

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO
CULTIVO DA MICROALGA *Messastrum gracile*
(Reinsch) T. S. Garcia**

Mayara Cristina Malvas Nicolau

Jaboticabal, São Paulo
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO
CULTIVO DA MICROALGA *Messastrum gracile*
(Reinsch) T. S. Garcia**

Mayara Cristina Malvas Nicolau

Orientadora: Prof^a Dr^a. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Lupino Gratão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo
2020

N639a Nicolau, Mayara Cristina Malvas
Avaliação de antioxidantes no cultivo da microalga *Messastrum gracile* (Reinsch)
T. S. Garcia / Mayara Cristina Malvas Nicolau. -- Jaboticabal, 2020
x, 72 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura,
2020
Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares
Coorientadora: Priscila Lupino Gratão
Banca examinadora: Antônio Fernando Monteiro Camargo, Rodrigo Ney Millan
Bibliografia

1. Antioxidantes. 2. *Messastrum gracile*. 3. Luminosidade. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA


Unidade Complementar - Jaboticabal

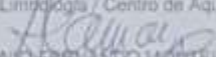
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de antioxidantes no cultivo da microalga *Microcystis aeruginosa* (Reinisch) T. S. Garcia

AUTORA: MAYARA CRISTINA MALVAS NICOLAU
ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAUBA TAVARES
COORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, área:
Biologia Aquática pela Comissão Examinadora:


Prof.ª Dra. LÚCIA HELENA SIPAUBA TAVARES
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP


Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO MONTEIRO CAMARGO
Departamento de Ecologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. RODRIGO NEY MILLAN
Departamento de Ciências Exatas / Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Fruzal-MG

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2020

DEDICO:

A minha família que sempre me apoiou para que eu seguisse e realizasse meus sonhos e por ser o espelho de quem eu quero me tornar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar durante minha trajetória, por me abençoar nos momentos de fraqueza.

A minha orientadora Profa. Dra. Lúcia H. Sipaúba Tavares pelo crescimento pessoal e profissional, por me apresentar a microalga e a ecologia, pelos ensinamentos durante meu projeto, principalmente na escrita, e pela oportunidade do mestrado e orientação.

A minha coorientadora Profª. Drª. Priscila Lupino Gratão por me incentivar a voar e conhecer coisas novas, pela preocupação, por não me deixar desistir, por acreditar sempre em mim, pelos ensinamentos e crescimento que eu tive e pela amizade.

A toda minha família, meus tios, meu avô, meus pais, minha irmã e meus primos, por acompanharem todos os meus passos e sempre me ajudarem no que fosse preciso. Obrigada por acreditarem em mim, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus colegas do laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, Juliane, Bruno, Mayara, Débora e Japa que me ajudaram sempre que precisei, pelos ensinamentos no laboratório e amizade que ganhei, principalmente a Mayara por toda ajuda e disponibilidade para fazer o projeto acontecer.

Também a todos os meus colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal por me auxiliarem nas análises, principalmente a Cássia que me ensinou todos as análises, que não mediu esforços para me ajudar, mesmo distante sempre retirava um tempo do seu dia para me auxiliar ou para me mostrar que as coisas dariam certo.

Em especial agradeço a técnica Soninha pelo auxílio durante cada protocolo, pela palavra amiga, pelo conforto do abraço, por sempre torcer por mim e pelos cuidados dentro e fora do laboratório. Ao técnico Rodrigo pela disponibilidade e ajuda com os equipamentos.

Agradeço a Mirela e ao Gilmar por toda a ajuda e ensinamento no laboratório durante meu projeto, mas acima disso agradeço pela amizade, por me entenderem em todos os momentos e me mostrarem quando eu não estava certa e continuarem ao meu lado apesar disso. Pelas palavras sempre precisas e tão calmas e acolhedoras nos momentos de desespero e tristeza. Por acreditarem em mim sempre e me mostrarem que as coisas acontecem no momento certo e

principalmente por me mostrarem quão sortuda eu sou por tê-los ao meu lado e por sempre ter com quem contar.

As minhas amigas (Gabi, Isabella, Ana e Leticia) e amigos de Jaboticabal e de Pontal, por torcerem por mim, me ajudarem em todos os momentos e entenderem minhas ausências em outros momentos.

A Capes pelo financiamento da bolsa.

Ao Caunesp, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e o laboratório de fisiologia vegetal (FCAV) pelas análises de antioxidante.

E a todos que contribuíram com este trabalho e minha formação, meus sinceros agradecimentos.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (1768969) pela bolsa concedida. A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro (14/24697-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2. OBJETIVO GERAL.....	11
2.1 Objetivos específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 <i>Messastrum gracile</i> (Reinsch) T. S. Garcia	12
3.2 Microalgas como agente antioxidante.....	14
3.3 Importância e cultivo da microalga.....	17
3.4 Influência da luminosidade em microalgas	20
4. DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA DE CULTIVO E ANÁLISE DE ANTIOXIDANTE.....	22
5. REFERÊNCIA	28
CAPÍTULO 1 - Interferência da luminosidade na atividade dos antioxidantes em <i>Messastrum gracile</i> (Chlorophyceae):.....	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. Introdução	40
2. Material e métodos.....	41
2.1. Microalga e condições de cultivo	41
2.2. Crescimento e Parâmetros do meio de cultura	42
2.3. Análise do estresse oxidativo: Peroxidação lipídica.....	42
2.4. Extração de enzimas e determinação de proteínas	43
2.5. Análise da atividade de antioxidantes.....	43
2.6. Análise estatística	44
3. Resultados	44
3.1. Crescimento da microalga e variáveis do meio de cultura	44
3.2. Avaliação do estresse e antioxidantes da microalga	47
4. Discussão e conclusões.....	51
5. Referências	54

ANEXO - Uso da biomassa da microalga <i>Messastrum gracile</i> via pré-tratamento de sementes no crescimento da <i>Lactuca sativa</i>	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
1. Introdução.....	60
2. Material e métodos	61
2.1 Cultivo e Biologia da <i>Messastrum gracile</i>	61
2.2 Dados biológicos da <i>Messastrum gracile</i>	62
2.3 Antioxidantes da <i>Messastrum gracile</i>	62
2.4 Tratamento na Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	63
2.5 Germinação e crescimento de plântulas.....	63
2.6 Peroxidação lipídica das plântulas de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	63
2.7 Análise estatística	64
3. Resultados	64
3.1 <i>Messastrum gracile</i>	64
3.1.1 Biologia e o meio de cultura	64
3.2 <i>Lactuca sativa</i>	66
4. Discussão e conclusão	69
5 Referências	71

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Eletrón-micrografia de varredura de exemplares da microalga <i>Messastrum gracile</i> em aumento (330x).....	11
Figura 2: Demonstração dos cultivos da microalga <i>Messastrum gracile</i> em laboratório em volume de 2L e 10L (A). Repicagem da microalga para cultivo e avaliação da biomassa (B).....	21
Figura 3. Diagrama esquemático do cultivo da microalga <i>Messastrum gracile</i> em diferentes fases de crescimento para a produção da biomassa algal. A- Inóculo da microalga (cepa). B- Aumento da biomassa transferindo para erlenmeyer de 250 ml. C- Avaliação do crescimento da microalga no volume de 2 L. D- Cultivo em volume de 13 L para centrifugação. E- Biomassa algal centrifugada para posterior avaliação de antioxidante.....	22
Figura 4: Imagens do cultivo da microalga <i>Messastrum gracile</i> em condições de estresse em função da elevação da luminosidade ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	23
Figura 5: Diferentes fases da curva de crescimento de microalgas em sistemas de cultivo tipo <i>Batch</i>	24
A- Demonstração da densidade algal ao longo da curva de crescimento.....	24
B- Desenho esquemático do padrão da curva de crescimento microalga ...	24
Figura 6: Processo de centrifugação da <i>M. gracile</i> (A) e o resultado do processo, em que a microalga está na forma de pasta (B).....	25
Figura 7: Microalga sendo centrifugada (A) e sonicada para posterior extração dos antioxidantes (B)	26

Capítulo 1

Fig. 1: Densidade celular do crescimento de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas nos diferentes dias de cultivo (7, 14, 21 e 28)	42
Fig. 2: Proteína total durante o crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e expostas a estresse luminoso de 24 e 72 horas.....	44
Fig 3: Nível de estresse (MDA) em <i>Messastrum gracile</i> durante o período de crescimento (7, 14, 21, 28 dias) em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas	45
Fig. 4: Concentração de pigmentos (clorofila a, carotenoides e clorofila total) em <i>Messastrum gracile</i> nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas	46
Fig. 5: Atividade específica dos antioxidantes durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28) de <i>Messastrum gracile</i> em cultivo sem estresse e exposta ao estresse luminoso de 24 e 72 horas	47

Anexo

Fig. 1: Germinação das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse	61
Fig. 2: Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse	62
Fig. 3. Altura da plântula e comprimento da raiz de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.....	63
Fig. 4. Massa seca da plântula de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e sem estresse luminoso.....	63
Fig. 5: Conteúdo de MDA das sementes de alface durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias) de <i>Messastrum gracile</i> exposta ao estresse luminoso e em sem estresse	64

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1: Média e desvio padrão das variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas três condições de cultivo: sem estresse, estresse luminoso de 24 e 72 horas) avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).....43

Anexo

Tabela 1: Variáveis do meio de cultura e condições biológicas de *Messastrum gracile* nas duas condições de cultivo: sem estresse e estresse luminoso de 24 horas avaliadas em diferentes etapas da curva de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias).
.....60

Tabela 2. Antioxidantes enzimáticos (GSH-Px, CAT, SOD, GPOX, GR em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) e não enzimático (Carotenoides em $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) produzidos pela microalga *Messastrum gracile* exposta ao estresse luminoso e sem estresse durante os dias de crescimento (7, 14, 21 e 28 dias)..... 61

RESUMO

As microalgas apresentam diversos compostos metabólitos que, atualmente, vem sendo extraídos de forma ascendente para originar produtos naturais. Um desses produtos são os antioxidantes cuja função é de proteger as células contra os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO). A microalga *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia é um importante recurso devido a seu fácil cultivo, grande quantidade de nutrientes, possível efeito antioxidante e principalmente pelo baixo custo. Nas microalgas, a luminosidade é um importante fator para seu desenvolvimento e produção de compostos nutricionais e metabólicos e, quando ofertada em excesso, pode gerar um estresse e afetar a produção de antioxidantes do organismo. Assim o projeto avaliou o potencial efeito dos antioxidantes produzidos pela microalga *Messastrum gracile* em cultivo ideal de luminosidade ($60 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$) e cultivo com estresse luminoso de $120 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ por dois períodos (24 horas e 72 horas). A microalga foi cultivada em meio de cultura CHU₁₂, em galões de 10 L, e foi avaliada em quatro períodos da curva de crescimento: 7º, 14º, 21º e 28º dia. Os antioxidantes Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e os carotenoides foram mais efetivos no 7º dia de crescimento da microalga, durante o cultivo ideal de luminosidade obtendo uma melhor resposta frente a peroxidação lipídica, em comparação com os cultivos de estresse luminoso de 24 e 72 horas. Os resultados obtidos permitem concluir que é possível cultivar a microalga até o 7º dia de crescimento sem aumentar o fornecimento de luz para produzir uma quantidade maior de antioxidantes, sem prejuízo para *M. gracile*.

Palavras-chave: Antioxidantes, *Messastrum gracile*, luminosidade.

ABSTRACT

Microalgae presents several metabolic compounds which have been extracted in order to obtain natural products. The antioxidants, which protects the cells from free radicals and reactive oxygen species (ROS) are among those compounds. The microalgi *Messastrum gracile* (Reinsch) T.S. Garcia is an important resource due to easiness on cultivation, great nutrients amount, potential antioxidant effect and mainly for its low-cost production. Light is an important factor for the development and nutritional compound production of microalgae. When in excess may result in a stress which affects the antioxidants production. The aim of the present research was to evaluate the antioxidants activity produced by the microalgi *Messastrum gracile* grown in optimal light conditions ($60 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$) compared with cultivation submitted to two light stress periods ($120 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$, 24 and 72 hours prior to sampling). The microalgi was grown on CHU₁₂ culture medium, in 10 L containers and was assessed in four periods: 7th, 14th, 21th and 28th day. The antioxidants Catalase, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Carotenoids were more effective at seven days of growth and at optimal light conditions and the lipid peroxidation presented better results in comparison with light stress conditions. The obtained results allow to conclude that is possible to grow *Messastrum gracile* until the 7th growth day without increasing light intensity to produce a higher antioxidant amount, with no harm to the microalgi.

Keywords: Antioxidant, *Messastrum gracile*, luminosity.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são organismos que apresentam diversificada composição bioquímica e têm atraído interesse na área comercial e de produção para a obtenção de compostos de alto valor nutricional (GARCÍA-ROMERAL et al., 2017).

No ambiente aquático as microalgas desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes, balanço do pH e na remoção de dióxido de carbono, gerando oxigênio e promovendo melhoria na qualidade da água, através da absorção de compostos nitrogenados (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Também atuam na remoção de nutrientes, elementos químicos, metais pesados e micro-organismos patogênicos presentes em águas residuais, sendo uma tecnologia limpa e sustentável para o tratamento de efluentes (ANSILAGO et al., 2016). Além disso, são fonte de micronutrientes, vitaminas e lipídeos para toda a comunidade aquática sendo de grande importância na produção e balanço de oxigênio dissolvido na água e servindo como fonte de alimento para diversas espécies, sendo um elo na cadeia alimentar (BARCELLOS et al., 2012).

O interesse em cultivar microalgas chama atenção em relação ao valor comercial de produtos extraídos e ampla variedade de aplicações (GULDHE et al., 2017). As microalgas assimilam os nutrientes incorporando-os à sua biomassa, obtendo um produto nutricionalmente rico, podendo ser utilizado como suplemento em diversas áreas. A produção de nutrientes e metabolitos varia ao longo das fases de crescimento da microalga, produzindo os nutrientes necessários para seu metabolismo (MORIOKA et al., 2014).

Compostos com atividade antioxidante podem ser encontrados em algumas microalgas, como as Chlorophyceae, devido a sua variedade de nutrientes, vitaminas, enzimas e carotenoides. Por se tratarem de organismos fotossintetizantes, a luz é um fator importante para o seu desenvolvimento e composição bioquímica. A alta luminosidade pode afetar o metabolismo, gerando uma desordem e um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), elevando conseqüentemente as respostas da linha de defesa, os antioxidantes.

Os carotenoides, importantes antioxidantes não enzimáticos, são utilizados na aquicultura para ressaltar a coloração de camarões, peixe salmonídeos e peixes ornamentais (BROWN, 2002). Também são utilizados na indústria cosmética e farmacêutica e na alimentação humana (MARIANO, 2014; EL GAMAL, 2010).

Alguns estudos relatam que os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos provenientes de microalgas podem prevenir e impedir diversas doenças, como a diabetes, doenças cardíacas e o câncer, podendo ser utilizadas para a fabricação de medicamentos (SHANAB et al, 2012; LUO et al., 2015).

Há um grande interesse em encontrar novos e seguros antioxidantes a partir de fontes naturais para prever a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos das células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos tem decrescido devido a sua atividade suspeita como promotor da carcinogênese (SHANAB et al., 2012).

Assim, a microalga *Messastrum gracile*, poderá ser uma linha de partida para utilização como produto de antioxidante natural para o uso no mercado e na pesquisa.

4. Discussão e conclusão

Em relação aos antioxidantes houve uma intensificação da atividade das enzimas antioxidantes quando *M. gracile* foi cultivada sem estresse em comparação com o cultivo de estresse luminoso, principalmente aos 7 dias de cultivo, em que as enzimas SOD, CAT e GSH-Px apresentaram uma atividade mais elevada. Essa maior atividade do sistema de defesa da microalga neste período foi efetiva na redução dos conteúdos de MDA na alface, em comparação com as sementes tratadas com a biomassa proveniente do estresse luminoso

O melhor desempenho do sistema de defesa antioxidante deste cultivo reflete também na germinação das sementes de alface em que a biomassa sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento da microalga, obteve 100% da germinação em todas as repetições. Também foi possível notar essa influência dos antioxidantes no IVG, que é mais elevado para a biomassa sem estresse luminoso com 7 dias de crescimento. O IVG elevado é extremamente

importante para a cultura da alface, já que as sementes de alface são altamente sensíveis as condições do ambiente e isso pode influenciar na emergência das plântulas. Com uma rápida germinação, as sementes sofrem menos danos do ambiente e garantem uma melhor produção (EIRA & MARCOS FILHO, 1990).

Com o sistema de defesa mais ativo, a germinação é finalizada de forma mais rápida e mais efetiva, e a plântula consegue transferir a energia para seu crescimento. Este fato pode ser notado no maior comprimento das raízes no tratamento com a biomassa sem estresse luminoso, com 7 dias de crescimento da microalga. As raízes mais compridas aumentam o campo de absorção de água e nutrientes, que são essenciais ao desenvolvimento de uma cultura e aumento da produção de biomassa da parte aérea (GIACOMINI et al., 2005).

Além disso, foi possível notar uma maior absorção de fósforo e nitrogênio pelas microalgas com 7 dias de crescimento, aumentando a parte nutricional da biomassa utilizada para o tratamento da germinação da alface. De acordo com Dias et al. (2017) as raízes têm um maior crescimento quando há grandes concentrações e disponibilidade de nutrientes, principalmente do fósforo, em que foi provado por Drew (1975), que o local com maior presença de P, teve um melhor desenvolvimento radicular.

Em relação a massa seca, o tratamento com a biomassa sem estresse luminoso apresentou maiores resultados para o período de 21 dias de crescimento. Este fato pode estar atrelado com o maior conteúdo de carotenóides produzidos pela microalga nesse período. Os carotenoides são responsáveis por proteger o aparato fotossintetizante e, conseqüentemente, aumentar absorção de luz (GONG & BASSI, 2016). A maior absorção de luz, eleva a produção de fotossíntese e gera um maior crescimento de plântula e com isso uma maior massa seca final.

Com isso é possível concluir que a biomassa de *Messastrum gracile* sem estresse luminoso e cultivada até o 7º dia de crescimento, quando utilizado como pré-tratamento pode

ser um importante artifício para cultura da alfaca, com a obtenção de alto IVG e redução no conteúdo de MDA para as sementes, assim como maior comprimento das raízes.

5 Referências

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes too transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BOGHADY, M.; SELIM, D. A. H.; NASSAR, R. M.A.; SALAMA, A. M. Influence of foliar spray with seaweed extract on growth, yield and its quality, profile of protein pattern and anatomical structure of chickpea plant (*Cicer arietinum* L.). **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 207-221, 2016.
- DIAS, L. P. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; ARRUDAM B.; COSTA, M. M. Distribuição e morfologia do sistema radicular de *Eucalyptus dunnii* em resposta à aplicação de fósforo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 3, p. 203-213, 2017.
- DOURADO NETO, D. et al. Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 371-379, 2014.
- DREW, M. C. Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. **New Phytologist**, v. 75, p. 479-490, 1975.
- EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento osmótico de sementes de alfaca. I. Efeitos sobre a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 12, n. 1, p. 9-27, 1990.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology** v. 105, p. 114-121, 1984.
- GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051-1061, 2016.
- GIACOMINI, A. A.; DE MATTOS, W. T.; DE MATTOS, H. B.; WERNER, J. C.; CUNHA, E. A.; DE CARVALHO, D. D. Crescimento de raízes dos capins aruana e tanzânia submetidos a duas doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1109- 1120, 2005.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxidedismutases: I. Occurrence in higherplants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2ed. **Blackwell Scientific Publication**, v. 8, p. 213, 1978.
- GOMES-JUNIOR, R. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.
- GONG, A.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396 – 1412, 2016.
- GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79-96, 2012.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: J. R. Stein (ed.), Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, London: **Cambridge University Press**, p. 289-311, 1973.
- KRZEMIŃSKA, I., PIASECKA, A., NOSALEWICZ, A., SIMIONATO, D., & WAWRZYKOWSKI, J. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. **Bioresource technology**, v. 196, p. 72-77, 2015.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In Grassnof, K. (ed.). Methods of seawater analysis, **Verlag Cermie**, v. 7, 1973.
- LABORIAU, L. G. A germinação das sementes. Whashington, DC: OEA – Prog. Reg. Desenv. **Cientia.Tecnology**, p. 174, 1983.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. 34, p. 350-382, 1978.
- MAGUIRE, J. A. Speed of Germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.
- PENNISI, G.; ORSINI, F.; BLASIOLI, S.; CELLINI, A.; CREPALDI, A.; BRASCHI, I.; SPINELLI, F.; NICOLA, S.; FERNANDEZ, J. A.; STANGHELLINI, C.; GIANQUINTO, G.; MARCELIS, L. F. M. Resource use efficiency of indoor lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivation as affected by red:blue ratio provided by LED lighting. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

PEREIRA, H. D.; FIORINI, I. V. A; VON PINHO, R. G.; RESENDE, E L.; PEREIRA, C. S. Ascophyllum nodosum seaweed extract effects in maize crop, **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 5, 2018.

SILVA E. M. N. C. P.; FERREIRA R. L. F.; ARAÚJO NETO S. E.; TAVELLA L. B.; SOLINO A. J. S., Qualidade de alface crespa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, 2011.

SILVEIRA, F.C. G; Desempenho de genótipos de alface-crespa em diferentes ambientes de cultivo, no município de Igarapava-sp; Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP; 2016.

SUTHERLAND, D. L; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R.J. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water Research**, v. 70, p. 9-26, 2015.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; KOCELA, R. Organic and mineral soil improvers intended for the cultivation of butterhead lettuce. **Ekonomia I Środowisko**, v. 1, n. 68, 2019.