

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA (FACET)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
AMBIENTAL (PPGCTA)

BRUNA APARECIDA MORTARI DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRODUTIVA DE MEIO ALTERNATIVO À BASE
DE *Lemna minor* PARA O CULTIVO DE *Chlorella sp.*

Dourados-MS

2026

BRUNA APARECIDA MORTARI DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRODUTIVA DE MEIO ALTERNATIVO À BASE
DE *Lemna minor* PARA O CULTIVO DE *Chlorella* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz

Área de concentração: 90500008 Ciências Ambientais.

Dourados-MS

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A554a Andrade, Bruna Aparecida Mortari De

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRODUTIVA DE MEIO ALTERNATIVO À BASE DE Lemna minor PARA O CULTIVO DE Chlorella sp.: Evaluation of the productive viability of an alternative medium based on Lemna minor for the cultivation of Chlorella sp. [recurso eletrônico] / Bruna Aparecida Mortari De Andrade. -- 2026.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcelo Fossa da Paz.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2026.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Nutrição. 2. Meio alternativo. 3. Lemna minor. 4. Chlorella sp.. 5. Nutrientes. 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.



TERMO DE APROVAÇÃO

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer Aprovada, para a dissertação intitulada: "**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRODUTIVA DE MEIO ALTERNATIVO À BASE DE *Lemna minor* PARA O CULTIVO DE *Chlorella* sp.**", de autoria de Bruna Aparecida Mortari de Andrade, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Documento assinado digitalmente
MARCELO FOSSA DA PAZ
Data: 26/02/2026 21:04:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Presidente da Banca Examinadora



Documento assinado digitalmente
MICHELE APARECIDA DOS SANTOS NOBREGA
Data: 05/03/2026 08:54:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Michele Aparecida dos Santos Nobrega
Membro Examinador(*UEMS*)



Documento assinado digitalmente
MICHELLE PINHEIRO VETORELLI
Data: 05/03/2026 21:07:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Michelle Pinheiro Vetorelli
Membro Examinador(*UFGD*)

Dourados/MS, 26 de fevereiro de 2026.

*Dedico esse trabalho a todos que caminharam
comigo e o tornaram possível.*

Resumo

Na atualidade as microalgas representam uma das fontes mais promissoras para geração de bioinsumos, mas a maior dificuldade enfrentada é o alto valor dos meios de cultivos. Então diante da escassez de estudos de novas formulações o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar o comportamento da microalga do gênero *Chlorella* em meio enriquecido com o extrato da macrófita *Lemna minor*, que é facilmente encontrada em grande quantidade em ambiente natural, quantificar a quantidade de proteína gerada pela microalga em meio alternativo e verificar a eficácia da criopreservação da espécie através da manutenção de sua viabilidade. A amostra de água foi obtida no córrego Itá, no assentamento Barra do Itá, em Bela Vista – MS, 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. Para preparo do extrato, foram adicionados 2,5% m/v de *L. minor* seca e triturada em água destilada mantida em ebulição por 15 minutos. Com os testes realizados foi possível constatar que o meio enriquecido com 1% e 2% *Lemna minor* foi mais nutritivo para *Chlorella* sp. em comparação com o meio BBM adaptado, e análises de macronutrientes realizadas no extrato de *Lemna minor* a 2,5%, mostra que essa macrófita tem um alto teor de nutrição, muito se dá ao fato de conseguir absorver grandes quantidades de nutrientes que estão presentes no meio em que foram cultivadas. Mas ainda é necessário o desenvolver mais pesquisas no ramo acadêmico sobre o uso dessa macrófita como fonte de nutrientes para outros microrganismos, e de outros prováveis fornecedores de nutrientes para novas formulações de meios alternativos. O estudo também demonstrou que a criopreservação de *Chlorella* sp. a -80°C utilizando glicerol 10% como crioprotetor é viável para armazenamento de curto a médio prazo (até 42 dias), com manutenção da viabilidade celular e capacidade de recuperação após o descongelamento.

Palavras-chave: Nutrição, meio alternativos, *Lemna minor*, *Chlorella* sp., nutrientes.

Abstract

Currently, microalgae represent one of the most promising sources for generating bio-inputs, but the greatest difficulty faced is the high cost of culture media. Therefore, given the scarcity of studies on new formulations, the present work aims to evaluate the behavior of the microalga of the genus *Chlorella* in a medium enriched with the extract of the macrophyte *Lemna minor*, which is easily found in large quantities in the natural environment, to quantify the amount of protein generated by the microalga in an alternative medium, and to verify the effectiveness of cryopreservation of the species through the maintenance of its viability. The water sample was obtained from the Itá stream, in the Barra do Itá settlement, in Bela Vista – MS. Isolation was performed using the “*streak plating*” method, in which a sample of the obtained water was subjected to streaking using a platinum loop on a Petri dish containing a solid medium composed of agar (1%) and NPK agricultural fertilizer (10-10-10 1.0 g.L⁻¹). After plating, the plates were kept on a bench under a 16-hour photoperiod until the first isolated colonies grew. To prepare the extract, 2.5% w/v of dried and crushed *L. minor* was added to distilled water, which was kept boiling for 15 minutes. Tests showed that the medium enriched with 1% and 2% *Lemna minor* was more nutritious for *Chlorella* sp. compared to the adapted BBM medium. Macronutrient analyses of the 2.5% *Lemna minor* extract show that this macrophyte has a high nutritional content, largely due to its ability to absorb large quantities of nutrients present in the

culture medium. However, further academic research is needed on the use of this macrophyte as a nutrient source for other microorganisms and on other potential nutrient suppliers for new alternative media formulations. The study also demonstrated that the cryopreservation of *Chlorella* sp. At -80°C using 10% glycerol as a cryoprotectant, it is viable for short to medium-term storage (up to 42 days), maintaining cell viability and recovery capacity after thawing.

Keywords: Nutrition, alternative media, *Lemna minor*, *Chlorella* sp., nutrients.

Lista de Figuras:

1. Figura 1: Preparo de <i>Lemna minor</i>	16
2. Figura 2: Tratamentos utilizados	18
3. Figura 3: Amostras criopreservadas com 10% de glicerol	33
4. Figura 4: Amostras criopreservadas com 15% de glicerol	33
5. Figura 5: Amostras criopreservadas com 20% de glicerol	34

Lista de Fotografias:

1. Fotografia 1: Cultivo em Shaker..... 15
2. Fotografia 2: Aeração de bancada com compressor de ar eletromagnético 17
3. Fotografia 3: Amostra preservadas em freezer -80 20
4. Fotografia 4: Materiais para filtragem da amostra (branco) para zerar o espectrofotômetro para realizar a leitura de absorbância com o objetivo de detectar o aumento na quantidade de clorofila..... 22

Lista de Gráficos:

1. Gráfico 1: Curva de calibração da <i>Chlorella sp.</i> (OD 680 nm vs Biomassa).....	21
2. Gráfico 2: Produção de biomassa em cultivos enriquecidos com extrato de <i>Lemna minor</i>	26
3. Gráfico 3: Crescimento de biomassa de <i>Chlorella sp.</i> ao longo de 15 dias	26
4. Gráfico 4: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 6 dias de criopreservação	40
5. Gráfico 5: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 12 dias de criopreservação.....	40
6. Gráfico 6: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 18 dias de criopreservação.....	41
7. Gráfico 7: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 24 dias de criopreservação.....	41
8. Gráfico 8: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 30 dias de criopreservação.....	42
9. Gráfico 9: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 36 dias de criopreservação	42
10. Gráfico 10: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de <i>Chlorella sp.</i> após 42 dias de criopreservação.....	43

Lista de Tabelas:

1. Tabela 1: Meio de cultivo básico para inóculo.....	14
2. Tabela 2: Meio de cultivo alternativo com <i>Lemna minor</i>	18
3. Tabela 3 Meio BBM (Bold's Basal Medium) adaptado.....	19
4. Tabela 4: Intensidade Luminosa do cultivo de bancada.....	28
5. Tabela 5: Macronutrientes presentes no extrato de <i>Lemna minor</i>	29
6. Tabela 6: Proteína presente na <i>Chlorella sp.</i> e <i>Lemna minor</i>	29
7. Tabela 7: Macronutrientes presentes no meio antes do cultivo (mg/L)	30
8. Tabela 8: Consumo dos nutrientes pela <i>Chlorella</i>	30
9. Tabela 9: Desempenho de crescimento após congelamento a -80 °C em diferentes concentrações de glicerol.....	32
10. Tabela 10: Macronutrientes presentes no meio após o cultivo (mg/L)	39

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1 Importância das microalgas	10
1.2 <i>Lemna minor</i>	11
1.3 Criopreservação	12
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Metodologia	13
3.1 Isolamento e Identificação	13
3.2 Manutenção do Inóculo	14
3.3 Preparo do Extrato	15
3.4 Cultivo de Bancada	16
3.5 Formulação dos Meios de Cultivo	17
3.6 Teste de Criopreservação	19
3.7 Monitoramento do Crescimento	20
3.8 Determinação de biomassa seca	22
3.9 Quantificação de proteínas	22
3.10 Análise de macronutrientes	23
3.10.1 Análise de Sulfato	23
3.10.2 Análise de Fósforo Total	23
3.10.3 Análise de Potássio	24
3.10.4 Análise de Ferro Livre (Complexado)	24
3.10.5 Análise de Ferro III	24
3.11 Análises Estatísticas	25
4. Resultados e Discussão	25
5. Considerações Finais	34
6. Referências	36
7. Apêndice A	39
8. Apêndice B	40

1. Introdução

Na atualidade as microalgas representam uma das fontes mais promissoras para geração de bioinsumos devido à sua elevada capacidade de síntese de compostos bioativos. Esses microrganismos produzem substâncias como aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos, fitohormônios e antioxidantes, que atua diretamente na promoção do crescimento vegetal e na mitigação de estresses abióticos. A produção desses bioinsumos pode estar associada a processos sustentáveis, como o aproveitamento de resíduos e captura de carbono (Khan *et al.*, 2009; Chisti, 2007; Renuka *et al.*, 2018).

Outro aspecto relevante é a contribuição das microalgas para economia circular e a sustentabilidade ambiental. Elas podem ser cultivadas utilizando efluentes industriais ou agrícolas, promovendo a remoção de nutrientes e a redução da poluição, ao mesmo tempo em que geram biomassa de alto valor agregado. Esse processo integra produção e tratamento ambiental, tornando-se uma solução inovadora para os desafios atuais da gestão de resíduos. Dessa forma, o uso de microalgas na produção de bioinsumos representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de sistemas produtivos mais resilientes e ecologicamente equilibrados (Markou & Georgakakis, 2011; Singh & Gu, 2010).

1.1 Importância das microalgas

Atualmente, os microrganismos, principalmente as microalgas, vêm despertando um grande aumento no interesse científico e tecnológico, em virtude de seu alto potencial biotecnológico e ambiental (Lukyanov, 2024). De acordo com Postolache (2025), esses microrganismos fotossintetizantes possuem um rápido crescimento e têm uma relevante eficiência na captura de dióxido de carbono (CO₂). Além de acumularem diversas substâncias que são de suma importância para o ramo industrial, como lipídios, pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados, carboidratos e proteínas (Bule *et al.*, 2018)

Ainda, de acordo com Bule (2018), as microalgas são uma promissora alternativa para o uso na biorremediação em ambientes aquáticos. Esse conjunto de características torna esses microrganismos uma fonte bastante vantajosa na produção de biocombustíveis, alimentos, fármacos e biofertilizante.

Em virtude a sua variedade evolutiva, as microalgas estão se tornando uma fonte em ascensão e sustentável em uma extensa variedade de compostos para variadas aplicações, o que acaba tornando esses microrganismos seres de grande interesse para a criação de novos

insumos, para a alimentação humana, ração para diferentes tipos de animais, fármacos, cosméticos, biofertilizante, biocombustíveis e para produção de energia (Severo *et al.*, 2021).

Esses microrganismos apresentam elevadas taxas de crescimento e grande efetividade fotossintéticas em razão às suas estruturas simples (Nakamura, 2006; Demirbas, 2006). De acordo com Stephenson *et al.* (2011) a conversão de luz solar em energia bioquímica das plantas é inferior à das microalgas. Em comparação com plantas terrestres de aparato fotossintético básico C3, as microalgas com suplementação de dióxido de carbono ao ar livre obtiveram de 5% a 8,3% de média anual de eficiência fotossintética, já as plantas terrestres que cresceram em atmosfera normal tiveram uma eficiência de 2,4% (Zhu *et al.*, 2008; Chisti, 2013).

Embora tenha um amplo potencial de aplicação, um dos principais desafios persistentes na biotecnologia é a viabilidade econômica da produção em grande escala dado ao custo elevado dos meios de cultivos sintéticos ricos em sais minerais, envolvendo outros fatores como, manutenção do pH, iluminação e controle de contaminação (Chakraborty e Bhowmick, 2023; Liang *et al.*, 2019). Vázquez-Romero *et al.* (2022) realizou estudos de análise tecnológico-econômica indicam que os custos de infraestrutura e operação do cultivo de microalgas em escala industrial são elevados e, dificultam a viabilidade econômica desse processo, assim, sendo um dos principais desafios à comercialização em larga escala.

Diante disso, é extremamente necessário desenvolver técnicas e alternativas que minimizem os impactos ambientais, combinando processos, como, água residuais, ou o uso de extrato vegetal de macrófitas usadas para biorremediação capazes de reciclar nutrientes e utilizá-los para meio de cultivo (Pina *et al.*, 2021; Ramalho *et al.*, 2025).

1.2 *Lemna minor*

O uso de extrato vegetal pode se tornar uma alternativa viável e inovadora para produção de biomassa microalgal, já que não traz com ele agentes microbianos contaminantes e, dentre vários extratos com grande potencial, encontra-se a *Lemna minor*, conhecida popularmente como lentilha-d'água e, no inglês “*duckweed*”. Essa macrófita está abundantemente presente em ambientes de água doce e obtém um rápido crescimento como atributo, possui uma ampla capacidade de absorção de nutrientes do meio aquático e uma rica composição em compostos orgânicos e minerais (Santos, 2018; Sipaúba-Tavares, 2020).

A *Lemna minor* tem capacidade de promover uma significativa remoção de poluentes em ambientes aquáticos, dentre esses poluentes estão a amônia, fosfato, sólidos suspensos, coliformes e metais pesados (Devlamynck *et al.*, 2021). Estudos comprovam que essa macrófita contém relevantes quantidades de nitrogênio, fósforo, potássio, aminoácidos, vitaminas e

compostos bioativos que podem favorecer o crescimento de microalgas, serem utilizadas em alimentação animal ou serem empregadas em tratamento de efluentes (Iatrou *et al*, 2018).

Visto que na atualidade as microalgas representam uma das fontes mais promissoras para geração de novos produtos e aplicações, é de suma importância a realização de estudos e avaliações de meios de cultivo alternativo (Nunes, 2021). Diante da escassez de falta de informação sobre concentração, composição química, efeitos inibitórios e entre outras informações necessárias, o presente estudo tem como objetivo avaliar o comportamento e o crescimento da microalga do gênero *Chlorella* em meio enriquecido com extrato da macrófita *Lemna minor*, buscando determinar seu efeitos sobre a produtividade de biomassa e de proteínas, representando uma abordagem sustentável e de baixo custo de manutenção uma vez que se utiliza um recurso natural e abundante que foi adquirido de sistemas de tratamento de tanques com dejetos suínos. Espera – se que os resultados alcançados possam contribuir com o avanço das pesquisas de inovação tecnológica no meio ambiental.

1.3 Criopreservação

O protocolo de criopreservação de microrganismos vivos é um conjunto de técnicas que busca manter o material em condições abaixo de 0°C sem prejudicar suas atividades biológicas (Wolkers; Oldenhof, 2015). De acordo com Souza (2023), esses protocolos podem ser simples ou podem ser técnicas elaboradas, que pode variar conforme o material que será submetido a criopreservação, os resultados almejados e os recursos disponíveis.

A criopreservação possibilita a realização da manutenção das cepas em longo prazo, assim minimizando gastos com materiais e com o espaço utilizado com preservação em meio aquoso e, ainda dispõe-se de estabilidade em razão das características biológicas do microrganismo preservado, sendo fundamental para garantir a reprodutibilidade de estudos (Tessarolli *et al.*, 2017).

O método mais eficaz para conservação de longo prazo consiste no armazenamento de células em temperaturas ultrabaixas (-80°C ou -196°C), mas requer o uso de crioprotetores, como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) ou metanol, para prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares que podem danificar as células (Day e Fleck, 2015)

No entanto, um dos principais desafios na utilização desse processo em microalgas é evitar a formação de cristais de gelo no interior e exterior das células, uma vez que, o congelamento de organismos vivo provoca lesões celulares devido ao rompimento provocado pela formação dos mesmos, assim, destruindo-as por ação mecânica direta, e a depender da

concentração do crioprotetor utilizado, pode haver intoxicação celular causando a perda de sua viabilidade (Wolkers e Oldenhof, 2015; Souza, 2023).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Formular um meio de cultivo alternativo que permita que a microalga tenha um bom desenvolvimento metabólico e aumento no crescimento da biomassa.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o desempenho da espécie no meio de cultivo alternativo;
- Quantificar a quantidade de proteína gerada pela microalga em meio alternativo;
- Verificar a eficácia da criopreservação da espécie através da manutenção de sua viabilidade.

3. Metodologia

Trata-se de uma pesquisa quali-quantitativa utilizando como objeto de pesquisa a microalga do gênero *Chlorella*. Todos os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprodutos (LADEBIO), Laboratório de Cultivo de Microrganismos, Laboratório de Bioengenharia e Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPEFER), localizados no centro de Laboratórios Finep (CLF).

3.1 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 10-10-10 como fonte de nutrientes atua também como pressão de seleção, visto que apresenta

limitações devido à 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 e Menezes, 2006).

3.2 Manutenção do Inóculo

A cepa foi mantida em meio de cultivo (Tabela 1) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 200 mL de meio. Os cultivos foram incubados em câmara B.O.D. (MA 415, Marconi) a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação contínua de $11,21 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, com agitação orbital de 200 rpm (Figura 1). Repicagens foram realizadas a cada 15 dias para manutenção da viabilidade da cepa.

Tabela 1:Meio de cultivo básico para inóculos

NPK 10-10-10 (g/L)	Cloreto de Cálcio di-hidratado (g/L)	Sulfato de Magnésio hepta- hidratado (g/L)
1	0,04	0,204

Fonte: Meio desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório LADEBIO, 2024

Fotografia 1 – Cultivo em Shaker



Fonte: Autoria Própria.

3.3 Preparo do Extrato

A *Lemna minor* utilizada para preparo do extrato foi coletada de um sistema de biorremediação em tanques com efluentes suínos localizado na Fazenda Marcante no município de Dourados-MS (coordenadas: -22.284016675078956, -55.05035103302872). A macrófita foi lavada abundantemente com água corrente para remoção de impurezas e, em seguida, com água destilada. O material foi seco em estufa a 60°C até peso constante e triturado em moinho, modelo NM-8300 do fabricante Nima Japan, até obtenção de pó fino (Figura 1). Para preparo do extrato, foram adicionados 2,5% m/v de *L. minor* seca e triturada em água destilada mantida em ebulição por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo e armazenado sob refrigeração (4°C) até o momento do uso.

Figura 1 – Preparo da *Lemna minor*



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Imagem (A) coleta de *Lemna minor* em tanques com dejetos suínos. Imagem (B) higienização após coleta. Imagem (C) *Lemna minor* seca e triturada.

3.4 Cultivo de Bancada

As microalgas para os testes foram mantidas em cultivo de bancada com oxigenação por meio de sistemas com compressor de ar eletromagnético (Fotografia 2). Esse sistema foi feito utilizando cano PVC para fazer a estrutura de passagem de ar, e ligado a essa estrutura contém fio espaguete PVC que conectado a canudos de alumínio conduz o ar para o interior do Erlenmeyer. A iluminação foi mantida por lâmpadas (LED vermelho e azul) com fotoperíodo de 16 horas de luz com aproximadamente $30 \pm 4,4 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}$, além de iluminação natural mantida por uma janela.

A intensidade luminosa emitida pelas lâmpadas LED foi determinada utilizando um luxímetro digital BSIDE L1. Para a padronização da medida, empregou-se uma proveta de 250 mL contendo 190 mL de meio de cultivo, cuja altura da coluna líquida foi ajustada de modo a reproduzir as condições do cultivo em Erlenmeyer de 6 L, com volume de trabalho de 5 L. A proveta foi recoberta com papel alumínio, com o objetivo de evitar interferências externas e simular as condições experimentais adotadas nos cultivos.

Fotografia 2 – Aeração de bancada com compressor de ar eletromagnético

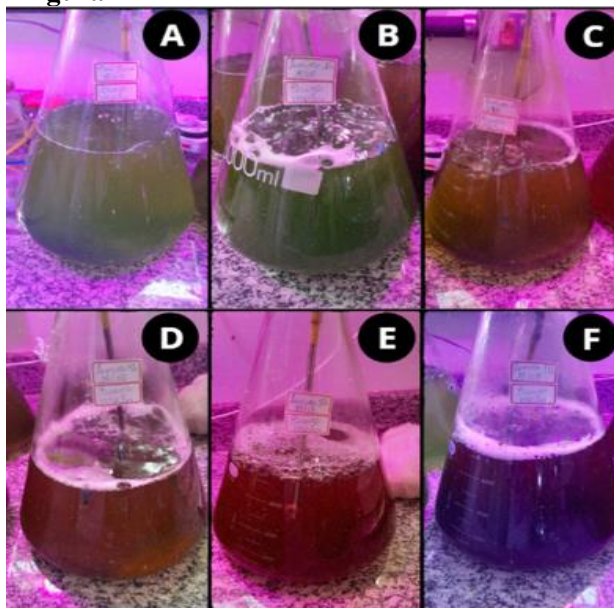


Fonte: Autoria própria.

3.5 Formulação dos Meios de Cultivo

Foram preparados 5 meios de cultivo, em Erlenmeyer de 6 L, com volume de trabalho de 5 L, com diferentes concentrações de extrato de *Lemna minor*, 1%, 2%, 4%, 8% e 16% (Figura 2), esses meios foram suplementados com Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado e NPK 10-10-10, foi utilizado também o Cloreto de Cálcio di-hidratado para fazer o tamponamento do meio e evitar que o pH sofresse mudanças bruscas (Tabela 2). O pH foi corrigido com solução de hidróxido de sódio 0,5 M até chegar em aproximadamente 7, após a preparação o meio passou por esterilização em autoclave para evitar contaminação com outros microrganismos. O meio de cultivo utilizado como controle foi uma adaptação do Bold's Basal Medium (Tabela 3) com o pH também corrigido. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco tratamentos e o controle, com três repetições no tempo.

Figura 2 – Tratamentos utilizados



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Meio de cultivo Basal e meios de cultivo a base de extrato de *Lemna minor* com microalgas já inoculadas. Imagem (A) Meio Basal modificado, imagem (B) meio com 1% de extrato de *Lemna minor*, imagem (C) meio com 2% de extrato de *Lemna minor*, imagem (D) meio com 4% de extrato de *lemna minor*, imagem (E) meio com 8% de extrato de *Lemna minor*, imagem (F) meio com 16% de extrato de *Lemna minor*.

Tabela 2 – Meio de cultivo alternativo com *Lemna minor*

Tratamento	NPK 10-10-10 (g/L)	Cloreto de Cálcio di- hidratado (g/L)	Sulfato de Magnésio hepta- hidratado (g/L)	Extrato de <i>Lemna minor</i> (%/L)
T1	1	0,04	0,204	1
T2	1	0,04	0,204	2
T3	1	0,04	0,204	4
T4	1	0,04	0,204	8
T5	1	0,04	0,204	16

Fonte: Meio adaptado com adição de *Lemna minor*.

Tabela 3 – Meio BBM (Bold's Basal Medium) adaptado.

Componentes	Quantidade adicionada (g/L)
Fosfato de Dipotássico (K_2HPO_4)	0,75
Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4)	0,14
Sulfato de magnésio Hepta-Hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,75
Nitrato de Sódio ($NaNO_3$)	0,9
Cloreto de Cálcio Di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,25
EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$)	0,5

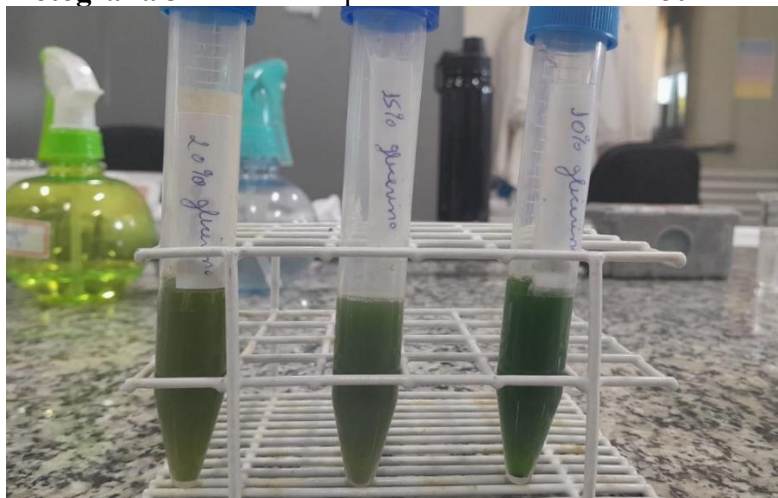
Fonte: Adaptado de UTEX [s.d.].

3.6 Teste de Criopreservação

O teste de criopreservação foi conduzido da seguinte maneira: utilizou-se o meio básico (Tabela 1) em um Erlenmeyer de 6 L, inoculando-se aproximadamente 1 mL de *Chlorella* sp. para cada 100 mL de meio de cultivo, totalizando 60 mL de microalga para 6 L de meio de cultivo. Após 15 dias de crescimento, o meio foi centrifugado para separar a biomassa microalgal, resultando em aproximadamente 3 g de biomassa úmida. Esta biomassa foi ressuspensa em 450 mL de água destilada e dividida em três partes iguais de 150 mL cada.

A preservação foi realizada com 10%, 15% e 20% de glicerol em 150 mL de água destilada contendo a microalga. Após a adição do glicerol, a solução foi deixada em repouso por 1 hora para permitir que as células do microrganismo absorvessem o anticongelante. Após o tempo estimado, as amostras foram distribuídas em tubos de centrifuga, tipo Falcon, com 10 mL por tubo (Fotografia 3), totalizando 7 amostras para cada teste, e congeladas em freezer a -80 °C. Este teste foi realizado por 42 dias, com o descongelamento de uma amostra de cada teste a cada 6 dias em banho termostático a 30 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remover a maior concentração possível de glicerol, permitindo sua inoculação em meio básico alternativo (Tabela 1). Cada amostra foi monitorada por um total de 15 dias, com verificação diária de sua absorbância até o término do acompanhamento. Para determinar a taxa de crescimento, foram construídos gráficos para o cálculo da regressão linear, visando a determinação do coeficiente angular.

Fotografia 3 – Amostras preservadas em freezer -80



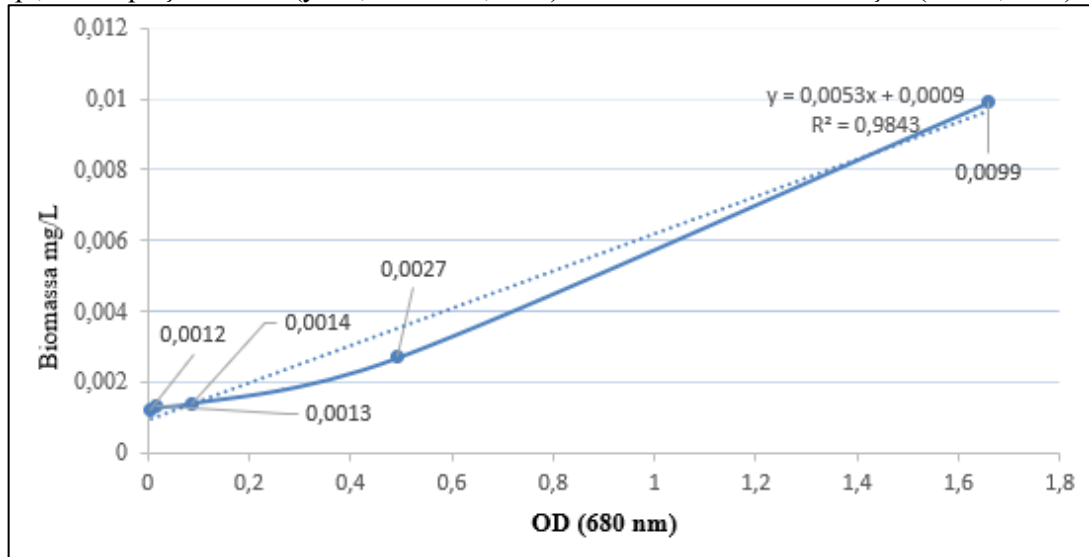
Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Amostras criopreservadas com diferentes concentrações de glicerol.

3.7 Monitoramento do Crescimento

Para determinar o crescimento das microalgas, foi empregada a técnica de Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis) a uma Densidade Óptica de 680 nm, com o objetivo de detectar o aumento na quantidade de clorofila. A partir da curva de calibração (Gráfico 1), elaborada com amostras de diferentes concentrações de biomassa microalgal, foi possível quantificar esse crescimento em termos de teor de biomassa. As medições foram realizadas ao longo de um período de 15 dias, com leituras efetuadas a cada dois dias. Nas amostras destinadas à preservação, essas leituras foram realizadas diariamente.

Gráfico 1: Curva de Calibração da *Chlorella* sp. (OD 680 nm vs Biomassa).
Relação linear entre a densidade óptica a 680 nm e a biomassa seca (mg L^{-1}) para *Chlorella* sp., com equação da reta ($y = 0,0053x + 0,0009$) e coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9843$).



Fonte: Autoria própria.

Para realizar a leitura no espectrofotômetro é necessário ter o branco (amostra sem células microalgais) para zerar o equipamento. Como o meio de cultivo com extrato de *L. minor* tem tendência a escurecer com o passar do tempo foi necessário realizar a retirada e a filtragem em filtro para seringa de $0,45 \mu\text{m}$ (Fotografia 4) de amostras dos 5 meios testes e do controle no dia de cada leitura, a leitura das amostras de criopreservação foram realizadas utilizando o mesmo método.

Fotografia 4: Materiais para filtragem da amostra (branco) para zerar o espectrofotômetro para realizar a leitura de absorbância com o objetivo de detectar o aumento na quantidade de clorofila.



Fonte: Autoria própria.

3.8 Determinação de biomassa seca

Após o período de 15 dias, ao término da análise de crescimento de biomassa, o meio de cultura foi submetido à centrifugação a 4800 rpm por 10 minutos à temperatura de 25 °C, com o objetivo de separar as células de microalgas. Posteriormente, essas células foram colocadas em uma estufa a 50 °C para obtenção da massa seca, a qual foi utilizada na determinação do teor de proteínas.

3.9 Quantificação de proteínas

A determinação do teor de proteína foi conduzida de acordo com o protocolo Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), um dos métodos mais tradicionais. Inicialmente, realizou-se a digestão da amostra, pesando-se exatamente 0,2 g de biomassa seca de microalga, a qual foi adicionada ao tubo Kjeldahl com 10 mL de solução de ácido sulfúrico, 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre (catalisador). O tubo foi então colocado no bloco digestor a 400 °C, aguardando-se até que a amostra adquirisse uma coloração clara ou esverdeada, indicando a conclusão da digestão. Após esse processo, foram adicionados 25 mL de solução de hidróxido de sódio a 40% à amostra, seguida pela destilação do nitrogênio no aparelho de destilação

Kjeldahl. A amônia liberada no destilador foi coletada em 50 mL de solução de ácido bórico a 4%, com algumas gotas de indicador, geralmente uma mistura de vermelho de metila e verde de bromocresol. Após a destilação, procedeu-se à titulação das amostras com HCl 0,1 N, utilizando-se o fator de conversão de 4,78 para calcular o teor de proteína a partir do nitrogênio (Watkins, 2025). A determinação do teor de proteína foi realizada com a biomassa microalgal dos meios testes, do meio controle e com a *L. minor* utilizada para fazer o extrato.

3.10 Análise de macronutrientes

O meio de cultivo foi separado antes da inoculação de microalga e após o cultivo da mesma por um período de 15 dias. Ao término desse período, a microalga foi centrifugada para permitir a separação do meio, visando a avaliação de macronutrientes, tais como sulfato, fosfato, potássio, ferro livre, ferro II e ferro III. Para tal análise, foram utilizados os kits de análises da Spectrokit da empresa Alfakit e um fotocolorímetro, cada kit vem acompanhado do protocolo de análise.

3.10.1 Análise de Sulfato

Primeiro passo: Medir 5 mL de amostra com a seringa e transferir para o tubo do fotocolorímetro, após, fazer uma prova em branco medindo 5 mL de água deionizada e adicionando os reagentes paralelamente a amostra.

Adicionar 10 gotas do Reagente 1 e agitar; adicionar 1 medida rasa nº 2 do reagente 2 e agitar intensamente por 5 minutos. Depois zerar o equipamento com a prova em branco e fazer a leitura das amostras, o resultado apresentado é a concentração em mg L^{-1} de SO_4 .

3.10.2 Análise de Fosfato Total

A primeira etapa consiste em medir 20 mL de amostra com a proveta e transferir para o Erlenmeyer, e fazer uma prova em branco, medindo 20 mL de água deionizada em outro Erlenmeyer e adicionando os reagentes paralelamente a amostra.

Adicionar 10 gotas do Reagente 3 e agitar até que se dissolva, após adicionar 1 medida rasa nº 2 do Reagente 4 e agitar até dissolver. Posteriormente adicionar os Erlenmeyer ao banho-maria fervente de 30 minutos a 2 horas.

Ao terminar o banho-maria, retirar os frascos e adicionar 4 gotas de Fenolftaleína e adicionar o Reagente 5, agitando a cada gota adicionada até surgir a cor rosa. Aguardar as amostras esfriarem e completar o volume até 20 mL com água deionizada e homogeneizar bem.

Em seguida medir 5 mL de amostra e transferir para o tubo de Fotocolorímetro e adicionar 10 gotas do Reagente 1 de Ortofosfato e agitar, adicionar 1 medida rasa da pazinha nº 2 do Reagente 2 de Ortofosfato AC e agitar, aguardar 10 minutos. Após, zerar o equipamento com a prova em branco e fazer a leitura das amostras, caso o equipamento apresente estar fora de escala é necessário diluir a amostra para fazer a leitura e no final multiplicar pela quantidade de vezes que foi diluída. O resultado é a concentração em mg L^{-1} de PO_4 , para expressar o resultado em P_2O_5 é necessário multiplicar o valor dado na leitura por 1,494. E para expressar o resultado e P deve-se multiplicar por o valor da leitura por 0,3263.

3.10.3 Análise de Potássio

Primeiramente medir 5 mL de água deionizada e transferir para o tubo de Fotocolorímetro (branco), e adicionar os reagentes paralelamente a amostra. Medir 0,5 mL de amostra e transferir para o tubo de Fotocolorímetro e adicionar 4,5 mL de água deionizada, em seguida adicionar 1 medida rasa da pazinha nº 2 do Reagente Potássio ES e agitar. Aguardar 5 minutos e realizar a calibração com o branco e realizar a leitura das amostras.

3.10.4 Análise de Ferro Livre (Complexado)

Medir 5 mL de amostra com a seringa e transferir para o tubo do Fotocolorímetro, fazer uma prova em branco medindo 5 mL de água deionizada e adicionando os reagentes paralelamente a amostra. Adicionar 1 gota do Reagente 1 e agitar, adicionar 4 gotas do Reagente 2 e agitar, e aguardar 5 minutos.

Após passar os 5 minutos, colocar os tubos em banho-maria fervente por 30 minutos. Retirar os tubos do banho-maria e esfriar até a temperatura ambiente. Completar para 5 mL com água deionizada. Adicionar 4 gotas do Reagente 3 e agitar, aguardar 10 minutos. Zerar o equipamento com a prova em branco e fazer a leitura das amostras, o resultado lido é a concentração e, mg L^{-1} de Fe.

3.10.5 Análise de Ferro III

Medir 5 mL de amostra com a seringa e transferir para o tubo do Fotocolorímetro, fazer uma prova em branco medindo 5 mL de água deionizada e adicionando os reagentes paralelamente a amostra. Adicionar 4 gotas do Reagente 2 e agitar, e aguardar 5 minutos.

Após, colocar os tubos em banho-maria fervente por 30 minutos. Retirar os tubos do banho-maria e esfriar até a temperatura ambiente. Completar para 5 mL com água deionizada.

Adicionar 4 gotas do Reagente 3 e agitar, aguardar 10 minutos. Zerar o equipamento com aprova em branco e fazer a leitura das amostras. Para obter a quantidade de Ferro II em cada amostra, é necessário subtrair o valor de Ferro III do Ferro Total.

3.11 Análises Estatísticas

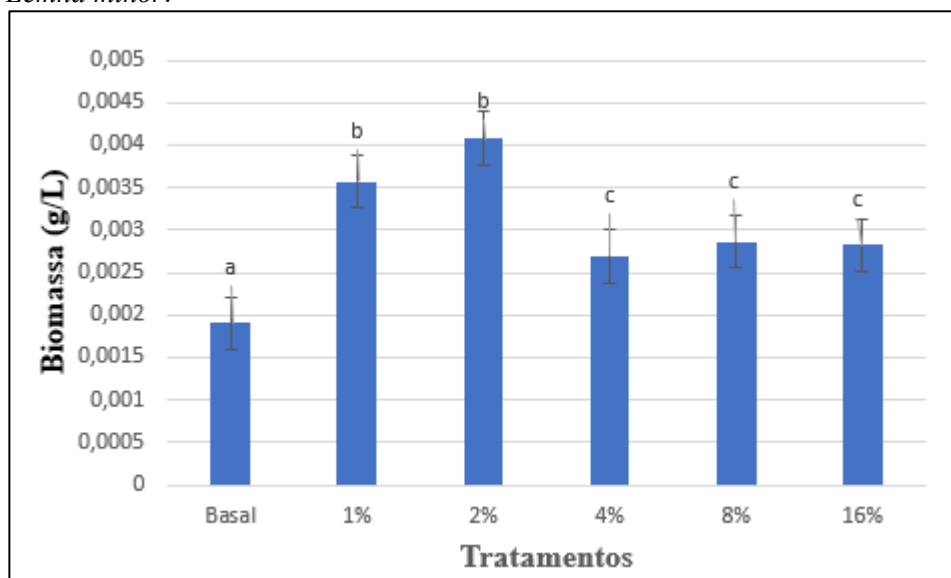
Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 réplicas de cada meio de cultivo. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Como os dados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$), foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre os tratamentos, seguido do teste post-hoc de Dunn para comparações múltiplas entre as amostras da criopreservação. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat versão 5.0.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. As concentrações de glicerola 15% e 20% não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$), optando-se, portanto, pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal–Wallis para comparação entre os tratamentos.

4 Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que o meio enriquecido com extrato de *Lemna minor* foi mais eficaz para o crescimento de *Chlorella* sp. do que o meio BBM adaptado. A análise estatística revelou que os tratamentos com 1% e 2% de extrato apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao meio controle (Gráfico 2). O gráfico 3 apresenta a curva de crescimento da biomassa ao longo dos 15 dias de cultivo, evidenciando que os meios com menores concentrações de extrato (1% e 2%) proporcionaram maior acúmulo de biomassa.

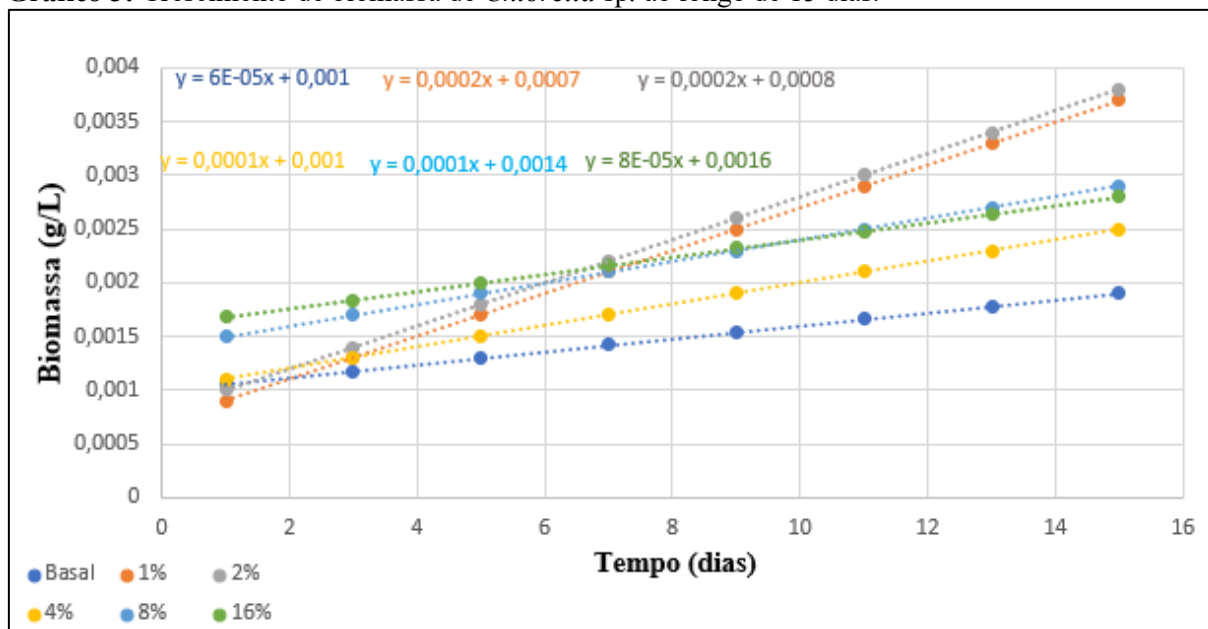
Gráfico 2: Produção de biomassa em cultivos enriquecidos com extrato de *Lemna minor*.



Fonte: (Autoria própria).

Legenda: Valores de biomassa seca (g L^{-1}) após o cultivo em seis tratamentos (Basal, 1%, 2%, 4%, 8% e 16%). Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla aplicado ($p < 0,05$).

Gráfico 3: Crescimento de biomassa de *Chlorella* sp. ao longo de 15 dias.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: – Crescimento de biomassa de *Chlorella* sp. ao longo de 15 dias em diferentes meios de cultivo. Biomassa seca (g L^{-1}) obtida em cultivos suplementados com diferentes concentrações de extrato de *Lemna minor*.

Esses resultados corroboram os achados de Santos (2018), que demonstrou que a utilização de *L. minor* como meio de cultura apresentou grande potencial para o crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis*, resultando em alta densidade celular. Similarmente, Colla (2024) avaliou meios de cultivo alternativos utilizando macrófitas e constatou que, embora meios com *Eichhornia azurea* tenham sido prejudiciais às cepas de microalgas cultivadas, o meio misto com *Lemna minor* e *Eichhornia crassipes* mostrou-se viável para o cultivo de microalgas com biomassa de alta qualidade. Adicionalmente, Sipaúba-Tavares (2020) relatou que a microalga *Messastrum gracile* cultivada em meio de cultura com *E. crassipes* e *L. minor* apresentou resultados satisfatórios no aumento do teor de lipídios e proteínas em cultivos mixotróficos.

A produção de biomassa seca variou significativamente entre os tratamentos (Gráfico 3). O meio com 2% de extrato de *L. minor* apresentou a maior produção de biomassa ($0,0040 \text{ g L}^{-1}$), seguido pelos meios com 1% ($0,0035 \text{ g L}^{-1}$), superiores ao meio BBM adaptado ($0,0019 \text{ g L}^{-1}$). Os meios com concentrações mais elevadas de extrato (4%, 8% e 16%) apresentaram produção de biomassa inferior aos meios com concentrações intermediárias, mas ainda comparável ao controle.

A análise da cinética de crescimento (Gráfico 3) revela que todos os tratamentos apresentaram fase lag curta (aproximadamente 2 dias), seguida de fase exponencial de crescimento. Os meios com 1% e 2% de extrato apresentaram fase exponencial mais prolongada e maior taxa de crescimento específico em comparação ao meio BBM adaptado. Os meios com 4%, 8% e 16% de extrato apresentaram crescimento inicial mais lento, devido à maior turbidez do meio, que pode ter limitado a penetração de luz (Tabela 4) e, consequentemente, a fotossíntese.

Tabela 4: Intensidade Luminosa do cultivo de bancada.

Meio de Cultivo	Intensidade Luminosa (início do cultivo) $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}$	Intensidade Luminosa (final do cultivo) $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}$
Basal	12,13 $\pm$ 0,05 a	5,19 $\pm$ 0,04 a
1%	10,58 $\pm$ 0,09 ab	1,3 $\pm$ 0,02 b
2%	7,81 $\pm$ 0,04 b	1,23 $\pm$ 0,02 b
4%	3,6 $\pm$ 0,02 c	0,95 $\pm$ 0,01 c
8%	2,99 $\pm$ 0,03 cd	0,81 $\pm$ 0,01 cd
16%	1,01 $\pm$ 0,02 d	0,61 $\pm$ 0,01 d

Fonte: Autoria pr3pria.

Legenda: Intensidade luminosa do cultivo de bancada, no qual 3 3 utilizado l3mpadas com LEDs vermelho e azul ideal para a fotoss3ntese, com intensidade luminosa de aproximadamente $30 \pm 4,4 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}$. A intensidade luminosa foi medida com um Lux3metro Digital MT-30. Letras iguais na coluna n3o diferem entre si pelo teste de Dunn ap3s Kruskal–Wallis ($p < 0,05$), indicando compara33es entre as diferentes concentra33es.

Conforme Zhang *et al.* (2023), a luz 3 o fator determinante para regula333o da efic3cia fotossint3tica, afetando a velocidade da fixa333o de carbono e a sua atribui333o para lip3dios e pigmentos. A intensidade luminosa atinge diretamente o crescimento e produtividade de microalgas e, de outros organismos que necessitam de fotoss3ntese, quanto menor a quantidade de luz dispon3vel menor ser3 a quantidade de biomassa produzida (Sartori *et al.*, 2024). Sendo assim, a baixa produ333o de biomassa nos meios com 4%, 8% e 16% de extrato de *Lemna minor* pode ser causada pela baixa quantidade de luz penetrando no meio devido sua opacidade, al3m de poss3veis efeitos alelop3ticos associados 3 libera333o de compostos bioativos por essa macr3fita, que podem inibir processos fisiol3gicos e contribuir para a redu333o do crescimento microalgal (Dauda *et al.*, 2024)

A an3lise de macronutrientes do extrato de *L. minor* a 2,5% (Tabela 5) revelou elevadas concentra333es de sulfato ($316,33 \pm 10,09\text{mg L}^{-1}$), fosfato ($68,06 \pm 1,09\text{mg L}^{-1}$) e pot3ssio ($162,8 \pm 1,23\text{mg L}^{-1}$), al3m de formas biodispon3veis de ferro (ferro livre, Fe^{2+} e Fe^{3+}). Esses resultados demonstram que a macr3fita acumula quantidades significativas de nutrientes, o que pode ser atribui33o 3 sua elevada capacidade de absor333o de nutrientes do meio aqu3tico, caracter3stica amplamente documentada em sistemas de biorremedia333o (Jaime *et al.*, 2024).

O teor de prote3na na biomassa de *Chlorella sp.* variou significativamente entre os tratamentos (Tabela 6). Os meios com 1%, 2% e 4% de extrato proporcionaram aumento no teor proteico (19,41, 23,83 e 25,76 g 100 g⁻¹, respectivamente) em compara333o ao meio BBM adaptado (14,39 g 100 g⁻¹). Entretanto, os meios com 8% e 16% de extrato apresentaram teores proteicos inferiores (21,42 e 18,40 g 100 g⁻¹, respectivamente), embora ainda superiores ao controle. Essa redu333o pode estar associada 3 maior turbidez observada visualmente nos meios

mais concentrados, o que pode ter limitado a penetração de luz e, consequentemente, reduzido a eficiência fotossintética e a síntese proteica. Estudos futuros devem incluir medições de turbidez e intensidade luminosa para confirmar essa hipótese.

Esses resultados são consistentes com os achados de Santos (2018), que demonstrou que o meio de cultivo com *L. minor* proporcionou aumento no teor de proteínas e lipídios da microalga *A. gracilis*, componentes essenciais na formulação de dietas para organismos aquáticos.

Tabela 5: Macronutrientes presentes no extrato de *Lemna minor* a 2,5%

Componentes	mg/L⁻¹
Sulfato	316,33 ± 10,09
Potássio	162,8 ± 1,23
Fosfato	68,06 ± 1,09
Ferro Livre	10,08 ± 0,13
Ferro II	5,57 ± 0,48
Ferro III	15,75 ± 0,12

Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Análise feita com 3 réplicas.

Tabela 6: Proteína presente em *Chlorella* sp. e *Lemna minor*

Tratamento	Proteína (g 100 g⁻¹)
Basal adaptado	14,39 ± 0,07 c
1%	19,41 ± 0,60 b
2%	23,84 ± 1,17 ab
4%	25,76 ± 0,65 a
8%	21,42 ± 0,61 b
16%	18,40 ± 0,64 b
<i>Lemna minor</i>	10,37 ± 0,67 d

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Teores de proteína (100 g⁻¹) obtidos em biomassa de *Chlorella* sp. cultivada em meios contendo diferentes concentrações de extrato de *Lemna minor* e no meio basal adaptado. Também é apresentada a quantidade de proteína presente na própria *Lemna minor* utilizada para a produção do extrato. Análise feita com 3 réplicas. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise comparativa dos macronutrientes antes (Tabela 7) e após o cultivo (Tabela 8) revelou que no período de 15 dias de cultivo nos meios com concentrações de 2% e 8% a microalga *Chlorella* consumiu mais de 50% de potássio e fosfato presente, o sulfato foi mais consumido pela microalga cultivada no meio com 1% de extrato, aproximadamente 32%. Em relação ao Ferro Livre, é possível observar que só foi detectado nos meios com 8% e 16% de extrato, e foi consumido próximo de 30% da quantidade disponível. O ferro II não foi

encontrado no meio basal, e foi mais consumido nos meios 4% e 16% de extrato, com 58% e 70,5% respectivamente. O Ferro III também não foi encontrado no meio basal, e foi mais consumido nos meios com 2% e 8% de extrato, com 36,4% e 35,7% respectivamente (Tabela 9).

Esses resultados corroboram com o que diz Kempen e Hu (2023), que reforçam que as microalgas têm capacidade para utilizar os macronutrientes presentes no meio com eficiência, mesmo que esses nutrientes estejam presentes de forma reduzida, assimilando-os para síntese de biomassa. Estudos futuros devem incluir análises mais frequentes ao longo do período de cultivo para melhor compreender a dinâmica de consumo e liberação de nutrientes.

Tabela 7: Macronutrientes presentes no meio antes do cultivo (mg/L)

	Basal adaptado	1%	2%	4%	8%	16%
Sulfato	205,9±14,9 a	115,4±1,2 b	115,1±1,9 b	127,93±2,1 ab	149,15±15,3 ab	191,08±4,4 a
Potássio	160,72±29,6 a	82,7±9,8 a	186,28±9,6 a	189,58±19,8 a	164,43±21,7 a	168,54±11,3 a
Fosfato	18,54±0,7 ab	15,47±1,9 b	22,12±1,6 b	22,25±2,8 b	25,89±1 a	23,9±3,1 ab
Ferro Livre	0 b	0 b	0 b	0 b	0,48±0,2 a	0,78±0,1 a
Ferro II	0 b	0,05±0,02 b	0,14±0,02 ab	0,5±0,01 a	0,56±0,2 a	0,95±0,4 a
Ferro III	0 b	0,05±0,01 b	0,22±0,01 ab	0,24±0,01 ab	0,42±0,02 ab	1,06±0,01a

Fonte: (Autoria própria) Análise realizada em meio antes da inoculação de microalga.

Legenda: As comparações foram realizadas entre tratamentos dentro de cada variável. Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Dunn após Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 8: Incorporação de nutrientes pela *Chlorella*

Macronutrientes	Basal (mg/L)	1% (mg/L)	2% (mg/L)	4% (mg/L)	8% (mg/L)	16% (mg/L)
Sulfato	2,05	37,04	30,73	15,09	42,35	45,66
Potássio	13,01	23,48	110,09	87,01	93,06	46,34
Fosfato	4	1,85	5,50	7,12	12,97	9,08
Ferro Livre	0	0	0	0	0,15	0,25
Ferro II	0	0,01	0,02	0,29	0,22	0,66
Ferro III	0	0,01	0,08	0,04	0,14	0,34

Fonte: Autoria própria.

A tabela 10 apresenta as taxas de crescimento de *Chlorella* sp. após criopreservação em diferentes concentrações de glicerol e períodos de congelamento. Os resultados demonstram que, para cada concentração de glicerol testada, houve diferença significativa somente entre os meios com 10% e 20% com um $p < 0,01$. Na concentração com 15% as taxas de crescimento foi relativamente constantes não se diferenciando significativamente das outras concentrações testadas ao longo dos diferentes períodos de congelamento avaliados (6 à 42 dias). A taxa de crescimento foi calculada a partir do coeficiente angular da regressão linear da curva de crescimento (Apêndice A), expressa em $\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$.

Após 42 dias de criopreservação (Tabela 10), as amostras com 15% e 20% de glicerol continuaram apresentando taxas de crescimento inferiores às observadas nos primeiros dias de congelamento (6 e 12 dias), sugerindo possível perda progressiva de viabilidade ao longo do tempo de armazenamento. Em contraste, as amostras com 10% de glicerol mantiveram taxas de crescimento relativamente constantes ao longo dos 42 dias, indicando melhor preservação da viabilidade celular. Esses resultados diferem parcialmente dos obtidos por Hadi (2015), que avaliou a criopreservação de microalgas clorofíceas e observou que a cepa LBA#14 apresentou melhor recuperação utilizando metanol 10% como crioprotetor, enquanto outras cepas testadas apresentaram recuperação mínima ou nula. No presente estudo, *Chlorella* sp. demonstrou viabilidade satisfatória com glicerol 10%, sugerindo que essa concentração é adequada para criopreservação de curto a médio prazo (até 42 dias) a -80°C .

Tabela 9: Desempenho de crescimento após congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em diferentes concentrações de glicerol.

Tempo de Congelamento	Tratamentos		
	Glicerol a 10%	Glicerol a 15%	Glicerol a 20%
6 dias (g/L/dias)	2×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}
12 dias (g/L/dias)	3×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}
18 dias (g/L/dias)	2×10^{-4}	1×10^{-4}	$0,9 \times 10^{-4}$
24 dias (g/L/dias)	2×10^{-4}	2×10^{-4}	$0,6 \times 10^{-4}$
30 dias (g/L/dias)	1×10^{-4}	1×10^{-4}	$0,7 \times 10^{-4}$
36 dias (g/L/dias)	2×10^{-4}	$0,4 \times 10^{-4}$	$0,6 \times 10^{-4}$
42 dias (g/L/dias)	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-4}$

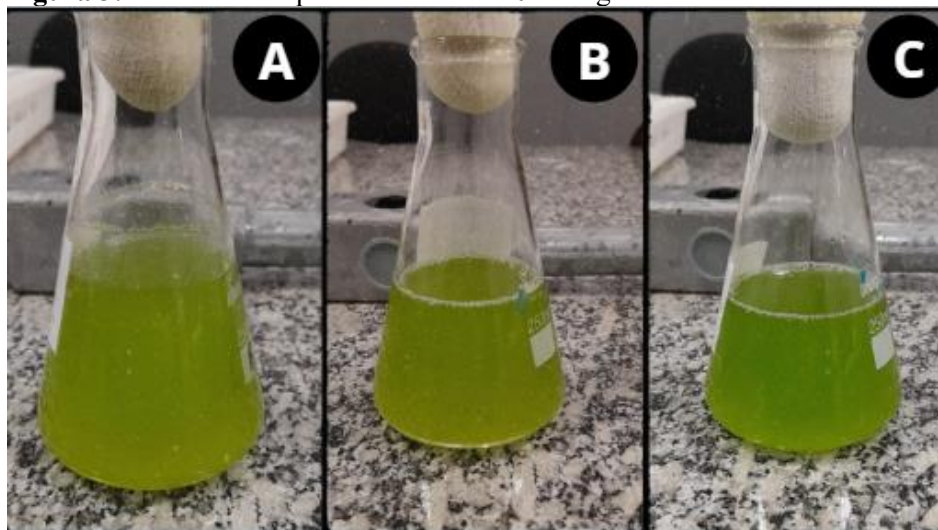
Fonte: Autoria própria.

Legenda: diferença significativa entre as concentrações com 10% e 20% de glicerol ($p < 0,01$) com base no teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

A análise visual das culturas após o descongelamento (Figuras 3, 4 e 5) revelou diferenças no padrão de recuperação entre as concentrações de glicerol. As amostras criopreservadas com 10% de glicerol (Figura 3) apresentaram coloração verde desde o primeiro dia pós-inoculação, indicando presença de clorofila e atividade fotossintética. Em contraste, as amostras criopreservadas com 15% e 20% de glicerol (Figuras 4 e 5) apresentaram coloração mais clara, que permaneceu de 24 a 72 horas, sugerindo menor conteúdo de clorofila inicial.

Esse comportamento pode estar relacionado a um possível metabolismo mixotrófico transitório, no qual as células utilizam o glicerol residual como fonte de carbono orgânico antes de retomar a fotossíntese autotrófica. O glicerol atua como fonte de carbono orgânico reduzido no metabolismo celular, assim, sendo capaz de ser assimilado pelas células microalgais e se integrando as vias metabólicas centrais diminuindo a dependência da luz solar para realizar fotossíntese e de carbono inorgânico. Portanto, o glicerol atua como fonte de energia para o microrganismo (Kashyap *et al.*, 2025; Dai *et al.*, 2026; Min *et al.*, 2017; Bello *et al.*, 2025).

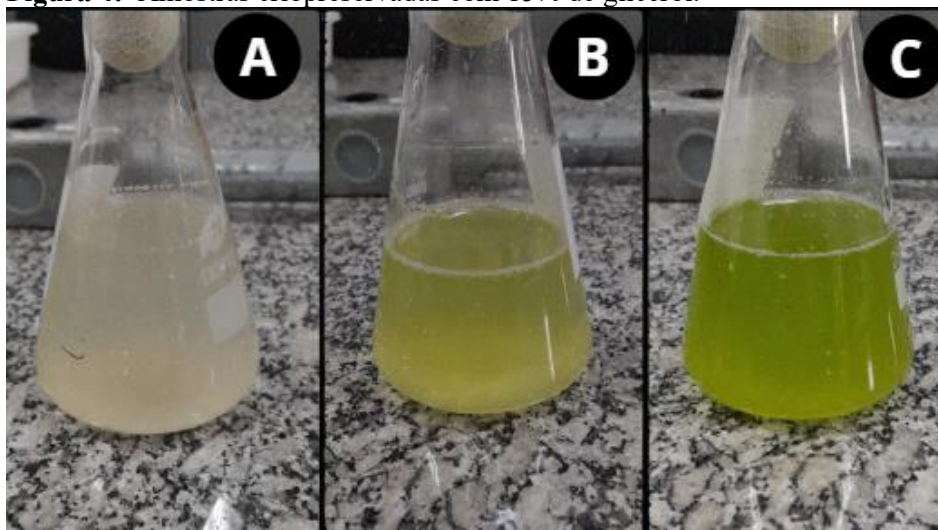
Figura 3: Amostras criopreservadas com 10% de glicerol



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Imagem (A) mostra o meio com o microrganismo com 1 dia de descongelamento e inoculação em meio básico. Imagem (B) com 4 dias de descongelamento e inoculação. E imagem (C) com 7 dias de descongelamento e inoculação.

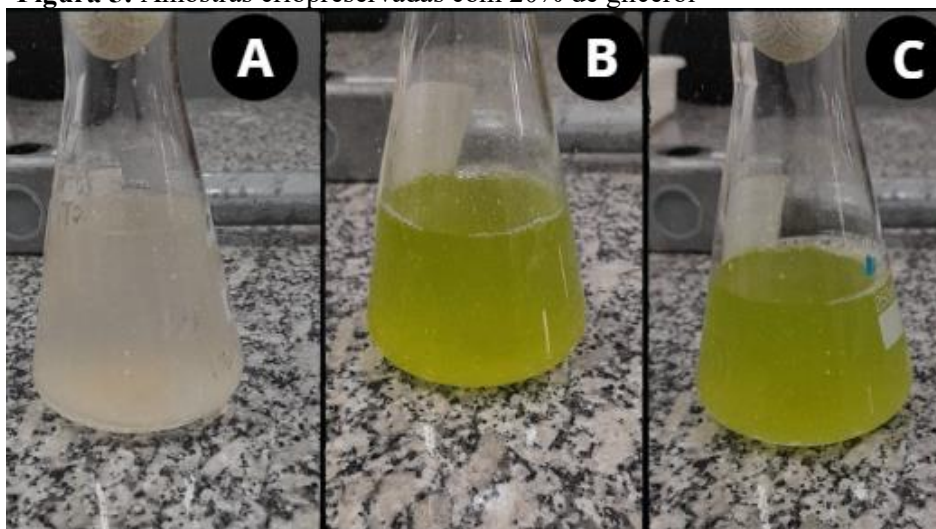
Figura 4: Amostras criopreservadas com 15% de glicerol.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Imagem (A) mostra o meio com o microrganismo com 1 dia de descongelamento e inoculação em meio básico. Imagem (B) com 4 dias de descongelamento e inoculação. E imagem (C) com 7 dias de descongelamento e inoculação.

Figura 5: Amostras criopreservadas com 20% de glicerol



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Imagem (A) mostra o meio com o microrganismo com 1 dia de descongelamento e inoculação em meio básico. Imagem (B) com 4 dias de descongelamento e inoculação. E imagem (C) com 7 dias de descongelamento e inoculação.

Os gráficos de 4 a 10 (Apêndice A) apresenta a velocidade de crescimento de acordo com o valor da inclinação da reta de regressão linear. No gráfico 10, onde as microalgas permaneceram 42 dias congeladas é possível observar que a amostra com 10% de glicerol continua apresentando um ótimo aumento de biomassa e sua velocidade de crescimento continua constante, divergindo do experimento feito por Souza (2023) onde avaliou a diatomácea *Chaetoceros muelleri* em criopreservação em freezer -80 °C por vinte dias, na qual após o fim do congelamento não apresentou resultados satisfatório, não havendo viabilidade em nenhuma das amostras que foram testadas com glicerol.

5. Considerações finais

O presente estudo demonstrou que o meio alternativo enriquecido com extrato de *Lemna minor* é promissor para o cultivo de *Chlorella sp.* Os meios com concentrações de 1%, 2% e 4% de extrato proporcionaram crescimento de biomassa e teor proteico superiores ao meio BBM adaptado, evidenciando o potencial dessa macrófita como fonte de nutrientes de baixo custo para produção de biomassa microalgal. A concentração de 2% proporcionou o melhor equilíbrio entre crescimento e teor proteico. Adicionalmente, o estudo demonstrou que a criopreservação de *Chlorella sp.* a -80°C utilizando glicerol 10% como crioprotetor é viável para armazenamento de curto a médio prazo (até 42 dias), com manutenção da viabilidade celular e capacidade de recuperação após o descongelamento. Esses resultados contribuem para

o avanço do conhecimento sobre meios de cultivo alternativos e sustentáveis para microalgas, com potencial aplicação em sistemas de produção de biomassa para diversas finalidades biotecnológicas. Estudos futuros devem investigar a aplicabilidade do extrato de *L. minor* para outras espécies de microalgas, bem como avaliar a viabilidade econômica e a escalabilidade do processo em sistemas de produção em larga escala.

REFERÊNCIAS

- Bello, U. *et al.* Vias baseadas em glicerol para a produção de bioenergia e metabolismo microbiano: uma revisão bibliométrica e crítica. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 117, 2025.
- 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.
- Bule, M. H. *et al.* Microalgas como fonte de compostos bioativos de alto valor. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 197–216, 2018.
- Chakraborty, B. *et al.* Transição de meios sintéticos para meios alternativos no cultivo de microalgas: uma revisão crítica. **Science of the Total Environment**, 2023.
- Chisti, Y. Biodiesel a partir de microalgas. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.
- Chisti, Yusuf. Produção de óleo bruto de algas baseada em canais de cultivo. **Green**, v. 3–4, p. 195, 2013.
- Coleção de Culturas de Algas da UTEX. Utex culture collection of algae. Meio Basal de Bold (BBM): formulação padrão utilizada para manutenção e cultivo de algas de água doce. Austin: University of Texas at Austin, [s.d.].
- Colla, L. C. - Meio de cultivo misto de macrófitas no cultivo de *Messastrum gracile* - 2024, 48f - **Dissertação** (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2024
- Dai, J.-L. *et al.* A superexpressão da glicerol-3-fosfato desidrogenase aumenta o acúmulo de lipídios sob estresse salino em *Dunaliella salina*. **Bioresource Technology**, v. 441, 2026.
- Dauda, S. *et al.* Interações alelopáticas entre *Lemna minor* e *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Botany**, [S.l.], 2024.
- Day, J. G.; Fleck, R. A. Crioinjúria em algas e suas implicações para a conservação de microalgas. **Microalgae Biotechnology**, v. 1, p. 11, 2015.
- De Pina, L. C. C.; *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 cultivo alternativos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37734-37777, 2021.
- Demirbas, Ayan. Produtos oleosos de musgos e algas obtidos por pirólise. **Energy Sources, Part A**, v. 28, n. 10, 2006.
- Devlamynck, Reindert *et al.* Cultivo de *Lemna minor* para tratamento de dejetos suínos e fornecimento de micronutrientes para alimentação animal. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1124, 2021.
- Iatrou, E. I. *et al.* Investigação da produção de biomassa, teor de proteína bruta e amido em sistemas laboratoriais de tratamento de águas residuárias cultivados com *Lemna minor* e *Lemna gibba*. **Environmental Technology**, v. 40, n. 20, p. 2649–2656, 2018.
- Jaimes, P.O.; *et al.*. Lentilha-d'água comum (*Lemna minor*): potencial alimentar e ambiental. Análise. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 2, pág. 404-424, 2024.

- Kashyap, S. *et al.* Efeito da suplementação com glicerol na produtividade de biomassa, rendimento lipídico e remoção de nutrientes em microalgas cultivadas em águas residuárias. **Algal Research**, v. 90, 2025.
- Khan, W. *et al.* Extratos de algas como bioestimulantes do crescimento e desenvolvimento vegetal. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 386–399, 2009.
- Kjeldahl, J. Novo método para a determinação de nitrogênio em compostos orgânicos. **Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 22, p. 366–382, 1883.
- Liang, M. H. *et al.* Bioprodutos de valor a partir de microalgas: estratégias e avanços. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 15, p. 2423–2441, 2019.
- Lukyanov, V. *et al.* Avaliação biotecnológica e econômica da produtividade da microalga *Chlorella vulgaris* IBSS-19 sob diferentes regimes de cultivo. **Bioresource Technology Reports**, v. 27, p. 101907, 2024.
- Markou, G.; Georgakakis, D. Cultivo de cianobactérias filamentosas (algas verde-azuladas) em resíduos agroindustriais e águas residuárias: uma revisão. **Applied Energy**, v. 88, p. 3389–3401, 2011.
- Min, M. *et al.* Efeitos do glicerol bruto no crescimento de microalgas e na remoção de nutrientes em sistemas baseados em águas residuárias. **Bioresource Technology**, v. 245, 2017.
- Nakamura, D. N. O apelo em massa da biomassa. **Oil & Gas Journal**, v. 104, n. 45, p. 15–15, 2006.
- Nunes, N. S. P. Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em vinhaça de cana-de-açúcar clarificada e suas aplicações biotecnológicas. 2021. 143 f. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2021.
- Postolache, L. V. *et al.* Fontes alternativas de energia a partir de resíduos e da microalga *Chlorella vulgaris* utilizada para a captura de CO₂ atmosférico na produção de cimento. **Materials Today Sustainability**, p. 101175, 2025.
- Ramalho, L. O.; *et al.* Potencial da utilização da lemna minor para o tratamento de efluentes suíno e produção de biomassa. **Revista Inovação Social**, v. 7, n. 1, p. 62-74, 2025.
- Renuka, N. *et al.* Microalgas como opções multifuncionais na agricultura moderna: tendências atuais, perspectivas e desafios. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 1255–1273, 2018.
- Santos, G. L. M. Avaliação da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) cultivada em meio de macrófita na alimentação de *Xiphophorus maculatus*. 2018.
- Severo, I. A.; *et al.* Microalgas: potenciais aplicações e desafios. **Mérida Publishers**. 2021.
- Singh, J.; GU, S. Potencial de comercialização de microalgas para a produção de biocombustíveis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596–2610, 2010.
- Sipaúba-tavares, L. H. *et al.* Comparação dos cultivos foto-autotrófico e mixotrófico da microalga *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) em meios de cultivo alternativos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 914-920, 2020.

Souza, P. S., *et al.* Estabelecimento de técnicas de criopreservação para manutenção do Banco de Microalgas do Instituto de Biologia-Universidade Federal da Bahia. **Dissertação de Mestrado**. Bahia, 2023.

Stephenson, P. G. et al. Melhorando a fotossíntese para biocombustíveis de algas: rumo a uma revolução verde. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 615–623, 2011.

Tessarolli, L. P. et al. Estabelecimento de um biobanco criopreservado para a Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 17, n. 2, 2017.

Vázquez Romero, B. et al. Avaliação tecnoeconômica da produção, colheita e secagem de microalgas para alimentos, ração, cosméticos e agricultura. **Science of the Total Environment**, v. 837, p. 155742, 2022.

Watkins, Jacob D. et al. Conjunto de dados: análise composicional e liquefação hidrotérmica de um biofilme de microalgas com alto teor de cinzas. **Data in Brief**, v. 60, p. 111490, 2025.

Wolkers, W. F.; Oldenhof, H. Protocolos de criopreservação e liofilização. **Humana Press**, 2015.

Zhu, XG.; *et al.* Qual é a eficiência máxima com que a fotossíntese pode converter energia solar em biomassa? **Opinião atual em biotecnologia**, v. 19, n. 2, p. 153-159, 2008.

Apêndice A: Tabela de macronutrientes presente no meio após o cultivo.

Tabela 10: Macronutrientes presentes no meio após o cultivo (mg/L)

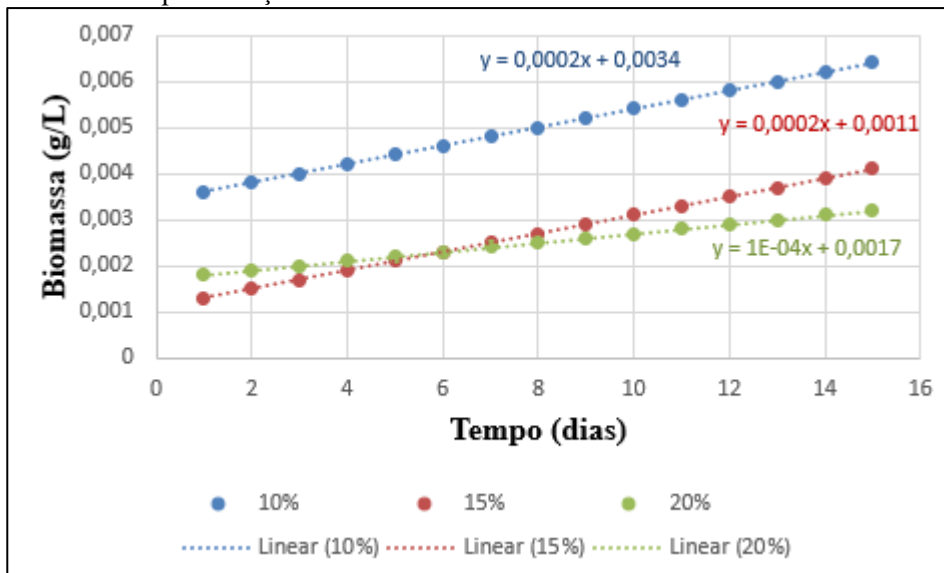
	Basal adaptado	1%	2%	4%	8%	16%
Sulfato	203,83±9,1 a	78,35±2,1 c	84,42±1,8 bc	112,85±10,2 ab	106,75±6,1 abc	145,4±4,2 a
Potássio	147,63±5,7 a	59,25±6,1 b	76,2±5,3 ab	102,48±5,4 ab	71,32±9,3 ab	122,18±4,9 a
Fosfato	14,54±0,1 ab	13,62±0,6 b	16,61±1,4 a	15,12±2,1 ab	12,92±1,3 ab	14,82±0,7 ab
Ferro Livre	0 b	0 b	0 b	0 b	0,33±0,1 ab	0,53±0,2 a
Ferro II	0 b	0,04±0,02 b	0,12±0,01 ab	0,21±0,01 a	0,34±0,2 ab	0,28±0,1 a
Ferro III	0 b	0,04±0,02 b	0,14±0,02 ab	0,19±0,01 ab	0,27±0,05 ab	0,72±0,05 a

Fonte: (Autoria própria) Análise realizada em meio depois do cultivo de microalga durante 15 dias. Para realizar a análise a microalga presente no meio foi centrifugada para realizar a separação da biomassa do meio de cultivo.

Legenda: Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Dunn após Kruskal–Wallis ($p < 0,05$). As comparações foram realizadas entre tratamentos dentro de cada variável.

Apêndice B: Gráficos de crescimento de *Chlorella* sp. a partir da regressão linear para determinação do coeficiente angular.

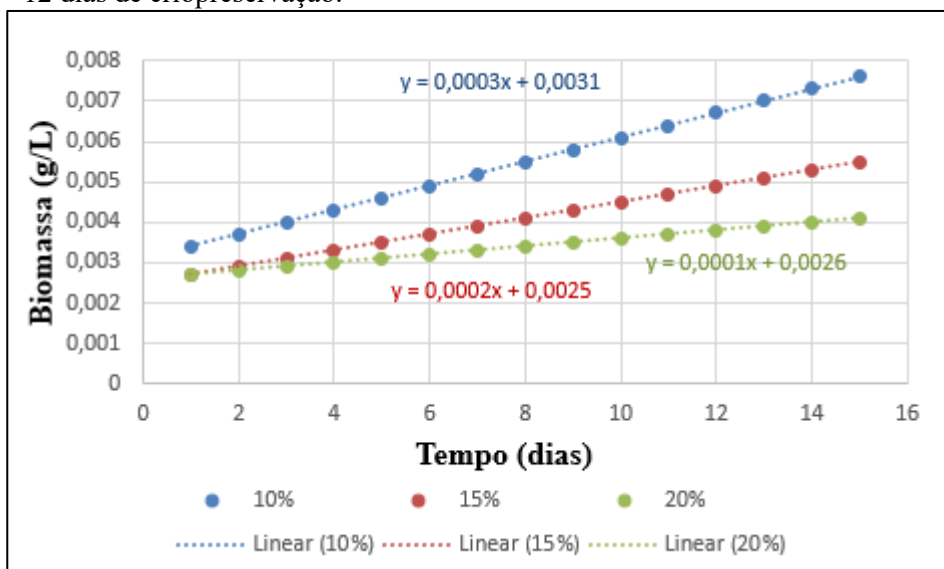
Gráfico 4: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* sp. após 6 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Amostras preservadas durante 6 dias em freezer -80 com diferentes concentrações de glicerol.

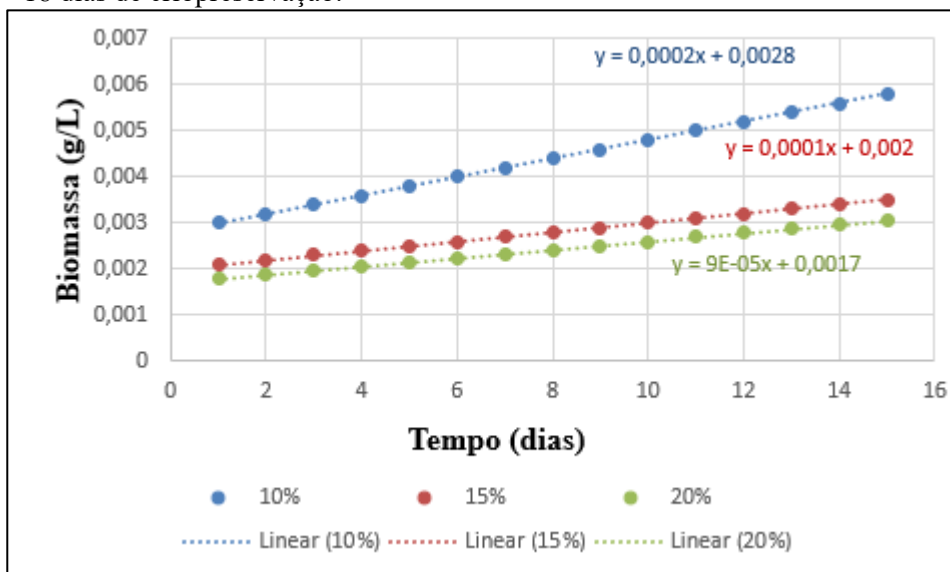
Gráfico 5: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* sp. após 12 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Amostras preservadas durante 12 dias em freezer -80 °C com diferentes concentrações de glicerol.

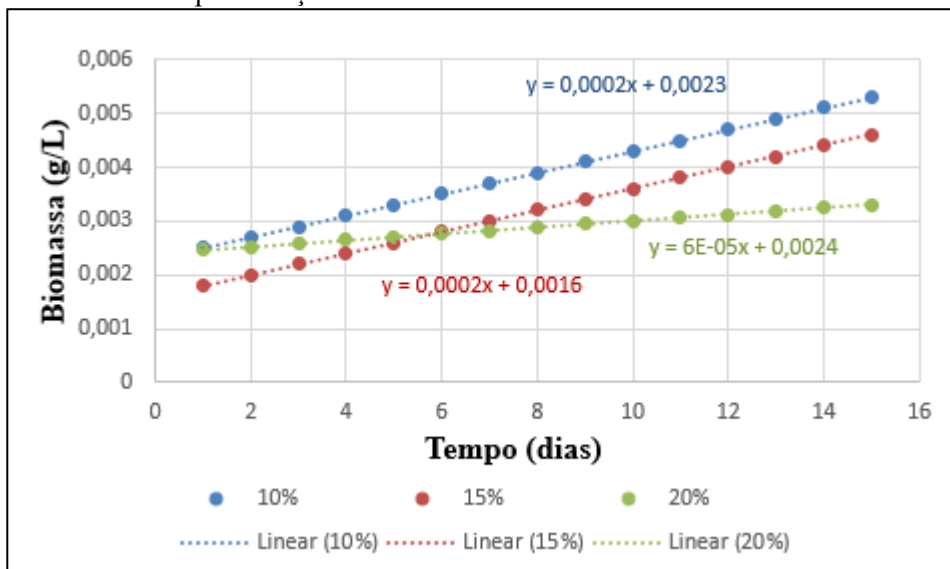
Gráfico 6: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* sp. após 18 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Amostras preservadas durante 18 dias em freezer -80 com diferentes concentrações de glicerol.

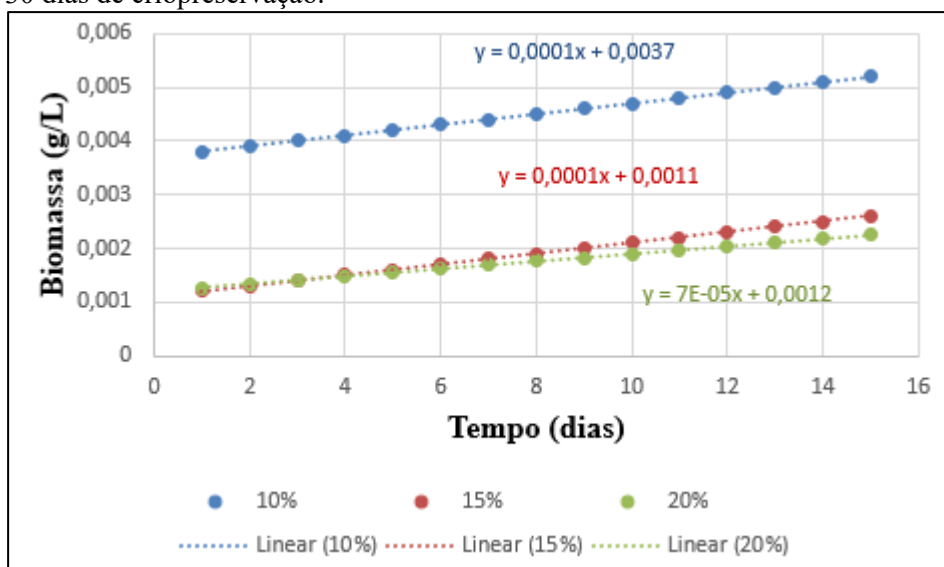
Gráfico 7: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* sp. após 24 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Amostras preservadas durante 24 dias em freezer -80 com diferentes concentrações de glicerol.

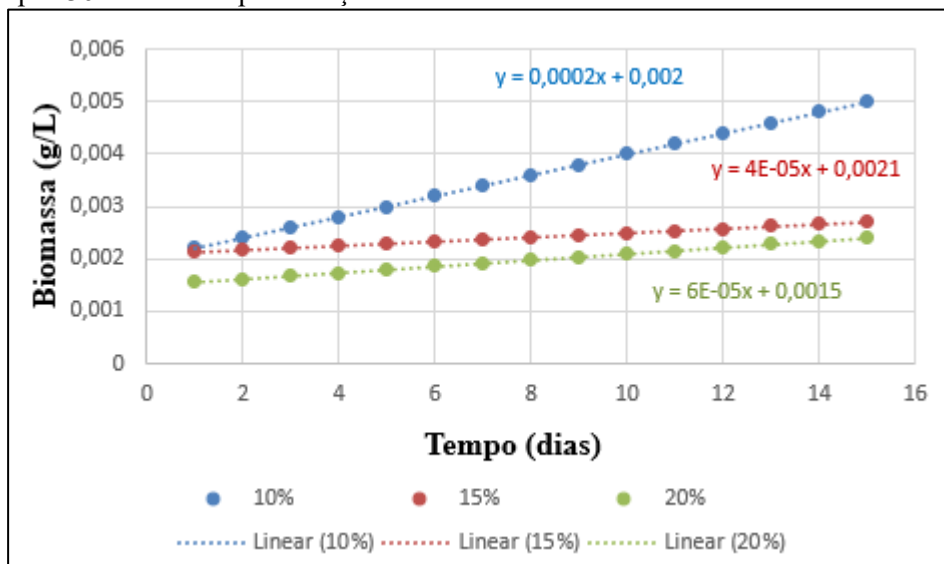
Gráfico 8: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* após 30 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Crescimento diários das amostras preservadas durante 30 dias em freezer -80 °C com diferentes concentrações de glicerol.

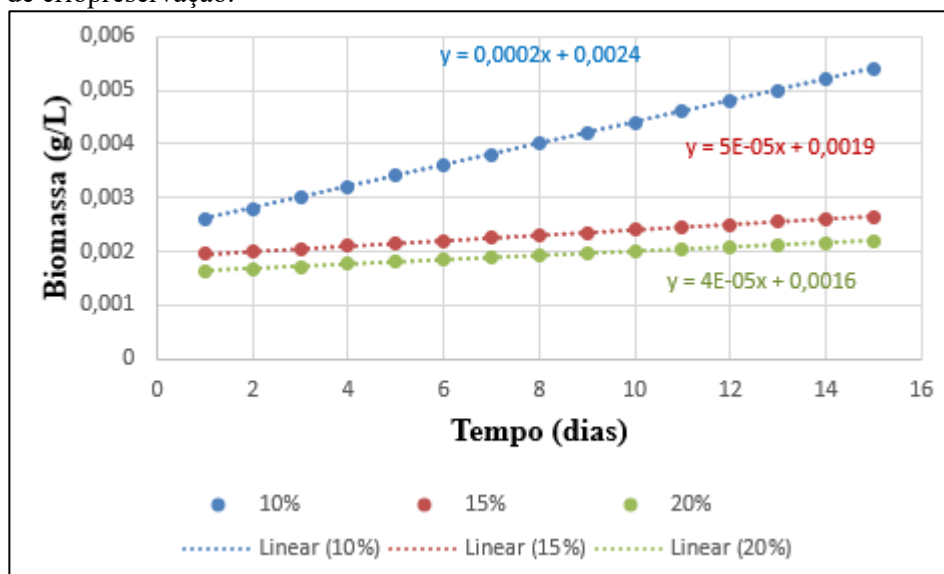
Gráfico 9: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* após 36 dias de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Crescimento diários das amostras preservadas durante 36 dias em freezer -80 °C com diferentes concentrações de glicerol.

Gráfico 10: Crescimento de biomassa (g/L/dias) de amostras de *Chlorella* após 42 de criopreservação.



Fonte: (Autoria própria)

Legenda: Crescimento diários das amostras preservadas durante 42 dias em freezer -80 com diferentes concentrações de glicerol.