

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS(UFGD)
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
(PPGCTA)
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOPROCESSOS

LETICIA BUENO DE MOURA

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Limnospira platensis*
(ESPIRULINA) COM O USO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Camellia*
sinensis* E *Lemna minor

Dourados, MS

2026

LETICIA BUENO DE MOURA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Limnospira platensis*
(ESPIRULINA) COM O USO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Camellia
sinensis* E *Lemna minor***

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação em
Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade
Federal da Grande Dourados, como requisito para a
obtenção de título de mestre

Orientador: Dr. Marcelo Fossa Paz

Coorientadora: Dra. Michelle Pinheiro Vetorelli

Dourados MS

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M929a Moura, Letícia Bueno De

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Limnospira platensis* COM O USO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Camellia sinensis* E *Lemna minor* [recurso eletrônico] / Letícia Bueno De Moura. -- 2026.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Dr. Marcelo Fossa Paz .

Coorientadora: Dra. Michelle Pinheiro Vetorelli.

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. Espirulina. 2. . 3. Meios de cultura alternativos. 4. . 5. Fertilizante NPK. 6. . 7. Lentilha d'água. 8. . 9. Produtividade de biomassa. I. Paz, Dr. Marcelo Fossa. II. Vetorelli, Dra. Michelle Pinheiro. III. 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.

LETICIA BUENO DE MOURA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Limnospira platensis*
(ESPIRULINA) COM O USO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Camellia*
sinensis E *Lemna minor***

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação em
Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade
Federal da Grande Dourados, como requisito para a
obtenção de título de mestre

Aprovado em: 27 de Março de 2026

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Presidente/ Orientador

Prof^a. Dr^a. Rozanna Marques Muzzi
Membro Titular Interno

Prof^a. Dr^a. Debora Pantojo de Souza
Membro Titular Externo

Dedico este trabalho a todas as pessoas que desejam o avanço da humanidade, onde, através da ciência e dos estudos, almejamos a evolução, afinal, o conhecimento é algo que deve ser compartilhado, para que assim, possamos passa-lo adiante e criar um mundo melhor.

RESUMO

Com o objetivo de elaborar um meio de cultura nutritivo e econômico para a produção de *Limnospira platensis* (espirulina), foram elaborados quatro meios de cultura, sendo um formulado apenas a base de NPK mais sais (meio X), dois a base de NPK mais extratos vegetais de *Lemna minor* (meio Lentilha) e *Camellia sinensis* (meio Chá verde) e um meio base (Zarrouk). Após análises, foi observado que todos os meios alternativos baseados em fertilizante NPK foram capazes de sustentar o crescimento de *Limnospira platensis* em níveis de biomassa semelhantes ou até mesmo superiores ao meio padrão Zarrouk, contanto que o período de cultivo seja suficientemente longo. Ao final do experimento, foi observado que o meio Zarrouk apresentou o maior teor de proteína bruta, diferindo significativamente dos demais meios, os meios contendo extratos vegetais não diferiram entre si, enquanto o meio X apresentou o menor valor. Após o teste de toxicidade da espirulina cultivada em diferentes meios de cultura, foi observado que houve menor sobrevivência no tratamento controle em relação a todos os tratamentos contendo extrato de *Limnospira platensis*, apresentando média de $65,5 \pm 18,0\%$, enquanto os extratos provenientes dos meios X, CV, Z e L apresentaram sobrevivência média de $97,1 \pm 4,35\%$, $97,7 \pm 4,25\%$, $97,1 \pm 4,35\%$ e $100,0 \pm 0,0\%$, respectivamente. Por fim, conclui-se que meios alternativos à base de NPK e extratos vegetais são tecnicamente viáveis e economicamente vantajosos para produção de espirulina, com *trade-off* entre velocidade de crescimento e produtividade final, definindo estratégias de produção adaptadas a diferentes objetivos industriais.

Palavras-chave: Espirulina; Meios de cultura alternativos; Fertilizante NPK; Lentilha d'água; Produtividade de biomassa;

ABSTRACT

With the aim of developing a nutritious and economical culture medium for the production of *Limnospira platensis* (spirulina), four culture media were prepared: one formulated solely with NPK fertilizer plus salts (medium X), two based on NPK fertilizer plus plant extracts of *Lemna minor* (Lentil medium) and *Camellia sinensis* (Green Tea medium), and one base medium (Zarrouk). After analysis, it was observed that all alternative media based on NPK fertilizer were able to sustain the growth of *Limnospira platensis* at biomass levels similar to or even higher than the standard Zarrouk medium, provided the cultivation period was sufficiently long. At the end of the experiment, it was observed that the Zarrouk medium presented the highest crude protein content, differing significantly from the other media; the media containing plant extracts did not differ from each other, while medium X presented the lowest value. After testing the toxicity of spirulina cultivated in different culture media, it was observed that there was lower survival in the control treatment compared to all treatments containing *Limnospira platensis* extract, presenting an average of $65.5 \pm 18.0\%$, while the extracts from media X, CV, Z, and L showed average survival rates of $97.1 \pm 4.35\%$, $97.7 \pm 4.25\%$, $97.1 \pm 4.35\%$, and $100.0 \pm 0.0\%$, respectively. Finally, it is concluded that alternative media based on NPK and plant extracts are technically viable and economically advantageous for spirulina production, with a trade-off between growth rate and final productivity defining production strategies adapted to different industrial objectives.

Keywords: Spirulina; Alternative culture media; NPK fertilizer; Duckweed; Biomass productivity;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Limnospira platensis</i> vista em Microscópio Óptico, lente ocular 5x.....	14
Figura 2. Produção de <i>Lemna minor</i> L. em tanques abertos na Fazenda Marcante-Campeixe em Dourados, Mato Grosso do Sul.....	16
Figura 3. Filtração da biomassa de <i>Limnospira platensis</i> em tela de nylon (30 µm) no Laboratório de Biotecnologia dos Alimentos (LADEBIO).....	22
Figura 4. Experimento 2- Cultivo de <i>Limnospira platensis</i> em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde sob bancada do Laboratório de Cultivo de Microrganismos.....	23
Figura 5. Preparação de amostras coletadas do meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde para a realização da análise de peso seco.....	24
Figura 6. Pesagem de uma amostra do meio Zarrouk após a secagem e o resfriamento.....	24
Figura 7. Produção de <i>Limnospira platensis</i> em maior escala (4L) em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde.....	26
Figura 8. Extrato vegetal de biomassa de <i>Limnospira platensis</i> cultivada em diferentes meios de cultura.....	30
Figura 9. Placa de Elisa contendo soluções experimentais do extrato vegetal da biomassa de <i>Limnospira platensis</i> cultivada em diferentes meios de cultura nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg mL ⁻¹	31
Figura 10. Crescimento de <i>Limnospira platensis</i> avaliado por absorbância ao longo do tempo em meio Zarrouk modificado (Zm) e em Zarrouk modificado suplementado com extrato de <i>Lemna minor</i> L. (ZmL). As curvas representam réplicas independentes de cada tratamento.....	32
Figura 11. Curvas de crescimento da biomassa seca de <i>Limnospira platensis</i> (g L ⁻¹) ao longo do tempo de cultivo em diferentes meios (Zarrouk, Chá verde, Lentilha-d'água e Meio X). Os pontos representam as médias e as barras verticais o desvio-padrão. Diferenças estatísticas entre tratamentos em cada tempo estão apresentadas na Tabela 3 (ANOVA seguida de teste pós-hoc, p < 0,05).....	35
Figura 12. Variação percentual da concentração de nutrientes nos meios de cultura após o cultivo de <i>Limnospira platensis</i> . Valores negativos indicam redução da concentração no meio ao final do cultivo, enquanto valores positivos indicam aumento da concentração em relação aos valores iniciais.....	40
Figura 13. Eficiência de remoção (%) dos nutrientes nos diferentes meios de cultura após o cultivo de <i>Limnospira platensis</i> . Os valores representam a redução percentual da concentração de cada nutriente em relação aos valores iniciais. Maiores valores indicam maior remoção do nutriente do meio ao final do cultivo.....	40
Figura 14. Relação entre a quantidade de <i>Artemia salina</i> viva e a concentração do extrato de <i>Limnospira platensis</i> aplicada (0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 1 mL e 1,5 mL). As caixas representam os valores entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha que separa as caixas representa o valor central dos dados, os traços a baixo e a cima das caixas representam os limites inferiores e superiores.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de cultura Zarrouk modificado (Zm) e Zarrouk modificado com extrato de <i>Lemna minor</i> L. (ZmL) expressa em gramas por litro de meio.....	17
Tabela 2 Composição dos meios de cultura (g/L) para o crescimento da <i>spirulina</i> (Experimento 2)..	20
Tabela 3. Valores médios de absorbância inicial, pico de crescimento, valor final e variação percentual do crescimento de <i>Limnospira platensis</i> cultivada em meio Zarrouk modificado (Zm) e em Zarrouk modificado suplementado com extrato de <i>Lemna minor</i> L. (ZmL).....	33
Tabela 4. Biomassa seca média ($\pm$ desvio-padrão) de <i>Limnospira platensis</i> (g L^{-1}) ao longo do tempo de cultivo em diferentes meios.....	35
Tabela 5. Equações do modelo logístico ajustado às curvas de crescimento da biomassa seca de <i>Limnospira</i> cultivada em diferentes meios de cultura. O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de ajuste do modelo aos dados experimentais.....	35
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>L. platensis</i> nos diferentes meios.....	36
Tabela 7. Resultados analíticos das amostras antes e após o cultivo de <i>Limnospira platensis</i> (mg L^{-1} , exceto CE).....	38
Tabela 8. Variação percentual (%) dos parâmetros químicos entre o início e o final do cultivo de <i>Limnospira platensis</i>	39
Tabela 9. Teor de proteína bruta (%) da biomassa nos diferentes tratamentos. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 2$). Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	41
Tabela 10. Concentração residual de potássio, sulfato e fósforo nos meios após o cultivo de <i>Limnospira platensis</i>	41
Tabela 11. Sobrevivência média dos náuplios de <i>Artemia salina</i> expostos aos extratos de <i>Limnospira platensis</i> cultivada em diferentes meios.....	42

Sumário

1. Introdução.....	10
1.1 Objetivo.....	13
2. Materiais e Métodos.....	14
2.1 Caracterização do Organismo de Estudo.....	14
2.2 Delineamento de Estudo	14
2.3.2.3 Experimento 1: Avaliação do Extrato de <i>Lemna minor</i> L. como Suplemento Nutricional (ensaio preliminar/piloto).....	15
2.3.1. Delineamento Experimental.....	15
2.3.2. Coleta e Preparo da Biomassa de <i>Lemna minor</i>.....	15
2.3.3. Composição dos Meios de Cultura.....	16
2.3.4. Inoculação e Condições de Cultivo.....	17
2.3.5. Monitoramento do Crescimento.....	18
2.3.6. Análise Estatística.....	18
2.4 Experimento 2: Avaliação do Crescimento em Diferentes Meios.....	18
2.4.1. Delineamento e Tratamentos.....	18
2.4.2. Preparo do Inóculo.....	19
2.4.3. Preparo dos Extratos Vegetais.....	19
• Extrato de Lentilha d'Água (<i>Lemna minor</i>).....	19
• Extrato de Chá Verde (<i>Camellia sinensis</i>).....	19
2.4.4. Preparo dos Meios de Cultura.....	19
2.4.5. Procedimento de Preparo	21
2.4.6. Lavagem do Inóculo.....	21
2.4.7. Condições de Cultivo.....	22
2.4.8. Monitoramento do Crescimento e Parâmetros Cinéticos.....	23
• Absorbância.....	23
• Peso Seco.....	23
2.4.9. Análise estatística.....	25
2.5. Experimento 3: Produção de Biomassa para Análises.....	25
2.5.1. Delineamento e Escala.....	25
2.5.2. Preparo dos Meios de Cultura.....	27
2.5.3. Coleta de Amostras para Análise de Nutrientes.....	27
• Amostras Pré-Inoculação.....	27
• Amostras Pós-Cultivo.....	28

2.5.4. Quantificação de Proteína Bruta.....	28
2.5.5. Análise Estatística.....	28
2.6. Experimento 4: Teste de toxicidade do extrato de espirulina cultivado em diferentes meios de cultura.....	29
2.6.1. Organismo teste.....	29
2.6.2. Delineamento e tratamentos.....	29
2.6.3. Eclosão dos náuplios de <i>Artemia</i>	29
2.6.4. Preparo das Soluções de Teste.....	30
2.6.5. Montagem do Bioensaio.....	30
2.6.6. Avaliação da Mortalidade.....	31
2.6.7. Análise Estatística.....	31
3. Resultados	32
3.1 Experimento 1: Avaliação do Extrato de <i>Lemna minor</i> como Suplemento Nutricional.....	32
3.2 Experimento 2: Avaliação do Crescimento em Diferentes Meios.....	33
3.3. Experimento 3: Produção de Biomassa para Análises.....	36
3.4 Experimento 4: Teste de toxicidade do extrato de espirulina cultivado em diferentes meios de cultura.....	42
4. Discussão.....	44
5. Conclusão.....	51
6. Referências.....	51

1. Introdução

Espirulina (*Limnospira platensis* (Gomont)) (Santos *et al.*, 2023), anteriormente conhecida como *Arthrospira platensis*, é uma cianobactéria fotossintetizante e filamentosa pertencente à categoria Cyanophyta, Cyanophyceae e Oscillatoria (Jian Li *et al.*, 2021). Originalmente, foi utilizada como fonte de alimento pelos povos astecas no Lago Texcoco, no México, e posteriormente descoberta pelo botânico Jean Léonard na década de 1960 (Vonshak, 1997). Em 1967, a Associação Internacional de Microbiologia Aplicada a reconheceu como uma "futura fonte de alimento" (Villaró-Cos *et al.*, 2024) e, em 1996, a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerou o "melhor alimento para o futuro" (Fernandes *et al.*, 2023). Esta cianobactéria filamentosa forma tricomas helicoidais livres, compostos por células cilíndricas dispostas linearmente e sem ramificações. Os filamentos variam de 200 a 500 micrômetros de comprimento e de 5 a 10 micrômetros de largura, apresentando espirais que podem ser abertas ou compactas. A presença de aerótopos é variável entre os filamentos, e as extremidades não demonstram diferenciação celular evidente (Ai *et al.*, 2023).

Na natureza, a espirulina pode ser encontrada em lagos alcalinos e salinos, águas residuais e no oceano, sendo caracterizada por seu rápido crescimento, baixo consumo de energia e água durante sua produção (Gouda *et al.*, 2022). Fora do ambiente natural, essa microalga pode ser cultivada em meio líquido, como em lagoas, tanques de produção e foto biorreatores (Uebel *et al.*, 2019), sendo posteriormente filtrada e seca até se transformar em pó. Devido à sua ampla gama de nutrientes, incluindo ácidos graxos essenciais, vitaminas (especialmente do complexo B), minerais, polissacarídeos, fibras, compostos fenólicos, pigmentos (carotenoides, ficobiliproteínas e clorofila) e propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidiabéticas, antitóxicas e antimicrobianas, a espirulina tem se tornado cada vez mais procurada pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (Hamidi *et al.*, 2023). Ela é utilizada na produção de alimentos, ração para peixes (Titin; Lestari; Dwiyantri, 2024), barras de cereais (Soui *et al.*, 2022), suplementos vitamínicos (Rutar *et al.*, 2022), medicamentos (Huang *et al.*, 2022) e cosméticos (Ragusa *et al.*, 2021).

Assim que os cientistas descobriram o potencial dessa cianobactéria, foram realizados diversos estudos a fim de formular um meio de cultura capaz de fornecer todos os nutrientes necessários para que ela seja produzida. Em 1966, Zarrouk conseguiu criar a base desse meio de cultura, tornando-se este o mais utilizado para a produção da espirulina em grande escala até os dias atuais. Porém, devido ao elevado custo e à complexidade do meio original (principalmente em larga escala) (Zarrouk, 1966) (Sopandi *et al.*, 2020), diversos estudos têm sido conduzidos com

o intuito de reduzir o custo de produção da espirulina, por exemplo: Kumari; Pathak e Guria (2015) elaboraram diversos cultivos otimizados de espirulina utilizando diferentes concentrações do fertilizante NPK 10:26:26 a fim de formular um meio de cultura com o fertilizante NPK 10:26:26 de grau comercial que pudesse proporcionar uma produção em massa da espirulina com taxas de crescimento iguais ou superiores as do meio de cultura padrão (Zarrouk). Ao final do experimento, observaram que o cultivo formulado a base de NPK 10:26:26 obteve resultados de crescimento superiores aos meios de cultura padrão (Zarrouk, NCL e CFTRI) quando exposto a 50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de LED branco, ciclo claro/escuro de 14 h/10 h e temperatura de 30 °C sob agitação orbital de 90 rpm, obtendo cerca de 1.12 g/L de concentração de biomassa de espirulina com 1.06 g/L de NPK 10:26:26, 18.5 g/L de bicarbonato de sódio, 1.33 g/L de sais e 1 mL de solução A5.

Os extratos vegetais são substâncias obtidas através do uso de plantas e de um líquido extrator (podendo ser água, álcool, glicerina vegetal, dentre outros), que possuem uma variedade de compostos bioativos como: vitaminas, minerais, antioxidantes, etc (Heide, 2024), podendo ser realizada através de processos de: infusão, maceração, percolação, decoção, extração contínua quente, extração em contracorrente, dentre outros (V.B. Oliveira *et al.*, 2016). Essas substâncias podem ser utilizadas tanto em indústrias de cosméticos (formulação de óleos essenciais, cremes, dentre outros) quanto em indústrias farmacêuticas (formulação de medicamentos fitoterápicos, etc) e alimentares (formulação de aromatizantes, corantes, etc) graças a seus princípios ativos (PCC,. 2024; ANVISA,. 2022; Inovação & Tendências,. 2019).

A lentilha d'água (*Lemna minor L.*) é uma planta aquática fotossintética que possui a capacidade de absorver, filtrar e acumular uma grande quantidade de nutrientes presentes no meio em que está inserida (Heitzman *et al.*, 2024), sendo rica em proteínas, lipídios, carboidratos, ômega-3 e ômega-6 (Fiordelmondo *et al.*, 2022). Originalmente sendo consumida no sudoeste da Ásia e descrita por Severi e Fornasiero (1983) como uma planta aquática de formato ovalado e diâmetro médio de 1,7 mm pertencente à família *Lemnaceae* (angiosperma) (Sosa *et al.*, 2024), pode ser encontrada em pequenas lagoas, valas, pântanos e em corpos d'água que se movem lentamente (Chakrabarti *et al.*, 2018), crescendo em águas com níveis relativamente altos em N, P e K, concentrando-os em sua composição e gerando proteína. Recentemente, vários estudos têm sido realizados com foco no valor nutritivo que essa macrófita possui, a fim de que possa ser utilizada como suplementação alimentícia para peixes, aves, suínos e humanos, como é o caso de Goswami *et al.* (2022), que estudaram o efeito da suplementação da dieta com *Lemna minor* no crescimento, fisiologia digestiva e expressão de genes da biossíntese de ácidos graxos em *Cyprinus carpio* com o objetivo de avaliar a lentilha-d'água *Lemna minor* como substituta de farinhas vegetais, como a farinha de soja, em rações

extrusadas peletizadas para carpa comum (*Cyprinus carpio*). Para isto, formularam cinco diferentes dietas, sendo a LM0 a dieta controle (baseada em farinhas vegetais e tendo a farinha de soja como sua principal fonte de proteína) e as demais dietas tendo a adição da lentilha d'água: dieta LM5 contendo 5% de lentilha d'água, a dieta LM10 contendo 10% de lentilha d'água, a dieta LM15 contendo 15% de lentilha d'água e a dieta LM20 contendo 20% de lentilha d'água. Ao início do experimento, 450 alevinos foram distribuídos de forma aleatória em 15 aquários (30 alevinos para cada aquário de 60 L) e cada um desses aquários recebeu uma das cinco dietas (LM0, LM5, LM10, LM15 e LM20) durante 60 dias, sendo cada dieta alocada aleatoriamente a três aquários (n=3). Ao final do experimento eles observaram que o peso das carpas alimentadas com as dietas LM15 e LM20 foram significativamente maiores em comparação daquelas alimentadas com as outras dietas, sendo o menor peso observado nas carpas que foram alimentadas com a dieta controle (LM0), além disso, a inclusão da lentilha d'água na dieta das carpas elevou o seu valor nutricional, suas proteínas, lipídios aminoácidos e AGPI-CL n-3.

Em 2021, Zeffer *et al* realizaram uma pesquisa onde avaliaram o efeito da inclusão de diferentes níveis de lentilha-d'água (*Lemna minor*) no desempenho de frangos de corte. Para isso, distribuíram cento e cinquenta filhotes de frango com apenas um dia de vida em cinco grupos de tratamento (com 30 filhotes em cada grupo e três repetições de 10 filhotes cada), sendo o primeiro grupo (T1) o grupo controle, o segundo grupo (T2) contendo apenas 5% de lentilha-d'água, o terceiro grupo (T3) contendo 5% de lentilha-d'água e enzimas, o quarto grupo (T4) contendo apenas 10% de lentilha-d'água e o quinto e último grupo (T5) contendo 10% de lentilha-d'água e enzimas. Ao final da pesquisa, observaram que o grupo T1 e T3 obtiveram resultados de ganho de peso corporal mais elevados em comparação com os demais grupos (sendo $1889,67 \pm 13,28$ g no grupo T1 e $1878,65 \pm 2,02$ g no grupo T3), além disso, a conversão alimentar cumulativa foi melhor nos grupos T1 e T3 ($1,74 \pm 0,01$) em comparação com os demais grupos (sendo $1,78 \pm 0,01$ no grupo T2; $1,85 \pm 0,01$ no grupo T4 e $1,78 \pm 0,04$ no grupo T5) e a mortalidade total registrada foi cerca de 3,3% em todos os grupos com exceção do grupo T3, pois não houve nenhuma morte neste grupo durante o período experimental.

Em uma pesquisa de revisão realizados por Sosa *et al.* (2024) a fim de desvendarem o valor nutricional da lentilha-d'água para a indústria de alimentos e rações, foi mencionado que, além de possuir uma gama de nutrientes e sua capacidade acumulativa de nutrientes e minerais presentes na água em que está inserida, a lentilha d'água também pode ser utilizada como um alimento alternativo para diversos seres vivos, sendo um destes os porcos, visto que na literatura é possível encontrar diversos trabalhos científicos relatando a aplicação desta planta aquática

na alimentação dos suínos e os benefícios gerados a eles após a lentilha d'água ser inclementada em sua ração (como o aumento de carne e pele, além da diminuição de gordura). Além disso, apesar dos poucos estudos relacionados ao uso da lentilha d'água como alimento humano, é possível encontrar na literatura diversos estudos ressaltando os benefícios que o consumo desta planta aquática pode trazer a saúde do ser humano devido a sua gama de nutrientes (Sosa et al., 2024).

A *Camellia sinensis*. Originária da Ásia, é uma planta arbustiva pertencente à família *Theaceae*, do gênero *Camellia* e espécie *sinensis* (Marques; Santos, 2021). Historicamente, é cultivada no Himalaia por monges budistas que preparavam bebidas utilizando as folhas da planta. Atualmente, através de estudos farmacológicos e fitoquímicos, foi descoberto que a *C. sinensis* é uma rica fonte de flavonoides, saponinas, taninos, compostos fenólicos e triterpenoides (Viana; Rodrigues, 2024), além de possuir ação antioxidante (Santos et al., 2023), antiobesidade (Marques; Santos, 2021), dentre outras.

Tendo em vista o aumento da popularidade e a demanda que a espirulina vem adquirindo no mercado e a necessidade da elaboração de um meio de cultura alternativo para a sua produção, visto que o meio original é complexo e de alto custo (principalmente em larga escala), este trabalho se justifica pela elaboração de um meio de cultura alternativo utilizando os extratos vegetais de *Camellia sinensis* e *Lemna minor* para a produção da espirulina, visando proporcionar a esta microalga os mesmos valores nutritivos essenciais que o meio original (Zarrouk) possui e consequentemente garantindo uma boa produção de sua biomassa.

1.1. Objetivo

Este estudo tem como objetivo desenvolver um meio de cultura nutritivo e econômico, utilizando extratos vegetais de lentilhas d'água (*Lemna minor* L.) e chá verde (*Camellia sinensis* L.) para a produção de espirulina (*Limnospira platensis* (Gomont)) (Santos et al., 2023).

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar se o uso dos extratos vegetais de *Lemna minor* L. e *Camellia sinensis* L. possuem o potencial nutritivo necessário para a produção da espirulina.
- 2) Avaliar se é possível cultivar a espirulina em maior escala utilizando extratos vegetais de *Lemna minor* L. e *Camellia sinensis* L.
- 3) Avaliar a toxicidade aguda dos extratos de *Limnospira platensis* cultivada em diferentes meios de cultura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização do Organismo de Estudo

A cianobactéria *Limnospira platensis* foi empregada como organismo modelo neste estudo (Figura 1. *Limnospira platensis* vista em Microscópio Óptico, lente ocular 5x). A cepa foi fornecida pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP) e está sendo mantida no cepário do Laboratório de Cultivo de Microrganismos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), sob registro SISGen BMAKD13. A cepa foi inicialmente cultivada em meio Zarrouk sob condições controladas de temperatura (25°C), salinidade (20) e fotoperíodo (16:8 claro:escuro) antes de ser inoculada nos tratamentos experimentais.

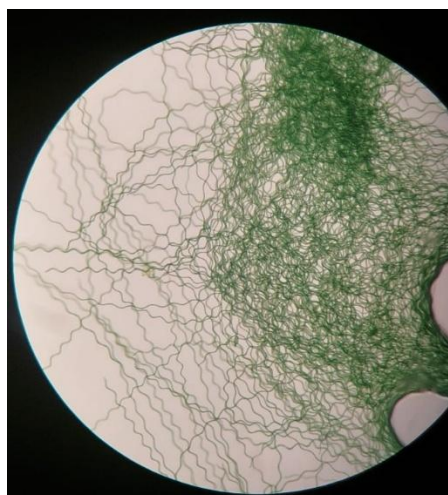


Figura 1. *Limnospira platensis* vista em Microscópio Óptico, lente ocular 5x.

2.2. Delineamento do Estudo

Este estudo foi estruturado em quatro experimentos sequenciais e complementares. O primeiro experimento (Experimento 1) foi realizado como um ensaio preliminar (piloto) para avaliar o potencial do extrato de *Lemna minor* L. como suplemento nutricional em meio Zarrouk modificado, permitindo a identificação de ajustes metodológicos necessários antes da execução dos experimentos principais. O Experimento 2 constituiu o ensaio principal, onde foram comparados o crescimento de *L. platensis* em quatro diferentes meios de cultura (Zarrouk, Meio X, Meio Lentilha e Meio Chá Verde) sob condições padronizadas, fornecendo os dados cinéticos fundamentais para a avaliação da viabilidade dos meios alternativos. O Experimento 3 foi uma replicação do Experimento 2 em maior escala (5 litros), com o objetivo de gerar

biomassa suficiente para análises de composição (proteína bruta) e avaliar o consumo de nutrientes do meio durante o cultivo, permitindo uma análise econômica e nutricional mais robusta. Por fim, o Experimento 4 foi realizado como um teste de segurança do produto final, avaliando a possível toxicidade aguda dos extratos de espirulina cultivada em diferentes meios de cultura utilizando náuplios de *Artemia* como organismo modelo de triagem ecotoxicológica.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprodutos (LADEBIO) e no Laboratório de Cultivo de Microrganismos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), localizados no centro de Laboratórios Finep (CLF).

2.3. Experimento 1: Avaliação do Extrato de *Lemna minor* L. como Suplemento Nutricional (ensaio preliminar/piloto)

2.3.1. Delineamento Experimental

Este experimento foi conduzido para avaliar o potencial do extrato aquoso de lentilha d'água (*Lemna minor* L.) como fonte de nutrientes suplementares em meio de cultura Zarrouk modificado para o crescimento de *L. Platenses*, sendo conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos em triplicata, totalizando seis unidades experimentais.

Tratamentos:

- Zm (Controle): Meio Zarrouk modificado sem adição de extrato de *Lemna minor* L.
- ZmL (Experimental): Meio Zarrouk modificado suplementado com extrato de *Lemna minor* L.

Cada unidade experimental consistiu em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 200 mL de meio de cultura.

2.3.2. Coleta e Preparo da Biomassa de *Lemna minor*

A biomassa de *Lemna minor* L. foi coletada na Fazenda Marcante-Campeixe, localizada no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (coordenadas: -22.2845, -55.0499) (Figura 2. Produção de *Lemna minor* L. em tanques abertos na Fazenda Marcante-Campeixe em Dourados, Mato Grosso do Sul).



Figura 2. Produção de *Lemna minor* L. em tanques abertos na Fazenda Marcante-Campeixe em Dourados, Mato Grosso do Sul.

Após a coleta, a biomassa foi submetida ao seguinte processo de preparação:

- 1 Secagem: A biomassa fresca foi distribuída em bandejas e mantida em estufa de circulação de ar a 50°C até completa desidratação.
- 2 Trituração: O material seco foi triturado mecanicamente em liquidificador até obtenção de um pó fino e homogêneo.
- 3 Extração Aquosa: O extrato foi obtido por decocção utilizando-se 2,5 g de biomassa seca em 100 mL de água destilada fervente, mantendo-se em infusão por 10 min. Esse procedimento resultou em um extrato bruto com concentração de 25 mg/mL (2,5% m/v).
- 4 Filtração: O extrato aquoso resultante foi filtrado através de tela de nylon (30 μ m) para remoção de resíduos sólidos, obtendo-se um filtrado límpido.

O extrato foi armazenado sob refrigeração (4°C) até o momento do uso na formulação dos meios de cultura.

2.3.3. Composição dos Meios de Cultura

A composição dos meios de cultura está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura Zarrouk modificado (Zm) e Zarrouk modificado

com extrato de *Lemna minor* L. (ZmL) expressa em gramas por litro de meio.

Reagente	Zm (g/L)	ZmL (g/L)
Ureia (CH ₄ N ₂ O)	0,100	0,100
NaCl	1,000	1,000
KCl	0,500	0,500
MgSO ₄	0,200	0,200
CaCl ₂	0,040	0,040
FeSO ₄	0,010	0,010
EDTA	0,050	0,050
NaHCO ₃	16,80	16,80
NPK (20:05:20)	1,750	1,750
Extrato de <i>Lemna minor</i> L.	-	2,500 g/L*

*O extrato bruto obtido (equivalente a 25 g/L de biomassa vegetal) foi posteriormente diluído no meio de cultura, resultando em concentração final equivalente a 2,5 g/L (0,25 % (m/v)) de biomassa seca de *L. minor* L. no meio modificado.

2.3.4. Inoculação e Condições de Cultivo

Após a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos e o resfriamento dos meios até temperatura ambiente, a inoculação foi realizada em condições assépticas, em capela de fluxo laminar, próximo à chama de um bico de Bunsen. Um volume de 4 mL ($\approx 2\%$ v/v) de cultura de *Limnospira platensis* em final da fase exponencial foi adicionado a cada frasco através do uso de uma pipeta graduada (10 mL) e béquer (25 mL), resultando em um volume final de 204 mL por unidade experimental. Considerando uma absorbância inicial do inóculo de 0,629 e a equação de conversão previamente estabelecida (biomassa seca = $1,5441 \times$ absorbância), a concentração de biomassa da cultura utilizada como inóculo foi estimada em $0,9718 \text{ g L}^{-1}$. A adição de 4 mL dessa cultura em um volume final de 204 mL resultou em uma densidade inicial aproximada de $0,019 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca de *Limnospira platensis*. Os cultivos foram mantidos em câmara de germinação tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) sob as seguintes condições:

- Temperatura: 30°C

- Agitação: Constante, proporcionada pelo sistema de agitação orbital da BOD (200 rpm)
- Iluminação: Fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro ($11,21 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas)
- Período de cultivo: 14 dias (336 horas)

2.3.5. Monitoramento do Crescimento

O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente por meio de leituras de densidade óptica em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 560 nm. As leituras foram realizadas por um período de 14 dias, iniciando-se 24 horas após a inoculação (tempo zero).

Para cada leitura, uma alíquota de 3 mL de cultura foi coletada assepticamente de cada frasco por meio de pipetas graduadas (10 mL) e béqueres (25 mL), transferida para cubeta de plástico com pipetas Pasteur, e submetida à leitura espectrofotométrica. O espectrofotômetro foi previamente zerado com o meio de cultura estéril correspondente a cada tratamento (branco). Após a leitura, as alíquotas foram descartadas.

Os valores de absorbância obtidos foram registrados e utilizados para a construção de curvas de crescimento ao longo do tempo de cultivo.

2.3.6. Análise Estatística

Os dados de absorbância foram submetidos à análise descritiva, calculando-se as médias e desvios-padrão para cada tratamento em cada tempo de amostragem. As curvas de crescimento foram construídas plotando-se os valores médios de absorbância em função do tempo de cultivo. A comparação entre os tratamentos foi realizada por meio de análise visual das curvas e dos valores de biomassa nos tempos inicial (24 horas), pico de crescimento (72 horas) e final do experimento (312 horas).

2.4. Experimento 2: Avaliação do Crescimento em Diferentes Meios

2.4.1. Delineamento e Tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos em triplicata, totalizando 12 unidades experimentais. Cada unidade experimental consistiu em um frasco Erlenmeyer de 1 L com volume final de 800 mL.

Os tratamentos avaliados foram:

- Meio Zarrouk (TZ): Meio padrão, utilizado como controle positivo

- Meio X (TX): Meio simplificado à base de NPK, controle para os extratos
- Meio Lentilha (TL): Meio X suplementado com extrato de lentilha d'água
- Meio Chá Verde (TCV): Meio X suplementado com extrato de chá verde

2.4.2. Preparo do Inóculo

O inóculo de *L. platensis* foi preparado em meio Zarrouk padrão. Inicialmente, o pH foi ajustado para 10 com NaOH e a salinidade para 20‰ com NaCl. O meio foi então distribuído em três frascos Erlenmeyer de 250 mL (200 mL por frasco), autoclavado a 121 °C por 20 minutos e, após resfriamento até temperatura ambiente, inoculado com 20 mL ($\approx 10\%$ v/v) de cultura de *L. platensis* coletada em fase final do crescimento exponencial (densidade de biomassa de $0,9718 \text{ g L}^{-1}$), totalizando um volume final de 220 mL por frasco. Os frascos foram então cultivados por 10 dias em incubadora BOD a 30°C até atingir novamente a fase exponencial de crescimento, gerando o inóculo para os experimentos principais.

2.4.3. Preparo dos Extratos Vegetais

- **Extrato de Lentilha d'Água (*Lemna minor* L.)**

A biomassa de *Lemna minor* L. foi coletada na Fazenda Mercante-Campeixe, Dourados/MS (coordenadas: -22.2845, -55.0499), seca em estufa a 50°C e triturada em liquidificador. A lentilha-d'água seca e triturada foi adicionada à água destilada previamente fervida, na proporção de 6 g para 600 mL, correspondente a 10 g/L (1% m/v). A mistura permaneceu em infusão por 10 minutos em béquer (1 L) e, em seguida, foi filtrada em tela de nylon (30 μm). O extrato foi reservado em Erlenmeyer (1 L) sob refrigeração (4°C) até o momento do uso.

- **Extrato de Chá Verde (*Camellia sinensis*)**

O extrato aquoso de chá verde foi preparado a partir de folhas secas adquiridas no mercado local, utilizando-se 6 g de material seco para 600 mL de água destilada previamente fervida, correspondente a 10 g/L (1% m/v). A mistura permaneceu em infusão por 10 minutos em béquer (1 L) e, em seguida, foi filtrada em tela de nylon (30 μm). Por fim, o extrato foi reservado em Erlenmeyer (1 L) sob refrigeração (4°C) até o momento do uso.

2.4.4. Preparo dos Meios de Cultura

A composição detalhada de cada meio está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 Composição dos meios de cultura (g/L) para o crescimento da spirulina

(Experimento 2).

Reagente	Zarrouk (TZ)	Meio X (TX)	Meio Lentilha (TL)	Meio Chá Verde (TCV)
K ₂ HPO ₄	0,500	-	-	-
NaNO ₃	2,500	-	-	-
K ₂ SO ₄	1,000	-	-	-
NaCl	1,000	Ajustado*	Ajustado*	Ajustado*
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,200	0,200	0,200	0,200
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,040	0,040	0,040	0,040
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,010	-	-	-
EDTA	0,080	0,080	0,080	0,080
NaHCO ₃	16,80	16,80	16,80	16,80
Solução A ₅	1,0 mL/L	-	-	-
NPK (20:5:20)	-	1,750	1,750	1,750
Ureia (CH ₄ N ₂ O)	-	0,100	0,100	0,100
KCl	-	0,500	0,500	0,500
Extrato Vegetal	-	-	75 mL/L	75 mL/L

* A salinidade dos meios X, Lentilha e Chá Verde foi ajustada com NaCl para igualar à do meio Zarrouk (20‰).

Nota: O extrato bruto foi preparado a 1% (m/v). No meio de cultura, foi adicionado volume correspondente a 75 mL L⁻¹ (7,5% v/v), resultando em concentração final equivalente a 0,075% (m/v) de biomassa vegetal na unidade experimental.

2.4.5. Procedimento de Preparo

Para cada unidade experimental, foram preparados 780 mL de meio (Tratamentos TZ e TX) ou 720 mL de meio (Tratamentos TL e TCV). Os reagentes foram dissolvidos sequencialmente em água destilada sob agitação constante. Para os Tratamentos TL e TCV, após a dissolução de todos os reagentes, foram adicionados 60 mL do extrato vegetal correspondente, completando-se o volume para 780 mL.

Após a completa dissolução de todos os componentes, o pH de cada meio foi aferido e ajustado para 9,0 utilizando solução de NaOH. A salinidade dos meios X, Lentilha e Chá Verde foi ajustada para 20‰ com adição de NaCl, igualando-se à salinidade do meio Zarrouk.

Os meios foram então transferidos para frascos Erlenmeyer de 1L e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização e o resfriamento até temperatura ambiente, a inoculação foi realizada em condições assépticas, adicionando-se 20 mL de inóculo de *L. platensis* (coletado em fase final do crescimento exponencial, com absorbância de 0,629 a 560 nm) previamente lavado a cada frasco, correspondendo a 2,5% (v/v) em um volume final de 800 mL por unidade experimental. A concentração inicial de biomassa seca do inóculo foi calculada a partir da absorbância utilizando o fator de conversão de 1,5441, resultando em uma densidade de biomassa inicial de aproximadamente 0,97 g L⁻¹ no inóculo e 0,024 g L⁻¹ no meio de cultivo.

2.4.6. Lavagem do Inóculo

Antes da inoculação, a biomassa do inóculo foi filtrada através de tela de nylon (30 µm) e lavada 10 vezes com água destilada estéril utilizando pipeta Pasteur descartável para remover nutrientes residuais do meio de cultivo original (Figura 3. Filtração da biomassa de *Limnospira platensis* em tela de nylon (30 µm) no Laboratório de Biotecnologia dos Alimentos (LADEBIO)). A biomassa lavada foi ressuspensa em solução salina estéril (NaCl 1%, pH 9) para facilitar a transferência e homogeneização.

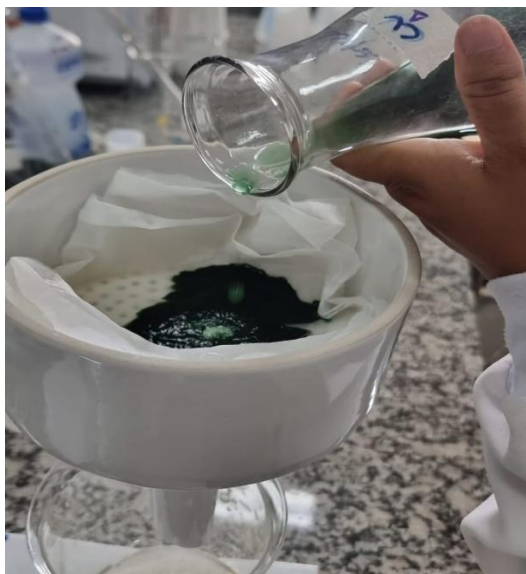


Figura 3. Filtração da biomassa de *Limnospira platensis* em tela de nylon (30 μm) no Laboratório de Biotecnologia dos Alimentos (LADEBIO).

2.4.7. Condições de Cultivo

Os cultivos foram mantidos em bancada de laboratório sob aeração constante fornecida por compressor de ar, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro proporcionado por lâmpadas fluorescentes brancas e temperatura média de $31,61 \pm 0,60^\circ\text{C}$ (Figura 4. Experimento 2- Cultivo de *Limnospira platensis* em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde sob bancada do Laboratório de Cultivo de Microrganismos). A intensidade luminosa média registrada durante o experimento foi de $65,66 \pm 35,27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (média $\pm$ desvio padrão; $n = 28$). A luminosidade foi monitorada com luxímetro Instrutherm LD-400 (em diferentes pontos do sistema experimental). Os valores registrados em lux foram convertidos para radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizando o fator de conversão $54 \text{ lux} \approx 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para luz branca. A temperatura foi monitorada com termómetro digital (Incoterm).



Figura 4. Experimento 2- Cultivo de *Limnospira platensis* em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde sob bancada do Laboratório de Cultivo de Microrganismos.

2.4.8. Monitoramento do Crescimento e Parâmetros Cinéticos

- **Absorbância**

O crescimento foi monitorado a cada 48 horas (360 horas) durante 15 dias por meio de leituras de densidade óptica em espectrofotômetro UV-Vis a 560 nm. Para cada leitura, uma alíquota de 4 mL de cultura foi coletada assepticamente de cada frasco com o uso de pipetas graduadas (10 mL) e béqueres de 25 mL. O branco utilizado foi o meio de cultura correspondente filtrado em membrana de 0,45 μ m, para correção da cor do próprio meio. As leituras foram realizadas em triplicata para cada amostra, e a média foi calculada.

- **Peso Seco**

Para analisar o peso seco dos tratamentos, em dias intercalados, foram coletados 5 mL de amostra de cada tratamento com pipetas graduadas (10 mL) e béqueres (25 mL) previamente esterelizados. As amostras foram filtradas utilizando papel filtro quantitativo JP42-Faixa azul com poros de 8 μ L, previamente identificado a lápis, com o auxílio de um filtro/funil de porcelana, um Erlenmeyer de 2 L e uma bomba do tipo hidrovácuo e EVA (Figura 5. Preparação de amostras coletadas do meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde para a realização da análise de peso seco). Todas as amostras foram lavadas cinco vezes com água destilada e posteriormente secas na estufa por 24 h a 60 °C. Após a secagem, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em um dessecador e em seguida pesadas em uma balança analítica

(BEL, M214AI, precisão de 0,1mg) (Figura 6. Pesagem de uma amostra do meio Zarrouk após a secagem e o resfriamento).



Figura 5. Preparação de amostras coletadas do meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde para a realização da análise de peso seco.



Figura 6. Pesagem de uma amostra do meio Zarrouk após a secagem e o resfriamento.

A biomassa foi calculada utilizando fator de conversão previamente estabelecido:

$$Biomassa = 1,5441 \times Abs$$

A partir dos dados de massa seca, foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos para cada tratamento:

1. Taxa Específica de Crescimento Máxima (μ_{max}): A μ_{max} (dia^{-1}) foi determinada pelo coeficiente angular da regressão linear do logaritmo natural ($\ln$) da concentração de biomassa versus o tempo durante a fase exponencial de crescimento.

2. Tempo de Duplicação (t_d): O tempo necessário para a duplicação da biomassa (em horas) foi calculado a partir da μ_{max} , utilizando a fórmula: $t_d = (\ln(2) / \mu_{max}) * 24$.

3. Biomassa Máxima (X_{max}): Corresponde ao maior valor de massa seca (g L^{-1}) alcançado por cada tratamento durante o período experimental.

4. Produtividade Volumétrica (P_v): A produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$) foi calculada considerando a biomassa gerada ao longo de todo o período de cultivo, através da fórmula: $P_v = (X_{final} - X_{inicial}) / t$, onde t é o tempo total de cultivo em dias.

2.4.9. Análise estatística

Os dados de biomassa seca foram inicialmente avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro–Wilk e à homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância fatorial, considerando os fatores meio de cultura e tempo de cultivo. Quando detectadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a análise cinética, a taxa específica de crescimento máxima (μ_{max} , dia^{-1}) foi estimada pelo coeficiente angular da regressão linear entre o logaritmo natural da biomassa seca média e o tempo, considerando-se a fase exponencial de crescimento em cada tratamento. A qualidade do ajuste foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). O tempo de duplicação (t_d , h) foi calculado pela expressão $t_d = (\ln 2 / \mu_{max}) \times 24$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R.

2.5. Experimento 3: Produção de Biomassa

2.5.1. Delineamento e Escala

O Experimento 3 foi uma replicação do Experimento 2 em maior escala, objetivando a produção de biomassa suficiente para análises de composição e avaliação do consumo de nutrientes. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos em duplicata,

totalizando 8 unidades experimentais. As condições de inoculação e cultivo foram as mesmas do Experimento 2, mantendo as mesmas proporções de inóculo e extrato vegetal.

Este experimento foi realizado em dois momentos com objetivos complementares:

Primeiro Cultivo: Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 6 L com volume final de 5.000 mL de meio de cultura por unidade experimental. Após o crescimento de *L. platensis* e retirada da biomassa, foram realizadas análises de proteína bruta (método de Kjeldahl) e avaliação do consumo de nutrientes. Amostras de meio foram coletadas em dois momentos: antes da inoculação (meio basal) e após a retirada da biomassa (meio residual), sendo encaminhadas para laboratório especializado (Laboratório de Substrato, Campinas/SP) para análise dos seguintes parâmetros: condutividade elétrica, nitrato, fósforo, cloreto, enxofre, amônia, potássio, sódio, cálcio, magnésio, boro, cobre, ferro, manganês e zinco.

Segundo Cultivo: Este tratamento foi replicado utilizando galões de água de 5 L com volume final de 4.000 mL de meio de cultura por unidade experimental (Figura 7. Produção de *Limnospira platensis* em maior escala (4L) em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde). Nesta etapa, as análises de nutrientes foram limitadas aos elementos-chave potássio, sulfato e fósforo, realizadas utilizando kits para fotolorimetria da marca Alfakit, conforme protocolos fornecidos pelo fabricante. A biomassa obtida neste segundo cultivo foi utilizada para o preparo de extratos de espirulina destinados ao teste de toxicidade (Experimento 4).



Figura 7. Produção de *Limnospira platensis* em maior escala (4L) em meio Zarrouk, meio X, meio Lentilha e meio Chá Verde.

2.5.2. Preparo dos Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados utilizando água destilada e reagentes de grau analítico. Nos Tratamentos TX (Meio X), TL (Lentilha-d'água) e TCV (Chá Verde), foi utilizado fertilizante NPK (20:5:20) como fonte de nutrientes em substituição aos componentes inorgânicos do meio Zarrouk. Cada reagente foi pesado em balança analítica (precisão de 0,0001 g) e dissolvido sequencialmente em água destilada, seguindo a ordem especificada na Tabela 2. Após a completa dissolução de todos os reagentes, a salinidade foi ajustada para 20‰ com adição de NaCl e o pH foi ajustado para 9,0 com solução de NaOH em todos os tratamentos.

Para os Tratamentos TL e TCV, além do NPK, foram adicionados 375 mL de extrato vegetal (preparado a 1% m/v) por 4.625 mL de meio base, resultando em uma proporção final de 7,5% (v/v) de extrato. Os meios foram então transferidos para frascos Erlenmeyer de 6 L (Cultivo 1) ou galões de 5 L (Cultivo 2) e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Após resfriamento até temperatura ambiente, a inoculação foi realizada em condições assépticas, adicionando-se 125 mL de inóculo de *L. platenses* (coletado em fase final do crescimento exponencial, com absorbância de 0,6293 a 560 nm e densidade de biomassa seca de 0,97 g L⁻¹) a cada frasco, correspondendo a 2,5% (v/v).

Cultivo 1: O volume final foi de 5.000 mL de meio de cultivo, resultando em uma densidade inicial de biomassa de aproximadamente 0,024 g L⁻¹.

Cultivo 2: Foi preparado um volume total de 5.000 mL de meio, sendo 4.000 mL transferidos para galões de 5 L para o cultivo (densidade inicial de 0,030 g L⁻¹) e 1.000 mL reservados para análises de nutrientes e cultivos complementares.

A composição detalhada dos meios está apresentada na Tabela 2. O meio Zarrouk (TZ) mantém a formulação padrão sem NPK. Os meios TX, TL e TCV utilizam NPK (20:5:20) como fonte de nutrientes. Adicionalmente, os meios TL e TCV recebem extrato vegetal como suplemento nutricional.

2.5.3. Coleta de Amostras para Análise de Nutrientes

- **Amostras Pré-Inoculação**

Antes da divisão nas unidades experimentais e da inoculação, foram coletadas amostras de 150 mL de cada meio preparado (totalizando 4 amostras: 1 de Zarrouk, 1 de Meio X, 1 de

Lentilha, 1 de Chá Verde). As amostras foram transferidas para frascos plásticos previamente identificados e armazenadas em freezer (-20°C) até o envio para análise laboratorial.

- **Amostras Pós-Cultivo**

Ao final do experimento, a biomassa de cada unidade experimental foi filtrada através de tela de nylon (30 µm). Foram coletadas amostras de 100 mL do sobrenadante (meio pós-cultivo) de cada unidade (8 amostras). As amostras foram transferidas para frascos plásticos de 500 mL previamente identificados, armazenadas em refrigerador (4°C) até o envio para análise laboratorial. As amostras pré e pós-cultivo (primeiro cultivo) foram enviadas para análise em laboratório terceirizado (Laboratório de Substrato, Campinas/SP) para análise de: condutividade elétrica, nitrato, fósforo, cloreto, enxofre, amônia, potássio, sódio, cálcio, magnésio, boro, cobre, ferro, manganês e zinco.

Já no segundo cultivo foi realizada a análise de macronutrientes (sulfato, fosfato, potássio). 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.

2.5.4. Quantificação de Proteína Bruta

Ao final do cultivo, a biomassa de cada tratamento foi filtrada em tela de nylon (30 µm), pesada em balança analítica e seca em estufa a 45°C por 48 horas. Após a secagem, a biomassa foi moída até obtenção de um pó fino e homogêneo.

Amostras de 0,300 a 0,315 g de biomassa seca foram analisadas para determinação do teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (1883), no Laboratório de Nutrição Animal (NUC) da UFGD. O teor de proteína bruta foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator de conversão de 6,25.

2.5.5. Análise Estatística

Os dados de proteína bruta foram analisados considerando delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e duas repetições por tratamento. Inicialmente, avaliou-se a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro–Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Após atendimento aos pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados das análises químicas dos meios no primeiro cultivo foram interpretados de forma descritiva, uma vez que a condição inicial de cada tratamento foi representada por

amostra composta única antes da distribuição nas unidades experimentais. Já os dados de potássio, sulfato e fósforo do segundo cultivo foram submetidos à análise de variância, seguida de comparação de médias quando aplicável. Todas as análises foram realizadas no software R.

2.6. Experimento 4: Teste de toxicidade do extrato de espirulina cultivado em diferentes meios de cultura

2.6.1. Organismo teste

O bioensaio foi conduzido com náuplios recém-eclodidos de *Artemia salina*, amplamente utilizados como organismo modelo em ensaios preliminares de toxicidade e triagem biológica, devido à facilidade de obtenção, sensibilidade experimental e reprodutibilidade dos resultados (Santos et al., 2023).

2.6.2. Delineamento e tratamentos

O experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda dos extratos de *Limnospira platensis* cultivada em diferentes meios de cultura, bem como explorar um possível efeito protetor desses extratos sobre a sobrevivência dos náuplios.

Para a avaliação entre extratos, adotou-se delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com dois fatores experimentais: tratamento, com quatro níveis correspondentes aos extratos obtidos a partir dos meios X, chá verde (CV), Zarrouk (Z) e *Lemna* (L); e concentração, com quatro níveis (0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹). Cada combinação tratamento × concentração foi composta por três repetições independentes.

Adicionalmente, foi incluído um tratamento controle negativo, constituído apenas por água salinizada, com seis repetições. Em cada unidade experimental, foram distribuídos náuplios viáveis de *A. salina*, sendo registrados ao final do período experimental o número de organismos vivos e mortos. A sobrevivência foi calculada pela razão entre o número de indivíduos vivos e o número total de organismos presentes em cada repetição

2.6.3. Eclosão dos náuplios de *Artemia*

Os cistos comerciais de *Artemia salina* foram inicialmente hidratados por 2 h em água salinizada. Em seguida, foram desinfetados com solução contendo 100 ppm de cloro ativo durante 10 min e posteriormente lavados em água doce até completa remoção do odor de cloro, utilizando peneira de 20 µm.

Após essa etapa, os cistos foram incubados em água salgada artificial preparada com 30 g L⁻¹ de NaCl e 2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio. A eclosão foi conduzida na proporção de 1 g de cistos por litro de solução, sob iluminação contínua (~1000 lux), temperatura controlada de

25 °C e aeração constante. Após 24 h, os náuplios recém-eclodidos foram separados dos cistos não eclodidos por fototropismo positivo, coletados com pipeta Pasteur estéril e transferidos para água salgada fresca.

2.6.4. Preparo das Soluções de Teste

Ao final da fase exponencial de crescimento, a biomassa de *L. platensis* cultivada nos diferentes meios foi lavada em água salinizada a 1%, filtrada em tela de nylon de 30 µm e seca em estufa a 45 °C por 48 h. Após a secagem, a biomassa foi triturada até obtenção de pó fino e homogêneo.

Para obtenção do extrato, a biomassa seca foi suspensa em água deionizada na concentração de 10 mg mL⁻¹, sob agitação magnética por 10 min. Em seguida, a suspensão foi submetida à sonicação em cuba ultrassônica (40 kHz) por 15 min e posteriormente centrifugada a 4800 rpm por 15 min. Ao final do processo, o sobrenadante foi separado e utilizado como solução-estoque dos extratos.



Figura 8. Extrato vegetal de biomassa de *Limnospira platensis* cultivada em diferentes meios de cultura.

As soluções experimentais foram preparadas em água salinizada a 30 g L⁻¹ de NaCl, nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹, a partir da diluição da solução-estoque.

2.6.5. Montagem do Bioensaio

Os bioensaios foram montados em duas placas de Elisa de 24 poços. Em cada poço foram adicionados 1000 µL da solução-teste ou da solução controle, seguidos da introdução dos náuplios viáveis. As placas foram mantidas por 24 h a 25 °C, sob iluminação difusa e sem alimentação adicional.

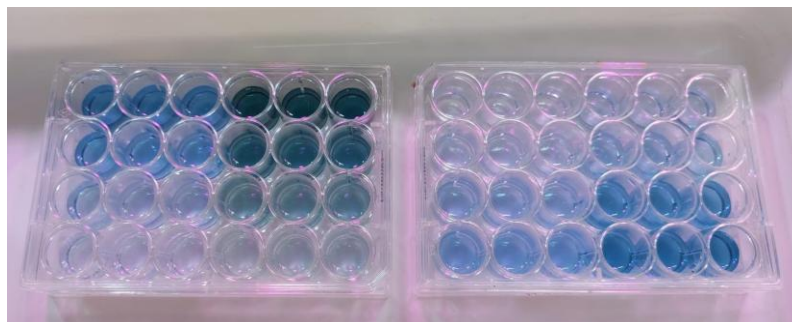


Figura 9. Placa de Elisa contendo soluções experimentais do extrato vegetal da biomassa de *Limnospira platensis* cultivada em diferentes meios de cultura nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹.

2.6.6. Avaliação da Mortalidade

Após 24 h de exposição, os náuplios foram avaliados sob microscópio estereoscópico. Foram considerados mortos os organismos sem movimento espontâneo e sem resposta ao estímulo mecânico leve. A mortalidade foi obtida pela equação: *Mortalidade* (%) = $\frac{\text{Número de náuplios mortos}}{\text{Número total de náuplios}} \times 100$ e a sobrevivência calculada de forma complementar.

2.6.7. Análise Estatística

Os dados de sobrevivência foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição binomial e função de ligação logit, utilizando-se como variável resposta o número de organismos vivos e mortos em cada repetição. Para avaliar a toxicidade entre os extratos, ajustou-se um modelo contendo os fatores tratamento, concentração e sua interação, excluindo-se o controle, uma vez que este não apresentava estrutura de doses. A significância dos efeitos foi testada por análise de deviance com teste do qui-quadrado.

Adicionalmente, para explorar um possível efeito protetor dos extratos sobre a sobrevivência dos náuplios, ajustou-se um segundo modelo contendo apenas o fator tratamento, incluindo o controle e os quatro extratos. A partir desse modelo, foram obtidas as probabilidades estimadas de sobrevivência, os contrastes entre cada extrato e o controle e as respectivas razões de chances (odds ratio), com ajuste de comparações pelo método de Dunnett.

A adequação dos modelos foi avaliada pelo índice de dispersão residual, calculado pela razão entre a deviance residual e os graus de liberdade residuais. Todas as análises foram realizadas no software R.

3. Resultados

3.1. Experimento 1: Avaliação do Extrato de *Lemna minor* como Suplemento Nutricional

Os resultados do ensaio piloto (Figura 1 e Tabela 3; Anexo 1) demonstraram que o meio ZmL promoveu um crescimento superior em comparação ao meio Zm nas primeiras 72 horas de cultivo. A biomassa no tratamento ZmL atingiu um pico de absorbância média de 0,905 em 72 horas, enquanto o tratamento Zm alcançou apenas 0,162. No entanto, o experimento apresentou limitações metodológicas significativas que comprometeram a validade dos resultados: 1. Declínio da Biomassa: Após o pico em 72 horas, ambos os tratamentos exibiram um declínio acentuado da biomassa, sugerindo morte celular. 2. Falha do Controle: O meio controle (Zm) não sustentou o crescimento, com um declínio de até 83% da biomassa inicial, invalidando-o como base de comparação. 3. Alta Variabilidade: Observou-se uma alta variação entre as réplicas, especialmente no tratamento ZmL, onde a absorbância inicial variou de 0,117 a 0,570 (diferença de 387%), indicando falha na padronização do inóculo. 4. Problemas Operacionais: Ocorreram interrupções no fornecimento de energia durante o período experimental, afetando a agitação e a temperatura das culturas.

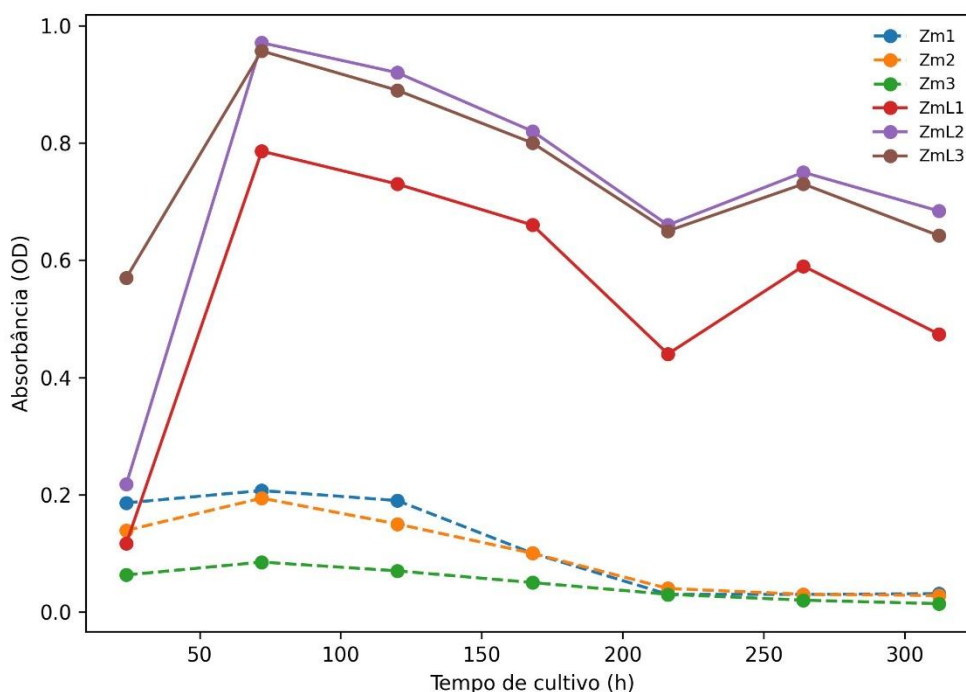


Figura 10. Crescimento de *Limnospira platensis* avaliado por absorbância ao longo do tempo em meio Zarrouk modificado (Zm) e em Zarrouk modificado suplementado com extrato de *Lemna minor* L. (ZmL). As curvas representam réplicas independentes de cada tratamento.

A análise dos valores médios evidencia comportamentos contrastantes entre os tratamentos. No meio Zarrouk modificado sem suplementação (Zm), observou-se redução de 81,3% da absorbância ao final do cultivo, indicando perda significativa de biomassa após o pico inicial. Em contraste, o meio suplementado com extrato de *Lemna minor* (ZmL) apresentou incremento de 98,7% na absorbância final em relação ao valor inicial, demonstrando efeito positivo da suplementação vegetal sobre o crescimento e a manutenção da biomassa de *L. platensis*.

Tabela 3. Valores médios de absorbância inicial, pico de crescimento, valor final e variação percentual do crescimento de *Limnospira platensis* cultivada em meio Zarrouk modificado (Zm) e em Zarrouk modificado suplementado com extrato de *Lemna minor* L. (ZmL).

Tratamento	Absorbância inicial (24 h)	Pico de crescimento (72 h)	Absorbância final (312 h)	Crescimento (%)
Zm (média)	0,129	0,162	0,024	-81,3
ZmL (média)	0,302	0,905	0,600	+98,7

Nota: O crescimento percentual foi calculado com base na variação entre a absorbância inicial (24 h) e a absorbância final (312 h), considerando as médias das réplicas de cada tratamento.

Este ensaio piloto, apesar de suas limitações, foi um passo crucial no desenvolvimento da pesquisa, permitindo a identificação e correção de falhas metodológicas e reforçando a hipótese de que o extrato de *Lemna minor* L. poderia ser uma alternativa viável. A seguir, serão apresentados os resultados dos experimentos principais, conduzidos com a metodologia aprimorada.

3.2.Experimento 2: Avaliação do Crescimento em Diferentes Meios

Validação da relação entre absorbância e biomassa

A relação entre densidade óptica (560 nm) e biomassa seca de *Limnospira platensis* foi determinada por regressão linear. A equação obtida foi: $y=1,5441x$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,94$, indicando forte relação linear entre as variáveis e permitindo a conversão confiável dos valores de absorbância em concentração de biomassa seca.

Efeito do meio de cultura sobre o crescimento

A análise de normalidade dos resíduos indicou desvio significativo da distribuição normal (Shapiro–Wilk, $p < 0,05$), enquanto o teste de Levene confirmou homogeneidade das

variâncias entre os tratamentos ($p > 0,05$). ANOVA é robusta a desvios moderados da normalidade. A análise de variância fatorial indicou efeito significativo do tempo de cultivo ($F = 225,50$; $p < 0,001$), do tipo de meio de cultura ($F = 51,14$; $p < 0,001$) e da interação entre esses fatores ($F = 5,02$; $p < 0,001$) sobre a biomassa de *L. platensis*.

Nas primeiras 72 h de cultivo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$). A partir de 96 h, o meio Zarrouk apresentou maior biomassa, atingindo $1,12 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$, mantendo superioridade até aproximadamente 168 h (Tabela 4).

Entre 216 h e 264 h, os meios alternativos apresentaram crescimento acelerado, reduzindo as diferenças observadas anteriormente. Nas avaliações finais (312–360 h), todos os tratamentos convergiram para valores semelhantes de biomassa ($1,74$ – $1,92 \text{ g L}^{-1}$), indicando que os meios alternativos foram capazes de sustentar crescimento equivalente ao meio padrão quando o período de cultivo foi prolongado.

Tabela 4. Biomassa seca média ($\pm$ desvio-padrão) de *Limnospira platensis* (g L^{-1}) ao longo do tempo de cultivo em diferentes meios

Tempo de cultivo (h)	Zarrouk (g L^{-1})	Chá verde (g L^{-1})	Lentilha-d'água (g L^{-1})	Meio X (g L^{-1})
24	$0,22 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,02^a$	$0,18 \pm 0,03^a$	$0,16 \pm 0,01^a$
48	$0,55 \pm 0,32^a$	$0,27 \pm 0,05^a$	$0,23 \pm 0,07^a$	$0,19 \pm 0,07^a$
72	$0,82 \pm 0,04^a$	$0,32 \pm 0,13^b$	$0,29 \pm 0,13^b$	$0,30 \pm 0,15^b$
96	$1,12 \pm 0,21^a$	$0,40 \pm 0,28^b$	$0,34 \pm 0,21^b$	$0,26 \pm 0,16^b$
120	$1,39 \pm 0,25^a$	$0,48 \pm 0,27^b$	$0,55 \pm 0,00^b$	$0,39 \pm 0,33^b$
168	$1,69 \pm 0,06^a$	$0,98 \pm 0,16^b$	$0,92 \pm 0,11^b$	$0,81 \pm 0,23^b$
216	$1,81 \pm 0,02^a$	$1,56 \pm 0,15^{ab}$	$1,28 \pm 0,14^{bc}$	$1,19 \pm 0,07^c$
264	$1,79 \pm 0,01^a$	$1,76 \pm 0,05^{ab}$	$1,69 \pm 0,11^{abc}$	$1,52 \pm 0,16^c$
312	$1,78 \pm 0,01^a$	$1,85 \pm 0,01^a$	$1,94 \pm 0,03^a$	$1,92 \pm 0,31^a$
360	$1,74 \pm 0,00^a$	$1,76 \pm 0,01^a$	$1,78 \pm 0,09^a$	$1,75 \pm 0,07^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os meios (ANOVA seguida de teste de Tukey, $p < 0,05$).

Curvas de crescimento

As curvas de crescimento obtidas ao longo do cultivo evidenciam padrões distintos entre os meios avaliados (Figura 2). O meio Zarrouk apresentou crescimento inicial mais rápido, com antecipação da fase exponencial, enquanto os meios alternativos apresentaram crescimento mais gradual.

Apesar da diferença na velocidade inicial de crescimento, todos os tratamentos atingiram biomassa final semelhante ao final do período experimental.

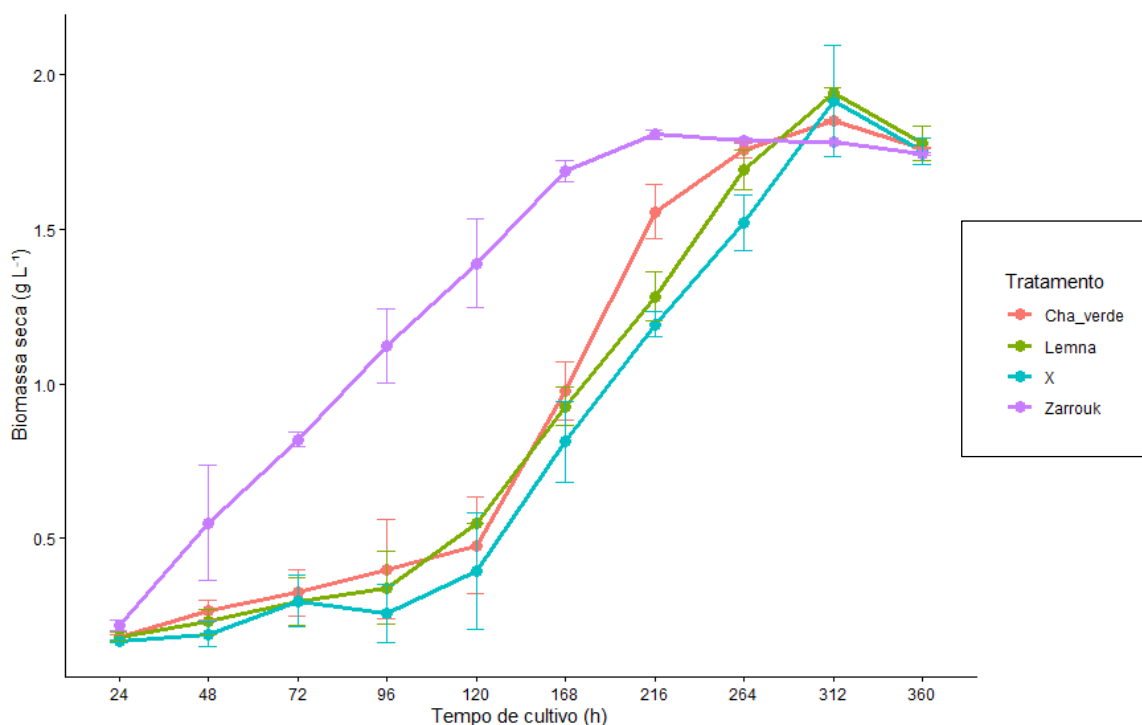


Figura 11. Curvas de crescimento da biomassa seca de *Limnospira platensis* (g L^{-1}) ao longo do tempo de cultivo em diferentes meios (Zarrouk, Chá verde, Lentilha-d'água e Meio X). Os pontos representam as médias e as barras verticais o desvio-padrão. Diferenças estatísticas entre tratamentos em cada tempo estão apresentadas na Tabela 3 (ANOVA seguida de teste pós-hoc, $p < 0,05$).

Ajuste do modelo logístico

As curvas experimentais foram ajustadas ao modelo logístico de crescimento, que apresentou elevado coeficiente de determinação ($0,936 \leq R^2 \leq 0,972$), indicando bom ajuste do modelo aos dados experimentais (Tabela 5).

O parâmetro de biomassa máxima estimada variou entre 1,78 e 1,97 g L^{-1} entre os tratamentos. O meio Zarrouk apresentou menor tempo de inflexão da curva (78 h), indicando crescimento inicial mais rápido, enquanto os meios alternativos apresentaram inflexão mais tardia (158–188 h).

Tabela 5. Equações do modelo logístico ajustado às curvas de crescimento da biomassa seca de *Limnospira* cultivada em diferentes meios de cultura. O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de ajuste do modelo aos dados experimentais.

Tratamento	Equação ajustada	(R^2)
Chá verde	$y = \frac{1.890}{1 + e^{-(t-158.03)/47.25}}$	0.956
Lemna	$y = \frac{1.970}{1 + e^{-(t-173.81)/55.83}}$	0.972
X	$y = \frac{1.957}{1 + e^{-(t-188.76)/56.50}}$	0.936

Tratamento	Equação ajustada	(R ²)
Zarrouk	$y = \frac{1.785}{1 + e^{-(t-78.06)/31.78}}$	0.952

Parâmetros cinéticos de crescimento

Os parâmetros cinéticos calculados para cada meio de cultura estão apresentados na Tabela 6. O meio Zarrouk apresentou maior taxa específica de crescimento ($\mu_{\max} = 0,932 \text{ dia}^{-1}$) e menor tempo de duplicação (17,9 h), evidenciando crescimento celular mais rápido.

Entretanto, os meios alternativos apresentaram biomassa máxima superior, destacando-se o meio X ($1,983 \text{ g L}^{-1}$) e o meio contendo extrato de lentilha-d'água ($1,943 \text{ g L}^{-1}$). A produtividade volumétrica foi semelhante entre os tratamentos, variando entre 0,109 e 0,114 $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos de crescimento de *L. platensis* nos diferentes meios.

Parâmetro	Zarrouk	Chá Verde	Lentilha-d'água	X (NPK)
$\mu_{\max} (\text{dia}^{-1})$	0,932	0,393	0,481	0,468
Tempo de Duplicação (h)	17,9	42,3	34,6	35,6
Biomassa Máxima (g L^{-1})	1,807	1,853	1,943	1,983
Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	0,109	0,113	0,114	0,113

3.3.Experimento 3: Produção de Biomassa para Análises

A composição química dos meios de cultura antes da inoculação e após o cultivo de *Limnospira platensis* no primeiro cultivo encontra-se apresentada na Tabela 7. De modo geral, observou-se que a magnitude e a direção das alterações químicas variaram entre os meios, indicando padrões distintos de consumo, retenção ou aumento aparente dos nutrientes ao final do cultivo.

No meio Zarrouk, verificou-se redução na concentração da maioria dos nutrientes avaliados, incluindo nitrato, fósforo, enxofre, amônia, potássio, magnésio e micronutrientes como boro, cobre, ferro, manganês e zinco. O cálcio apresentou queda acentuada, com valor final abaixo do limite de detecção analítica. Em contraste, observou-se aumento expressivo na

concentração de cloreto e discreto aumento da condutividade elétrica.

No meio suplementado com extrato de lentilha-d'água, também foram observadas reduções em nitrato, fósforo, cloreto, amônia, potássio e magnésio. Por outro lado, alguns componentes apresentaram manutenção ou leve aumento, como enxofre, sódio, cobre e zinco.

No meio X, o comportamento foi distinto, com aumento aparente na concentração de vários nutrientes ao final do cultivo, incluindo nitrato, cloreto, enxofre, amônia, potássio, sódio, boro e cobre. Em contrapartida, cálcio, magnésio, ferro e manganês apresentaram redução.

De forma geral, os dados indicam que, além do consumo celular de nutrientes durante o crescimento, podem ter ocorrido processos adicionais afetando a composição final do meio, como concentração por evaporação, liberação de compostos dissolvidos pela biomassa, mineralização de frações orgânicas e contribuição residual de nutrientes provenientes do inóculo.

Tabela 7. Resultados analíticos das amostras antes e após o cultivo de *Limnospira platensis* (mg L⁻¹, exceto CE)

Amostra	CE (dS m ⁻¹)	Nitrato	Fósforo	Cloreto	Enxofre	Amônia	Potássio	Sódio	Cálcio	Magnésio	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
Zarrouk – inicial	10,5	963,6	180,9	74,9	499,2	15,5	1338,9	1425,5	14,4	31,5	11,2	0,2	0,7	1,2	0,5
Zarrouk – final	11,4	909,2	155,8	1246,1	442,8	7,8	1228,5	1400,6	<0,01	11,2	8,6	0,1	0,4	0,2	0,3
Lentilha-d'água – inicial	17,5	23,3	62,6	8573,3	68,6	194,3	1380,3	1090,2	<0,01	37,8	0,5	0,1	0,6	0,4	0,3
Lentilha-d'água – final	14,4	7,8	47,4	6581,7	69,0	124,3	1343,5	1120,5	<0,01	30,0	0,4	0,3	0,6	0,3	0,4
Meio X – inicial	11,0	11,7	25,9	475,7	20,9	57,5	346,2	271,8	13,0	14,9	1,0	0,01	0,4	0,1	0,2
Meio X – final	14,0	108,8	25,0	575,1	24,8	116,6	728,1	1104,4	9,9	6,1	3,9	0,1	0,1	<0,01	0,2

Métodos analíticos: nitrogênio amoniacal e nitrato determinados por **destilação**; potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) determinados por **ICP-OES**; bicarbonato determinado por **titulação potenciométrica**. CE = condutividade elétrica.

A Tabela 8 e a Figura 3 evidenciam que o meio Zarrouk apresentou reduções moderadas para a maior parte dos macronutrientes, enquanto o meio de lentilha-d'água apresentou forte redução de nitrato e reduções intermediárias para fósforo, amônia e magnésio. Já o meio X apresentou elevação percentual expressiva para diversos elementos, o que dificulta interpretar esses resultados exclusivamente como balanço de consumo.

Tabela 8. Variação percentual (%) dos parâmetros químicos entre o início e o final do cultivo de *Limnospira platensis*

Parâmetro	Zarrouk (%)	Lentilha-d'água (%)	Meio X (%)
CE (dS m ⁻¹)	+8,6	-17,7	+27,3
Nitrato	-5,6	-66,5	+830,8
Fósforo	-13,8	-24,3	-3,5
Cloreto	+1563,7	-23,2	+20,9
Enxofre	-11,3	+0,6	+18,7
Amônia	-49,7	-36,0	+102,8
Potássio	-8,2	-2,7	+110,3
Sódio	-1,7	+2,8	+306,4
Cálcio	ND	ND	-23,8
Magnésio	-64,4	-20,6	-59,1
Boro	-23,2	-20,0	+290,0
Cobre	-50,0	+200,0	+900,0
Ferro	-42,9	0,0	-75,0
Manganês	-83,3	-25,0	ND
Zinco	-40,0	+33,3	0,0

Nota: A variação percentual foi calculada com base nas concentrações iniciais e finais (mg L⁻¹). Valores marcados como **ND** indicam impossibilidade de cálculo devido a concentrações abaixo do limite de detecção analítica (<0,01 mg L⁻¹).

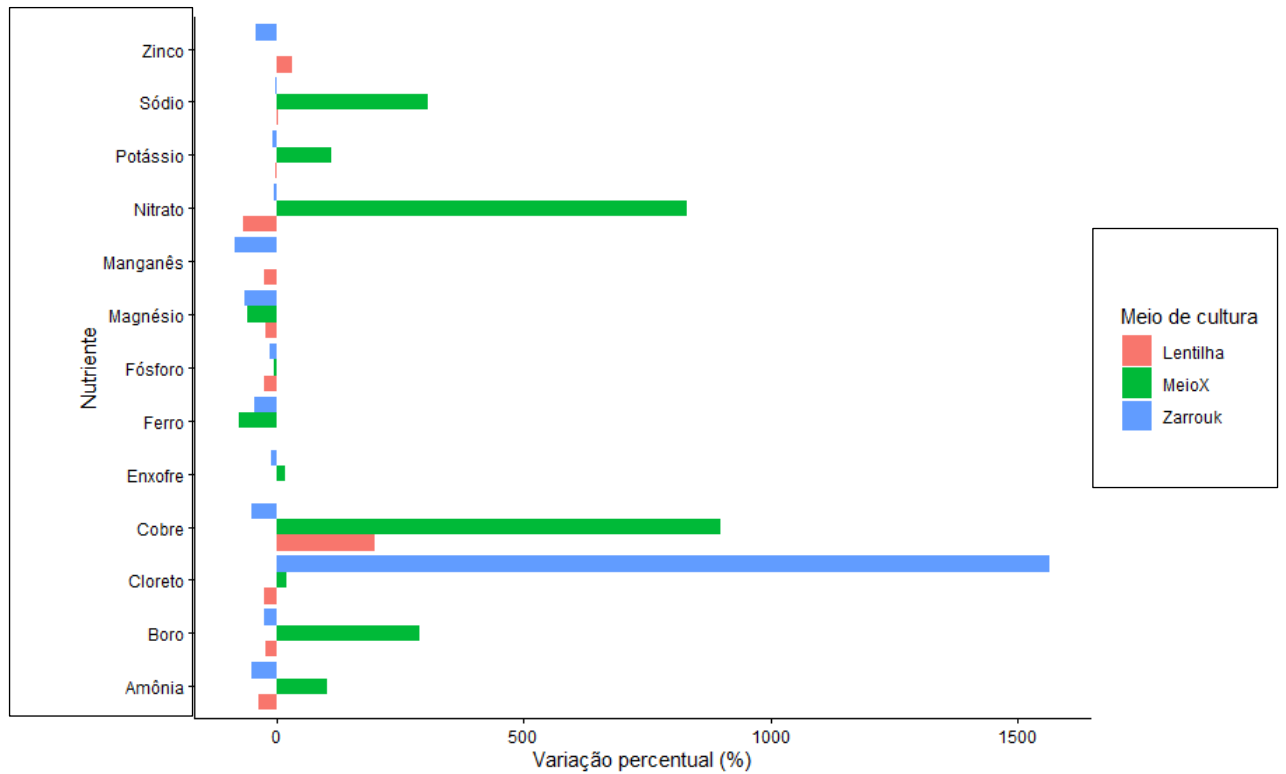


Figura 12. Variação percentual da concentração de nutrientes nos meios de cultura após o cultivo de *Limnospira platensis*. Valores negativos indicam redução da concentração no meio ao final do cultivo, enquanto valores positivos indicam aumento da concentração em relação aos valores iniciais.

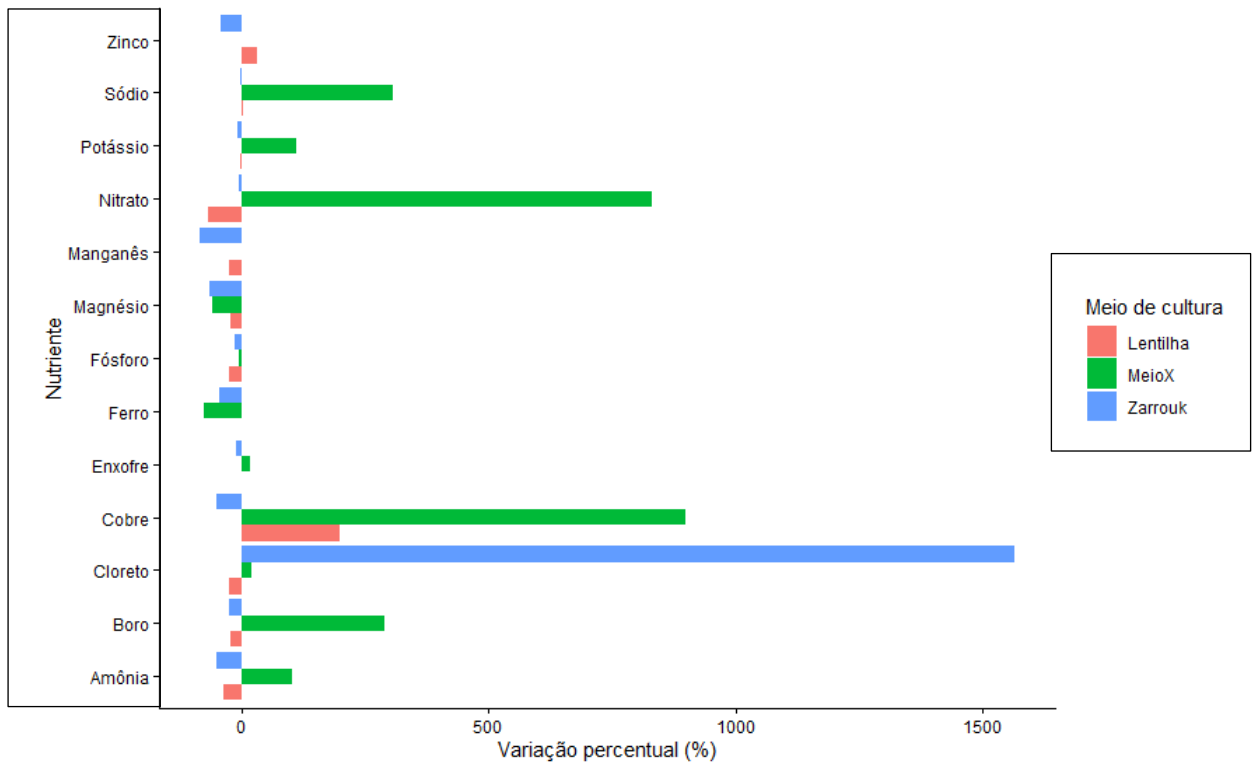


Figura 13. Eficiência de remoção (%) dos nutrientes nos diferentes meios de cultura após o cultivo de *Limnospira platensis*. Os valores representam a redução percentual da concentração de cada nutriente em relação aos valores iniciais. Maiores valores indicam maior remoção do nutriente do meio ao final do cultivo.

Proteína Bruta da biomassa

A análise de variância indicou efeito significativo dos tratamentos sobre o teor de proteína bruta da biomassa de *L. platensis* (ANOVA, $F(3,4) = 218,3$; $p < 0,001$). A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Shapiro–Wilk ($W = 0,9858$; $p = 0,9859$), e a homogeneidade das variâncias foi atendida pelo teste de Bartlett ($K^2 = 6,47$; $p = 0,091$).

A comparação de médias pelo teste de Tukey mostrou que o tratamento Z apresentou o maior teor de proteína bruta, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os tratamentos CV e Lemna não diferiram entre si, enquanto o tratamento X apresentou o menor valor de proteína bruta.

Tabela 9. Teor de proteína bruta (%) da biomassa nos diferentes tratamentos. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 2$). Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tratamento Proteína bruta (%)	
Z	66,98 $\pm$ 0,02 a
CV	49,85 $\pm$ 1,88 b
L	46,13 $\pm$ 0,56 b
X	41,83 $\pm$ 0,76 c

Nutrientes residuais do segundo cultivo

No segundo cultivo, as concentrações residuais de potássio, sulfato e fósforo após a remoção da biomassa estão apresentadas na Tabela 10. Observou-se elevada variabilidade entre réplicas, especialmente para potássio no meio Zarrouk e no meio X, e para sulfato no meio X e no meio Chá Verde.

Tabela 10. Concentração residual de potássio, sulfato e fósforo nos meios após o cultivo de *Limnospira platensis*

Tratamento	K (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	P (mg/L)
Zarrouk	130,30 $\pm$ 77,36	178,80 $\pm$ 75,69	9,33 $\pm$ 0,74
Meio X	61,95 $\pm$ 69,23	407,76 $\pm$ 246,79	19,86 $\pm$ 2,16

Tratamento	K (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	P (mg/L)
Chá Verde	0,00 ± 0,00	374,49 ± 215,93	17,38 ± 1,02
Lentilha d'água	299,90 ± 95,12	143,85 ± 33,16	11,38 ± 0,66

A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos para potássio residual ($F = 6,75$; $p = 0,048$) e fósforo residual ($F = 29,30$; $p = 0,004$). Para o potássio, o tratamento Chá Verde apresentou esgotamento completo do nutriente, enquanto o tratamento com extrato de lentilha-d'água apresentou os maiores valores residuais. Para fósforo, os maiores valores residuais foram observados nos meios X e Chá Verde. Para sulfato, a elevada dispersão dos dados entre as repetições limitou a interpretação comparativa entre os tratamentos.

3.4.Experimento 4: Teste de toxicidade do extrato de espirulina cultivado em diferentes meios de cultura

A análise descritiva evidenciou menor sobrevivência no tratamento controle em relação a todos os tratamentos contendo extratos de *L. platensis*. O controle apresentou sobrevivência média de $65,5 \pm 18,0\%$, enquanto os extratos provenientes dos meios X, CV, Z e L apresentaram sobrevivência média de $97,1 \pm 4,35\%$, $97,7 \pm 4,25\%$, $97,1 \pm 4,35\%$ e $100,0 \pm 0,0\%$, respectivamente. Em relação ao controle, esses valores corresponderam a incrementos de 31,6 pontos percentuais para X e Z, 32,2 pontos percentuais para CV e 34,5 pontos percentuais para L.

Tabela 11. Sobrevivência média dos náuplios de *Artemia salina* expostos aos extratos de *Limnospira platensis* cultivada em diferentes meios

Tratamento	n	Vivos totais(24h)	Mortos totais	Total de organismos	Sobrevivência média (%)	DP	Diferença vs. controle (p.p.)
Controle	6	34	19	53	65,5	18,0	0,0
X	12	124	4	128	97,1	4,35	31,6
CV	12	131	3	134	97,7	4,25	32,2

Tratamento	n	Vivos totais(24h)	Mortos totais	Total de organismos	Sobrevivência média (%)	DP	Diferença vs. controle (p.p.)
Z	12	124	4	128	97,1	4,35	31,6
L	12	134	0	134	100,0	0,0	34,5

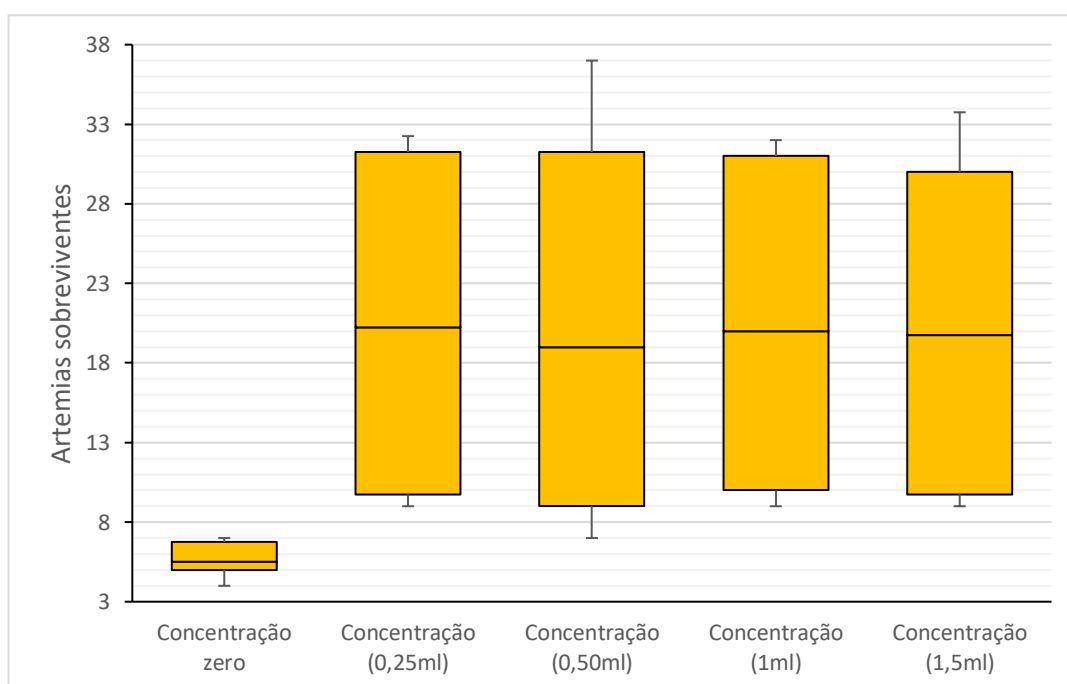


Figura 14. Relação entre a quantidade de *Artemia salina* viva e a concentração do extrato de *Limnospira platensis* aplicada (0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 1 mL e 1,5 mL). As caixas representam os valores entre o primeiro e o terceiro quartil, a linha que separa as caixas representa o valor central dos dados, os traços a baixo e a cima das caixas representam os limites inferiores e superiores.

Na análise exploratória incluindo o controle, o modelo binomial indicou efeito altamente significativo do fator tratamento sobre a sobrevivência dos náuplios (deviance = 66,715; gl = 4; $p < 0,0001$). A deviance residual foi de 32,445 com 49 graus de liberdade, resultando em índice de dispersão de 0,662, indicando bom ajuste do modelo aos dados.

As probabilidades estimadas de sobrevivência foram de 0,642 para o controle, 0,969 para os tratamentos X e Z, 0,978 para CV e 1,000 para L. Os contrastes entre tratamentos e controle mostraram que os extratos X, CV e Z aumentaram significativamente a chance de sobrevivência dos náuplios em relação ao controle, com odds ratio de 17,0 para X, 24,0 para

CV e 17,0 para Z ($p < 0,0001$ em todos os casos). Para o tratamento L, embora tenha sido observada sobrevivência de 100% em todas as repetições, o contraste em relação ao controle apresentou estimativa instável em razão da ausência total de mortalidade, o que impediu inferência estatística confiável por esse método.

Quando a análise foi restrita apenas aos extratos, a interação entre tratamento e concentração não foi significativa ($\chi^2 = 1,578$; $p = 0,9965$), assim como o efeito isolado da concentração ($\chi^2 = 0,222$; $p = 0,9740$). O fator tratamento apresentou efeito marginalmente não significativo ($\chi^2 = 6,840$; $p = 0,0772$). O modelo apresentou deviance residual de 23,944 com 32 graus de liberdade, resultando em índice de dispersão de 0,748.

As probabilidades estimadas de sobrevivência dentro de cada dose permaneceram elevadas e bastante homogêneas entre os extratos, variando entre 0,967 e 1,000. A análise simplificada do efeito de dose, considerando todos os extratos em conjunto, confirmou a ausência de resposta dose-dependente ($\chi^2 = 0,230$; $p = 0,9726$).

Em conjunto, os resultados indicam que os extratos de *L. platensis* não apresentaram toxicidade aguda nas concentrações testadas e, adicionalmente, promoveram sobrevivência superior à observada no controle.

4. Discussão

Os resultados obtidos demonstram que meios alternativos baseados em fertilizante NPK, suplementados ou não com extratos vegetais, são capazes de sustentar o crescimento de *Limnospira platensis* até níveis de biomassa semelhantes ou superiores aos obtidos no meio padrão Zarrouk, desde que o período de cultivo seja suficientemente longo. A análise temporal evidenciou que o meio Zarrouk promove crescimento inicial significativamente mais rápido, enquanto os meios alternativos apresentam crescimento mais gradual, porém sustentado ao longo do cultivo. Este padrão de dinâmica de crescimento diferenciada entre meios sintéticos e alternativos foi também observado em estudos com outras microalgas, como *Ankistrodesmus gracilis*, onde meios baseados em macrófitas como *Lemna minor* L. apresentaram fase de crescimento exponencial prolongada (até o 25º dia) em comparação com meios comerciais, demonstrando a capacidade de suporte nutricional prolongado de sistemas baseados em fontes vegetais (Sipaúba-Tavares et al., 2018).

A biomassa máxima observada no meio Zarrouk (1,74–1,80 g L⁻¹) encontra-se dentro da faixa reportada para cultivos laboratoriais em frascos Erlenmeyer sob aeração e iluminação controladas, geralmente entre 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa seca, dependendo das condições de cultivo e da cepa utilizada (Belay, 2013; Becker, 2013; Habib et al., 2008). Esses valores

confirmam que as condições experimentais adotadas neste estudo foram adequadas para o crescimento da cianobactéria.

A taxa específica de crescimento máxima observada no meio Zarrouk ($\mu_{\text{max}} = 0,932 \text{ dia}^{-1}$) foi aproximadamente duas vezes superior à registrada nos meios alternativos ($0,393\text{--}0,481 \text{ dia}^{-1}$). Esse comportamento está diretamente relacionado à composição química do meio Zarrouk, que fornece nitrogênio, fósforo e micronutrientes em formas altamente biodisponíveis, como nitrato de sódio (NaNO_3) e fosfato de potássio (K_2HPO_4). A disponibilidade imediata desses nutrientes favorece a rápida assimilação celular e acelera a fase exponencial de crescimento, fenômeno amplamente descrito para cultivos de *Arthrospira/Limnospira* em meios sintéticos completos (Zarrouk, 1966; Becker, 2013; Belay, 2013). Em contraste, meios baseados em melaços demonstraram produtividades de 0.098 g/L/dia com melaços em pó e 0.066 g/L/dia com melaços em forma líquida, ainda superiores aos 0.045 g/L/dia obtidos em cultivo autotrófico (Andrade & Costa, 2008).

Por outro lado, os meios alternativos baseados em NPK apresentaram crescimento inicial mais lento, possivelmente devido à necessidade de transformação ou solubilização parcial de nutrientes presentes no fertilizante e nos extratos vegetais. Em fertilizantes agrícolas, parte do nitrogênio pode estar presente em formas que requerem hidrólise ou conversão antes de se tornarem totalmente assimiláveis, o que pode retardar a taxa inicial de crescimento microalgal (Habib et al., 2008; Becker, 2013). Além disso, compostos orgânicos presentes nos extratos vegetais podem influenciar a dinâmica nutricional do meio, atuando como fontes secundárias de carbono, nitrogênio ou fatores bioestimulantes. Estudos com meios baseados em resíduos orgânicos, como melaços e efluentes de aquacultura, demonstraram que esses sistemas podem sustentar crescimento prolongado, embora com cinética inicial reduzida (Andrade & Costa, 2008; Silva et al., 2019).

Apesar da menor velocidade de crescimento inicial, os meios alternativos apresentaram biomassa máxima superior ou equivalente à obtida no meio Zarrouk. O meio X (NPK) atingiu a maior densidade celular ($1,983 \text{ g L}^{-1}$), seguido pelo meio de lentilha-d'água ($1,943 \text{ g L}^{-1}$), ambos superando o valor máximo registrado no meio padrão ($1,807 \text{ g L}^{-1}$). Esse resultado está alinhado com estudos anteriores que demonstraram que meios baseados em melaços podem alcançar rendimentos de até 2.83 g/L , superando cultivos autotróficos (1.44 g/L) (Andrade & Costa, 2008), e que resíduos de malte de cervejaria podem sustentar crescimento equivalente ao meio Zarrouk em certas concentrações (Varandas et al., 2022). Essa dinâmica sugere um *trade-off* fisiológico entre velocidade de crescimento e capacidade final de biomassa, fenômeno frequentemente observado em cultivos microalgais quando diferentes estratégias nutricionais

são utilizadas (Becker, 2013; Belay, 2013)

A contribuição dos extratos vegetais para esse desempenho diferenciado pode ser atribuída à composição específica de cada suplemento. A biomassa de *Lemna minor* L., por exemplo, apresenta elevados teores de nitrogênio, minerais e compostos orgânicos solúveis, que podem atuar como fonte nutricional adicional ou estimular o metabolismo microalgal (Graeff et al., 2007; Baldi et al., 2024). Estudos com *Ankistrodesmus gracilis* confirmam que *Lemna minor* L. como meio de cultura fornece níveis de nitrogênio de 30 g kg⁻¹ e fósforo de 9 g kg⁻¹, resultando em maior densidade celular máxima (473 x 10⁵ células mL⁻¹) e maiores teores de clorofila-a (3,9 g L⁻¹) comparado a outras macrófitas testadas (Sipaúba-Tavares et al., 2009). Meios baseados em resíduos orgânicos como melaços e efluentes de aquacultura também demonstraram manter ou aumentar compostos bioativos como ficocianina e produzir biomassa com perfil nutricional favorável (Silva et al., 2019; Varandas et al., 2022). Embora estudos específicos sobre chá verde (*Camellia sinensis*) como suplemento para *Spirulina* sejam limitados na literatura, extratos vegetais em geral têm demonstrado potencial para influenciar processos metabólicos em microrganismos fotossintéticos, como evidenciado pelo desempenho superior de meios baseados em macrófitas na sustentação de crescimento microalgal prolongado (Sipaúba-Tavares et al., 2018, 2020).

A convergência dos valores de biomassa observada após aproximadamente 312 horas (13 dias) de cultivo, quando todos os tratamentos apresentaram valores semelhantes (1,74–1,92 g L⁻¹), representa o resultado mais relevante do ponto de vista aplicado. Esse comportamento demonstra que meios alternativos de menor custo podem alcançar produtividade equivalente ao meio Zarrouk padrão, desde que o ciclo de cultivo seja ajustado para compensar a menor velocidade inicial de crescimento.

Essa diferença de estratégia de crescimento possui implicações importantes para sistemas de produção de microalgas. Em sistemas fechados ou fotobiorreatores operados com ciclos curtos de cultivo, meios sintéticos completos como o Zarrouk tendem a ser mais eficientes devido à rápida taxa de crescimento celular. Entretanto, em sistemas abertos, como tanques tipo raceway ponds, onde os ciclos produtivos são geralmente mais longos e o custo do meio de cultura representa um fator limitante, meios alternativos baseados em fertilizantes agrícolas e extratos vegetais podem oferecer melhor relação custo-benefício. Estudos comparativos com *Ankistrodesmus gracilis* demonstraram que tanto sistemas fotoautotróficos quanto mixotróficos podem ser efetivos com meios baseados em macrófitas, com a escolha dependendo do objetivo de cultivo e das condições ambientais disponíveis (Sipaúba-Tavares et al., 2020). Para aplicações em aquacultura onde alimento vivo de alta qualidade nutricional é

requerido, meios baseados em *Lemna minor* L. produziram microalgas com conteúdo proteico de 29-30% da biomassa seca, adequado para nutrição de organismos aquáticos (Sipaúba-Tavares et al., 2018).

Além disso, a utilização de insumos agrícolas e biomassa vegetal como componentes do meio de cultura está alinhada com estratégias de produção sustentável e economia circular, reduzindo custos e ampliando as possibilidades de produção descentralizada de microalgas em regiões agrícolas (Carvalho et al., 2022; Martínez et al., 2017; Rojo et al., 2023; Costa et al., 2024). Esta abordagem é particularmente relevante em regiões tropicais onde macrófitas aquáticas como *Lemna minor* L., *Azolla caroliniana* e *Salvinia auriculata* são abundantes e frequentemente consideradas resíduos biológicos que restringem atividades de pesca e disponibilidade de água. Sua remoção e uso como meios de cultura fornece um benefício ambiental e econômico duplo, permitindo a produção de microalgas de alta qualidade nutricional a baixo custo (Sipaúba-Tavares et al., 2018). Estudos demonstram que esta abordagem é viável em escala laboratorial e apresenta potencial para escalabilidade em sistemas de produção de maior volume (Sipaúba-Tavares et al., 2009, 2015, 2020).

Em conjunto, os resultados indicam que, embora o meio Zarrouk permaneça superior em termos de cinética de crescimento, os meios alternativos testados apresentam elevado potencial para produção de biomassa de *Limnospira platensis*, especialmente em sistemas de cultivo de maior duração. Esses achados reforçam a viabilidade do uso de formulações simplificadas baseadas em fertilizantes agrícolas e extratos vegetais como alternativas economicamente competitivas para a produção de *spirulina*. Esta conclusão é apoiada por evidências de que outras cianobactérias e microalgas, como *Ankistrodesmus gracilis*, podem ser cultivadas com sucesso em meios baseados em macrófitas, alcançando densidades celulares comparáveis ou superiores aos meios comerciais padrão (Sipaúba-Tavares et al., 2018). A reprodutibilidade destes resultados em múltiplas espécies microalgais e em diferentes condições experimentais (Sipaúba-Tavares et al., 2009, 2015, 2018, 2020) fornece forte evidência para a aplicação prática desta tecnologia em produção comercial.

Complementando a análise de crescimento e produtividade, é importante examinar como a composição química final dos meios de cultura variou entre os tratamentos. Os resultados do Experimento 3 mostram que a composição química final dos meios de cultura variou de maneira marcante entre os tratamentos, refletindo não apenas a absorção de nutrientes pela biomassa, mas também a influência da composição inicial do meio, da presença de compostos orgânicos nos extratos vegetais e de processos físico-químicos ocorridos durante o cultivo. No meio Zarrouk, a redução observada para a maior parte dos nutrientes sugere

absorção efetiva pela biomassa, o que é compatível com o uso consolidado desse meio para produção de *Arthrospira*. Ainda assim, a baixa remoção proporcional de alguns macronutrientes indica que, nas condições testadas, parte relevante da carga nutricional permaneceu residual ao final do cultivo. Esse resultado não significa necessariamente inadequação da formulação clássica, mas sugere que, em sistema descontínuo e para o tempo de cultivo empregado, o meio pode ter disponibilizado nutrientes em excesso em relação à demanda observada da biomassa. O comportamento do meio X foi o mais atípico, uma vez que diversos nutrientes apresentaram aumento aparente ao final do cultivo. Esse padrão torna improvável interpretar o resultado apenas como consumo celular. Uma explicação plausível é a contribuição de nutrientes carregados pelo inóculo previamente cultivado em outro meio, mesmo após procedimentos de lavagem. Outra hipótese é a mineralização de compostos orgânicos ou liberação de substâncias dissolvidas da biomassa para o sobrenadante ao longo do cultivo. Variações por evaporação ou concentração do meio também podem ter contribuído. Portanto, os aumentos registrados, especialmente para nitrato, amônia, sódio e potássio, devem ser interpretados com cautela, pois não representam necessariamente síntese ou geração líquida desses nutrientes no sistema.

Nos meios suplementados com extratos vegetais, os resultados sugerem resposta intermediária. No tratamento com lentilha-d'água, houve redução de nitrato, fósforo e amônia, indicando uso parcial dos nutrientes disponíveis, mas a permanência de concentrações residuais elevadas de potássio sugere que parte desse elemento continuou disponível no meio ao final do cultivo. Em sistemas baseados em fontes vegetais ou efluentes, esse comportamento é esperado, pois a fração mineralizável pode continuar liberando nutrientes ao longo do cultivo, modificando o perfil químico do meio ao longo do tempo. Este padrão foi também observado em estudos com *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meios baseados em macrófitas, onde a dinâmica nutricional diferiu entre as espécies de plantas utilizadas, com *Lemna minor* L. apresentando maior eficiência de absorção de nutrientes enquanto *Salvinia auriculata* mostrou padrão de rápido crescimento inicial seguido de declínio, indicativo de limitação nutricional (Sipaúba-Tavares et al., 2018). A utilização de resíduos ou subprodutos vegetais como fonte alternativa de nutrientes está alinhada às estratégias de bioeconomia circular e tem sido apontada como abordagem promissora para redução de custos e aproveitamento de correntes residuais em bioprocessos com microalgas e cianobactérias (Sipaúba-Tavares et al., 2009, 2018).

Além da dinâmica de nutrientes residuais, a qualidade nutricional da biomassa produzida também foi influenciada pela composição do meio, como evidenciado pelos

resultados de proteína bruta. O tratamento Z apresentou teor de proteína bruta próximo à faixa superior normalmente relatada para biomassa de *Spirulina/Arthrospira*, enquanto os tratamentos alternativos, principalmente o meio X, resultaram em biomassa com menores teores proteicos. A literatura descreve que o teor proteico dessa biomassa pode variar amplamente em função da disponibilidade de nitrogênio, fósforo, intensidade luminosa, salinidade e estágio fisiológico de colheita, sendo comum encontrar valores ao redor de 60–70% da matéria seca em condições favoráveis (Habib et al., 2008; Becker, 2013; Belay, 2013). Estudos com meios alternativos demonstraram que proteína bruta pode variar de 51-74% dependendo do tipo de meio, com meios baseados em melaços mantendo teores proteicos entre 64-74% (Andrade & Costa, 2008) e resíduos de malte de cervejaria produzindo biomassa com 55.9 g/100g de proteína para *S. platensis* e 53.3 g/100g para *S. maxima* (Varandas et al., 2022). Padrão similar foi observado em *Ankistrodesmus gracilis*, onde meios baseados em *Lemna minor* L. e *Azolla caroliniana* produziram biomassa com conteúdo proteico de 29-30% da biomassa seca, enquanto meio baseado em *Salvinia auriculata* resultou em biomassa com apenas 20% de proteína, correlacionando com as variáveis de crescimento observadas (Sipaíba-Tavares et al., 2018). Estes resultados demonstram que a seleção adequada da fonte vegetal para o meio de cultura é crítica para otimizar tanto o crescimento quanto a qualidade nutricional da biomassa produzida.

Em conjunto, os resultados demonstram que meios alternativos formulados com NPK e suplementados com extratos vegetais são capazes de sustentar a produção de biomassa de *L. platensis*, embora com diferenças importantes na qualidade bromatológica e no perfil residual de nutrientes em comparação ao meio Zarrouk. Sob o ponto de vista aplicado, esses sistemas apresentam interesse por seu potencial de redução de custos e inserção em estratégias de reaproveitamento de insumos vegetais, mas ainda demandam ajuste fino da formulação para alcançar desempenho comparável ao meio convencional. Esse tipo de otimização é particularmente relevante em propostas de produção de biomassa com enfoque em sustentabilidade e circularidade do processo produtivo.

Além de avaliar o desempenho produtivo e a composição química dos meios, este estudo também investigou a segurança biológica dos extratos de *L. platensis* através de ensaio de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*. Os resultados demonstraram que os extratos de *L. platensis* não exerceram toxicidade aguda sobre os náuplios de *Artemia salina* nas condições experimentais avaliadas. As probabilidades estimadas de sobrevivência permaneceram elevadas em todos os tratamentos com extrato, mesmo na maior concentração testada, indicando que a LC_{50} é superior a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ nas condições do presente estudo. Esse resultado reforça a

baixa toxicidade aguda do material avaliado.

Além da ausência de toxicidade, a análise exploratória revelou um padrão biologicamente consistente de maior sobrevivência nos tratamentos contendo extrato em comparação ao controle. Enquanto a sobrevivência média no controle foi de 65,5%, os tratamentos com extratos apresentaram valores entre 97,1% e 100%. Esse padrão foi corroborado pelo modelo binomial que incluiu o controle, no qual o fator tratamento foi altamente significativo, e pelos contrastes que mostraram aumento expressivo na chance de sobrevivência para os extratos X, CV e Z em relação ao controle.

Esse resultado sugere que os extratos de *L. platensis* podem ter exercido efeito protetor sobre os náuplios, possivelmente relacionado à presença de compostos bioativos, como ficocianina, carotenoides, compostos fenólicos e polissacarídeos, que apresentam propriedades antioxidantes e bioestimulantes. Em organismos aquáticos, esses compostos podem contribuir para maior estabilidade fisiológica, redução de danos oxidativos e aumento da resistência frente a condições ambientais adversas. Estudos com *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meios baseados em macrófitas também demonstraram que a composição bioquímica da biomassa foi significativamente influenciada pelo tipo de meio utilizado, com meios baseados em *Lemna minor* L. mantendo maiores teores de clorofila-a ($3,9 \text{ g L}^{-1}$) e maiores volumes celulares ($27.3\text{-}30.6 \mu\text{m}^3$) comparado a outros meios testados (Sipaúba-Tavares et al., 2018). Estes resultados sugerem que meios baseados em macrófitas podem não apenas suportar crescimento microalgal, mas também promover a acumulação de compostos bioativos de interesse, potencializando aplicações em nutrição animal e bioestimulação (Sipaúba-Tavares et al., 2018, 2020).

De modo geral, os resultados permitem concluir que os extratos de *L. platensis* cultivada nos diferentes meios não apenas foram seguros para *A. salina* nas concentrações testadas, como também apresentaram potencial efeito benéfico sobre a sobrevivência dos náuplios. Esse achado amplia a interpretação do ensaio, inicialmente proposto como teste de toxicidade, e sugere a possibilidade de uso desses extratos como agentes bioestimulantes em sistemas aquícolas. Potencial similar foi observado com *Ankistrodesmus gracilis*, onde a biomassa cultivada em meios baseados em macrófitas demonstrou ser adequada como alimento vivo para organismos aquáticos, com alta qualidade nutricional (proteína 29-30%) e características morfológicas favoráveis (tamanho celular $27.3\text{-}30.6 \mu\text{m}^3$) (Sipaúba-Tavares et al., 2018). Estes resultados sugerem que meios alternativos baseados em macrófitas não apenas reduzem custos de produção, mas também podem melhorar a qualidade nutricional e funcional da biomassa produzida. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esse efeito em

delineamentos específicos, com maior padronização do número inicial de organismos por unidade experimental, inclusão de biomarcadores fisiológicos e avaliação de exposições crônicas ou subletais.

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que meios de cultura alternativos, baseados em fertilizante NPK e suplementados com extratos vegetais, são capazes de sustentar o cultivo de *Limnospira platensis* com produção de biomassa comparável ao meio padrão Zarrouk. Embora o meio Zarrouk promova uma cinética de crescimento inicial superior, os meios alternativos atingem densidades de biomassa equivalentes ou superiores quando o período de cultivo é suficientemente prolongado.

Os resultados evidenciam um *trade-off* fisiológico entre velocidade de crescimento e capacidade de suporte final dos meios. Enquanto o meio Zarrouk favorece a rápida proliferação celular, os meios alternativos sustentam o crescimento por períodos mais prolongados, resultando em biomassa final comparável. Contudo, a qualidade bromatológica da biomassa, especificamente o teor de proteína bruta, foi superior no meio Zarrouk, indicando a necessidade de otimizações nas formulações alternativas.

Um resultado promissor foi obtido no ensaio de toxicidade com *Artemia salina*: os extratos da biomassa de *L. platensis* não apenas se mostraram atóxicos, mas também exerceram um efeito protetor, aumentando significativamente a sobrevivência dos náuplios. Este achado sugere potencial aplicação da biomassa como aditivo benéfico em sistemas aquícolas.

Recomenda-se que estudos futuros incluam análises econômicas detalhadas da produção em larga escala de *spirulina* utilizando os diferentes meios de cultivo testados, bem como a avaliação de diversos mercados de aplicação da biomassa produzida, como alimentação animal e bioinsumos agrícolas. Adicionalmente, sugere-se a investigação dos compostos bioativos responsáveis pelo efeito protetor observado, visando novas aplicações biotecnológicas e agregação de valor ao produto.

6. Referências

AI, Xiaopeng; YU, Peiling; LI, Xiangyu; LAI, Xianrong; YANG, Ming; LIU, Fu; LUAN, Fei; MENG, Xianli. Polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 231, n. 15, mar. 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2023. 123211.

ANDRADE, M. C. N., & COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, Rio Grande, v.264, n.1-4, p.85-

93, April. 2008. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.11.021.

ANVISA. **ORIENTAÇÕES SOBRE O USO DE FITOTERÁPICOS E PLANTAS MEDICINAIS**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, p. 7-29, 2022.

BALDI, A.; VERDI, Leonardi.; PIACENTI, Lorenzo.; LENZI, Anna. From waste to resource: Use of *Lemna minor* L. as unconventional fertilizer for lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Horticulturae**, Florence, v. 11, n. 1, p. 20, 31 December 2024. DOI: 10.3390/horticulturae11010020.

BECKER, E.W. Microalgae for Human and Animal Nutrition. In Handbook of Microalgal Culture (eds A. Richmond and Q. Hu), n. 25, 12 April 2013. DOI: 10.1002/9781118567166.ch25

BELAY, A. Biology and Industrial Production of *Arthrospira (Spirulina)*. In Handbook of Microalgal Culture (eds A. Richmond and Q. Hu), n. 17. 12 April 2013. DOI: 10.1002/9781118567166.ch17

CARVALHO, Cesar J.; AULESTIA, Molina D. T.; BURGOS, Martinez W. J.; KARP, Susan G.; MaANZOKI, Maria C.; MEDEIROS, Adriane B. P.; RODRIGUES, Cristine; SCAPINI, Thamarys; VANDENBERGHE, Luciana P. S.; VIEIRA, Sabrina; WOICIECHOWSKI, Adenise L.; SOCCOL, Vanete T. & SOCCOL, Carlos R. Agro-Industrial Wastewaters for Algal Biomass Production, Bio-Based Products, and Biofuels in a Circular Bioeconomy. **Fermentation**, Paraná, v. 8, n. 12, p. 728. 2022. DOI: 10.3390/fermentation8120728

CHAKRABARTI, Rina; CLARK, William; SHARMA, Jai; GOSWAMI, Ravi; SHRIVASTAV, Avanish; TOCHER, Douglas. Mass Production of *Lemna minor* and Its Amino Acid and Fatty Acid Profiles. **Frontiers in Chemistry**, India, v. 6, 14 October 2018. DOI: 10.3389/fchem.2018.00479.

COSTA, M. H. J.; SANTOS, S. F. M; PEREIRA, D. A.; SASSI, C. F. da C.; NONATO, N. S.; LIRA, E. B.; PINA, L. C. C.;ALMEIDA, A. F. Uso de efluentes de biodigestor como meio de cultivo para consórcio de microalgas. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v.22, n. 7, 17 Julho 2024. DOI: 10.55905/oelv22n7-198.

FERNANDES, Raquel; CAMPOS, Joana; SERRA, Monica; FIDALGO, Javier; ALMEIDA, Hugo; CASAS, Ana; TOUBARRO, Duarte; BARROS, Ana .Exploring the Benefits of Phycocyanin: From *Spirulina* Cultivation to Its Widespread Applications. **Pharmaceuticals**, Portugal, v. 16, p. 592, 14 abr. 2023. DOI: 10.3390/ph16040592.

FIORDELMONDO, Elisa; CESCHIN, Simona; MAGI, Gian; MARIOTTI, Francesca; LAFFALDANO, Nicolaia; GALOSI, Lívio; RONCARATI, Alessandra. Effects of Partial Substitution of Conventional Protein Sources with Duckweed (*Lemna minor*) Meal in the Feeding of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on Growth Performances and the Quality Product. **Plants**, Italy, v. 11, n. 1220, abr. 2022. DOI:10.3390/plants11091220.

GOSWAMI, Ravi; SHARMA, Jai; SRIVASTAV, Avanish; KUMAR, Guddu;GLENCROSS, Brett; TOCHER, Douglas; CHAKRABARTI, Rina. Effect of *Lemna minor* supplemented

diets on growth, digestive physiology and expression of fatty acids biosynthesis genes of *Cyprinus carpio*. **Scientific reports**, India, v. 12, n. 3711, 8 March 2022.

GOUDA, Mostafa; TADDA, Musa A; ZHAO, Yinglei; FARMANULLAH, F; CHU, Bingquan; LI, Xiaoli; HE, Yong. Microalgae Bioactive Carbohydrates as a Novel Sustainable and Eco-Friendly Source of Prebiotics: Emerging Health Functionality and Recent Technologies for Extraction and Detection. **Frontiers in Nutrition**, China, v. 9, Mar. 2022. DOI: 10.3389/fnut.2022.806692.

GRAEFF, Á.; VIANNA, A. G.; TONETTA, D.; PRUNER, E. N. Avaliação do potencial nutritivo da Macrófia aquática *Lemna minor*, por meio da análise da composição química e por sua utilização em ração para carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) na fase de recria. *Revista de Ciência Agronômica*, v. 9, n. 14, p. 11710. 2007.

HABIB, M.A.B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T.C.; HASAN, M.R. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, Bangladesh, v.1, n. 1034, p. 33. 2008. ISBN: 9789251061060, Series number: 2070-6065 - C1034. Disponível em: <<https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i0424e>>. Acesso em: 15 Mar. 2026.

HAMIDI, Mohammadreza; MOHAMMADI, Ahmad; MASHHADI, Hamid; MAHMOUDNIA, Fahimeh. Evaluation of effective environmental parameters on lipid, protein and beta-carotene production in *Spirulina platensis* microalga. **Engineering**, Iran, v. 18 jun. 2023. DOI: 10.1016/j.rineng.2023.101102.

HEIDE. **O que são extratos vegetais?**. Heide extratos vegetais. Disponível em: <<https://heide.com.br/o-que-sao-extratos-vegetais/>>. Acesso em: 25 jan. 2025.

HEITZMAN, Beatriz S; BUENO, Guilherme W; CAMARGO, Tavani R; PROENÇA, Danilo C; YAEKASHI, Carlos T.O; SILVA, Regildo M.G; MACHADO, Levi P. Duckweed application in nature-based system for water phytoremediation and high-value coproducts at family agrisystem from a circular economy perspective. **Science of The Total Environment**, Brazil, v. 919, fev. 2024. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170714.

HUANG, Z.; WANG, C.; CHEN, J.; HE, X.; CHEN, K.; JIANG, X.; ZHAO, C.; LIU, B. Ameliorating Effect on Glycolipid Metabolism of *Spirulina* Functional Formulation Combination from Traditional Chinese Medicine. **Hindawi**, China, v. 2022, p. 1-14, 16 jul. 2022. DOI:10.1155/2022/3910116.

INOVAÇÃO & TENDÊNCIAS. **Conheça os principais processos de fabricação de extratos vegetais para a indústria alimentícia**. Inovação & Tendências, 2019. Disponível em: <<https://www.duasrodas.com/blog/conheca-os-principais-processos-de-fabricacao-de-extratos-vegetais-para-a-industria-alimenticia/#:~:text=Na%20ind%C3%BAstria%20aliment%C3%ADcia%2C%20os%20extratos,para%20agregar%20valor%20aos%20produtos.>> Acesso em: 08 abr. 2025.

KUMARI, Ankita; PATHAK, Akhilendra; GURIA, Chandan. Cost-Effective Cultivation of *Spirulina platensis* Using NPK Fertilizer. **Agric. Res**, India, v. 4, n. 3, p. 261-271, 2015. DOI 10.1007/s40003-015-0168-4.

LI, Jian; ZHANG, Yaqi; YANG, Shen; LU, Zhenhua; LI, Guiling; LI, Jingwen; ZHOU, Bo; WU, Daren; WANG, Li. Isolation, purification, characterization, and immunomodulatory activity analysis of α -Glucans from *Spirulina platensis*. **ACS Omega**, China, v. 6, n. 33, Aug. 2021. DOI: 10.1021/acsomega.1c02175.

MARQUES, Ana; SANTOS, Jânio. Análise das funcionalidades do chá de *Camellia sinensis*. **Research, Society and Development**, Brasil, v. 10, n. 14, 27 out. 2021. ISSN 2525-3409. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21638>.

MARTÍNEZ, Jorge . **Desarrollo y análisis técnico-económico de la gestión de nutrientes residuales en la producción de biomasa de algas para fines agrícolas y ganaderos**. Tese (Doutorado em Ciencia e Ingeniería Agroalimentaria y de Biosistemas), Universidad de Valladolid. 2017.

PCC. **Extratos vegetais em cosméticos** — descubra os benefícios de usá-los!. PCC, 2024. Disponível em: <<https://www.products.pcc.eu/pt/blog/extratos-vegetais-em-cosmeticos-descubra-os-beneficios-de-usa-los/#:~:text=Extrato%20vegetal%20%E2%80%93%20defini%C3%A7%C3%A3o,nas%20ind%C3%BAstrias%20farmac%C3%AAutica%20e%20alimentar%20.>>>. Acesso em: 08 abr. 2025.

RAGUSA, I.; NARDONE, G. N.; ZANATTA, S.; BERTIN, W.; AMADIO, E. *Spirulina* for Skin Care: A Bright Blue Future. **Cosmetics**, Itália, v. 8, n. 1, p. 7, jan. 2021. DOI: 10.3390/cosmetics8010007.

ROJO, Elena M.; MOLINOS-SENANTE, María; FILIPIGH, Alejandro A.; LAFARGA, Tomás; ACIÉN, Fernández; BOLADO, Silvia. Agricultural products from algal biomass grown in piggery wastewater: a techno-economic analysis. **Science of the Total Environment**, Spain, v. 887, 20 August 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164159.

RUTAR, J. M.; HUDOBINIK, M. J.; NECEMER, M.; MIKUS, K. V.; ARCON, I.; OGRINC, N. Nutritional Quality and Safety of the *Spirulina* Dietary Supplements Sold on the Slovenian Market. **Foods**, Slovenia, v. 11, n. 6, p. 849, 26 jan. 2022. DOI: 10.3390/foods11060849.

SANTOS, Bruna F. S.; OLIVEIRA, Gabriela L. M.; OLIVEIRA, Gabriella R. S.; MAZZINGHY, Ana C. C.; RAMOS, Ana L. C. C.; COELHO, Vinícius S.; SILVA, Viviane D. M.; SILVA, Cléber J.; ARAÚJO, Raquel L. B.; MELO, Júlio O. F. TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E A *ARTEMIA SALINA*. *Ciências Agrárias: limites e potencialidades em pesquisa*. Minas Gerais. v. 3, n. 1, p. 9-27, 30 out. 2023. DOI: 10.37885/231014642.

SANTOS, KRS; HENTSCHEKE GS; FERRARI G; ANDREOTE APD; FIORE MdF; VASCONCELOS V; SANT'ANNA CL. Molecular, morphological and ecological studies of *Limnospira platensis* (Cyanobacteria), from saline and alkaline lakes, Pantanal Biome, Brazil. **Front. Environ. Sci.**, v. 11, p. 1204787, 25 Sep. 2023. DOI: 10.3389/fenvs.2023.1204787.

SILVA, Borges A.; CARDOSO, Guimarães; DUARTE, Hartwig; COSTA, Alberto V.; ASSIS, Jesus; DRUZIAN, Izabel; CHINALIA, Alexandre; GALVÁN, Lizzeth P. PRODUÇÃO DE *Spirulina* sp. (LEB18) COM ELEVADOS TEORES DE PROTEÍNA E FICOCIANINA, UTILIZANDO ÁGUA RESIDUAL DA AQUICULTURA. In: SIMPÓSIO

INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA, 5., 2019, Salvador/BA.
SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; GALATTI-TEDESQUE, M.; MELO-SANTOS, G. L.;
SCARDOELI-TRUZZI, B. Macrophytes to improve the cultivation of *Ankistrodesmus gracilis*. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 9, n. 1, p. 18–25, 2018. ISSN: 2229 – 6905.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., IBARRA, L.C. and FIORESI, T.B., 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 35, n. 1, p. 111-118, 01 Dez 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/225986>>. Acesso em: 15 Março. 2026.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., SCARDOELI-TRUZZI, B., FENERICK, D.C. and TEDESQUE, M.G., 2020. Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) in alternative culture media. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 80, n. 4, p. 914-920. DOI:10.1590/1519-6984.226548.

SOPANDI, Tatang; ROHMAH, Siti; AUGUSTINA, Siti. Biomass and nutrient composition of *Spirulina platensis* grown in goat manure media. **AJAB**, Indonesia, v. 8, n. 2, p. 158-167, April 2020. DOI: 10.35495/ajab.2019.06.27425.

SOSA, Diana; ALVES, Felipe; PRIETO, Miguel; PEDROSA, Marina; HELENO, Sandrina; BARROS, Lilian; FELICIANO, Manuel; CAROCHO, Márcio. *Lemna minor*: Unlocking the Value of This Duckweed for the Food and Feed Industry. **Foods**, Portugal, v. 13, n. 10, 7 May 2024. DOI: 10.3390/foods13101435.

TITIN.; LESTARI, Dewi P.; DWIYANTI, Septiana. Effectiveness of *Spirulina* Meal in Enhancing Platy Fish (*Xiphophorus maculatus*). **Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research**, Indonesia, v. 26, n. 12, p. 149-162, 13 Dec. 2024.

UEBEL, Livia; COSTA, Jorge; OSLON, Adriana; MORAIS, Michele. Industrial plant for production of *Spirulina* sp. LEB 18. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brazil, v. 36, n. 1, p. 51-63, Jan-Mar. 2019. DOI: [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20180361s20170284](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180361s20170284).

V.B. OLIVEIRA. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clade de *dicksonia sellowiana* (presl.). *Hook, dicksoniaceae*. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016.

VARANDAS, R. C. R.; CONCEIÇÃO, R.; RIBEIRO, V.; SANTOS, J. Use of malt residue from the brewing industry as an alternative medium for growing *Spirulina platensis* and *Spirulina máxima*. **Research Society and Development**, Paraíba, v. 11, n. 16. 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38249.

VIANA, Yuri; RODRIGUES, Virginia. *Camellia sinensis*: um levantamento fitoquímico. **rcfm**, Brasil, ISSN 2965-6575, v. 19, n. 1, p. 39-56, 28 jun. 2024. DOI:10.29184/1980-7813.rcfmc.1028.vol.19.n1.2024.

VILLARÓ-COS, Silvia; SÁNCHEZ, José; ACIÉN, Gabriel; LAFARGA, Tomás. Research trends and current requirements and challenges in the industrial production of *Spirulina* as a food source. **Trends in Food Science & Technology**, Spain, v. 143, jan. 2024. DOI:

10.1016/j.tifs.2023.104280.

VONSHAK, Avigad. ***Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology And Biotechnology***. ed. 1, London: Taylor & Francis, 20 maio 1997. ISBNB 9780429079948. DOI: doi.org/10.1201/9781482272970.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cyanophyce. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de Spirulina maxima Geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris. 1996.