

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

Lauzézio Souza Barcelos Neto

**BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGA NA BACIA DO RIO APA COM POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO MEIOS A BASE DE NPK**

**DOURADOS - MS
2024**

LAUZÉZIO SOUZA BARCELOS NETO

**BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGA NA BACIA DO RIO APA COM
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO MEIOS A
BASE DE NPK**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz.

**DOURADOS - MS
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B242b Barcelos Neto, Lauzézio Souza

Bioprospecção de microalga na bacia do Rio Apa com potencial para produção de proteínas utilizando meios a base de NPK [recurso eletrônico] / Lauzézio Souza Barcelos Neto. -- 2025.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcelo Fossa da Paz .

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

I. Microalgas. 2. Alimentos. 3. Biomassa. 4. Magnésio. 5. Nitrogênio. I. Paz, Marcelo Fossa Da.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

LAUZÉZIO SOUZA BARCELOS NETO

**BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGA NA BACIA DO RIO APA COM
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO MEIOS A
BASE DE NPK**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz.

Aprovado em: 22/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



MARCELO FOSSA DA PAZ
Data: 08/02/2025 18:40:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Presidente

Documento assinado digitalmente



MICHELLE PINHEIRO VETORELLI
Data: 06/02/2025 14:13:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dra. Michele Pinheiro Vetorelli
Membro

Documento assinado digitalmente



RODRIGO SIMOES RIBEIRO LEITE
Data: 08/02/2025 18:30:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Membro

DOURADOS-MS
2024

Bioprospecção de microalga na bacia do Rio Apa com potencial para produção de proteínas utilizando meios a base de NPK

Lauzéio Souza Barcelos neto
Universidade Federal da Grande Dourados
lauzezio.neto069@academico.ufgd.edu.br

RESUMO

Com o agravamento das mudanças climáticas, somado ao aumento na população humana, ocorrem preocupações a respeito da oferta de alimentos para a sociedade nos próximos anos, gerando uma crescente demanda por tecnologias que promovam a obtenção de alimentos de qualidade, com alta eficiência e de forma sustentável. Nesse cenário, as microalgas, organismos responsáveis pela maior parte da atividade fotossintetizante no planeta, se apresentam como fontes promissoras de nutrientes, incluindo proteínas para alimentação humana, além de serem “sumidouros de carbono”. A produção desses organismos em ambientes isolados resulta em baixo impacto nos ecossistemas naturais e são utilizadas na obtenção de diversos produtos como fármacos, biocombustíveis, pigmentos, celulose, proteínas, além de serviços como a biorremediação. Foi realizado o isolamento de uma espécie coletada na bacia do Rio APA, identificada como um membro do gênero *Chlorella*, que foi cultivada e submetida a ensaios de análise de crescimento e quantificação de proteínas em diferentes meios de cultura à base de NPK. Foi possível determinar que nas concentrações de NPK 10-10-10 1,0 g.L⁻¹ suplementado com sulfato de magnésio 0,2 g.L⁻¹, houve baixo acúmulo de proteínas em comparação com os teores descritos na literatura para outras espécies do mesmo gênero, assim como nos meios suplementados com nitrato de sódio (0,075 g.L⁻¹) e uréia (0,026 g.L⁻¹). Nas condições de cultivo, portanto, a espécie apresentou baixo potencial para produção de proteínas para alimentação humana.

Palavras-chaves: Microalgas; Alimentos; Biomassa; Magnésio; Nitrogênio; Proteína.

Bioprospecting of microalgae in the Apa River basin with potential for protein production using NPK-based media

Lauzézio Souza Barcelos neto
Universidade Federal da Grande Dourados
lauzezio.neto069@academico.ufgd.edu.br

SUMMARY

With the worsening of climate change, coupled with the increase in the human population, there are concerns about the food supply for society in the coming years, generating a growing demand for technologies that promote the obtaining of quality food, with high efficiency and in a sustainable manner. In this scenario, microalgae, organisms responsible for most of the photosynthetic activity on the planet, present themselves as promising sources of nutrients, including proteins for human consumption, in addition to being “carbon sinks”. The production of these organisms in isolated environments results in low impact on natural ecosystems and are used to obtain various products such as pharmaceuticals, biofuels, pigments, cellulose, proteins, as well as services such as bioremediation. A species collected in the APA River basin was isolated, identified as a member of the *Chlorella* genus, which was cultivated and subjected to growth analysis and protein quantification assays in different NPK-based culture media. It was possible to determine that at concentrations of NPK 10-10-10 1.0 g.L⁻¹ supplemented with magnesium sulfate 0.2 g.L⁻¹, there was low protein accumulation compared to the levels described in the literature for other species of the same genus, thus as in media supplemented with sodium nitrate (0.075 g.L⁻¹) and urea (0.026 g.L⁻¹). Under cultivation conditions, therefore, the species had low potential for producing proteins for human consumption.

Key-words: Microalgae; Food; Biomass; Magnesium; Nitrogen; Protein.

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Morfologia da espécie isolada - Fotografias A e B.....	27
Imagem 2. Varredura em diferentes comprimentos de onda das amostras de células, extratos e células fixadas.....	28
Imagem 3. Variação da absorbância dos tratamentos no Cultivo 1 em função do tempo.....	30
Imagem 4. Meios do <i>Cultivo 1</i> com diferença no acúmulo de pigmentos.....	31
Imagem 5. Diferença de rendimento nas condições de presença e ausência de sulfato de magnésio.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos meios de cultivo testados.....	21
Tabela 2.	Rendimento dos cultivos nas condições de presença e ausência de Mg.....	33
Tabela 3.	Produtividade máxima de cada tratamento.....	34
Tabela 4.	Produtividade específica de cada tratamento.....	36
Tabela 5.	Percentual de proteínas totais obtido em cada tratamento.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO	13
3.1 Aumento populacional e oferta de alimentos.....	13
3.2 Características das microalgas.....	14
3.3 Microalgas na alimentação humana.....	15
3.4 Fertilizante NPK.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Isolamento e Identificação.....	16
4.2 Determinação do comprimento de onda de trabalho.....	17
4.2.1 Determinação por espectrofotometria na região da luz visível.....	17
4.2.2 Análise em espectrofotômetro de varredura (faixa visível e ultravioleta)...	18
4.3 Correlação da massa seca pela absorbância.....	19
4.4 Correlação do número de células pela absorbância.....	20
4.5 Elaboração dos meios de cultivo.....	21
4.6 Cinética de crescimento em diferentes meios.....	22
4.6.1 Análises dos dados de cultivo.....	23
4.7 Determinação do percentual de proteínas totais.....	24
4.7.1 Cultivo para obtenção de biomassa.....	24
4.7.2 Determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.....	25
4.7.3 Cálculo para determinação do percentual de proteínas.....	26
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	27
5.1 Isolamento e identificação.....	27
5.2 Determinação do comprimento de onda de trabalho.....	27
5.3 Curva de calibração: Biomassa seca versus absorbância.....	29
5.4 Curva de calibração: Número de células versus absorbância.....	29
5.5 Cinética de crescimento em diferentes meios.....	29
5.6 Determinação do rendimento, produtividade e μ_{\max} - produtividade específica.....	32

5.4.1 Rendimento.....	32
5.4.2 Produtividade.....	34
5.4.3 Velocidade específica de crescimento máximo (μ_{max}) e produtividade específica.....	35
5.5 Determinação das proteínas totais.....	36
6. CONCLUSÕES.....	37
6.1 Considerações Finais.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

1 - INTRODUÇÃO

Em virtude do crescimento populacional, somado ao advento das mudanças climáticas, fica clara a necessidade de se produzir alimentos de forma eficiente, com alto valor nutritivo e a partir de fontes sustentáveis. Nesse contexto, as microalgas podem desempenhar um papel importante na produção de diferentes tipos de alimentos, em virtude de suas características nutricionais e baixo impacto ecológico.

As microalgas não compreendem um grupo específico de organismos, mas sim diversos grupos com características semelhantes, sendo a principal a autotrofia, pois são capazes de realizar fotossíntese. Os principais grupos de interesse acadêmico e industrial pertencem aos reinos Eubacteria, com o grupo das cianófitas, e Eukarya, representado principalmente pelas clorófitas (Souto *et al.*, 2014). São organismos que apresentam amplo potencial para produção de diversos bioprodutos de interesse, como proteínas, antioxidantes, lipídios, biocombustíveis (Souto *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2024).

A utilização de microalgas na alimentação humana se apresenta como um recurso sustentável e que atende à agenda da ONU (Organização das Nações Unidas), pois se alinha com algumas das ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável), como por exemplo, a ODS 3, “Saúde e Bem Estar”, devido aos seus elevados valores nutricionais e a ODS 13, “Ação Climática”, em virtude da captação de CO₂ (dióxido de carbono) da atmosfera (Ang *et al.*, 2024). O estudo acerca de espécies de microalgas selvagens com potencial para aplicações industriais pode fomentar a conservação dos ecossistemas nativos e preservação da biodiversidade no país, visto que se trata de um recurso estratégico para obtenção de novos produtos e processos eficientes.

Os fertilizantes NPK, além de baratos, são amplamente difundidos, atuando como fontes de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), sendo empregados em diversas produções agrícolas, podendo apresentar diferentes variações em relação à proporção entre esses nutrientes. Esses elementos constituem alguns dos principais macronutrientes exigidos pelas microalgas e em virtude do baixo custo, esses fertilizantes se apresentam como fontes em potencial para o desenvolvimento de meios de cultivo para microalgas e subsequente aplicação em produções economicamente viáveis.

As microalgas se apresentam como microrganismos capazes de sintetizar diversos metabólitos de interesse e aplicáveis em diferentes áreas, incluindo

macromoléculas essenciais para o organismo humano, como proteínas. Em virtude da necessidade de desenvolvimento de processos eficientes e que favoreçam a obtenção de proteína para a alimentação humana de qualidade, em grande escala e com baixo custo, o trabalho proposto possui como intuito o isolamento de uma espécie selvagem, avaliação do crescimento dessa espécie em meio de cultivo a base de fertilizante agrícola, avaliação do potencial para produção de proteínas e desenvolvimento de um meio de cultivo barato para esse fim.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolamento de microalga selvagem e avaliação do potencial para produção de proteínas.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolamento e identificação de uma microalga coletada na bacia do Alto Paraguai.
- Avaliação do crescimento em fertilizante agrícola suplementado com diferentes fontes de nitrogênio visando aumento na produção de proteína.
- Quantificação do rendimento, produtividade e produtividade específica em diferentes meios.
- Avaliação do potencial para produção de proteína visando utilização na alimentação humana.
- Quantificação da proteína produzida em diferentes composições de meio.
- Determinação do meio de cultivo mais eficiente para produção de biomassa e proteína.

3 - REVISÃO

3.1 Aumento populacional e oferta de alimentos

De acordo com Domene *et al.* (2023), estimativas apontam um crescimento populacional de aproximadamente 2 bilhões de pessoas nos próximos 40 anos. Segundo

Hadley *et al.* (2023), em 2021, 2,3 bilhões de pessoas, equivalentes a 29,3% da população mundial, sofreram algum tipo de insegurança alimentar (moderada ou grave).

Diferentes fatores podem comprometer a produção e oferta de alimentos em curto, médio e longo prazo. Caso a emissão de gases de efeito estufa continue nos níveis atuais, a temperatura média do planeta aumentará 1,5 e 2,0 °C em relação aos níveis pré industriais até 2030 e 2050 respectivamente. Esse aumento na temperatura pode gerar prejuízos na produtividade agrícola, pois podem promover eventos climáticos adversos, provocando mudanças no regime de chuvas, ondas de calor, entre outros efeitos (Domene *et al.*, 2023; Pixley *et al.*, 2023).

3.2 Características das microalgas

As algas são consideradas um grupo não monofilético, podendo ser eucariontes ou procariontes e macroscópicas (no caso das eucariontes) ou microscópicas, unicelulares ou pluricelulares. As algas microscópicas são também denominadas microalgas e as espécies planctônicas são comumente conhecidas como fitoplânctons, habitando diversos tipos de ambientes aquáticos, sendo organismos responsáveis por mais de 50% da fotossíntese global (Santos; Junqueira, 2024; Camargo, 2020; Andrade; Filho, 2014).

Todas as microalgas apresentam a clorofila *a* e presença dos demais pigmentos fotossintetizantes pode variar em função da espécie, sendo considerados como pigmentos acessórios (Souto *et al.*, 2014). As microalgas são, do ponto de vista fisiológico, similares às plantas superiores e apresentam metabolismo análogo ao das mesmas (Souto *et al.*, 2014). Em relação a uma das principais espécies eucarióticas de interesse, no caso as espécies de *Chlorella* sp., estas são bioquimicamente classificadas como possuidoras de metabolismo C3 (Kluge; Tezotto-Uliana; Silva, 2015). O metabolismo C3 está presente na maioria das espécies de plantas, que nesse caso, não apresentam adaptações fisiológicas voltadas para a redução da fotorrespiração, ao contrário das plantas C4 e CAM e portanto, a enzima rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) atua sobre o CO₂, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (carboxilação), mas também sobre o O₂, formando uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de fosfoglicolato (fotorrespiração), o que resulta em aumento do custo energético (Valente *et al.*, 2011; Moreira, 2013).

Os macronutrientes exigidos pelas microalgas são carbono (C) hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), silício (Si), potássio (K), fósforo (P), sódio (Na), cálcio (Ca), enxofre (S) e ferro (Fe) e alguns dos micronutrientes são zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu), manganês (Mn) e molibdênio (Mo) (Souto *et al.*, 2014). Os elementos nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e magnésio correspondem a nutrientes de grande importância para as microalgas. O nitrogênio é um elemento determinante em relação a produção de proteínas devido a demanda para síntese dos grupos amina dos aminoácidos e na dinâmica de proporção carbono/nitrogênio nas células. O potássio atua de forma livre (K^+) nas células, atuando principalmente como agente osmótico, ativador de enzimas e também no transporte entre membranas. O fósforo está relacionado principalmente às dinâmicas de transferência de energia, como ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato). O enxofre é um dos elementos que constituem o aminoácido cisteína, onde, através das ligações dissulfeto, contribui para a formação da estrutura tridimensional dessas moléculas. O magnésio está presente na molécula de clorofila, está relacionado a processos metabólicos do nitrogênio e auxilia na estabilidade dos ribossomos (Souto *et al.*, 2014; Wojciechowski *et al.*, 2013).

3.3 Microalgas na alimentação humana

As microalgas representam um valioso recurso no processo de obtenção de fontes alternativas de alimentos. As espécies de microalgas mais consumidas globalmente correspondem às espécies de *Spirulina sp.* (Atualmente agrupadas no gênero *Arthrospira*) e *Chlorella sp.* (Ang *et al.*, 2024). De acordo com Sarkar, *et al.* (2020), a partir da biomassa de microalgas podem ser extraídos diversos metabólitos de interesse, como biocombustíveis, proteínas, carboidratos e corantes alimentares. Outra importante aplicação das microalgas é na produção de biopolímeros voltados para a alimentação humana (Martins, 2014).

Segundo Oliveira (2022), para a produção de 1 tonelada de proteína utilizando espécies pertencentes ao gênero *Chlorella*, são necessárias duas vezes menos água em comparação com a produção da mesma quantidade de proteína oriunda de gado bovino. Segundo o mesmo autor, algumas espécies de microalgas podem produzir cerca de 100 vezes mais vitamina B12 em comparação a produtos de origem animal.

De acordo com Carnevalli (2021), microalgas são amplamente utilizadas na obtenção de proteínas para alimentação humana e no desenvolvimento de “alimentos funcionais”. Algumas das espécies mais empregadas na produção de proteína em larga escala são *Arthrospira platensis* (antiga *Spirulina platensis*), *Arthrospira maxima*, *Chlorella* sp. e *Dunaliella salina*.

Algumas das vantagens da produção de microalgas é a não competitividade com outros sistemas de produção, podendo ser produzidas em ambientes isolados e em qualquer época do ano, não demandando utilização de agrotóxicos, o que resulta em baixo impacto nos ecossistemas naturais (Camargo, 2020).

3.4 Fertilizante NPK

O NPK consiste em uma mistura sólida granulada que possui, essencialmente, os elementos nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), apresentando proporções variadas entre os mesmos. Os fertilizantes podem apresentar diferenças em relação a granulometria e também sobre a oferta dos nutrientes, onde cada grânulo pode ou não apresentar todos os nutrientes. Nas formulações mais comuns, o nitrogênio se encontra disponível nas formas de uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e fosfato monoamônico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), o fósforo na forma de superfosfato simples ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + \text{CaSO}_4$), e o potássio na forma de cloreto de potássio (KCl) (Neto, 2010; Dias; Fernandes, 2006).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos, Laboratório de Cultivo de Microrganismos, Laboratório de Bioengenharia e Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, localizados no centro de Laboratórios Finep (CLF).

4.1 Isolamento e Identificação

O isolamento foi realizado a partir de uma amostra de água de rio. A amostra de água foi obtida no córrego Itá, no assentamento Barra do Itá, em Bela Vista - MS (coordenadas: 22°11'17.7"S 56°18'35.9"W). Este córrego pertence a Bacia do Rio Apa,

que por sua vez, está incluída na Bacia do Alto Paraguai (Broch, 2008). Sua nascente localiza-se no município de Antônio João - MS e é um dos afluentes do Córrego Estrela, que deságua no Rio Apa, um dos afluentes do Rio Paraguai.

O isolamento foi realizado através do método “*streak plating*”, no qual uma amostra da água obtida foi submetida ao estriamento utilizando uma alça de platina em uma placa de Petri contendo um meio sólido composto por ágar (1%) e fertilizante agrícola NPK (10-10-10 1,0 g.L⁻¹). Após o plaqueamento, as placas foram mantidas em bancada com fotoperíodo de 16 h de luz até que ocorresse o crescimento das primeiras colônias isoladas. A utilização de NPK como fonte de nutrientes atua também como pressão de seleção, visto que apresenta limitações devido a ausência de outros macronutrientes e micronutrientes. Os critérios utilizados para a seleção da colônia foram a velocidade de crescimento e o diâmetro da colônia, e após o isolamento de uma colônia selecionada, foram realizados novos plaqueamentos por estriamento a fim de se garantir a pureza da espécie isolada.

A confirmação de pureza foi realizada através de microscopia óptica, onde foi constatada a presença de células apresentando características morfológicas uniformes. Foram realizadas observações nos aumentos de 40, 100, 400 e 1.000 vezes e a identificação ao nível de gênero foi realizada através da comparação das características morfológicas com as características inerentes aos gêneros descritos no livro “Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições” (Bicudo., Menezes, 2006).

4.2 Determinação do comprimento de onda de trabalho

4.2.1 Determinação por espectrofotometria na região da luz visível

Para determinar o comprimento de onda a ser utilizado durante a construção da curva de crescimento, foi previamente preparado um meio líquido (NPK 10-10-10 1,0 g.L⁻¹), no qual foi inoculada a espécie isolada. Após aproximadamente duas semanas de crescimento microbiano, uma alíquota do frasco foi coletada e submetida a uma varredura manual por espectrofotometria. A determinação do comprimento de onda foi realizada por meio da aferição da absorbância em comprimentos de onda entre 400 e 780 nm, no qual a variação foi realizada de forma manual até obter o pico de

absorbância. O comprimento de onda no qual foi constatado o pico de absorbância foi empregado na determinação da densidade óptica (D.O.) durante as análises de cinética de crescimento, nos ensaios “correlação de massa seca pela absorbância” e “correlação do número de células pela absorbância”.

4.2.2 Análise em espectrofotômetro de varredura (faixa visível e ultravioleta)

A fim de confirmar o comprimento de onda determinado no item 4.2.2 e verificar quais comprimentos de onda são absorvidos pelos pigmentos presentes nas células, foram realizadas leituras utilizando um espectrofotômetro de varredura. Para isso, cinco diferentes amostras foram submetidas à leitura, sendo elas: células pigmentadas, células despigmentadas, extrato hidroetanólico pigmentado, extrato hidroetanólico despigmentado e células fixadas em formol. O tratamento com hipoclorito de sódio foi escolhido para degradação dos pigmentos devido ao potencial oxidante desse reagente e de testes preliminares realizados visando degradar os pigmentos das células.

A amostra de células pigmentadas e despigmentadas foram obtidas de frascos contendo células previamente cultivadas em meio líquido (NPK 10-10-10 1,0 g.L⁻¹). Para a obtenção das células despigmentadas, uma alíquota de células pigmentadas foi coletada e transferida para um béquer, onde foi feita a adição de gotas de uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% até a mudança de coloração do meio, de verde para transparente. Ambas as amostras, com e sem pigmento, foram submetidas a centrifugação a 4.497 G (velocidade máxima da centrífuga) em dois ciclos de 10 min para padronização e eliminação do hipoclorito de sódio sobressalente e posteriormente, foram ressuspensas em uma solução de meio básico (NPK 10-10-10 1,0 g.L⁻¹). Uma alíquota do meio básico foi coletada para utilização como branco durante a análise dessas duas amostras a fim de se evitar efeito de leitura de fundo.

Para a obtenção do extrato hidroetanólico, 0,02g de biomassa da microalga seca (sobressalente da biomassa coletada para o método de Kjeldahl) foi solubilizada em uma solução de etanol de aproximadamente 50% e em seguida, submetida à maceração com agitação magnética durante uma hora. Após a maceração, a mistura foi filtrada em papel filtro e dividida em duas partes, onde metade foi separada para ser utilizada como

extrato pigmentado, enquanto a outra foi separada e transferida para um béquer, no qual foi feita a adição de gotas de hipoclorito de sódio 2,5% até a mudança de coloração da solução de verde para transparente. O branco utilizado para essas duas amostras foi uma alíquota da solução etanólica de aproximadamente 50%. As células fixadas em formol foram obtidas de uma amostra de células armazenadas em formol 4% durante 6 meses. Para o branco dessa amostra, foi utilizada uma solução de formol com a concentração correspondente.

4.3 Correlação da massa seca pela absorbância

A partir de um frasco contendo células previamente cultivadas em meio líquido (NPK 10-10-10 1,0 g.L⁻¹), foram obtidas as amostras para realização desse ensaio. O meio foi concentrado mediante centrifugação. Foram preparadas oito diluições a partir da solução inicial concentrada, das quais foram coletadas alíquotas que foram submetidas a determinação da densidade óptica. A absorbância de cada diluição foi determinada três vezes, sendo a mesma amostra homogeneizada entre cada leitura e os valores reais obtidos mediante o cálculo da média das três determinações. O volume restante de cada diluição foi separado em microtubos do tipo eppendorf, previamente pesados e com suas respectivas massas anotadas. Foram inseridos 1 mL em cada microtubo, onde foram separados três tubos para cada diluição, totalizando 24 microtubos. Os microtubos contendo as amostras foram mantidos em estufa sob temperatura de 60 °C durante 36 horas, até a completa evaporação da água e após esse período, foram novamente pesados. A determinação da biomassa seca presente em 1 litro de cada diluição foi realizada através da seguinte fórmula:

$$B_{seca} = \left(\frac{M_{c.a.} - M_{s.a.}}{V} \right) \times 1000$$

Onde:

B_{seca} = Biomassa seca presente em 1 litro de solução (g.L⁻¹)

$M_{c.a.}$ = Massa do tubo contendo amostra (g)

$M_{s.a.}$ = Massa do tubo sem amostra (g)

V = Volume de amostra líquida inserida no tubo para secar (mL)

$1000 =$ Fator para conversão de g.mL^{-1} para g.L^{-1} .

Após o cálculo da média para cada diluição, os valores de absorbância e de massa seca em 1 L de cada concentração foram plotados em um gráfico utilizando a ferramenta Google Sheets a fim de construir um gráfico de regressão linear. Entre as diferentes diluições, foram selecionadas aquelas com dados que se ajustaram melhor ao modelo, com coeficiente de determinação acima de 0,95 e mais próximo de 1 ($R^2 > 0,95$) e o coeficiente angular obtido (Coeficiente angular 1 - *C.A.1*) foi anotado a fim de ser empregado na estimativa dos valores de biomassa nas demais análises através da multiplicação do mesmo pela absorbância.

4.4 Correlação do número de células pela absorbância

A partir de um frasco contendo células previamente cultivadas em meio líquido (NPK 10-10-10 $1,0 \text{ g.L}^{-1}$), foram obtidas as amostras para realização desse ensaio. Foram preparadas dez diluições, das quais foram coletadas alíquotas que foram submetidas a determinação da D.O. A absorbância de cada diluição foi determinada três vezes, sendo a mesma amostra homogeneizada entre cada leitura e os valores reais obtidos mediante o cálculo da média das três determinações. O volume restante de cada diluição foi submetido à contagem de células em um hemocitômetro (ou câmara de Neubauer). Devido ao tamanho das células, as mesmas foram contadas utilizando o quadrante central da lâmina, que por sua vez é dividido em 20 quadrículos menores. A contagem foi realizada seguindo a metodologia descrita por Capes-Davis e Freshney (2010), na qual cinco quadrículos dispostos em diagonal entre os 20 centrais foram escolhidos para contagem (quadrículos 1, 2, 3, 4 e 5). Esses quadrículos, por sua vez, são subdivididos em 16 compartimentos menores, totalizando 80 compartimentos ($5 \times 16 = 80$). A contagem utilizando os quadrículos 1, 2, 3, 4 e 5 foi realizada somando todas as células encontradas nos mesmos (as células presentes sobre e/ou encostando nas linhas divisórias internas foram consideradas, assim como as células localizadas sobre e/ou encostando nas linhas superiores e esquerda dos quadrículos, enquanto as células encontradas sobre e/ou encostando nas linhas direita e inferior de cada quadrículos foram desconsideradas). O volume presente nesses cinco quadrantes

somados totaliza 5×10^{-4} mL e o cálculo para determinação do número de células presentes em 1 L foi realizado através da fórmula:

$$N^{\circ}_{cél. 1L} = (N^{\circ}_{cél. contadas} \times 5 \times 10^4) \times 1000$$

Onde:

$N^{\circ}_{cél. 1L}$ = Número de células em 1 litro

$N^{\circ}_{cél. contadas}$ = Número total de células contadas nos 5 quadrículos

5 = Número de quadrículos contados em diagonal

10^4 = Fator para conversão de 10^{-4} mililitro em 1 mililitro

1000 = Fator para conversão de 1 mililitro em 1 litro.

Os valores de absorbância e do número de células em 1 L de cada diluição foram plotados em um gráfico utilizando a ferramenta Google Sheets a fim de construir um gráfico de regressão linear. Entre as diferentes diluições, foram selecionadas aquelas com dados que se ajustaram melhor ao modelo, com coeficiente de determinação acima de 0,95 e mais próximo de 1 ($R^2 > 0,95$) e o coeficiente angular obtido (Coeficiente angular 2 - CA2) foi anotado a fim de ser empregado na estimativa do número de células em amostras através da multiplicação do mesmo pela absorbância.

4.5 Elaboração dos meios de cultivo

Foram testados diferentes meios (tratamentos) a fim de avaliar parâmetros como rendimento, produtividade e acúmulo de proteínas. Todos os meios foram preparados a partir do meio básico composto por fertilizante comercial NPK 10-10-10 $1,0 \text{ g/L}^{-1}$. Seis diferentes composições foram testadas, nas quais foram realizadas variações em relação a presença ou ausência de magnésio no meio, na forma de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), além de diferentes fontes suplementares de nitrogênio, sendo elas o nitrato de sódio (NaNO_3) e a uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). O pH de todos os meios foi ajustado para $7 (\pm 0,5)$ e foi utilizado cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_{12} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como tampão. A composição dos meios testados pode ser visualizada na **Tabela 1**:

Tabela 1: Composição dos meios de cultivo testados.

Tratamento	Gramas de reagente para preparação de 1 litro de cada meio (g.L ⁻¹)				
	NPK	Cloreto de cálcio	Sulfato de Magnésio	Nitrato de Sódio	Uréia
T1	1	0,04	0	0	0
T2	1	0,04	0	0,075	0
T3	1	0,04	0	0	0,026
T4	1	0,04	0,2	0	0
T5	1	0,04	0,2	0,075	0
T6	1	0,04	0,2	0	0,026

Fonte: O autor, 2024.

O nitrato de sódio e a uréia correspondem às fontes suplementares de nitrogênio adicionadas nos tratamentos *T2-T5* e *T3-T6*, respectivamente. A suplementação foi realizada visando verificar se haveria aumento na produtividade e no acúmulo de proteínas, assim como verificar qual entre essas fontes de nitrogênio promoveria esses efeitos de forma mais eficiente. Em virtude disso, a concentração de ambos os reagentes foi ajustada a fim de que os meios referentes às mesmas possuísem o mesmo número de mols de nitrogênio. A concentração de nitrogênio em todos os meios a partir da adição de NPK 10-10-10 1,0 g/L⁻¹ é de cerca de 0,1 g/L⁻¹, mas a partir da adição de uma das duas fontes suplementares em suas respectivas concentrações, a concentração passa a ser de cerca de 0,112 g/L⁻¹, promovendo um acréscimo de aproximadamente 12% de nitrogênio em relação ao controle.

4.6 Cinética de crescimento em diferentes meios

Para as análises de crescimento, foram realizados dois cultivos, sendo eles o *Cultivo 1* e o *Cultivo 2*. Os experimentos foram conduzidos em BOD, sob fotoperíodo de 16h de luz, intensidade luminosa de cerca de 801 Lux, agitação de 202 rpm e utilizando 200 mL de meio de cultivo, inseridos em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL. No primeiro cultivo (*Cultivo 1*), foi empregada uma repetição de cada um dos seis tratamentos e estes foram mantidos a 20°C. No segundo cultivo (*Cultivo 2*), em virtude dos resultados preliminares obtidos durante o primeiro cultivo, foram selecionados apenas três dos seis tratamentos iniciais, que por sua vez, foram cultivados em duplicata sob temperatura de 30 °C.

As amostragens foram realizadas com intervalos de 48 e 60 horas, onde foram coletados 600 μL , aos quais foram adicionados 600 μL de água destilada a fim de obter amostras diluídas (2x). A mesma diluição foi aplicada em todas as amostragens a fim de reduzir o erro experimental. A absorbância de cada amostra foi determinada três vezes, sendo a mesma homogeneizada entre cada leitura e os valores reais obtidos mediante o cálculo da média das três determinações. Todos os valores de absorbância finais foram posteriormente multiplicados por 2 ($\text{Abs} \times 2$) para correção dos valores em virtude da diluição.

4.6.1 Análises dos dados de cultivo

Todos os dados foram analisados utilizando a plataforma Google Sheets. Os dados de cada unidade experimental utilizada no *Cultivo 1* referentes à variação da absorbância em função do tempo de cultivo foram plotados em um gráfico a fim de observar o perfil de crescimento da espécie. A partir da análise dos dados do *cultivo 1*, apenas três entre os seis meios de cultivo originais foram selecionados para utilização nos demais ensaios. Os critérios para a escolha desses meios de cultivo em relação aos demais foi o tempo de cultivo até que a população de microalgas presente no frasco atingisse a senescência, onde aqueles que promoveram a senescência em um menor período de tempo foram eliminados. Todas as demais análises descritas foram realizadas empregando os três meios de cultivo (tratamentos) selecionados.

Os dados obtidos ao longo do *Cultivo 1* foram empregados na estimativa do rendimento nas condições de presença e ausência de sulfato de magnésio no meio. Para quantificar o rendimento, a absorbância máxima observada nas condições de presença e ausência desse reagente foram convertidos em biomassa em 1 litro (g.L^{-1}) através da multiplicação desse valor pelo *CAI*.

Os dados do *Cultivo 1* e do *Cultivo 2* dos tratamentos selecionados foram empregados na determinação da produtividade. Os dados de absorbância de ambos os cultivos foram convertidos em g.L^{-1} através da multiplicação dos valores pelo C.A.1. Para determinar a produtividade, todos os valores de variação da biomassa em g.L^{-1} em função do tempo foram submetidos à fórmula:

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{t}$$

Onde:

P_x = Produtividade em formação de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)

X_f = Concentração final de biomassa (g.L^{-1})

X_0 = Concentração inicial de biomassa (g.L^{-1})

t = Tempo de cultivo (dias)

Analisando os valores obtidos, foi possível determinar o momento de cada cultivo em que houve o maior acúmulo de biomassa por dias de cultivo. A produtividade máxima foi expressa em $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Os dados dos tratamentos selecionados e coletados ao longo do *Cultivo 1* e do *Cultivo 2* foram empregados na determinação do μ_{max} . O μ_{max} corresponde à velocidade específica de crescimento máximo da espécie e é expresso em dia^{-1} (Pina, 2021). Consiste na taxa de crescimento obtida na fase exponencial, que por sua vez, é a única fase onde essa taxa se apresenta de forma constante (Monod, 1949). Para determinar o μ_{max} , os dados de absorvância de todos os frascos foram tratados através da fórmula: $\ln x$ Abs. Os dados modificados foram plotados em um gráfico da variação do \ln da absorvância em função do tempo. Por meio desse gráfico, para cada unidade experimental, foi possível determinar a fase de crescimento exponencial. Entre os dados presentes nessa fase, foram selecionados aqueles com melhor ajuste ao modelo linear ($R^2 > 0,95$) e a partir dessa curva, foi possível obter o coeficiente angular de cada repetição. O valor do coeficiente angular, por sua vez, corresponde ao μ_{max} , cujo valor foi multiplicado pelo *C.A.I* para determinação da produtividade específica dos tratamentos, expressa em $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Os dados de rendimento, produtividade e produtividade específica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizada utilizando a plataforma Google Sheets, por meio da aplicação das fórmulas específicas aos devidos delineamentos.

4.7 Determinação do percentual de proteínas totais

4.7.1 Cultivo para obtenção de biomassa

Para a obtenção de biomassa para a aplicação do método de Kjeldahl para análise de nitrogênio e determinação do percentual de proteína, foi realizado um cultivo em bancada, utilizando 5 L de meio de cultivo, inseridos em frascos do tipo erlenmeyer de 6 L, sendo um frasco para cada tratamento. Os frascos foram mantidos em um local no qual receberam luz natural, advindo da janela do laboratório, além da luz artificial, advinda de lâmpadas instaladas sobre as bancadas. As lâmpadas presentes sobre as bancadas foram programadas para o fotoperíodo de 16 h de luz, e as duas fontes totalizaram, em média, 1.281,13 Lux. A agitação do meio foi realizada por meio de aeradores de aquário, cujas mangueiras foram acopladas em pipetas de vidro de 20 mL autoclavadas, que foram inseridas dentro dos frascos e cujas pontas foram submergidas no meio de cultivo. Na extremidade superior das pipetas, foi inserido algodão a fim atuar como filtro para a passagem do ar dos aeradores para os frascos.

Após o cultivo, o conteúdo dos meios de cultivo foi submetido a centrifugação e secagem em estufa para a obtenção da biomassa seca para a utilização no método de Kjeldahl. Foram realizadas sucessivas centrifugações dos meios cultivados fim de extrair o máximo de células, e para isso, os mesmos foram inseridos em frascos de 600 mL específicos para o modelo da centrífuga e centrifugados a 4.497 G em ciclos de tempo variável (de 10 à 30 min de duração). A biomassa úmida sedimentada em cada frasco foi transferida para placas de Petri, que foram mantidas abertas em estufa sob temperatura de 60 °C durante 24 horas. Após a secagem, a biomassa seca foi raspada do fundo das placas com o auxílio de uma espátula e foram coletados pelo menos 0,3 g de cada tratamento para a realização do experimento em triplicata (0,1 g para cada tubo digestor).

4.7.2 Determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl

A determinação do percentual de nitrogênio nas amostras foi realizada utilizando a metodologia de Kjeldahl modificada e com base nos métodos descritos em Sannazzaro, Pascuet e Zenebon, (2004) e Sant'ana, Gomes e Evangelista, (2007). A digestão das amostras foi realizada em balões de Kjeldahl acoplados a um sistema de aquecimento e de destilação. Foram necessários dois ciclos para a digestão de todas as amostras em virtude do fato de que o equipamento possuía 5 balões e havia um total de 9 amostras (3 para cada tratamento). Em cada balão foram inseridos 0,1 g de biomassa

seca, sobre a qual foi adicionada a solução digestora. O procedimento foi conduzido até a digestão completa das amostras. Ao longo do processo, foi realizada a adição de pequenos volumes de água destilada a fim de corrigir o volume da solução em virtude da evaporação. Ao final da digestão, o aquecimento foi suspenso a fim de promover o resfriamento do conteúdo dos balões e posteriormente, foi realizada a adição da solução neutralizadora. Imediatamente após a adição da solução de neutralização, foi feito o acoplamento do sistema de destilação. A mangueira de saída do condensador foi inserida em um erlenmeyer de 125 mL e submergida na solução de recepção. Em seguida, o aquecimento foi novamente ativado a fim de promover a destilação da amônia (NH₃). Após verificar a mudança de coloração da solução de recepção (rosa para verde), a digestão foi mantida ao longo de pelo menos mais uma hora e ao final da mesma, a solução de recepção foi titulada com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) padronizada e o ponto de viragem foi inferido por meio do retorno da solução para a coloração inicial (rosa) (ver **ANEXO A** - Composição das soluções do método de Kjeldahl adaptado). O percentual de nitrogênio total presente nas amostras foi determinado através da fórmula:

$$\%N = \frac{V_{gasto} \times N_{ácido} \times 14 \times 100}{g \times 1000}$$

Onde:

%N = Porcentagem de nitrogênio na amostra

V_{gasto} = Volume de solução de H₂SO₄ gasto na titulação

N_{ácido} = Normalidade do ácido utilizado na titulação (teórico: 0,1 N; padronizado: 0,1072 N)

14 = Peso molecular do Nitrogênio

4.7.3 Cálculo para determinação do percentual de proteínas

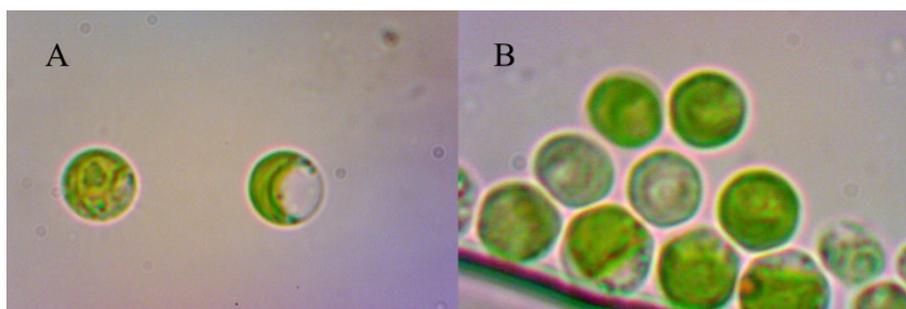
O percentual de proteínas totais presentes na amostra foi determinado através da multiplicação do percentual de nitrogênio (%N) pelo fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25. O fator de conversão foi escolhido com base na metodologia utilizada por Malhão (2021).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação.

A presença de uma única espécie no meio foi constatada por meio de microscopia óptica, no qual foi observada a presença de uma espécie unicelular e esférica. A identificação ao nível de gênero foi realizada com base no livro “Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições” (Bicudo; Menezes, 2006), e a espécie foi identificada como sendo pertencente ao gênero *Chlorella* (*Chlorella sp.*). Imagens da espécie isolada, ampliadas com aumento de 1.000 vezes e capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio óptico podem ser observadas na **Imagem 1**:

Imagem 1: Morfologia da espécie isolada - Fotografias A e B.



Fonte: O autor, 2024.

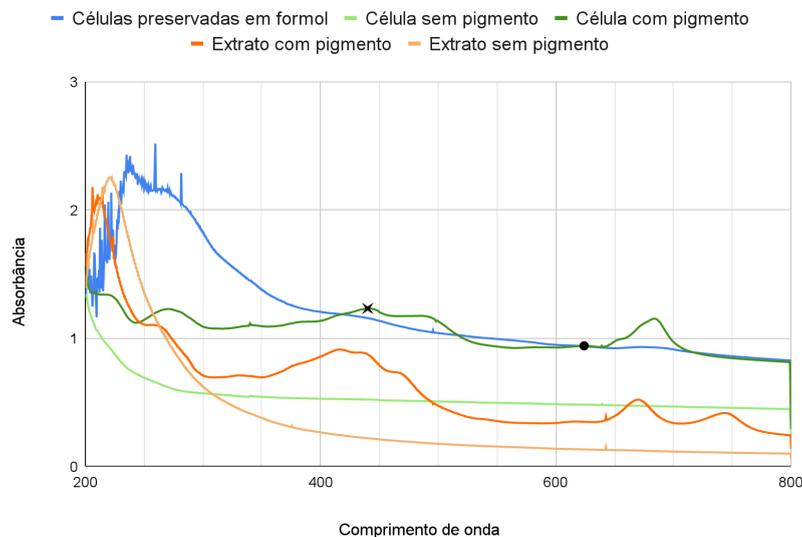
Mais imagens da espécie isolada, capturadas no aumento de 1000 vezes, podem ser visualizadas no APÊNDICE A (Imagens da espécie isolada: Fotografias a, b, c, d, e e f).

5.2 Determinação do comprimento de onda de trabalho

Durante esse ensaio, o comprimento de onda obtido foi de 624 nm, que por sua vez, foi inicialmente estabelecido como o comprimento de onda padrão para a espécie e foi utilizado em todas as análises de cinética de crescimento. Por meio da observação dos dados oriundos do *Cultivo 1*, demonstrados na **Imagem 3**, constatou-se de que havia a necessidade de confirmar se o comprimento de onda utilizado se refere a uma frequência absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes, além de confirmar se ele se correspondia ou não ao comprimento de onda no qual ocorre o pico de absorbância na

espécie. Devido a essa demanda, foram preparadas as amostras de células pigmentadas, células despigmentadas, extrato hidroetanólico pigmentado, extrato hidroetanólico despigmentado e células fixadas em formol. Essas amostras foram submetidas à varredura utilizando um espectrofotômetro de varredura com software acoplado. Os resultados dessa análise podem ser observados no **Imagem 2** :

Imagem 2: Varredura em diferentes comprimentos de onda das amostras de células, extratos e células fixadas.



Fonte: O autor, 2024.

Legenda: Ponto (□) indica o comprimento de onda de trabalho (624) e X indica o comprimento de onda com pico de absorbância para células pigmentadas na região visível (440).

A luz visível compreende uma faixa que varia de 380 a 740 nm e as clorofilas são capazes de absorver luz com maior eficiência nos comprimentos de onda do espectro do azul, cuja faixa varia de 440 a 485 nm e no espectro do vermelho, que varia de 625 a 740 nm (Kluge; Tezotto-Uliana; Silva, 2015). Durante a determinação do comprimento de onda de trabalho, é possível que falhas no equipamento ou na preparação da amostra tenham ocasionado o erro, pois analisando a **Imagem 2**, é possível observar que o comprimento de onda de trabalho não representa o comprimento no qual ocorre o pico de absorbância no espectro visível, porém, localiza-se próximo a região da luz vermelha, sendo passível de utilização para a realização de análises de crescimento e aferição da densidade óptica. O pico de

absorbância na região da luz visível foi verificado no comprimento de onda de 440 nm, que por sua vez, está inserido na faixa correspondente à luz azul e que, portanto, corresponde a um comprimento de onda mais adequado para realização de trabalhos posteriores com a espécie. Os picos na faixa do vermelho e na faixa do azul também foram observados na leitura com extrato hidroetanólico pigmentado, enquanto nas demais amostras, ocorreu a degradação desses pigmentos, pois não foram observados picos na região visível. Em todas as amostras foram observados picos na região ultravioleta.

5.3 Curva de calibração: Biomassa seca versus absorbância

Entre as 8 diferentes concentrações de biomassa utilizadas, 4 apresentaram bom ajuste ao modelo linear, com coeficiente de determinação de 0,999 (ver **APÊNDICE B** - Curva de Calibração: Biomassa seca versus Absorbância). A partir da curva de calibração, foi possível obter o coeficiente angular 1 (*C.A.1*), cujo valor é 0,75. Esse valor foi empregado na multiplicação dos dados de absorbância obtidos em cada amostragem dos cultivos a fim de converter os respectivos valores em biomassa, expressa em g.L⁻¹.

5.4 Curva de calibração: Número de células versus absorbância

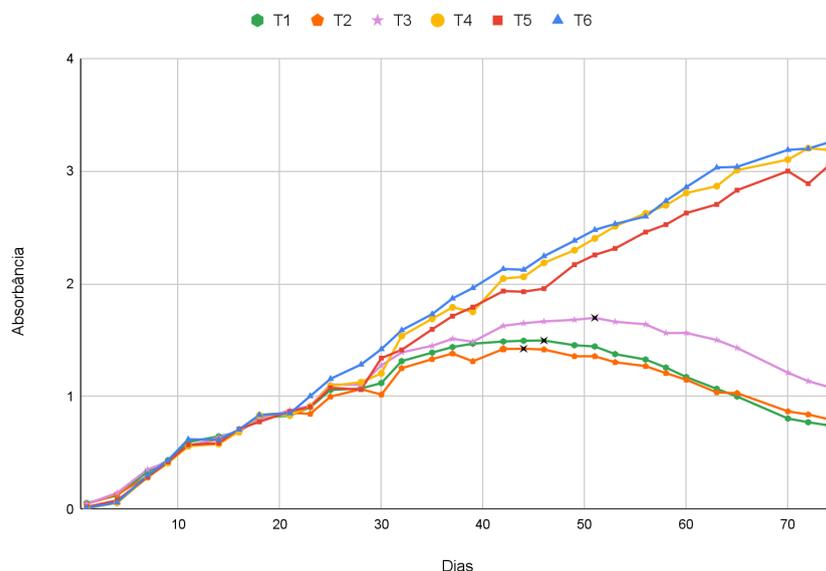
Entre as 10 diferentes concentrações celulares utilizadas, 8 apresentaram bom ajuste ao modelo linear, com coeficiente de determinação de 0,992 (ver **APÊNDICE C** - Curva de Calibração: N° de células versus absorbância). A partir da curva de calibração, foi possível obter o coeficiente angular 2 (*C.A.2*), cujo valor é $1,39 \times 10^{10}$. Para obter 1 g de biomassa seca, o meio de cultivo hipotético deve apresentar absorbância de 1,333. Utilizando o coeficiente angular, é possível estimar a partir da multiplicação de 1,333 pelo valor do coeficiente de $1,39 \times 10^{10}$, que para obter 1g de biomassa seca por litro, são necessárias 18.532.870.000 células por litro de meio.

5.5 Cinética de crescimento em diferentes meios

Para inoculação dos meios empregados no *Cultivo 1*, foi utilizado um inóculo com absorbância de 868, do qual foram coletados 500 µL para a inoculação de cada meio. O cultivo foi realizado ao longo de 74 dias, nos quais foram realizadas 31

amostragens. Os dados de absorbância de cada tratamento em função do tempo pode ser observado na **Imagem 3**:

Imagem 3: Variação da absorbância dos tratamentos no *Cultivo 1* em função do tempo.



Fonte: O autor, 2024.

Legenda: **T1**: NPK + Cloreto de Cálcio; **T2**: NPK + Cloreto de Cálcio + Nitrato de Sódio; **T3**: NPK + Cloreto de Cálcio + Uréia; **T4**: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio; **T5**: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio + Nitrato de Sódio; **T6**: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio + Uréia. *Pontos (x) marcados em preto nos cultivos T1, T2 e T3 indicam o dia referente ao pico de absorbância em cada tratamento.

É possível verificar que, em nenhuma das condições, houve período adaptativo (fase Lag) nitidamente definido. As curvas apresentam um perfil linear, embora períodos curtos de redução no crescimento, seguidos de crescimento exponencial possam ser observados. Observa-se que as células dos meios referentes aos tratamentos T1, T2 e T3, que por sua vez, não possuíam suplementação com sulfato de magnésio, atingiram o pico de acúmulo de biomassa no 46º dia para o T1, 44º dia para T2 e 51º dia para T3. Após esses respectivos dias, o decaimento da absorbância indica senescência e possivelmente, morte celular, enquanto os demais tratamentos mantiveram o vigor durante 74 dias. Foi possível observar a diferença em relação ao acúmulo de pigmentos entre os meios com e sem sulfato de magnésio através da visualização da coloração do

conteúdo dos frascos. As fotografias dos frascos, capturadas no 14º e 35º dia de cultivo, podem ser visualizada na **Imagem 4**:

Imagem 4: Meios do *Cultivo 1* com diferença no acúmulo de pigmentos.



Fonte: O autor, 2024.

Legenda: Ordem dos frascos da esquerda para direita - T1, T2, T3, T4, T5 e T6. Fotografia I - capturada no 14º dia de cultivo; Fotografia II - Capturada no 35º dia de cultivo.

Nota-se, relacionando as fotografias I e II com o gráfico da **Imagem 3**, que no período da captura da fotografia I, os valores de absorbância de todos os tratamentos permaneceram próximos entre si, assim como a coloração dos meios de cultivo, mas que no dia da captura da fotografia II, correspondente ao período em que a absorbância dos meios suplementados com sulfato de magnésio se distanciaram dos demais tratamentos, estes apresentaram coloração verde mais intensa. Segundo Zou *et al.* (2020), a baixa quantidade de magnésio no meio de cultivo pode ocasionar diminuição da clorofila e das atividades enzimáticas nas células de microalgas e a importância desse elemento se deve ao fato de que o mesmo se faz presente no centro da molécula de clorofila. De acordo com Souto *et al.* (2014) ele consiste no mineral que promove maior ativação enzimática nas microalgas, estando diretamente relacionado às enzimas relacionadas à transferência de ATP.

A mudança na coloração de meios pode estar relacionada à produção de feofitinas, produtos da remoção do átomo de magnésio da clorofila ou produção de feoforbídeos, produtos da remoção do magnésio de clorofilídeos. O enxofre, por sua vez, apresenta grande importância na produção de proteínas, visto que constitui a cisteína, aminoácido responsável pelas pontes de dissulfeto na estrutura terciária destas moléculas (*Ibidem*).

Devido ao efeito superior dos meios contendo magnésio em relação a manutenção do vigor das células por um período de tempo mais prolongado e conseqüentemente, aumento no rendimento, apenas os três meios contendo esse nutriente (*T4*, *T5* e *T6*) foram selecionados para utilização nas demais análises. A escolha desses tratamentos também foi realizada em virtude da suscetibilidade à contaminação que a espécie demonstrou nesse experimento e em testes preliminares, de acordo com o pressuposto de que o aumento no vigor celular reduziria essa suscetibilidade.

Para inoculação dos meios empregados no *Cultivo 2*, foi utilizado um inóculo com absorbância de 35,466, do qual foram coletados 1 mL para a inoculação de cada meio. Em comparação com o *Cultivo 1*, foi realizado aumento na concentração de inóculo, a fim de diminuir a suscetibilidade dos cultivos à contaminação. O cultivo foi realizado ao longo de 41 dias, nos quais foram realizadas 17 amostragens. Os dados de absorbância dos tratamentos selecionados no *Cultivo 1* (*T4*, *T5* e *T6*), juntamente aos dados das demais repetições referentes a esses tratamentos obtidas no *Cultivo 2*, foram convertidos em g.L⁻¹. A conversão foi realizada multiplicando todos os valores de absorbância pelo *C.A.I* e os dados foram empregados na determinação da produtividade. Os gráficos da variação da biomassa seca presente em 1 litro de meio de cada tratamento em função do tempo podem ser observados no **APÊNDICE D**.

5.6 Determinação do rendimento, produtividade e μ_{\max} - produtividade específica.

5.6.1 Rendimento

Realizou-se uma estimativa da diferença do rendimento nas condições de presença e ausência de sulfato de magnésio. Para fins estatísticos, as três condições com

presença e ausência de fonte de nitrogênio suplementar foram definidas como blocos. Dessa forma, o fator corresponde ao nitrogênio e os níveis são: 1 = NPK; 2 = NPK + nitrato de sódio; 3 = NPK + uréia . Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os dados podem ser visualizados na **Tabela 2**:

Tabela 2: Rendimento dos cultivos nas condições de presença e ausência de Mg.

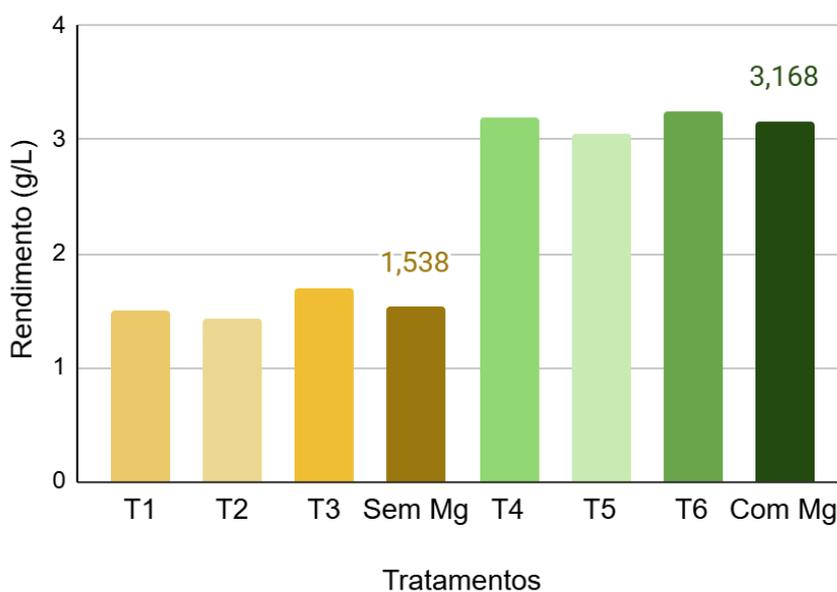
Blocos	Rendimento (g.L⁻¹)	
	Sem Mg	Com Mg
1 (NPK)	1,497	3,203
2 (NPK + Nitrato de Sódio)	1,421	3,047
3 (NPK + Uréia)	1,698	3,255
Média	1,539	3,168

* Teste F: Significativo a 5 e 1% - Há diferença estatística entre os tratamentos.

Fonte: O autor, 2024.

O teste F demonstrou significância a 5 e 1%, indicando que há diferença estatística entre as duas condições. A diferença em relação ao rendimento pode ser visualizada na **Imagem 5**:

Imagem 5: Diferença de rendimento nas condições de presença e ausência de Mg.



Fonte: O autor, 2024.

Legenda: Colunas com números (Sem Mg e Com Mg) representam a média aproximada para essas condições.

Nessa condição, o sulfato de magnésio se apresentou como reagente limitante. Segundo Monod (1949), o crescimento é interrompido quando o nutriente limitante é esgotado. A adição do sulfato de magnésio promoveu, aproximadamente, um aumento de 105,98% no rendimento, em virtude do fato de que as células mantiveram o vigor por um período mais prolongado e conseqüentemente, possibilitou melhor aproveitamento dos nutrientes restantes no meio.

5.6.2 Produtividade

Para fins estatísticos e devido às diferenças nas condições de cultivo, ao *Cultivo 1* e ao *Cultivo 2* pode ser atribuída a alcunha de blocos, porém, para que isso seja possível, o *Cultivo 2* foi dividido em dois blocos, a fim de que fosse obtido um total de três blocos com números equivalentes de repetições. O delineamento foi casualizado no tempo, onde as repetições do *Cultivo 2* foram atribuídas aos blocos 1 e 2 e as repetições de cada tratamento provenientes do *Cultivo 1* foram atribuídas ao bloco 3. A produtividade máxima de cada repetição foi determinada e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados podem ser observados na **Tabela 3**:

Tabela 3: Produtividade máxima de cada tratamento.

Blocos	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)		
	T4	T5	T6
1	0,0529	0,0429	0,0421
2	0,0363	0,0421	0,0355
3	0,0364	0,0343	0,0379
Média	0,0419	0,0398	0,0385

* Teste F: Não significativo a 5 e 1% - Não há diferença estatística entre os tratamentos.

Fonte: O autor, 2024.

O teste F não indicou significância a 5 ou a 1%, indicando que os dados não apresentam diferenças estatísticas. Isso sugere que no que se refere a produtividade de biomassa, a adição de fontes suplementares de nitrogênio nas concentrações utilizadas não é necessária, o que pode reduzir custos de produção, visto que não demonstraram aumento em relação ao controle (*T4*). Para fins de comparação, em um estudo conduzido por Santos (2013), a produtividade máxima encontrada para *Chlorella vulgaris* foi de 0,032 g.L⁻¹.d⁻¹, utilizando meio composto por 1,21 g.L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃) e 4,49 g.L⁻¹ de K₂HPO₄. O meio BG11 (*Blue Green 11*) é frequentemente utilizado como meio de referência em virtude da eficiência para produção de *Chlorella* sp, porém, apresenta custo elevado. Em um trabalho conduzido por Garcia *et al*, (2023) a produtividade máxima obtida com cultivo de *Chlorella sorokiniana* em meio BG11 foi de 0,860 g.L⁻¹.d⁻¹. Comparando os resultados obtidos para as espécies do mesmo gênero com os resultados da condição que promoveu maior produtividade, nesse caso o meio *T4* (0,0419 g.L⁻¹.d⁻¹), o mesmo demonstrou maior produtividade quando comparada ao meio utilizado por Santos (2013), mas menor quando comparado ao meio BG11 utilizado por Garcia *et al*. (2023). Como consistem em trabalhos realizados com espécies distintas, essa comparação é relativa, mas atua como precedente para utilização de outras composições de meio, utilizando como base composições documentadas na literatura e que promovam aumento da produtividade para o gênero.

5.6.3 Velocidade específica de crescimento máximo (μ_{max}) e produtividade específica.

A partir do tratamento dos dados da cinética de crescimento e subsequente elaboração dos gráficos de ln x Abs versus tempo, foi possível obter o coeficiente angular de cada repetição. A determinação do coeficiente angular foi realizada selecionando, para cada unidade experimental, a região da curva de maior inclinação (crescimento exponencial), selecionando trechos específicos nos quais houvesse maior coeficiente de determinação ($R^2 > 0,95$) e mais proximidade entre o coeficiente angular das repetições do respectivo tratamento (ver **APÊNDICE D**: Gráficos para determinação do μ_{max}). Após a obtenção dos dados e multiplicação dos mesmos pelo *C.A.1* (0,75), a fim de obter a produtividade específica, os dados foram organizados

seguindo o delineamento em blocos descrito no item 5.6.2 e submetidos à análise de variância (ANOVA). Os valores referentes a cada tratamento podem ser visualizados na **Tabela 4**:

Tabela 4: Produtividade específica de cada tratamento.

Blocos	μ_{\max} (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)		
	T4	T5	T6
1	0,0518	0,0482	0,0480
2	0,0491	0,0482	0,0478
3	0,0510	0,0512	0,0524
Média	0,0506	0,0492	0,0494

* Teste F: Não significativo a 5 e 1% - Não há diferença estatística entre os tratamentos.

Fonte: O autor, 2024.

De acordo com o teste F, não houve significância a 5 ou 1%, indicando que não há diferença estatística significativa entre os tratamentos, não havendo variação da produtividade específica. Esses dados, juntamente aos valores de produtividade presentes na **Tabela 2**, demonstram que, embora haja variações nos diferentes meios de cultivo em relação à suplementação de nitrogênio, as mesmas não promoveram diferenças no perfil de crescimento da espécie. Dessa forma, é possível obter resultados de produtividade de biomassa semelhantes a partir do emprego de qualquer composição.

5.5 Determinação das proteínas totais

O cultivo para obtenção de biomassa durou 28 dias. A absorbância inicial para T4 foi de 0,014, para T5 foi de 0,014 e para T6 foi de 0,070. Os dados de percentual de proteínas obtidos a partir da determinação de nitrogênio nas amostras pelo método de Kjeldahl e subsequente multiplicação do valor pelo fator de conversão de 6,25 podem ser visualizados na **Tabela 5**:

Tabela 5: Percentual de proteínas totais obtido em cada tratamento.

Tratamento	Percentual de Proteínas (%)
T4	13,757
T5	12,819
T6	15,946

Fonte: O autor, 2024.

Entre os tratamentos testados, o meio contendo uréia como fonte de nitrogênio suplementar (*T6*) foi o que promoveu maior acúmulo de proteínas, seguido do controle (*T4*), sem nitrogênio suplementar, e do meio contendo nitrato de sódio (*T5*). No meio *T6* foi verificado um aumento de 15,91% em relação ao controle, enquanto no meio *T5*, foi 6,81% menor em relação ao mesmo.

Utilizando o percentual do controle (*T4*) como parâmetro de comparação, verifica-se que em relação aos valores descritos na literatura para outras espécies do gênero *Chlorella*, o percentual obtido, de 13,757%, está abaixo dos teores descritos para *C. vulgaris*, que varia entre 51 e 58% e para *C. pyrenoidosa*, de cerca de 57% (Andrade; Filho, 2014). Um dos fatores que podem ter contribuído para a baixa produção de proteínas seria a subnutrição de nitrogênio, onde o mesmo pode ser requerido em maiores quantidades pela espécie. Segundo Viana (2020), nas condições de baixa oferta desse nutriente, podem ocorrer alterações na dinâmica de carbono nas células, que por sua vez, favorecem a produção de triacilgliceróis em detrimento da produção de carboidratos e proteínas. Para testar essa hipótese, ensaios utilizando dosagens mais elevadas de nitrogênio poderiam ser realizadas, mas caso houvesse aumento na produção de proteínas, essas dosagens apresentariam implicações sobre o custo de produção.

Nessas condições de cultivo, a microalga isolada não demonstrou potencial para produção de proteína e portanto, a utilização dos meios *T5* e *T6* com suplementação de nitrogênio não resultaria em vantagens econômicas. No entanto, para fins de produção de biomassa com baixo custo, partindo da concentração básica de NPK, o meio *T4*, contendo sulfato de magnésio, poderia ser utilizado.

6 - CONCLUSÕES

Através da identificação a nível de gênero, foi possível determinar que a espécie isolada pertence ao gênero *Chlorella*. Com base nos resultados da determinação de proteínas totais, conclui-se que a espécie isolada *Chlorella* sp. produziu teores baixos de proteínas a partir dos meios de cultivo utilizados, visto que os valores obtidos se encontram abaixo dos valores médios descritos para as demais espécies do gênero.

O cultivo da espécie em meio contendo fertilizante agrícola NPK suplementado com sulfato de magnésio promoveu a manutenção e vigor das células por um período de tempo mais prolongado em relação ao controle. A suplementação dos meios contendo NPK e sulfato de magnésio com as duas fontes de nitrogênio testadas não ocasionou aumento significativo na produtividade máxima em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os valores de produtividade específica obtidos em cada tratamento. Nas condições de cultivo, o maior percentual de proteínas foi observado no meio contendo uréia como fonte de nitrogênio suplementar.

Para fins de produção de biomassa utilizando a microalga isolada, o meio mais indicado, considerando a otimização do cultivo e a redução de custos, é o tratamento *T4*, composto de NPK, suplementado com sulfato de magnésio e isento de nitrogênio adicional.

6.1 Considerações Finais

A espécie de *Chlorella* sp. isolada não demonstrou potencial para produção de proteínas para alimentação humana nas condições de cultivo testadas, no entanto, não foram realizadas análises de quantificação de outros metabólitos de interesse, como lipídios, pigmentos, celulose, amido, entre outros. Também não foram conduzidos ensaios voltados para processos de biorremediação, ou outras aplicações documentadas na literatura para espécies do gênero.

O presente estudo se apresenta como precedente para a realização de outros trabalhos com a espécie. As características relacionadas ao rendimento, produtividade e μ_{\max} podem atuar como parâmetros para ajustes na metodologia ou otimização de processos envolvendo a mesma microalga. Outros parâmetros como temperatura, pH, radiância, variação nas dosagens dos nutrientes empregados, assim como adição de micronutrientes também não foram testados e podem influenciar a produção de bioprodutos de interesse alimentar, bioenergético ou farmacêutico. Por fim, o efeito da

uréia sobre o acúmulo de proteínas corresponde a um ponto que pode ser explorado em outros estudos envolvendo espécies do mesmo gênero com potencial para produção de proteínas.

7 - REFERÊNCIAS

SOUTO, A, R, et al. Microalgas de águas continentais, v.1. Instituto Agronômico do Paraná. Londrina, 2014.

ANG, W, S, et al. Unveiling the rise of microalgae-based foods in the global market: perspective views and way forward. *Food Bioscience*, p. 105390, 1 nov. 2024.

BICUDO, C; MENEZES, M. Gêneros de algas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. *RiMa*, 2 ed. São Paulo, 2006.

BROCH, S. A. O. Gestão transfronteiriça de águas: o caso da Bacia do Apa. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado. Brasília, 2008.

CAMARGO, E, C, D. Estudo da fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e fotossíntese em 30 espécies de microalgas verdes de água doce. Universidade Federal de São Carlos. Tese de Doutorado. São Carlos, 2020.

CAPES-DAVIS, A; FRESHNEY, R. I. Freshney's culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons, 2021.

CARNEVALLI, F, R. Uso de Biomassa de Microalgas e seus Derivados em Alimentos. Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. São Paulo, 2021.

DIAS, V, P; FERNANDES, E. Fertilizantes: uma visão global sintética. web.bndes.gov.br, 1 set. 2006.

DOMENE, S, M, A, et al. Segurança alimentar: reflexões sobre um problema complexo. *Estudos Avançados*, v. 37, n. 109, p. 181–206, 1 dez. 2023.

GARCIA, A, B, et al. Avaliação do uso de fertilizantes minerais no cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Embrapa.br, 2023.

HADLEY, K, et al. Impacts of climate change on food security and resulting perinatal health impacts. *Seminars in Perinatology*, p. 151842, 10 out. 2023.

KLUGE, R, A; TEZOTTO-ULIANA, J. V.; SILVA, P. P. M. D. Aspectos Fisiológicos e Ambientais da Fotossíntese. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 1, p. 56–73, 2015.

MARTINS, R, G. Síntese, extração e caracterização de biopolímeros de origem microalgal para desenvolvimento de nanofibras. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Rio Grande do Sul, 2014.

MONOD, J. Adaptation, mutation and segregation in relation to the synthesis of enzymes by bacteria. *The Biochemical Journal*, v. 44, n. 3, 1949.

MOREIRA, C. Fotossíntese. *Revista de Ciência Elementar*, v. 1, n. 1, 2013.

NETO, S, P, D, M. Fertilizantes NPK e suas origens. Embrapa.br, 2010.

- NIU, Q, et al. Role of catalyst porosity and acidity in nitrogen transformation during catalytic fast pyrolysis of microalgae: Study on extracted protein and model amino acids. *Energy Conversion and Management*, v. 322, p. 119210, 31 out. 2024.
- OLIVEIRA, A, V. Algas como fonte alternativa de proteínas e outros nutrientes para a alimentação humana: do cultivo à aplicação. Universidade Federal de Uberlândia. Trabalho de Conclusão de curso. Uberlândia, 2022.
- PINA, L, C, C, D, et al. Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 37734–37777, 13 abr. 2021.
- PIXLEY, K, V, et al. Redesigning crop varieties to win the race between climate change and food security. *Molecular Plant*, v. 16, n. 10, p. 1590–1611, 2 out. 2023.
- SANNAZZARO, C, A, D, C; PASCUET, N, S; ZENEBON, O. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz. ANVISA. São Paulo, 2004.
- SANT'ANA, L, S; GOMES, M. I. F. V.; EVANGELISTA, R. M. Apostila de Práticas de Bromatologia para o Curso de Nutrição. Universidade Estadual Paulista Campus de Botucatu, Faculdade De Ciências Agrônomicas. Botucatu, 2007.
- SANTOS, R, F, D; JUNQUEIRA, D. I. Levantamento Taxonômico de Microalgas de Água Doce na Região do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres. *Acta Biologica Brasiliensia*, v. 7, n. 1, p. 74–92, 7 jun. 2024.
- SANTOS, R, R, D. Estudo de diferentes condições de cultivo de *Chlorella vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Rio de Janeiro, 2013.
- SARKAR, S, et al. Priority-based multiple products from microalgae: review on techniques and strategies. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 40, n. 5, p. 590–607, 6 may 2020.
- SOUTO, A, R, et al. Microalgas de águas continentais, v.1. Instituto Agrônomico do Paraná. Londrina, 2014.
- VALENTE, T, N, P, et al. Anatomia de plantas forrageiras e a disponibilidade de nutrientes para ruminantes: revisão. Universidade Estadual Paulista, Veterinária e Zootecnia. Artigo de Revisão. Botucatu, 2011.
- VIANA, C, R, D, A. Sistemas sustentáveis de cultivo de *Chlorella vulgaris* a partir de efluentes de aquicultura. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Pesquisa em Bioenergia. Tese de Doutorado. São Paulo, 2020.
- WOJCIECHOWSKI, J, et al. Isolamento e cultivo de microalgas. Universidade Federal do Paraná. 2013.
- ZOU, G, et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a Light-Receiving-Plate (LRP)-Enhanced Raceway Pond for Ammonium and Phosphorus Removal from Pretreated Pig Urine. *Energies*, v. 13, n. 7, p. 1644–1644, 2 abr. 2020.

ANEXO A

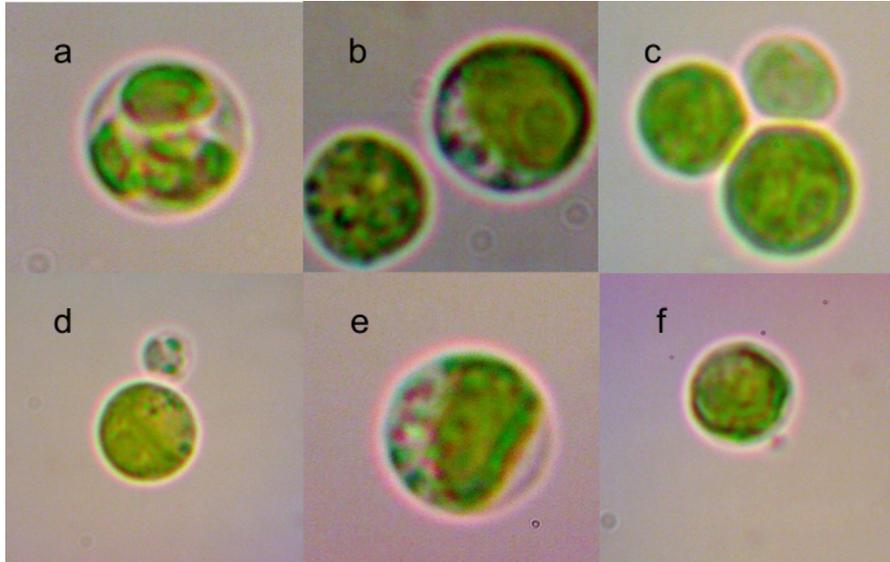
Composição das soluções do método de Kjeldahl adaptado

Soluções	Composição
Digestora	8 g.L ⁻¹ de sulfato de cobre (CuSO ₄), 8 g.L ⁻¹ de selenito de sódio (Na ₂ SeO ₃) e 80 g.L ⁻¹ de sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄).
Neutralizadora	Hidróxido de sódio (NaOH) 40%.
Receptora	20 g de ácido bórico (H ₃ BO ₃), 6 ml de solução alcoólica de vermelho de metila a 0, 1% e 15 mL de solução alcoólica de verde de bromocresol a 0, 1%.
Tituladora	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 0,05 mol.L ⁻¹ ou 0,1 N.

Fonte: Adaptado de - Sannazzaro, Pascuet e Zenebon, (2004) e Sant'ana, Gomes e Evangelista, (2007).

APÊNDICE A

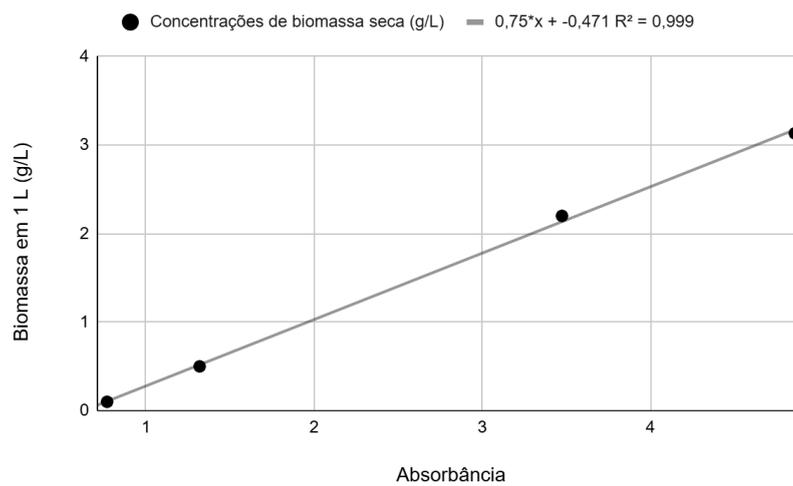
Imagens da espécie isolada: Fotografias **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f**.



Fonte: O autor, 2024.

APÊNDICE B

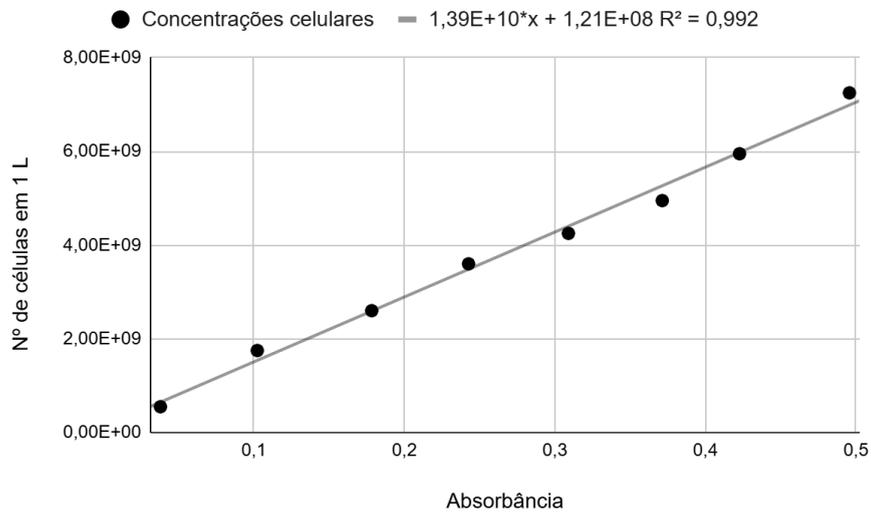
Curva de Calibração: Biomassa seca versus absorvância



Fonte: O autor, 2024.

APÊNDICE C

Curva de Calibração: N° de células versus absorvância

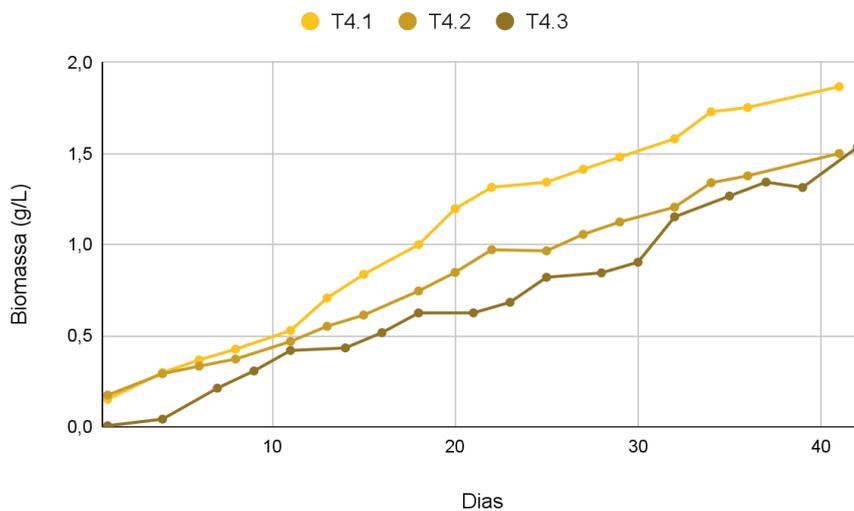


Fonte: O autor, 2024.

APÊNDICE D

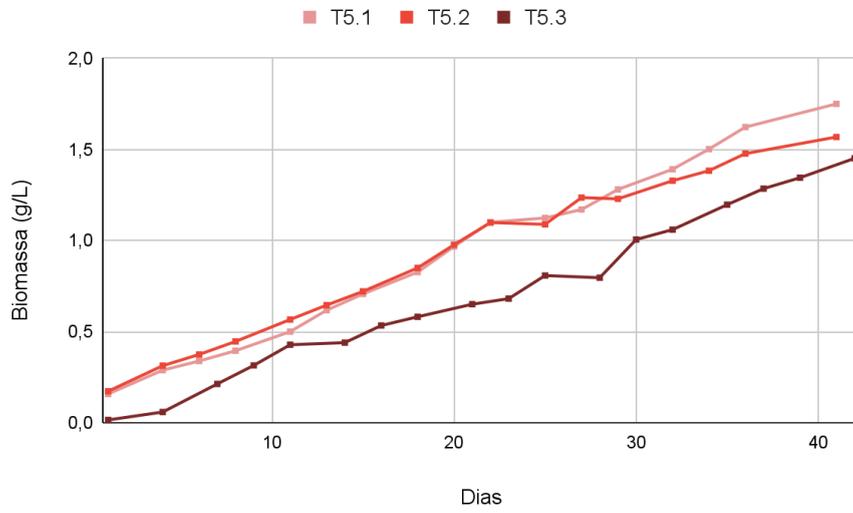
Variação da biomassa das repetições dos tratamentos *T4*, *T5* e *T6* em função do tempo.

T4: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio



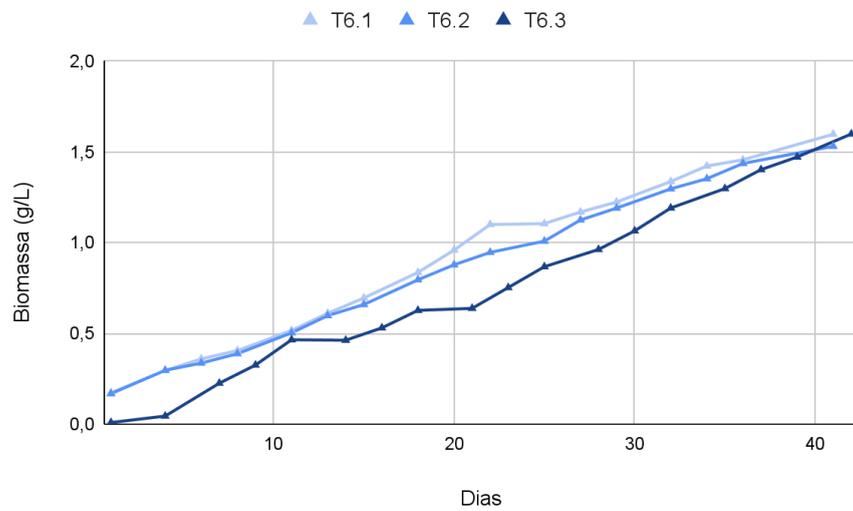
Fonte: O autor, 2024.

T5: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio + Nitrato de Sódio



Fonte: O autor, 2024.

T6: NPK + Cloreto de Cálcio + Sulfato de Magnésio + Uréia

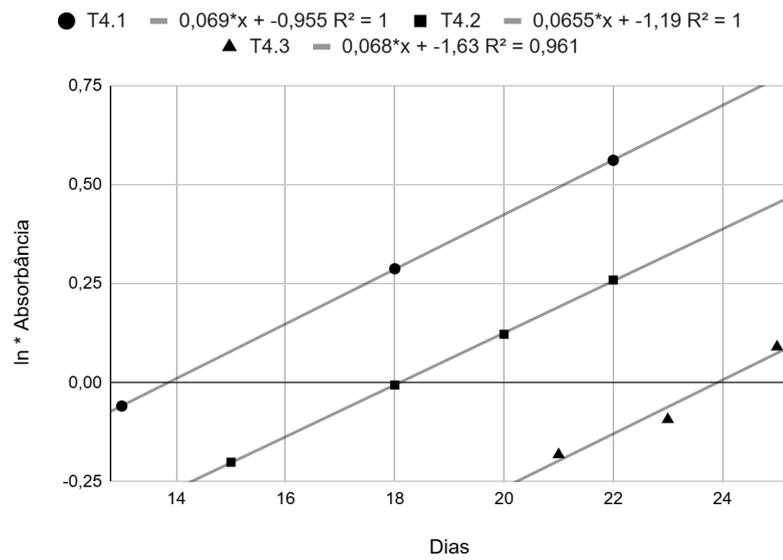


Fonte: O autor, 2024.

APÊNDICE E

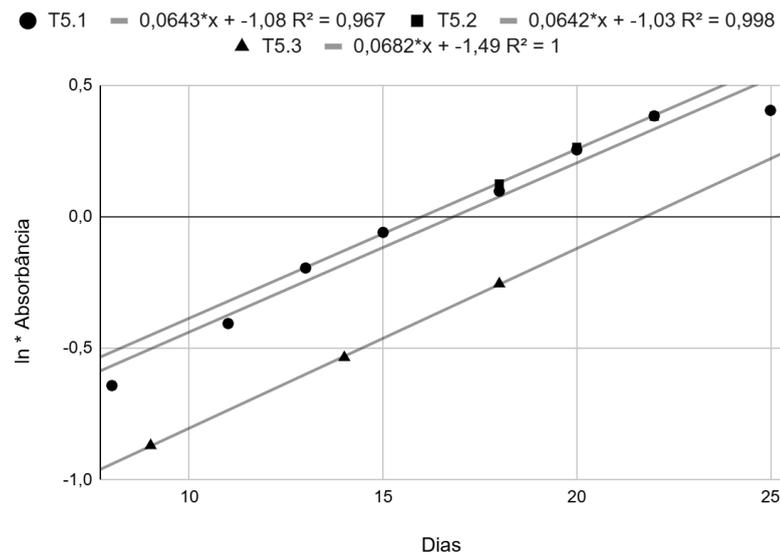
Gráficos para determinação do μ_{\max} ($T4$, $T5$ e $T6$).

T4: $\ln^* \text{Abs}$ versus dias



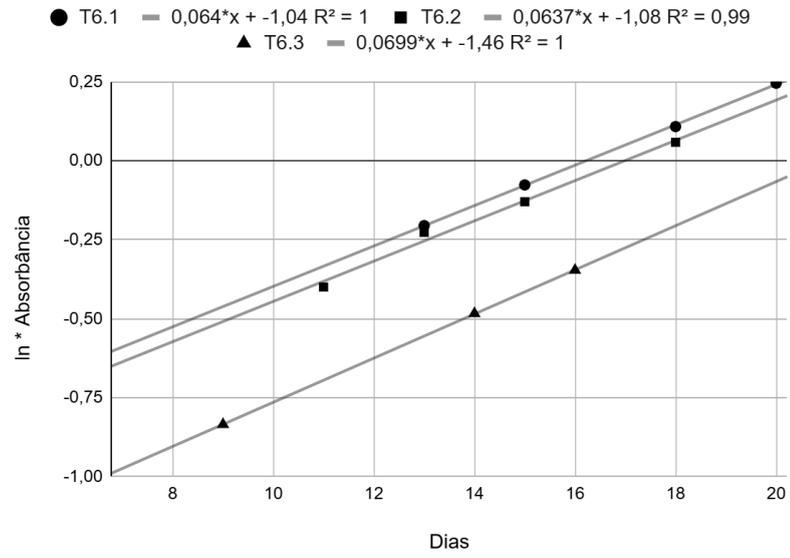
Fonte: O autor, 2024.

T5: $\ln^* \text{Abs}$ versus dias



Fonte: O autor, 2024.

T6: ln*Abs versus dias



Fonte: O autor, 2024.