a região foi responsável por 16,03% da produção total de suínos no estado, conforme dados da Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS, 2023). Esse contexto favorece o desenvolvimento de soluções que integrem a produção agrícola com o manejo eficiente dos resíduos gerados pela indústria suinícola.

O uso de *E. gracilis* para tratar efluentes não apenas contribui para mitigar os impactos ambientais dessa atividade, mas também agrega valor aos resíduos, transformando-os em matéria-prima para o cultivo de biomassa de microalgas. Este processo inovador oferece não apenas benefícios ambientais, mas também abre novas oportunidades econômicas, ao

promover práticas mais sustentáveis na agricultura e no reaproveitamento de resíduos. Dessa forma, é possível criar um ciclo produtivo mais eficiente, sustentável e economicamente viável, beneficiando tanto a indústria suinícola quanto a produção agrícola da região;

- Além disso, em relação à atividade antioxidante, o uso de efluentes sintéticos como meio de cultivo mixotrófico mostrou-se uma oportunidade promissora para utilizar águas residuais na produção de biomassa com alto valor bioativo, trazendo benefícios tanto econômicos quanto ambientais;
- Ainda nesta etapa da pesquisa, foi possível observar que, embora o cultivo fotoautotrófico (BG11NPK) tenha promovido maior produtividade de biomassa, foi sob a condição mixotrófica (SUE) que a atividade antioxidante atingiu níveis significativamente mais elevados, especialmente durante a fase de crescimento exponencial. Esse achado reforça a importância de avaliar um cultivo não apenas com base na produtividade de biomassa, mas também de considerar as condições que melhor favoreçam a síntese do composto de interesse.

(5) Caracterizar e identificar padrões na composição bioquímica da biomassa de *E. gracilis* em resposta a variáveis ambientais e nutricionais, utilizando espectroscopia FTIR e a análise multivariada dos dados (Análise dos Componentes Principais, PCA) como ferramentas ambiental e economicamente mais sustentáveis para a otimização dos cultivos e o desenvolvimento de bioprodutos de valor agregado;

- A aplicação da espectroscopia FTIR e análise multivariada forneceram *insights* valiosos, permitindo uma compreensão mais consistente e precisa sobre como diferentes condições de cultivo influenciam a produtividade e a síntese de compostos bioativos;
- O uso dessas ferramentas reafirma o compromisso de promover métodos analíticos mais sustentáveis.

(6) Demonstrar o alinhamento do estudo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS):

- De maneira complementar, adicionou-se aos objetivos específicos a relação do estudo com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (sessão 3.2). De forma geral, observa-se uma contribuição significativa, especialmente no que diz respeito à promoção de práticas agrícolas sustentáveis e à utilização mais eficiente e econômica dos recursos naturais. O emprego de *E. gracilis* surge como uma alternativa viável e promissora para a produção de bioprodutos de alto valor agregado, ao mesmo tempo que promove o

tratamento de efluentes e o desenvolvimento de soluções sustentáveis para a agricultura, constituindo uma ferramenta dentro da bioeconomia circular e contribuindo para o alcance dos ODS.

Outra contribuição significativa da presente pesquisa é oferecer uma possível solução para uma das limitações da produção em escala industrial de *E. gracilis*: sua dependência de vitaminas, especialmente B1 (tiamina) e B12 (cobalamina), que eleva os custos do processo (Harada *et al.*, 2020). Este trabalho demonstrou o crescimento consistente de *E. gracilis* em efluentes sintéticos e águas residuais *sem a necessidade de suplementação dessas vitaminas*. Sugere-se que concentrações-traços desses nutrientes essenciais podem estar presentes nos ingredientes utilizados, como por exemplo no extrato de carne utilizado no preparo do MEUS. Com estudos futuros, essa abordagem pode contribuir para a redução dos custos operacionais e viabilizar a produção de *E. gracilis* em larga escala, tornando-a mais acessível e sustentável para aplicações industriais e biotecnológicas.

Os resultados também reforçam a importância de explorar a biodiversidade local, demonstrando que, muitas vezes, não é necessário recorrer a cepas de coleções internacionais. No caso da pesquisa, o material utilizado foi isolado de um corpo d'água local, evidenciando que espécies de microalgas além das mais conhecidas podem ser fontes valiosas de bioprodutos. Esse achado amplia as possibilidades de exploração biotecnológica e destaca o potencial ainda pouco explorado da diversidade de organismos presentes em nosso ambiente. Assim, os avanços obtidos neste estudo não apenas abrem novos caminhos para o uso de *E. gracilis*, mas também incentivam uma maior valorização e exploração dos recursos naturais locais.

Esses resultados abrem caminhos para investigações futuras e aplicações industriais de *Euglena gracilis*, com foco na otimização dos processos de cultivo e na ampliação das possibilidades de uso da microalga em setores como agricultura, biotecnologia e tratamento de efluentes.

Com base na metodologia utilizada nesta pesquisa e nos resultados alcançados, destacam-se alguns aspectos importantes a serem considerados em estudos futuros.

Por exemplo, a dependência atual de diluir o efluente com água potável, um método reconhecidamente insustentável, representa um desafio. Recomenda-se investigar abordagens alternativas para reduzir a carga de nutrientes do efluente, tornando-o adequado para o cultivo de *E. gracilis* sem a necessidade de diluição com recursos hídricos potáveis. Outra possibilidade seria integrar a microalga em sistemas de tratamento de efluentes, promovendo uma abordagem mais holística e sustentável.

A utilização de técnicas como a espectroscopia FTIR para monitorar alterações na composição bioquímica da biomassa demonstrou-se altamente valiosa nesta pesquisa. No entanto, reconhece-se a necessidade de -implementar novos estudos com maior número de amostras/espectros, com o objetivo de realizar análises quantitativas mais precisas e confiáveis, o que pode ampliar ainda mais sua aplicabilidade.

Além disso, considerando o crescente interesse na atividade bioestimulante da biomassa de microalgas, futuras investigações poderiam focar no desenvolvimento de métodos mais robustos para a detecção e quantificação de compostos bioativos, como fitormônios. Técnicas avançadas, como cromatografia ou até mesmo a espectroscopia FTIR , podem ser exploradas para esse propósito. Essas análises aprofundadas seriam fundamentais para compreender melhor os mecanismos envolvidos, consolidando o potencial da biomassa como bioinsumo agrícola em escala industrial.

Publicações:

- Publicação do artigo originário da dissertação de mestrado: Leal, V.L., Machado, G. da R.M., Kliemann, M., Teixeira, M.L., Schneider, R. de C. de S., Silva, C. de M., Fuentefria, A.M. 2021. Anti-*Candida* activity of *Tripodanthus acutifolius* (Loranthaceae), mechanism of action and toxicity parameters. Scientific Electronic Archives, 13(6). doi: [10.36560/14620211347](https://doi.org/10.36560/14620211347)
- Publicação de uma nota científica, originada a partir de um trabalho realizado na disciplina de Avaliação de Impactos Ambientais: Alves, G., Julich, J., Dahmer, M., Louzada Leal, V., Stoffel Viña, F., André Ribas Moraes, J., Mahlmann Kipper, L. 2022. O Método Ad Hoc na avaliação de impactos ambientais. Tecno-Lógica, 26(1), 9-14. <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/17109>
- Publicação de um estudo de caso, originado a partir de um trabalho realizado na disciplina de Gestão e Tecnologia Ambiental: Siqueira, D.S., Leal, V.L., Tostes, S., Batista, J.L., Rieger, A., Machado, E.L., Lobo, E.A. 2021. Impacto da Covid-19 na geração e gestão dos Resíduos de Serviço da Saúde: estudo de caso. Revista Interdisciplinar de Promoção da Saúde, 4(3). <https://online.unisc.br/seer/index.php/ripsunisc/article/view/17110>
- Valéria Louzada Leal, Sílvio Augusto Ortolan, Giséle Alves, Michele Junkherr Rodrigues, Valeriano Antonio Corbellini, Rosana de Cassia de Souza Schneider. 2024. The antioxidant potential of microalgal biomass using the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) method. In: Alvarez-Montero, X., Mercado-Reyes, I. Microalgae Protocols Book II. Red Cyt320rt0005 Renuwal. ISBN: 978-84-15413-62-2. <https://cyted.org/conteudo.php?idm=227>
- Publicação de um dos artigos originários da presente tese: Butzke, V.L.L., Ferreira, A., de Oliveira Corrêa, D., Furlan, J. M., Gouveia, L., Schneider, R.C.S., Corbellini, V.A. 2024. Unlocking the potential of *Euglena gracilis* cultivated in piggery wastewater: biomass production, nutrient removal, and biostimulant potential in lettuce and tomato plants. Journal of Applied Phycology 36, 2681–2702. doi: [10.1007/s10811-024-03286-y](https://doi.org/10.1007/s10811-024-03286-y)
- Colaboração e publicação: Ferreira, A., Vladić, J., de Oliveira Corrêa, D., Butzke, V. L. L., Martins, P. L., Ribeiro, B., dos Santos, C. M., Acien, F. G., Gouveia, L. 2024. Innovative approach in sustainable agriculture: Harnessing microalgae potential via subcritical water extraction. Environmental Technology & Innovation 36, 103797. doi: [10.1016/j.eti.2024.103797](https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103797)

- Colaboração e publicação: de Oliveira, F. R., Rizzetti, T. M., Zanella, R., de Oliveira, J. A., Rathke, C. R., Butzke, V. L. L., Machado, E. L., Lutterbeck, C. A., de Souza Schneider, R. D. C. (2024). *Scenedesmus subspicatus* potential for pharmacological compounds removal from aqueous media. Algal Research, 103771. doi: [10.1016/j.algal.2024.103771](https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103771)
- Butzke, V.L.L., Ferreira, A., de Oliveira Corrêa, D., Gouveia, L., Corbellini, V. A., Schneider, R.C.S. 2024. Avaliação do potencial de *Euglena gracilis* para redução de nutrientes das águas residuárias da suinocultura. Anais do 3º Congresso Internacional de Engenharia Ambiental. Vol 1E. ISBN 978-90-833476-4-6. <https://www.3ciea.com.br/anais/>

Participação em Eventos Científicos:

- 2º Seminário Sul de Inovações em Tecnologias Ambientais (2022), com apresentação do trabalho Avaliação de três diferentes métodos de quantificação da biomassa de *Euglena* sp. Valéria Louzada Leal e Gisèle Alves;
- III Mostra de Extensão, Ciência e Tecnologia da Unisc (2022):
 - Avaliação do rendimento de biomassa microalgal utilizando diferentes concentrações de meio de cultivo a base de fertilizante agrícola com e sem adição de resíduo cervejeiro. Vitória Costa da Rocha, Gisele Alves, Valéria Louzada Leal, Michele Hoeltz, Tiele Medianeira Rizzetti e Rosana de Cássia de Souza Schneider; e,
 - Avaliação do crescimento celular e rendimento de biomassa de *Euglena* sp. frente ao meio de cultivo convencional e um meio alternativo. Camila Rafaela Rathke, Rosana de Cássia de Souza Schneider, Valeria Louzada Leal, Gisèle Alves, Tiele Medianeira Tizzetti, Michele Hoeltz e Valeriano Antônio Corbellini.
- III Mostra da Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Unisc (2022). Atividade biológica e valoração da biomassa de *Euglena* sp. cultivada em águas residuais;
- IV Mostra de Extensão, Ciência e Tecnologia da Unisc (2023):
 - Avaliação do potencial de biorremediação de fármacos através da microalga *Scenedesmus subspicatus*. Rathke, C.R., Schneider, R.C.S., Oliveira, F.R., Leal, V.L., Rizzetti, T.M., Zanella, R., Machado, E.L. (com premiação de destaque).
- Young Algaeneers Symposium (2023) com o poster Antioxidant potential of different extracts from *Euglena* sp. microalga. Leal, V.L., Ortolan S.A., Rathke, C., Gouveia, L., Schneider, R.C.S., Corbellini, V.A.;
- V Mostra de Extensão, Ciência e Tecnologia da Unisc (2024):
 - Biorremediação e bioprodutos: microalgas como uma alternativa de desenvolvimento sustentável. Anna Giulia Quintana Soder, Valéria Louzada Leal Butzke, Camila Rafaela Rathke, Valeriano Antonio Corbellini e Rosana de Cássia de Souza Schneider; e,
 - Ensaio preliminar da influência do comprimento de onda na atividade bioestimulante das microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Porphyridium* sp.. Camila Rafaela Rathke, Isabela Beatriz Müller Schwengber,

Valéria Louzada Leal Butzke, Michele Hoeltz, Lisianne Brittes Benitez e Rosana de Cassia de Souza Schneider.

- 3º Congresso Internacional de Engenharia Ambiental (CIEA 2024) com o trabalho Avaliação do potencial de *Euglena gracilis* para redução de nutrientes das águas residuárias da suinocultura. Valéria Louzada Leal Butzke, Alice Ferreira, Diego de Oliveira Corrêa, Luisa Gouveia, Valeriano Antonio Corbellini e Rosana de Cassia de Souza Schneider.
- I Simpósio Brasileiro de Algas (SIMBIALGAS 2024) com o painel Pesquisas em microalgas no Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul. Giséle Alves, Mireila Beling, Lisianne Brittes Benitez, Valeriano Antônio Corbellini, Maria Viviane Gomes Muller, Alexandre Rieger, Michele Hoeltz, Betina Mariela Barreto, Camila Rafaela Rathke, Valéria Louzada Leal Butzke, Vanessa Rosana Ribeiro, Tiele Medianeira Rizzetti e Rosana de Cassia de Souza Schneider.

Educação e Divulgação Científica:

- Aula para os alunos da disciplina de Biotecnologia do curso de Biologia da Unisc, abordando trajetória acadêmica, carreira e aplicações da biotecnologia/biologia molecular no diagnóstico do COVID-19;
- Aula “Introdução as Técnicas de Biologia Molecular” para os alunos da disciplina de Biotecnologia do curso de Farmácia da Unisc;
- Ministrante do curso “Cultivo de microalgas para biotecnologia sustentável: da teoria à prática”, vinculado ao projeto "Bioestimulantes para aplicação em sementes: exploração biotecnológica de microalgas”, realizado no dia no dia 24 de novembro de 2023, perfazendo 08 horas de atividades;
- Palestrante na 3ª Semana Acadêmica de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) com a palestra “Desvendando o potencial das microalgas –sustentabilidade e inovação”;
- Participação na “Feira de Ciências – Inovação e Sustentabilidade” da Unisc, participando da comissão científica e avaliação dos projetos;
- Visita técnica e orientação aos alunos do ensino médio do Colégio Teresa Verzeri, de Santo Ângelo/RS, para o desenvolvimento de seu projeto de ciências com microalgas. Com esse projeto, os alunos foram finalistas da Feira Brasileira de Ciências e Engenharia 2022;
- Idealização do Podcast “*Fuga pra Salinha*”, junto com os colegas do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da Unisc, com objetivo de divulgação científica;
- Organização local do “Pint of Science 2022”, em Santa Cruz do Sul;

- Ministrante do curso “Efeito de fitormônios da biomassa de microalgas”, vinculado ao projeto “Bioestimulantes para aplicação em sementes: exploração biotecnológica de microalgas”, no dia 26 de junho de 2024, perfazendo 04 horas de atividades;
- Ministrante da oficina teórico-experimental “Potencial antioxidante de microalgas” vinculada ao projeto “Bioestimulantes para aplicação em sementes: exploração biotecnológica de microalgas”, nos dias 05 e 07 de novembro de 2024, perfazendo 08 horas de atividades.

Capacitações e demais atividades:

- Participação no evento “Acelerando Cientistas”, do SEBRAE/SP, sobre empreendedorismo científico e inovação;
- Participação como ouvinte no “III Encuentro de la Red Renuwal: Red Iberoamericana para el tratamiento de efluentes con microalgas”, promovido pela Rede Renuwal, com apresentação das pesquisas realizadas pelo grupo da Unisc;
- Participação no Webinar “Microalgae as sustainable source for new products and materials”, promovido pela Universidade de Aveiro através do projeto ‘Coccolitho4BioMat’;
- Ouvinte da sessão “Improving de sustainability of algae production in commercial-scale facilities” do workshop “Microalgae biotechnology for biofuel production and environmental application”, promovido pela Universidade Nacional da Irlanda, Galway (NUI Galway), Ryan Institute e Autoridade de Energia Sustentável da Irlanda (SEAI);
- Ouvinte no “2nd Annual International Congress on Euglenoids 2022”;
- Ouvinte do webinar “Circular Bioeconomy - from effluents to novel product through microalga”, do projeto AlgaValor liderado pela Allmicroalgae;
- Ouvinte do Webinar “Biorrefinaria de algas”, organizado pela APAA – Associação Portuguesa de Algologia Aplicada;
- Realização do curso “Algaculture for Biotechnology” do Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP);
- Realização de doutorado-sanduiche no Laboratório Nacional de Energia e Geologia, Unidade de Bioenergia e Biorrefinaria, Lisboa, Portugal (PDSE/2022, de Nov/2022 a Ago/2023);
- Visita técnica às empresas e instituições do setor de microalgas GreenColab, Necton, CCMAR, Algarve, Portugal;
- Participação voluntária em atividades relacionada a pandemia da COVID-19, desenvolvidas pela Unisc: diagnóstico molecular e confecção de sabão para a comunidade carentes;

- Auxílio a demais grupos de pesquisa e colega no desenvolvimento de protocolos como avaliação de atividade enzimática, antioxidante, caracterização de biomassa microalgal, entre outros;
- Demais capacitações técnicas, acompanhamento de seminários, defesas de dissertações e teses do PPGTA;
- Atividades curriculares e pré-requisitos para obtenção do título (**Figura 4.1**).

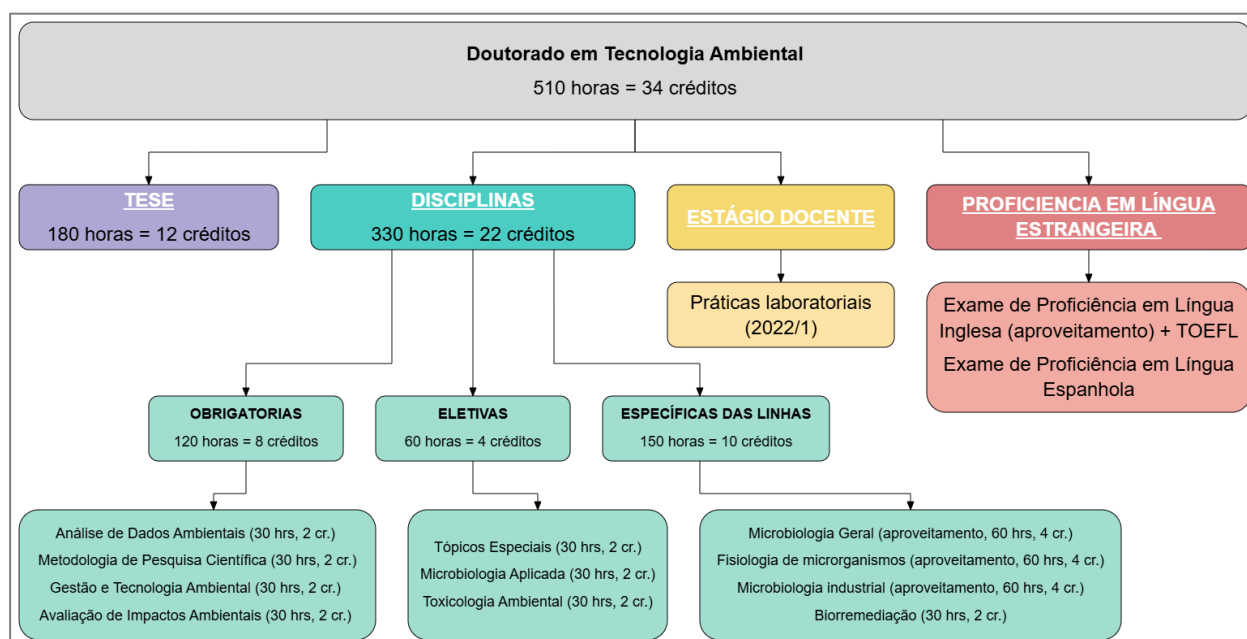


Figura 4.1 Quadro-resumo com atividades curriculares realizadas para a obtenção do título de doutora, conforme os requisitos estabelecidos pelo Regimento do PPGTA.

É fundamental destacar o valor dessas atividades em minha formação durante o doutorado, pois proporcionaram oportunidades valiosas para complementar meu aprendizado acadêmico e expandir meu conhecimento em diversas áreas. Ao participar de eventos científicos, como webinars e seminários, pude acompanhar as últimas tendências e avanços na minha área de pesquisa, além de me conectar com outros profissionais e pesquisadores. As aulas ministradas e as atividades de divulgação científica também me permitiram desenvolver habilidades de comunicação e ensino. Além disso, envolvimento em projetos de extensão e iniciativas sociais, especialmente durante a pandemia da COVID-19, fortaleceram meu senso de responsabilidade social e ética, destacando a importância de usar meu conhecimento e habilidades para contribuir positivamente para a sociedade. Além disso, destaco a experiência enriquecedora do doutorado-sanduíche, que proporcionou não apenas um intercâmbio de conhecimento técnico-científico, mas também uma valiosa troca cultural. Esta experiência ampliou meus horizontes acadêmicos e profissionais, permitindo-me estabelecer conexões significativas com colegas de todo o mundo.

No geral, essas experiências enriquecedoras contribuíram significativamente para minha formação como pesquisadora e profissional da área, preparando-me para enfrentar os desafios e oportunidades que surgirão ao longo da minha carreira.

- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G. *et al.* Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, 2018. 10.3389/fsufs.2018.00059
- AEMIRO, A. *et al.* The effect of euglena (*Euglena gracilis*) supplementation on nutrient intake, digestibility, nitrogen balance and rumen fermentation in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 123-133, 2017.
- ALAVIANGHAVANINI, A. *et al.* Microalgae cultivation for treating agricultural effluent and producing value-added products. **Sci Total Environ**, v. 912, p. 169369, 2024. 10.1016/j.scitotenv.2023.169369
- ALDHOLMI, M. **Microbial Natural Product Discovery through Nutritional and Epigenetic Manipulation**. 2020. (Doutorado) - University of East Anglia, Norwich, England.
- ALDHOLMI, M. *et al.* Euglenatides, Potent Antiproliferative Cyclic Peptides Isolated from the Freshwater Photosynthetic Microalga *Euglena gracilis*. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 61, n. 23, p. e202203175, 2022. 10.1002/anie.202203175
- ALVAREZ, A. L. *et al.* Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. **Algal Research**, v. 54, p. 102200, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>
- ALVES, G. *et al.* **Biomass of *Euglena* sp. produced in Mineral Medium Supplemented With Craft Brewery Residue**. 2023.
- AMAYA-SANTOS, G. *et al.* Production of *Chlorella vulgaris* using urban wastewater: Assessment of the nutrient recovery capacity of the biomass and its plant biostimulant effects. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 6, p. 2971-2979, 2022. 10.1007/s10811-022-02843-7
- ARAÚJO, R. *et al.* Current status of the algae production industry in Europe: an emerging sector of the blue bioeconomy. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 626389, 2021.
- ACSURS. Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul. 2023. Abate de suínos – Rio Grande do Sul 2023. Disponível em: <https://acsurs.com.br/suinocultura/producao-e-abate/>. Acesso em: Janeiro/2025.
- BANSKOTA, A. H. *et al.* Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 309-318, 2019.
- BARSANTI, L. *et al.* Paramylon treatment improves quality profile and drought resistance in *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom. **Agronomy**, v. 9, n. 7, p. 394, 2019.

- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Paramylon, a Potent Immunomodulator from WZSL Mutant of *Euglena gracilis*. **Molecules**, v.24, n. 17, DOI: 10.3390/molecules24173114.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Anatomy of *Euglena gracilis*. *In*, 2020. p. 61-70.
- BARSANTI, L. *et al.* Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. **Natural product reports**, v. 28, n. 3, p. 457-466, 2011.
- BEDARD, S. *et al.* The biomolecules of *Euglena gracilis*: Harnessing biology for natural solutions to future problems. **Protist**, v. p. 126044, 2024.
- BERNARD, E.; GUÉGUEN, C. Influence of carbon sources on the phenolic compound production by *Euglena gracilis* using an untargeted metabolomic approach. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 795, 2022.
- BILAL, M. *et al.* High-value compounds from microalgae with industrial exploitability—a review. **Frontiers in Bioscience-Scholar**, v. 9, n. 3, p. 319-342, 2017.
- BOURGOUGNON, N. *et al.* Algae for global sustainability? *In: Advances in botanical research*: Elsevier, 2021. v. 100, p. 145-212.
- BRASIL. **Programa Nacional de Bioinsumos. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020.**, 2020. Disponível em: <http://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa>. Acesso em: Dezembro/2024.
- BRAUN, J. C. A.; COLLA, L. M. Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. **BioEnerg Res**, v. 16, n. 1, p. 289-310, 2022. 10.1007/s12155-022-10456-8
- BULE, M. H. *et al.* Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. **Front. Biosci**, v. 10, n. 2, p. 197-216, 2018.
- BUTZKE, V. L. L. *et al.* Unlocking the potential of *Euglena gracilis* cultivated in piggery wastewater: biomass production, nutrient removal, and biostimulant potential in lettuce and tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 2024. 10.1007/s10811-024-03286-y
- CLIFFORD DOBELL, F. R. S. Antony van Leeuwenhoek and his “little animals”: being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious in discoveries in these disciplines New York: Harcourt, Brace and Company: 516 p. 1932.
- CONDE, T. A. *et al.* Microalgae as sustainable bio-factories of healthy lipids: Evaluating fatty acid content and antioxidant activity. **Marine drugs**, v. 19, n. 7, p. 357, 2021.
- DE SOUZA, M. P. *et al.* Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, p. 2139-2156, 2018. 10.1007/s12649-018-0253-6

- EBENEZER, T. E. *et al.* *Euglena gracilis* genome and transcriptome: organelles, nuclear genome assembly strategies and initial features. **Euglena: biochemistry, cell and molecular biology**, v. p. 125-140, 2017.
- EBENEZER, T. E. *et al.* *Euglena* International Network (EIN): Driving euglenoid biotechnology for the benefit of a challenged world. **Biol Open**, v. 11, n. 11, p. bio059561, 2022. 10.1242/bio.059561
- ESFA. Safety of paramylon as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. **ESFA Journal**, v. n. European Food Safety Authority Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens- NDA Panel, 2023. 10.2903/j.efsa.2023.7995
- EUGLENA CO., LTD. **Euglena Co., Ltd.**, 2024. Acesso em: Dezembro/2024.
- FARJALLAH, A. *et al.* Metabolic responses of *Euglena gracilis* under photoheterotrophic and heterotrophic conditions. **Protist**, v. 175, n. 3, p. 126035, 2024.
- FDA. GRAS Notice for Dried *Euglena gracilis* (ATCC PTA-123017). Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. USA.
- FERREIRA, A. *et al.* Exploring Different Pretreatment Methodologies for Allowing Microalgae Growth in Undiluted Piggery Wastewater. **Agronomy**, v.12, n. 3, DOI: 10.3390/agronomy12030580.
- FERREIRA, A. *et al.* Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. **Environmental Advances**, v. 4, p. 100062, 2021. 10.1016/j.envadv.2021.100062
- FOGLIO, L. *et al.* **Biostimulant properties of *Euglena gracilis* biomass grown on pre-treated exhausted dairy byproducts.** 2022.
- FU, W. *et al.* Bioactive compounds from microalgae: Current development and prospects. *In: Studies in natural products chemistry*: Elsevier, 2017. v. 54, p. 199-225.
- FUERST, E.-J. K. *Euglena gracilis* as a plant biostimulant. KEMIN INDUSTRIES, I. united State. US 2019/0191705 A1 2018.
- GALLIE, D. R. Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value—Successes and challenges. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3424-3446, 2013.
- GISSIBL, A. *et al.* Bioproducts from *Euglena gracilis*: synthesis and applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 108, 2019.
- GROSS, J. A. **Efeitos de diferentes componentes opticamente ativos na reflectância da água para a estimativa remota das concentrações de clorofila-a fitoplantônica.** 2019.

- (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Geografia da Universidade Federal de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
- GUIRY, M.; GUIRY, G. **AlgaeBase. Euglena Ehrenberg, 1830**. Galway, Ireland, 2024. Disponível em: <https://www.algaebase.org>. Acesso em: Dezembro/2024.
- HARADA, R. *et al.* Genetic engineering strategies for *Euglena gracilis* and its industrial contribution to sustainable development goals: A review. **frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 556462, 2020.
- HARRIS, J. VII. Some microscopical observations of vast numbers of animalcula seen in water by John Harris, M. A. Rector of Winchelsea in Sussex, and F. R. S. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 19, n. 220, p. 254-259, 1997. 10.1098/rstl.1695.0036
- HASAN, M. T. *et al.* A comprehensive assessment of the biosynthetic pathways of ascorbate, α -tocopherol and free amino acids in *Euglena gracilis* var. *saccharophila*. **Algal Research**, v. 27, p. 140-151, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.029>
- HASSAN, S. *et al.* Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999-1029, 2022.
- HAUSLAGE, J. *et al.* Eu: CROPIS—“*euglena gracilis*: combined regenerative organic-food production in space”—a space experiment testing biological life support systems under lunar and martian gravity. **Microgravity Science and Technology**, v. 30, p. 933-942, 2018.
- HUANG, A. *et al.* The Antioxidant Ability and Extraction Yield of Beta Carotene. **Highlights in Science, Engineering and Technology**, v. 58, p. 256-264, 2023.
- INUI, H. *et al.* Production and composition of wax esters by fermentation of *Euglena gracilis*. **Agricultural and biological chemistry**, v. 47, n. 11, p. 2669-2671, 1983.
- KAPOORE, R. V. *et al.* Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. **Biotechnol Adv**, v. 49, p. 107754, 2021. 10.1016/j.biotechadv.2021.107754
- KHAN, M. I. *et al.* The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018.
- KHATIWADA, B. *et al.* Proteomic response of *Euglena gracilis* to heavy metal exposure – Identification of key proteins involved in heavy metal tolerance and accumulation. **Algal Research**, v. 45, p. 101764, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101764>

- KHATIWADA, B. *et al.* Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: From biorefineries to bioremediation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 12, p. 3952-3967, 2020b.
- KHAVARI, F. *et al.* Microalgae: therapeutic potentials and applications. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 5, p. 4757-4765, 2021.
- KIM, J. T. *et al.* Floristic and Taxonomic Accounts of the Genus *Euglena* (Euglenophyceae). **Algae**, v. 13, n. 2, p. 173-197, 1998.
- KIM, S. *et al.* Biofuel production from *Euglena*: Current status and techno-economic perspectives. **Bioresource Technology**, v. 371, p. 128582, 2023.
- KIM, S. *et al.* Enhancement of growth and paramylon production of *Euglena gracilis* by upcycling of spent tomato byproduct as an alternative medium. **Applied Sciences**, v. 11, n. 17, p. 8182, 2021.
- KIRAN, B. R.; VENKATA MOHAN, S. Microalgal cell biofactory—therapeutic, nutraceutical and functional food applications. **Plants**, v. 10, n. 5, 2021. 10.3390/plants10050836
- KOSTYGOV, A. Y. *et al.* Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biol**, v. 11, n. 3, p. 200407, 2021. 10.1098/rsob.200407
- KOTTUPARAMBIL, S. *et al.* *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. **Algal research**, v. 37, p. 154-159, 2019.
- KUHNE, A. M. *et al.* Cultivation of heterotrophic *Euglena gracilis*: The effects of recycled media on culture growth and associations with growth regulating phytohormone profiles. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, n. 5, p. 2161-2175, 2023. 10.1007/s10811-023-03062-4
- KURODA, M. *et al.* Biomass production and nutrient removal through cultivation of *Euglena gracilis* in domestic wastewater. **Jap J Water Treat Biol**, v. 54, p. 105-113, 2018.
- LAZARUS, D.; JAHN, R. Using the Ehrenberg Collection. **Diatom Research**, v. 13, p. 273-291, 1998. 10.1080/0269249X.1998.9705451
- LEANDER, B. S.; FARMER, M. A. Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 469-479, 2000.
- LEVINE, R. B. *et al.* Modulation of plant immune system function. KEMIN INDUSTRIES, I. United States. US10,130,099 B2 2018.
- LI, M. *et al.* Shape-based separation of microalga *Euglena gracilis* using inertial microfluidics. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10802, 2017.
- LI, X. *et al.* Growth characteristics of acclimated strain of *Chlorella vulgaris* under high concentrations of ammonia nitrogen and phosphorus. **International Journal of**

- Environmental Science and Technology**, v. 19, n. 10, p. 10131-10142, 2022. 10.1007/s13762-021-03827-9
- LU, F. *et al.* Enhancing wastewater remediation in microalga *Euglena gracilis*: The role of trivalent cerium (Ce^{3+}) as a hormonal effect factor and its metabolic implications. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 186, p. 1273-1285, 2024.
- LUCHE, D. E. D. **Avaliação da produção de biomassa e clorofila pela microalga *Chlorella minutissima* em presença de fármacos antimicrobianos**. 2020. 126 f. (Master degree) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- LUKÁČOVÁ, A. *et al.* The Influence of Phenol on the Growth, Morphology and Cell Division of *Euglena gracilis*. **Life**, v. 13, n. 8, p. 1734, 2023.
- MAHAPATRA, D. M. *et al.* *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 855-865, 2013. 10.1007/s10811-013-9979-5
- MOESTRUP, Ø.; ENEVOLDSEN, H. On sexual reproduction in euglenoids, a tribute to Berthe Biecheler. **Phycologia**, v. 58, n. 3, p. 326-328, 2019.
- MONFILS, A. K. *et al.* Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). **Phycologia**, v. 50, n. 2, p. 156-169, 2011.
- MORILLAS-ESPANA, A. *et al.* Biostimulant Capacity of *Chlorella* and *Chlamydomodium* Species Produced Using Wastewater and Centrate. **Biology (Basel)**, v. 11, n. 7, p. 1086, 2022. 10.3390/biology11071086
- MÜLLER, O. F. *Animalcula infusoria fluviatilia et marina. : Hauniae, Typis N. Mölleri*: 540 p. 1786.
- MURATA, M. M. *et al.* What do patents tell us about microalgae in agriculture? **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 154, 2021. 10.1186/s13568-021-01315-4
- NAAZ, S. *et al.* Paramylon marvels: enhancing plant productivity and resilience. *In: Biostimulants in Plant Protection and Performance*: Elsevier, 2024. p. 73-87.
- NAKASHIMA, A. *et al.* The alga *Euglena gracilis* stimulates *Faecalibacterium* in the gut and contributes to increased defecation. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1074, 2021.
- NEZBRYTSKA, I. *et al.* Application of *Euglena gracilis* in wastewater treatment processes. **BioTechnologia (Pozn)**, v. 103, n. 4, p. 323-330, 2022. 10.5114/bta.2022.120702
- NOBLE, A. *et al.* *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) produces abscisic acid and cytokinins and responds to their exogenous application singly and in combination with other growth

- regulators. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 2, p. 244-254, 2014. 10.1080/09670262.2014.911353
- O'NEILL, E. Using new techniques to study old favorites: A case study of Euglena. In: **Handbook of Algal Science, Technology and Medicine**: Elsevier, 2020. p. 161-170.
- OLABI, A. G. *et al.* Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. **Science of The Total Environment**, v. 854, p. 158689, 2023.
- OLAVESON, M. M.; NALEWAJKO, C. Effects of acidity on the growth of two Euglena species. **Hydrobiologia**, v. 433, n. 1-3, p. 39-56, 2000. 10.1023/A:1004006401516
- OLIVEIRA, C. Y. B. *et al.* An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. **Journal of Environmental Management**, v. 320, p. 115897, 2022.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. **Sobre o nosso trabalho para alcançar os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Brasília, Brasil, 2024. Disponível em: <http://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: Dezembro/2024.
- PARK, S. Y. *et al.* Euglena gracilis (Euglena) powder supplementation enhanced immune function through natural killer cell activity in apparently healthy participants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutr Res**, v. 119, p. 90-97, 2023. 10.1016/j.nutres.2023.09.004
- PINA-PÉREZ, M. C. *et al.* Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. **Food chemistry**, v. 235, p. 34-44, 2017.
- REZAEI, R. *et al.* Effect of algae acclimation to the wastewater medium on the growth kinetics and nutrient removal capacity. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, n. 11, p. 679, 2019. 10.1007/s10661-019-7856-7
- RIBEIRO, V. R. *et al.* The use of microalgae-microbial fuel cells in wastewater bioremediation and bioelectricity generation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 48, p. 102882, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102882>
- RIPPKA, R. *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.
- RUMIN, J. *et al.* Analysis of Scientific Research Driving Microalgae Market Opportunities in Europe. **Mar Drugs**, v. 18, n. 5, p. 264, 2020. 10.3390/md18050264
- SALDEEN, K.; SALDEEN, T. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. **Nutrition Research**, v. 25, n. 10, p. 877-889, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.019>

- SANTINI, G. *et al.* Plant Biostimulants from Cyanobacteria: An Emerging Strategy to Improve Yields and Sustainability in Agriculture. **Plants (Basel)**, v. 10, n. 4, p. 643, 2021. 10.3390/plants10040643
- SCARTAZZA, A. *et al.* The role of *Euglena gracilis* paramylon in modulating xylem hormone levels, photosynthesis and water-use efficiency in *Solanum lycopersicum* L. **Physiol Plant**, v. 161, n. 4, p. 486-501, 2017. 10.1111/ppl.12611
- SCHWARTZBACH, S. D. Photo and nutritional regulation of *Euglena* organelle development. **Euglena: biochemistry, cell and molecular biology**, v. p. 159-182, 2017.
- SEHGAL, A. *et al.* Morpho-taxonomic, genetic, and biochemical characterization of freshwater microalgae as potential biodiesel feedstock. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 137, 2019.
- SHAO, Q. *et al.* Metabolomic response of *Euglena gracilis* and its bleached mutant strain to light. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0224926, 2019. 10.1371/journal.pone.0224926
- SINGH, K. *et al.* Microalgae from wastewaters to wastelands: Leveraging microalgal research conducive to achieve the UN Sustainable Development Goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 188, p. 113773, 2023.
- SUGIYAMA, A. *et al.* Oral administration of paramylon, a beta-1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **J Vet Med Sci**, v. 72, n. 6, p. 755-763, 2010. 10.1292/jvms.09-0526
- SUGIYAMA, A. *et al.* Hepatoprotective effects of paramylon, a beta-1, 3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z, on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. **J Vet Med Sci**, v. 71, n. 7, p. 885-890, 2009. 10.1292/jvms.71.885
- SUZUKI, K. Large-Scale Cultivation of *Euglena*. In: SCHWARTZBACH, S. D. e SHIGEOKA, S. (Ed.). **Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 285-293.
- SUZUKI, K. *et al.* *Euglena gracilis* Z and its carbohydrate storage substance relieve arthritis symptoms by modulating Th17 immunity. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191462, 2018. 10.1371/journal.pone.0191462
- TERRIENTE-PALACIOS, C. *et al.* Taurine, homotaurine, GABA and hydrophobic amino acids content influences “in vitro” antioxidant and SIRT1 modulation activities of enzymatic protein hydrolysates from algae. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 20832, 2022.
- TUCCI, S. *et al.* Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and the elongase inhibitor flufenacet. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 63-69, 2010.

- VERMA, R. *et al.* Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104149, 2020.
- WANG, J. *et al.* Residual plastids of bleached mutants of *Euglena gracilis* and their effects on the expression of nucleus-encoded genes. **Progress in Natural Science**, v. 14, n. 3, p. 213-217, 2004.
- WANG, Y. *et al.* *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195329, 2018. 10.1371/journal.pone.0195329
- WU, M. C. *et al.* A new pilot-scale fermentation mode enhances *Euglena gracilis* biomass and paramylon (β -1,3-glucan) production. **J Clean Prod**, v. 321, p. 128996, 2021. 10.1016/j.jclepro.2021.128996
- YAN, K. T. H. *et al.* Medium and process optimizations for *Euglena gracilis* with high biomass production enriched with protein. **Algal Res**, v. 75, p. 103265, 2023. 10.1016/j.algal.2023.103265
- ZAKRYŚ, B. *et al.* Evolutionary origin of *Euglena*. **Euglena: biochemistry, cell and molecular biology**, v. p. 3-17, 2017.
- ZOLTNER, M.; FIELD, M. C. Microbe profile: *Euglena gracilis*: photogenic, flexible and hardy. **Microbiology**, v. 168, n. 9, p. 001241, 2022.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO E
DOUTORADO
**TECNOLOGIA
AMBIENTAL**



Av. Independência, 2293 - Universitário
Santa Cruz do Sul - RS
CEP 96815-900

(51) 3717-7300
www.unisc.br