

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**DESEMPENHO de *Messastrum gracile* (CHLOROPHYCEAE) SUBMETIDA À DIFERENTES
CICLOS DE LUZ EM MEIOS DE CULTURA COMERCIAL E ALTERNATIVO**

MARIA JULIA GONÇALVES BREDÁ

JABOTICABAL - SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

DESEMPENHO DE *Messastrum gracile* (CHLOROPHYCEAE) SUBMETIDA à
DIFERENTES CICLOS DE LUZ EM MEIOS DE CULTURA COMERCIAL E ALTERNATIVO

MARIA JULIA GONÇALVES BREDAS

Orientadora: Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares
Coorientadora: MSc. Mayara Galatti Tedesque

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

2º Semestre / 2022
Jaboticabal – SP

Breda, Maria Julia Gonçalves
B831d Desempenho de *Messastrum gricile* (Chlorophyceae)
submetida à diferentes ciclos de luz em meios de cultura
comercial e alternativo. /
Maria Julia Gonçalves Breda. -- Jaboticabal, 2022
91 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado – Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares
Coorientadora: MSc. Mayara Galatti Tedesque

1. Microalga. 2. Macrófitas Aquáticas. 3. Claro-escuro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEPARTAMENTO:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO:

**DESEMPENHO de *Messastrum gracile* (CHLOROPHYCEAE) SUBMETIDA À
DIFERENTES CICLOS DE LUZ EM MEIOS DE CULTURA COMERCIAL E
ALTERNATIVO**

ACADÊMICO: Maria Julia Gonçalves Breda

CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Profa. Dra Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Membro: Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino

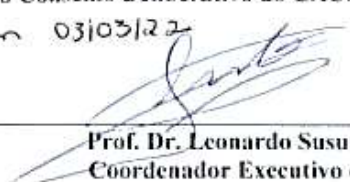
Membro: MSc. Juliane dos Santos Alves da Silva



Jaboticabal, 25/02/2022

Aprovado em reunião do Conselho Deliberativo do CAUNESP

Ad referendum 03/03/22



Prof. Dr. Leonardo Susumo Takahashi
Coordenador Executivo do CAUNESP

Dedico,

Aos meus pais Fátima da Conceição Gonçalves Breda e Luiz Carlos Breda por me inspirarem a cada segundo e por serem os melhores pais do mundo. Aos meus familiares, amigos, professora, parceiros de laboratório por cada incentivo profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida por estarem me acompanhando a cada momento da minha vida, por me protegerem, me tornarem cada vez mais forte e capaz de enfrentar os momentos difíceis, além de agradecer cada vez mais pelos momentos de felicidade.

À minha Orientadora Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares, por me proporcionar oportunidades, ensinamentos inesquecíveis, por me acolher no laboratório e me incentivar com paciência e confiança nessa longa jornada.

À minha Coorientadora Msc. Mayara Galatti Tedesque pela paciência e parceria, além de proporcionar diversos conselhos e ensinamentos. Obrigada por estar sempre presente!

Aos meus pais, por me darem a vida, por me mostrarem o verdadeiro significado do amor e por serem as pessoas que me incentivam a ser quem eu sou e quem eu pretendo ser a cada dia, meu simples obrigada e meu abraço e beijo com amor e carinho. Tenho orgulho por serem quem são, estou aqui por causa de vocês! Quero que saibam isso. Amo vocês.

À Juliane, por toda ajuda e me trazer paz e incentivo sempre! À Débora pelos ensinamentos e companheirismo, à Lívia por cada apoio, dedicação e incentivo, à Lays pela parceria ao longo do tempo, ao Japa pela amizade e diversas conversas. A todos pela amizade e pela ajuda, cada um de sua forma, no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas de curso, em especial à Júlia e ao Guilherme por serem além de parceiros de grupos, verdadeiros amigos. E a todos que passaram por mim durante a minha formação acadêmica me incentivando profissionalmente e pessoalmente.

Aos meus familiares, em especial à tia Rita, Madrinha, Érica e Rodolfo por sempre me incentivarem profissionalmente e por me mostrarem o quanto sou capaz. Em destaque também para os meus irmãos, avós, tios, sobrinhos, amigas, amigos, afilhadas, primas, primos, padrinho por cada momento e palavras de incentivo e carinho.

A todos que passaram pela minha vida até o momento e me acrescentaram de forma positiva. À cada playlist, suco de maracujá e conversas incentivadoras para que tudo fosse feito da melhor forma possível demonstrando que sim, eu sou capaz.

Ao CAUNESP e funcionários por proporcionarem ajuda para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias – Campus Jaboticabal e aos professores da mesma que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

OBRIGADA!

“ VIVA LA VIDA ”

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Avaliação geral das microalgas.....	13
2.2. Importância da luz no cultivo e manutenção das microalgas.....	17
2.3. Aspectos gerais do cultivo de microalgas.....	19
2.4. Meio de cultura.....	25
2.5. Aplicações e produção de microalgas.....	30
3. MICROALGA ESTUDADA- <i>Messastrum gracile</i>	35
4. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTIVO DE MICROALGAS.....	39
5. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	43
6. OBJETIVOS GERAIS.....	47
6.1. Objetivos específicos.....	47
7. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
7.1. Meios de cultura e montagem experimental.....	47
7.2. Condição de iluminação para o crescimento de <i>Messastrum gracile</i>	48
7.3. Crescimento da microalga.....	48
7.4. Parâmetros do meio de cultura.....	50
7.5. Biomassa da microalga <i>Messastrum gracile</i>	50
7.6. Considerações econômicas.....	51
7.7. Análise estatística dos dados.....	51
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
8.1. Dados biológicos da microalga <i>Messastrum gracile</i>	51
8.2. Dados do Meio de Cultura.....	59
8.3. Custo/benefício da produção da microalga <i>Messastrum gracile</i> nas con dições aplicadas neste estudo.....	66
9. CONCLUSÃO.....	71
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de espécies de algas, ordenado por ambiente e classe taxonômica (BICUDO et al., 2010).....	15
Figura 2. Equipamentos e materiais utilizados na separação e manutenção das microalgas em sistema de cultivo onde: (A) Microscópio, placa de petri, capilar, tubos de ensaio, entre outros; (B) Lâminas escavadas; (C) Microalgas separadas em meio sólido e líquido; (D) Microalgas em tubos de ensaio com meio de cultura líquido; (E) Microalga em erlenmeyer de 2L em meio líquido; (F) Autoclave para esterilização dos meios de cultura; (G) Câmara de assepsia contendo os meios de cultura com bico de bunsen. (Imagens cedidas pela Prof ^a . Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).....	22
Figura 3. Imagens do cepário do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Caunesp), onde: (A) cultivo em volume 2L; (B) cultivo em “Carboy” de vidro e cubas de fibra de vidro transparente; (C) cultivo em saco plástico; (E) cultivo em Carboy de vidro; (D) cultivo em cuba de vidro. (Imagens cedidas pela Prof ^a . Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).....	22
Figura 4. Diferentes fases da curva de crescimento da microalga (A); e a respectiva biomassa em cada fase da curva (B). (Adaptado de Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001).....	25
Figura 5. Imagem da planta <i>Eichhornia crassipes</i> . Fonte: < https://ufrgs.br/flora/Campestre/eichhornia-crassipes-aguape/ >.....	28
Figura 6. Bioprodutos provindos do cultivo de microalgas (KHAN et al., 2018).....	32
Figura 7. Processos e aplicações a partir da produção microalgal. Fonte: < lmed.edu.br >.....	33
Figura 8. Mercado para produtos derivados de algas. Fonte: EMBRAPA AGROENERGIA (2016).....	34
Figura 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida das sequências do gene 18S rDNA de alguns membros de Selenastraceae (GARCIA DA SILVA et al., 2017). A seta em destaque indica a microalga estudada <i>Messastrum gracile</i> CCMA-UFSCar 5.....	36

Figura 10. Vista frontal da colônia da microalga <i>Messastrum gracile</i> . Foto original da linhagem CCMA-UFSCar 622. Barra de escala: 10µm (GARCIA DA SILVA et al., 2017).....	37
Figura 11. Vista da microalga <i>Messastrum gracile</i> no meio de cultivo que ficam em formas unicelulares. (Microscópio no aumento: (x10). Fonte: Própria.....	38
Figura 12. Área externa do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton. Fonte: Própria.....	39
Figura 13. Vista panorâmica da sala de cultivo e Produção de Plâncton. Microalga em cultivo de 2L e 13 L. Fonte: Própria.....	40
Figura 14. Microalga <i>Messastrum gracile</i> em meio comercial CHU12 (A) e de extrato de macrófita (B) na sala de cultivo. Fonte: Própria.....	41
Figura 15. <i>Messastrum gracile</i> mantida no laboratório de cultivo para experimento de ciclo de luz. Fonte: Própria.....	41
Figura 16. Câmara de assepsia com luz UV ligada e estufa (A); Vista interna da câmara de assepsia com o material utilizado para a repicagem e manutenção da microalga para cultivo (B). Fonte: Própria.....	42
Figura 17. Cultivo da microalga destacando o aparelho utilizado para controle do fotoperíodo no Laboratório (A). Câmara de Neubauer para a contagem das células no crescimento da microalga (B) e vista sob microscópio das microalgas na câmara de contagem (C), aumento: (x5). Fonte: Própria.....	43
Figura 18. Meios de cultura utilizados no cultivo da Chlorophyceae <i>Messastrum gracile</i> sendo CHU12 e WC meios comerciais e, NPK e ME meios alternativos. (Imagens cedidas pela Prof ^a . Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).....	44
Figura 19. Preparo do meio de cultura CHU12. Fonte: Própria.....	44
Figura 20. Preparo do meio com extrato de macrófita (ME): (1) Tanque específicos para o cultivo de <i>Eichhornia crassipes</i> ; (2) Fase de secagem da <i>E. crassipes</i> ao sol; (3) <i>E. crassipes</i> em processo de moagem; (4) Fase de fervura do meio; (5) Fase de filtragem do meio; (6) Meio de cultura do extrato de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Fontes: Própria.....	45
Figura 21. Procedimento de centrifugação da biomassa algal. (1) desnatadeira, aparelho utilizado para retirar o excesso de líquido; (2) visão dentro da	

desnatadeira mostrando a biomassa da alga; (3) local do aparelho onde fica retida a biomassa concentrada; (4) Biomassa final onde (A) da microalga *Messastrum gracile* cultivada em meio ME e (B) em meio CHU₁₂. Fonte: Própria..... 46

Figura 22. Diagrama esquemático do cultivo de *Messastrum gracile* durante o período experimental, onde: A = manutenção da cepa 10 ml; B = cultivo em 250 mL; C = cultivo em meio de cultura CHU₁₂ e NPK; D = experimento nos diferentes ciclos claro/escuro de luz nos meios de cultura CHU₁₂ e ME..... 49

Figura 23. Curvas de crescimento e taxa de crescimento (tempo - dias) para a microalga *Messastrum gracile* em meio de cultura comercial (CHU₁₂) e de extrato de macrófita (ME) para os diferentes ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante os 15 dias de experimento. Fonte: Própria..... 53

Figura 24. Concentração de nutrientes nos diferentes ciclos de luz: 24 h: 0 h, 20 h:4 h, 16 h: 8 h e 12 h: 12 h nos dois meios de cultura: meio comercial (CHU₁₂) e extrato de macrófita (ME), onde: NH₃ (Amônia), NO₃ (Nitrato) NO₂ (Nitrito) FT (Fósforo total)..... 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que influenciam na taxa de crescimento alga (LARSDOTTER, 2006).....	14
Tabela 2. Número de gêneros, espécies, categorias infraespecíficas e táxons endêmicos de algas, ordenado por classe taxonômica (BICUDO et al., 2010).....	16
Tabela 3. Composição (gL ⁻¹) dos nutrientes e vitaminas nos meios CHU ₁₂ e extrato de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).....	29
Tabela 4. Dados biológicos da microalga <i>Messastrum gracile</i> no meio ME para os diferentes ciclos de luz (24 h: 0h; 20 h:4 h; 16 h:8 h; 12 h:12 h) Fonte: Própria.....	55
Tabela 5. Dados biológicos da microalga <i>Messastrum gracile</i> no meio CHU ₁₂ para os diferentes ciclos de luz (24 h: 0h; 20 h:4 h; 16 h:8 h; 12 h:12 h) Fonte: Própria.....	56
Tabela 6. Variação dos nutrientes, condutividade e pH no meio de cultura comercial (CHU ₁₂) nos ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante o crescimento de <i>M. gracile</i>	60
Tabela 7. Variação dos nutrientes, condutividade e pH no meio de cultura com Extrato de Macrófita (ME) nos ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante o crescimento de <i>M. gracile</i>	61
Tabela 8. Estimativa dos custos de produção (em US\$ dólar)* para 100.000 L ⁻¹ ano no cultivo de <i>Messastrum gracile</i> em diferentes ciclos de luz (24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12h:12h) e nos dois meios de cultura CHU ₁₂ e de extrato de macrófita (ME).....	68
Tabela 9. Custo/benefício da produção de biomassa por grama de <i>Messastrum gracile</i> , nos dias de cultivo (5°, 10° e 15°) nos diferentes ciclos de luz (24 h:0 h; 20 h:4 h; 16 h:8 h e 12 h:12 h, e meios de cultura um comercial (CHU ₁₂) e outro de extrato de macrófita (ME).....	70

RESUMO

Um dos fatores que dificulta a produção em larga escala de microalgas é o custo de energia e meio de cultura uma vez que, as microalgas necessitam de luz e nutrientes para seu crescimento. Este estudo visa avaliar se a redução do consumo de energia através do uso de diferentes ciclos de luz (claro/escuro) poderá manter elevada biomassa e valor nutricional destes microrganismos, podendo ser uma nova tecnologia adotada para a microalga *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia (CCMA-UFSCar 5). A microalga foi cultivada em dois meios de cultura, um comercial CHU₁₂ e outro alternativo de extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes* (Mait.) Solms (MART.) – ME) de acordo com os protocolos adotados. Além disso, para testar a variação dos efeitos dos ciclos de luz, quatro condições de luminosidades foram utilizadas: 24 h:0 h (luz constante); 20 h: 4 h; 16 h:8 h e 12 h:12 h (claro/escuro). Em termos de biomassa o custo da microalga no ciclo de luz 24 h: 0 h no 15º dia de crescimento apresentou o maior custo de produção por gramas (US\$ 0.42), devido a elevada biomassa. Durante as horas de luz, a intensidade foi mantida em $60 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Na condição de luz constante (24 h:0 h) foi obtida a maior biomassa e tempo de duplicação, no entanto, em relação aos parâmetros como densidade celular média, carbono orgânico total, volume celular e comprimento total, os ciclos de luz 20 h:4 h e 16 h:8 h apresentaram maior desempenho. No ciclo 12 h:12 h o rendimento de *M. gracile* foi baixo. O meio de cultura de extrato de macrófita (ME) apresentou as maiores densidades do que o CHU₁₂ nos ciclos de luz 24 h:0 h e 20 h:4 h. Somente no ciclo de luz 16 h:8 h a densidade celular foi maior no meio CHU₁₂ a partir do 7º dia de crescimento. No ciclo de luz 12 h:12 h a densidade celular esteve abaixo de $35 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$ nos dois meios utilizados. Dentre os compostos nitrogenados a amônia foi a mais elevada, variando ao longo do período experimental. O ciclo de luz 24 h:0 h foi o que apresentou maior concentração de fósforo total. Assim, o meio de cultura apresentou influência direta na produção de *M. gracile* e os períodos escuros também influenciaram na biomassa da microalga. Em relação ao custo/benefício da produção de *M. gracile* nas condições de cultivo e ciclo de luz, o meio ME (24 h:0 h) apresentou o menor custo. Quanto maior a intensidade de luz consequentemente, ocorrerá maior biomassa. O meio CHU₁₂ (comercial) contém todos os macro e micronutrientes adequados para o crescimento da microalga, no entanto, o uso de macrófita (*Eichhornia crassipes*) como meio de cultura é uma alternativa a ser adotada para esta microalga.

Palavras-chave: Macrófita; CHU₁₂; Cultivo de microalga; Claro/escuro; Biomassa.

ABSTRACT

One of the features which hampers a large-scale microalgae production is the energy and culture medium cost, since the microalgae demands light and nutrients for its growth. The present study aims to evaluate if the energy consumption reduction through the employment of distinct light cycles (light/dark) may keep elevated biomass and nutrient value for the microorganisms, which may present a new technology for microalgae *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia (CCMA-UFSCar 5). The microalgae were cultivated in two culture mediums: commercial CHU₁₂ and an alternative based on macrophyte extract (*Eichhornia crassipes* (Mait.) Solms (MART.) – ME) according to adopted protocols. Besides, to evaluate the effects of light cycle variation, four light conditions were employed: 24 h:0 h (constant light); 20 h:4 h; 16 h:8 h and 12 h:12 h (light/dark). Regarding biomass, the microalgae cost with 24 h:0 h at growth day 15 presented higher production cost per grams (US\$ 0.42), due to elevated biomass. During light periods, the light intensity was kept at 60 $\mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. At constant light condition (24 h:0 h) the highest biomass and duplication time were obtained, however, regarding average cell density, total organic carbon, cell volume and total length, the light cycles 20 h:4 h and 16 h:8 h presented better performance. In the 12 h:12 h cycle the *M. gracile* yield was low. The macrophyte extract culture medium (ME) presented better densities than CHU₁₂ with 24 h:0 h and 20 h:4 h. Only in the 16 h:8 h cycle the cell density was higher in CHU₁₂ medium from growth day 7. At 12 h:12 h cycle the cell density was below 35×10^5 cells mL^{-1} in both culture mediums. Among the nitrogenous compounds, the ammonia was the most elevated, varying along the experimental period. The 24 h:0 h cycle presented the highest total phosphorus concentration. Thus, the culture medium presented direct influence in the production of *M. gracile* and the dark periods also influenced in the microalgae biomass. Regarding cost-benefit, the ME medium (24 h:0 h) presented the lower cost. The higher the light intensity, consequently, the higher is the biomass. CHU₁₂ medium contains all the suitable macro and micronutrients for the growth of the microalgae, however, the employment of the macrophyte (*E. crassipes*) as culture medium is an alternative to be adopted for this microalga.

Keywords: Macrophyte; CHU₁₂; Microalgae cultivation; Light/dark; Biomass.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas realizam diversos papéis ecológicos e biológicos e o interesse no seu cultivo tem crescido muito nos últimos anos devido ao seu valor convencional em diferentes setores da indústria.

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 metabólitos varia ao longo do crescimento da microalga, necessários ao seu desenvolvimento (GULDHE et al., 2017). Os elementos essenciais podem ser divididos em macronutrientes minerais e orgânicos como o nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio, enxofre, hidrogênio e oxigênio e os micronutrientes como ferro, boro, cobre, cobalto, zinco, vanádio, molibdênio e sódio (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). Além dos elementos essenciais (macro e micronutrientes), a adição de vitaminas principalmente, do complexo B são indicadas para proporcionar maior biomassa sendo essenciais para o cultivo de algumas espécies de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES & BACHION, 2002).

O cultivo é uma ferramenta importantíssima e fundamental para o estudo de diversos processos, tais como os ecológicos, fisiológicos, ontogenéticos, bioquímicos, comportamentais, dentre outros. Além dessas características, esses microrganismos possuem enormes potenciais científicos, econômicos e de produção, que precisam cada vez mais serem destacados e estudados por profissionais da área (LOURENÇO, 2006).

A microalga *Messastrum gracile* (Reinsch) T. S. Garcia, anteriormente denominada como *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov, apresenta elevado valor nutricional com nível de proteína acima de 45% (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008). O seu cultivo vem crescendo nos últimos anos, visto que é uma espécie de alta versatilidade na sua aplicação dentre os diferentes setores da indústria, uma vez que sintetizam diversos compostos de interesse para produção, sendo eles: fármacos, cosméticos, suplementos, antioxidantes e alimentos. Destaca-se, o valor comercial dos produtos extraídos e a ampla variedade de aplicações a partir desse cultivo. Este processo é uma ferramenta essencial para promover a produção de biomassa algal, por conta das condições estabelecidas para o

crescimento e desenvolvimento das espécies a serem cultivadas (LOURENÇO, 2006).

No cultivo laboratorial são comumente utilizadas luzes artificiais fluorescentes que é de fácil controle, com maior incidência e homogeneidade no cultivo, já que a iluminação ao atingir todos os ângulos do recipiente propicia oportunidade à célula de absorver mais energia para a fotossíntese. Com o controle da luminosidade é possível retardar ou acelerar o crescimento da microalga e, modificar os metabólitos gerados (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). Existem diferentes condições de cultivo em relação à disponibilidade de luz (fotoautotrófico, heterotrófico ou mixotrófico), no entanto o mais utilizado é o fotoautotrófico, esta condição de cultivo, tem como principal característica a necessidade de iluminação, atuando como fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono orgânico que através de processos fotossintéticos são convertidos pelas células das microalgas em energia química e utilizada no seu desenvolvimento (CHEIRSILP & TORPEE, 2012).

A intensidade e frequência da luz para a microalga são fatores importantes no seu desenvolvimento. Em sistemas de cultivo o uso do ciclo de luz (claro/escuro) interfere diretamente no metabolismo da microalga e está ligado diretamente na síntese dos compostos orgânicos (CORRÊA, 2015; SINGH et al., 2015). A determinação do tempo de luminosidade necessária a otimização do cultivo de microalga é um fator que vem sendo estudado com forma de diminuir o custo de produção e elevar a biomassa (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008). Ciclos de luz (claro/escuro) apresentam interações diretas com o metabolismo celular, taxa de absorção e controle de fótons, interações com o aparato fotossintético e a dinâmica energética das microalgas (TAKACHE et al., 2015).

Quando a microalga é exposta a intensa luminosidade, poderá ocorrer a foto-inibição, ou seja, prejudicando a fotossíntese ou a foto-oxidação, provocada pela formação de peróxido de hidrogênio, ocasionando a morte das células (CORRÊA, 2015). Sob alta intensidade luminosa os pigmentos são, em sua maioria, produzidos em maior quantidade e modificam sua função de pigmento acessório para proteção da clorofila-a, estabilizando o aparato fotossintetizante. Algumas espécies de microalga podem utilizar a alta disponibilidade de luz para acumular lipídio e proteína, melhorando a taxa de crescimento em resposta ao estresse (KRZEMIŃSKA et al., 2015).

Nos cultivos de microalgas, fontes de nutrientes devem ser utilizadas nas formulações dos meios de cultura, como fontes de carbono e nitrogênio, micronutrientes, vitaminas e oligoelementos (SINGH et al., 2015). O uso do extrato de planta aquática, como a macrófita *Eichhornia crassipes* (Mait.) Solms (MART.), popularmente conhecida como aguapé, promove a substituição dos meios de cultura comerciais, sendo uma ferramenta adotada por conter elevadas concentrações de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco entre outros compostos, disponibilizando diretamente para as células das microalgas e, possibilitando o seu uso como meio de cultura (SAHU et al., 2002; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2015, 2017, 2018). O uso de meios de cultura alternativos além de reduzir os custos de produção pode fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento da microalga auxiliando no aumento da biomassa. Quando cultivada em meios alternativos, como por exemplo, de extratos de macrófitas (ME), proporciona maior produção específica de determinados nutrientes, como também o aumento nas concentrações de lipídios e proteínas barateando o custo de produção e mantendo a qualidade nutricional da microalga (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018, 2019).

Portanto, um dos fatores que impede a produção em larga escala de microalgas com vantagens comerciais, é o custo de energia e do meio de cultura, uma vez que as microalgas necessitam de luz e nutrientes para seu crescimento. Produzir microalgas com baixo custo e elevada biomassa com alto valor nutricional são tecnologias a serem adotadas nesta área da ciência, assim, pesquisas voltadas na utilização de novos resíduos e subprodutos para formulação de meios de cultura alternativos e redução de energia, por meio do fotoperíodo mais adequado para o cultivo de microalgas, são essenciais na viabilização do cultivo, gerando novos protocolos metodológicos para produção de biomassa algal (SIPAÚBA-TAVARES, 2013).

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avaliação geral das microalgas

O termo microalga é aplicado para descrever um conjunto diversificado de organismos fotossintéticos podendo conter espécies unicelulares ou multicelulares com ampla diversidade de características morfológicas e fisiológicas (BICUDO & MENEZES, 2016). As microalgas possuem rápido crescimento populacional, apresentando papel importante na ciclagem de nutrientes afetando também, no balanço do pH dos sistemas aquáticos pela remoção do dióxido de carbono, além da produção de oxigênio (HOFF & SNELL, 1997). As microalgas possuem alta capacidade fotossintetizante, capazes de converter a energia solar em biomassa, com alta eficiência, sendo esta quase cinco vezes maior quando comparada com a eficiência fotossintética de plantas arbóreas dentre outras (THOMAS et al., 1984). São extremamente resistentes às condições ambientais, destacadas como importantíssimas constituintes e produtoras primárias da cadeia trófica de um ecossistema, e, responsáveis pela maior produção de oxigênio presente na atmosfera terrestre (PRIYADARSHANI & RATH, 2012).

São organismos eucarióticos, compondo um grupo extremamente heterogêneo, possuindo uma distribuição biogeográfica por todo o mundo e podendo ser encontradas não só em ambientes aquáticos, como solos úmidos. A grande maioria é considerada organismos de vida livre e possuem a capacidade de formarem colônias, destaca-se o fato de algumas espécies serem capazes de viver em associação simbiótica com outros organismos (RAVEN, et al., 2001; TOMASSELI, 2004).

Esses organismos apresentam formas e tamanhos variados, as formas não móveis possuem uma tendência maior a afundarem, caso precisem permanecer na zona fótica para fixar fotossinteticamente razoáveis quantidades de carbono que compensem as perdas na respiração. Diante disso, quanto maior for o tempo que a microalga permanece na zona fótica, maior será o incremento potencial de biomassa desse organismo. Mediante isso, a saída definitiva dessa zona fótica significa a possível morte da microalga, ocorrendo, portanto, a liberação de nutrientes pela célula (SIPAÚBA - TAVARES & ROCHA, 2001).

O crescimento fototrófico das microalgas requer luz, CO₂, água, nutrientes, biomassa rica em lipídios, proteínas e açúcares (CECCHIN, et al., 2018). Considera-se que a disponibilidade de carbono orgânico geralmente provoca uma diminuição na concentração de clorofila e mudanças em outros pigmentos. O armazenamento de nitrogênio intracelular pode estar na forma de aminoácidos, compostos amino, nitrato, amônio, proteína e clorofila (WAGENEN, et al., 2015).

As taxas de crescimento das células das microalgas são afetadas por uma combinação de inúmeros fatores, dentre eles destacam-se a intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura e nutrientes, por entre outros. A intensidade luminosa é uma componente essencial da fotossíntese participando da etapa fotoquímica em que possibilita a síntese de oxigênio e de carboidrato a partir do dióxido de carbono (CORRÊA, 2015), sendo a intensidade luminosa um fator limitante que poderá acarretar mudanças no crescimento, bioquímica e metabolismo da microalga (JANSSEN et al, 2003). Tanto em ambiente natural como em sistemas de cultivo (“in door” ou “outdoor”), as microalgas sofrem influência de fatores bióticos e abióticos e de fatores operacionais em sistemas de cultivo (SIPAÚBA-TAVARES, 2013). A Tabela 1 mostra alguns desses fatores que interferem no desempenho da microalga.

TABELA 1. Fatores que influenciam na taxa de crescimento da microalga (LARSDOTTER, 2006).

Fatores	Parâmetros
Abióticos	Luz (qualidade, quantidade)
	Temperatura
	Concentração nutricional
	O ₂ , CO ₂
	pH
	Salinidade
	Toxicidade
	Patógenos (Bactérias, fungos, vírus)
Bióticos	Predação por zooplânctons
	Competição interespécies
Operacionais	Mistura
	Taxa de diluição
	Profundidade
	Adição de bicarbonato
	Frequência de coleta

As microalgas são consideradas como o maior grupo de organismos vivos e são comumente classificados de acordo com suas características morfológicas, cloroplastos e tipos de pigmentação, composição bioquímica, estrutura celular, ciclo de vida e a sequência genética (ANDERSEN & THRONDSSEN 2004).

Algumas estimativas calculam aproximadamente em torno de 40.000 espécies de algas presentes no mundo (WILSON, 1992). Segundo Menezes & Bicudo (2009) há em torno de 5.614 espécies já catalogadas no Brasil. Distribuídas em 3.689 espécies epicontinentais (164 Cyanobacteria, 50 Rhodophyceae, 10 Prasinophyceae, 700 Chlorophyceae, 875 Charophyceae, 370 Euglenophyceae, 42 Dinophyceae, 20 Cryptophyceae, 1200 Bacillariophyceae, 10 Raphidophyceae, 2 Prymnesiophyceae, 14 Chrysophyceae, 40 Synurophyceae, 62 Xanthophyceae), e 1.925 marinhas (164 Cyanophyceae, 455 Rhodophyceae, 2 Prasinophyceae, 223 Ulvophyceae, 6 Euglenophyceae, 296 Dinophyceae, 653 Bacillariophyceae, 2 Raphidophyceae, 92 Phaeophyceae, 27 Prymnesiophyceae, 5 Dictyocophyceae) (Figura 1).

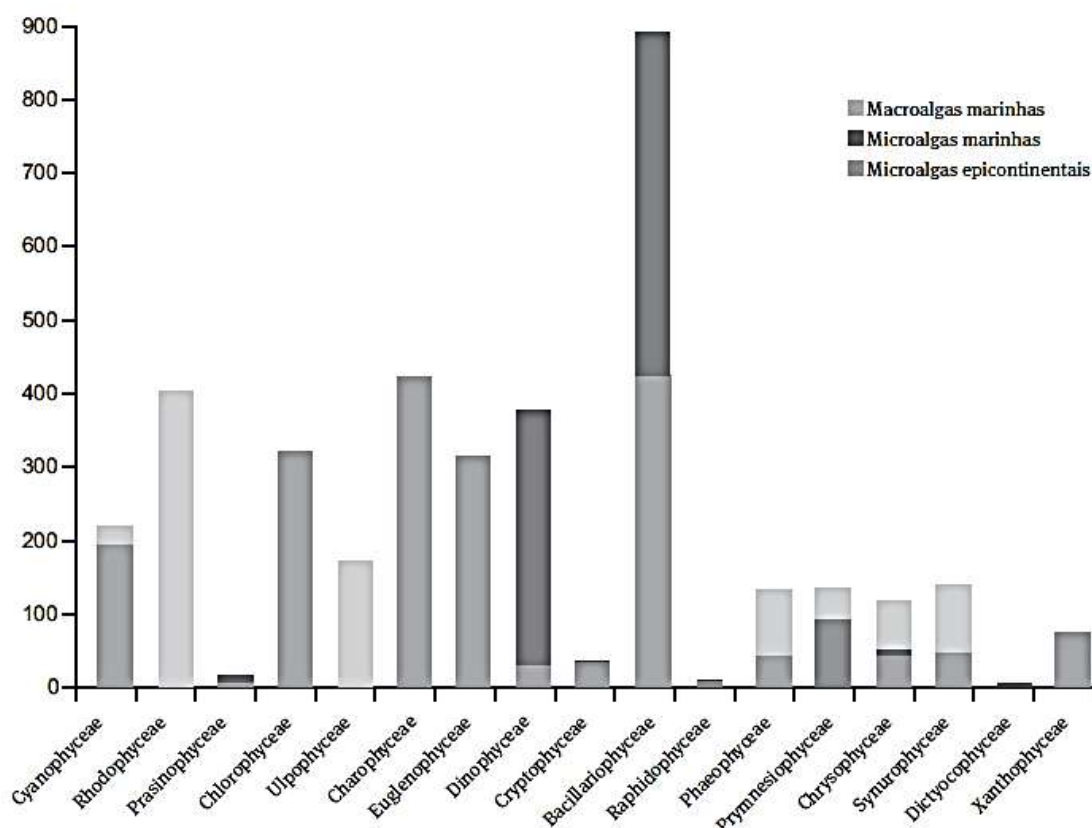


FIGURA 1. Número de espécies de algas, ordenado por ambiente e classe taxonômica (BICUDO et al., 2010).

Existe uma enorme diversidade de gêneros e espécies que agrupam as microalgas em uma determinada classe de acordo com suas características e ao sequenciamento genético, no passado a divisão por classes era baseada no tipo de pigmento e não nos aspectos de estrutura biológica e bioquímica (BEN-AMOTZ et al., 2009) (Tabela 2).

TABELA 2. Número de gêneros, espécies, categorias infraespecíficas e táxons endêmicos de algas, ordenado por classe taxonômica (BICUDO et al., 2010).

CLASSES	GÊNEROS		ESPÉCIES		SUB-ESPÉCIES		VARIEDADES	
	TOTAL	ENDÊMICOS	TOTAL	ENDÊMICAS	TOTAL	ENDÊMICAS	TOTAL	ENDÊMICAS
Cyanophyceae	89	0	208	3	0	0	1	0
Rhodophyceae	153	2	402	6	3	0	14	2
Prasinophyceae	8	0	15	0	0	0	0	0
Chlorophyceae	88	0	319	2	0	0	80	0
Charophyceae	35	0	419	11	3	0	279	19
Euglenophyceae	20	0	311	13	0	0	213	15
Dinophyceae	65	0	374	0	0	0	0	0
Cryptophyceae	9	0	35	3	0	0	2	0
Bacillariophyceae	163	0	888	5	0	0	320	0
Raphidophyceae	6	0	9	0	0	0	0	0
Prymnesiophyceae	46	0	93	0	0	0	0	0
Chrysophyceae	17	0	43	3	0	0	2	0
Synurophyceae	3	0	42	0	0	0	15	1
Xanthophyceae	28	0	71	2	0	0	4	0
Phaeophyceae	48	0	94	2	0	0	14	0
Ulvophyceae	49	0	170	2	2	0	23	0
Dictyocophyceae	2	0	4	0	0	0	0	0

As microalgas por serem fontes de micronutrientes, vitaminas, óleos e elemento traço para toda comunidade aquática, são de grande importância na produção e balanço de oxigênio dissolvido na água, no uso como alimento e nas diversas áreas da indústria e da agroindústria. Algumas espécies de microalgas chegam a absorver dez vezes mais carbono quando comparada com espécies de plantas terrestres (CHISTI, 2007).

Assim, o interesse no cultivo de microalgas vem crescendo muito nos últimos anos em função do múltiplo uso desses microrganismos incrementando o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados e viabilizando protocolos metodológicos na produção de biomassa algal (SIPAÚBA-TAVARES, 2013).

2.2 Importância da luz no cultivo e manutenção das microalgas

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

Em cultivo laboratorial são comumente utilizadas luzes artificiais que são de fácil controle, com maior incidência e homogeneidade no cultivo, já que a iluminação ao atingir todos os ângulos do recipiente propicia oportunidade às células absorverem mais energia para a fotossíntese. Com o controle da luminosidade é possível retardar ou acelerar o crescimento da microalga, modificando os metabólitos gerados (SIPAÚBA- TAVARES & ROCHA, 2001). Sob alta intensidade luminosa os pigmentos são, em sua maioria, produzidos em maior quantidade e modificam sua função de pigmento acessório para proteção da clorofila-a, estabilizando o aparato fotossintetizante. Além disso, as espécies de microalgas podem utilizar a alta disponibilidade de luz para acumular lipídio e proteína, incrementando a taxa de crescimento em resposta ao estresse (KRZEMIŃSKA et al., 2015). Entretanto, se a microalga for exposta ao excesso de luminosidade, em que seu sistema de defesa não seja mais efetivo, poderá ocorrer a foto-inibição, ou seja, a inibição da fotossíntese provocada pelo excedente de luz. Além disso, a abundância de luminosidade poderá gerar a foto-oxidação, provocado pela formação de peróxido de hidrogênio, ocasionando a morte das células (CORRÊA, 2015).

A escolha do regime de cultivo (fotoautotrófico, heterotrófico ou mixotrófico) é uma ferramenta que pode auxiliar no desenvolvimento da microalga, no entanto, algumas microalgas não têm desempenho satisfatório em um fotoperíodo com ausência de luz. A iluminação e o uso de ciclos de luz, também são fatores que podem acelerar ou reduzir as taxas de crescimento e alterar a composição bioquímica da microalga cultivada (CORRÊA, 2015). O cultivo em condições fotoautotróficas tem como principal característica a necessidade de iluminação. Nesta condição de cultivo é comumente adotada em 12 horas de

escuro e 12 horas de luz, ou 8 horas de escuro e 16 horas de luz, ou contínua 24 horas de luz, de acordo com cada espécie e a forma com que se adequa a cada ciclo de luz (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

A luz é um dos mais importantes parâmetros que afetam o crescimento algal. A intensidade da luz e o fotoperíodo desempenham um papel importantíssimo para o crescimento e distribuição das algas, variando os requisitos e especificidades para cada espécie. As condições e densidade das culturas de produção das algas, somado ao regime de luz, incluindo flutuações na intensidade e fotoperíodo, são um dos principais fatores que influenciam o crescimento e a composição bioquímica das microalgas (WAHIDIN et al., 2013).

Fotoperíodos ou ciclos claro/escuro em diferentes fases de crescimento apresenta efeito significativo na composição lipídica das algas, conforme demonstrado por Brown (1996). Considerando o fato de que a quantidade e qualidade de luz determinam a energia disponível aos organismos fotossintéticos para que possam conduzir suas atividades metabólicas (LATASA, 1995).

Diversos estudos com vários grupos de microalgas sugerem que em resposta ao aumento ou diminuição da intensidade da luz, diversos pigmentos, ácidos graxos insaturados, carboidratos e conteúdo de proteínas mudam nesses organismos (BOULUS et al., 2007).

Considera-se que a luz e a energia química, atuam juntas como formas de auxiliar no aumento da concentração da biomassa no cultivo. Somado a isso, tem sido estudado que o lipídio metabolizado na microalga é afetado pelas mudanças nas fontes de carbono, na intensidade de luz e nos fotoperíodos (MONDAL et al., 2017). Inúmeros estudos descrevem os impactos dos ciclos claro/escuro na produção microalgal, dentre estes, podemos destacar o desenvolvido por Eppley et al. (1974) em que descreveram oscilações na densidade celular em cultivos com limitação por nitrogênio com ciclos de claro/escuro. Sistemas de produção em larga escala principalmente, em ambientes abertos, aproveitam a incidência natural de luz solar (YOO et al., 2010).

Uma solução para otimizar o cultivo de algumas espécies de microalgas é o uso de ciclos de luz (claro/escuro) que desempenham importante função e são diretamente ligados a síntese de compostos orgânicos e no consumo dos nutrientes, afetando diretamente a taxa de crescimento e produtividade de acordo

com o tempo de fotoperíodo (SINGH et al., 2015). Ciclos de luz (claro/escuro) apresentam interações diretas com o metabolismo celular, taxa de absorção e controle de fótons, interações com o aparato fotossintético e a dinâmica energética das microalgas (TAKACHE et al., 2015).

Um dos pilares mais importantes no cultivo de microalgas é o controle da iluminação artificial fluorescente. Para isso, uma luz adequada para cada espécie deve ser implementada em seu respectivo ambiente de cultivo. A luz difusa geralmente é insuficiente para proporcionar crescimento adequado das microalgas, exceto espécies com afinidades por ambientes de baixa intensidade de luz, como por exemplo, Cyanobacteria (JEFFREY et al., 1997). Poderão ser utilizadas como formas de iluminação a luz fria, a luz branca quente ou luz do dia (LOURENÇO, 2006).

A luz é considerada o principal fator que afeta o crescimento das microalgas em ambientes controlados, porém, fatores físicos e químicos como temperatura e disponibilidade de nutrientes também interferem no desenvolvimento das microalgas (BROWN et al., 1997).

A luz atua como fonte de energia em sistemas de cultivo e a intensidade a ser utilizada é de grande importância na produtividade algal sendo que a taxa de luminosidade fotossinteticamente ativa nas microalgas encontra-se nos comprimentos de onda entre 400 a 750nm (WILHELM & JAKOB, 2011).

Os fótons são fontes de energia celular e a intensidade da luz regula a mudança entre o metabolismo autotrófico e heterotrófico, geralmente um dos fatores limitantes e, para cada célula há uma intensidade luminosa e intervalos de comportamento de onda eficazes que induzem a biomassa algal (PULZ & SCHENIBEN-BOGEN, 1998).

2.3. Aspectos gerais do cultivo de microalgas

Nos cultivos de microalgas, nutrientes devem ser utilizados nas formulações dos meios de cultura, como fontes de carbono, nitrogênio, micronutrientes, vitaminas e oligoelementos (SINGH et al., 2015). Dentre estes elementos disponíveis no meio de cultura, alguns são considerados nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. O fato de determinado elemento estar presente na composição da microalga não indica que este elemento seja

essencial para o seu desenvolvimento. Os elementos são considerados essenciais quando sua deficiência afeta diretamente o metabolismo algal, sendo esse elemento insubstituível para o desempenho de determinada função metabólica, e este elemento deve estar diretamente ligado a nutrição da microalga independente de seus efeitos de otimização de cultivo (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Atualmente, diversas espécies de microalgas são produzidas comercialmente, favorecendo financeiramente diversas áreas, tais como a aquicultura, indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos, dentre muitos outros (METTING et al., 1988).

As microalgas se reproduzem muito rapidamente, acabam gerando produtos em um curto período de tempo devido à elevada biomassa. A produtividade da microalga pode ser de 10 a 100 vezes maior do que os cultivos agrícolas tradicionais, chamando a atenção de setores que necessitam de grandes quantidades de matéria-prima, tais como o setor de biocombustíveis. (LOURENÇO, 2006).

As culturas de microalgas podem ser axênicas, ou seja, cultura com apenas uma única espécie ou cepa e livre de todos os contaminantes; e não-axênicas, são culturas desprovidas ou não de bactérias ou fungo. Para o cultivo adequado e duradouro das microalgas deve ser aplicada técnicas de isolamento, purificação e manutenção das cepas, além de um amplo conhecimento sobre a fisiologia das espécies, ciclos de vida, fotoperíodos, bioquímica, dentre muitas outras características. Por meio disso, condições favoráveis de cultivo podem ser implementadas por especialistas na área visando uma otimização da produção de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Em geral, o inóculo da microalga vem de uma população natural coletada com material específico. O isolamento das células passa por vários processos de lavagem (6 a 12 vezes) utilizando ponta da micropipeta ou capilar e colocado em placas de vidro escavada contendo o meio de cultura comercial específico para a microalga em questão. Todo esse procedimento é realizado sob um microscópio e o material é esterilizado em autoclave antes do uso para o isolamento da microalga (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Para assegurar a homogeneidade, as culturas devem ser iniciadas de um clone preparado de uma única célula, ou de um simples filamento de poucas células, ou de um pedaço de talo (HOFF & SNELL, 1997).

Após a lavagem e separação das células em cada depressão da placa escovadas, deve ser verificado cuidadosamente se não ocorre contaminação, fazer várias lavagens com meio específico para a microalga, sempre sob um microscópio. Posteriormente, cada célula é colocada em tubo de ensaio quando o meio de cultura é líquido, quando sólido em placas de Petri e, deixar crescer no cepário sob iluminação e temperatura adequadas para a microalga. Caso seja necessário, aumentar o volume da cultura, esse tem que ser gradativo até o volume desejado. (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001)

Todo esse processo passa sempre por uma assepsia, para evitar contaminação. Em ambiente “indoor” (laboratório) os volumes são menores do que o “outdoor” (sistema aberto), e a contaminação também é menor, pois todo o material passa pela Câmara de assepsia e também, a vidraria utilizada é esterilizada em autoclave. (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). A Figura 2, mostra os diferentes equipamentos e materiais utilizados na separação do clone e manutenção da cultura em laboratório.

Importante ressaltar que em um cultivo de microalgas deve ter sala específica para manutenção das cepas. No laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, localizado no CAUNESP, esta sala contém cepas em tubo de ensaio e também, em diferentes volumes que variam de 10ml a 13L, com temperatura e luz adequada para manutenção das microalgas cultivadas. O volume em que são mantidas as microalgas vai depender do tipo de procedimento realizado. Neste laboratório, existem duas espécies de Chlorophyceae (algas verdes) *Messastrum gracile* e *Haematococcus pluvialis*, a aeração dos meios é constante para disponibilidade de CO₂, evitar a sedimentação das microalgas no fundo do recipiente e, conseqüentemente, a morte das células (SIPAÚBA-TAVARES, 2013) (Figura 3).

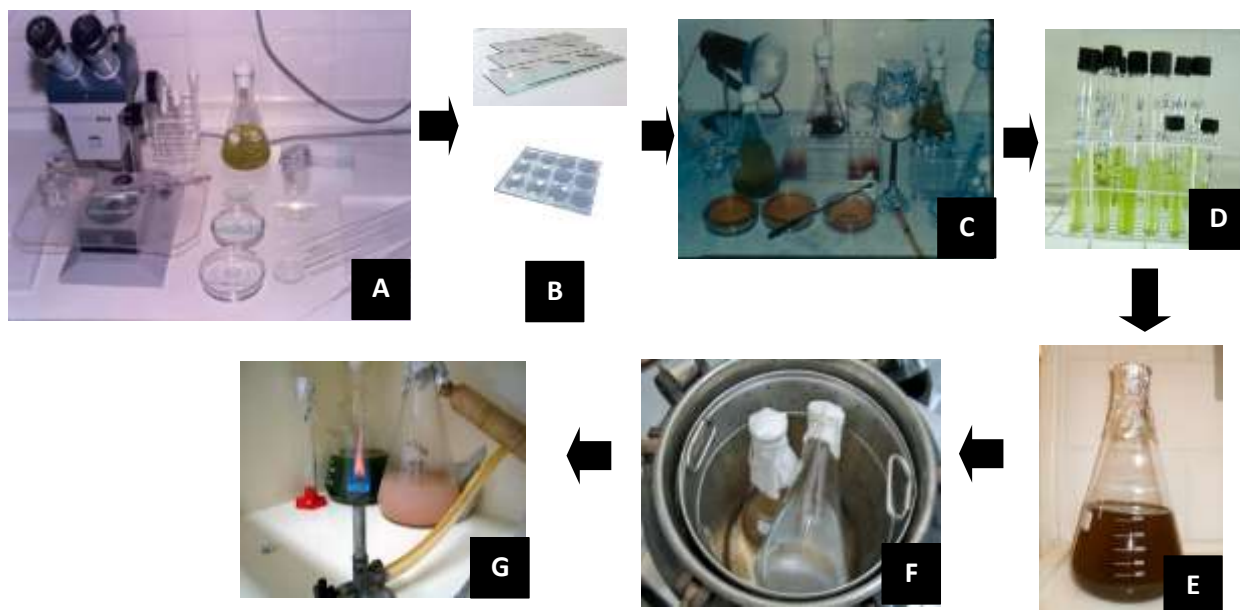


FIGURA 2. Equipamentos e materiais utilizados na separação e manutenção das microalgas em sistema de cultivo, onde: (A) Microscópio, placa de petri, capilar, tubos de ensaio, entre outros; (B) Lâminas escavadas; (C) Microalgas separadas em meio sólido e líquido; (D) Microalgas em tubos de ensaio com meio de cultura líquido; (E) Microalga em erlenmeyer de 2L em meio líquido; (F) Autoclave para esterilização dos meios de cultura; (G) Câmara de assepsia contendo os meios de cultura com bico de bunsen. (Imagens cedidas pela Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).

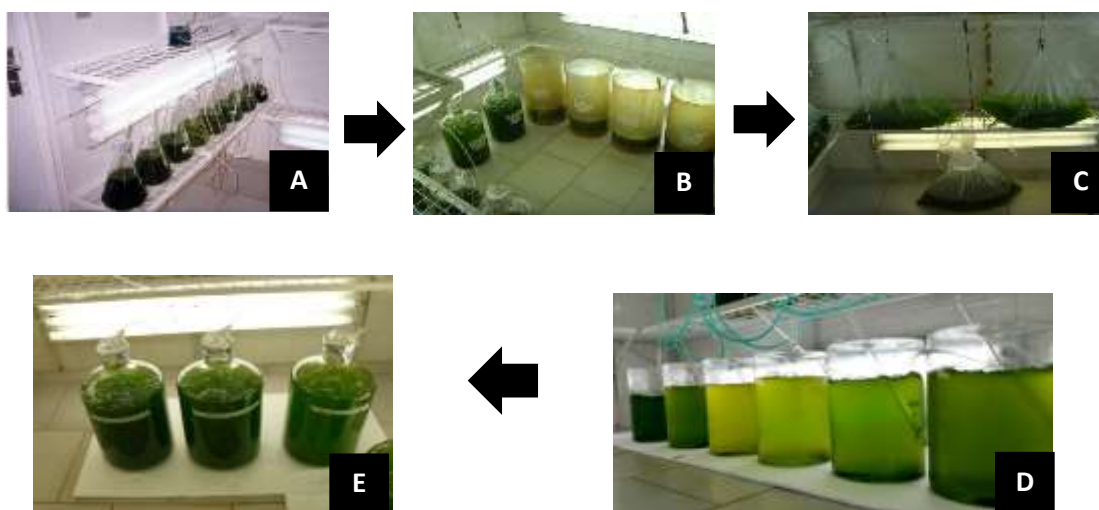


FIGURA 3. Imagens do cepário do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Caunesp), onde: (A) cultivo em volume 2L; (B) cultivo em "Carboy" de vidro e cubas de fibra de vidro transparente; (C) cultivo em saco plástico; (E) cultivo em Carboy de vidro; (D) cultivo em cuba de vidro. (Imagens cedidas pela Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).

A partir do cultivo microalgal obtêm-se os produtos metabólicos tais como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídeos (DERNER et al., 2006; MALLICK et al., 2012; SPOLAORE et al., 2006). Para um cultivo efetivo em laboratório, faz-se necessário a adequação dos fatores físicos, de nutrição e químicos para a otimização do crescimento da microalga. Em relação aos fatores físicos entre os principais estão a luz, a temperatura e a aeração; entre os fatores de nutrição, pode citar o carbono, nitrogênio, fósforo, sílica, ferro e micronutrientes; e os fatores químicos, destaca-se o controle adequado do pH (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

No cultivo aberto “outdoor” a luz é natural, já no cultivo em laboratório (cultivo “indoor”) a luz pode ser por lâmpadas de led; por luz filtrada quando se tem uma parede de vidro ou acrílico ou quando o cultivo é dentro de uma estufa coberto por material transparente facilitando a penetração de luz. Em cultivo “indoor” os tanques ou recipientes para produção em larga escala são transparentes possibilitando a penetração de luz (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

A penetração da luz durante o cultivo é um relevante fator para o cultivo em massa, pois sua incidência durante a produção algal pode ser insuficiente para a realização da fotossíntese sendo neste caso muito importante a forma e a profundidade do recipiente para que a incidência da luz possa penetrar de forma adequada para o vigoroso crescimento da microalga (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

A temperatura é capaz de alterar significativamente a taxa metabólica dos organismos, e a maioria das algas cultivadas desenvolvem-se entre 10°C e 35°C, com um ótimo crescimento próximo da variação de temperatura 15°C e 25°C. Em cultivos controlados, os meios de cultura possuem os nutrientes necessários para o crescimento adequado das espécies de microalgas. O crescimento adequado da microalga em meio de cultura é dependente do balanço de nutrientes e a adição de complexo vitamínico (KAEWPINTONG et al., 2007).

A grande maioria das microalgas apresenta rápido crescimento quando em condições adequadas de cultivo. No entanto, durante o seu crescimento passam por uma fase de adaptação às condições de cultivo para depois aumentar a biomassa até um determinado ponto, onde o meio diminui as reservas de macro e micronutrientes devido à absorção da microalga e, esta tende primeiramente, a

reduzir e posteriormente, estabilizar o crescimento para em seguida declinar pois não existe nutrientes no meio de cultura suficiente para manter elevada biomassa. Assim, o crescimento da microalga apresenta 5 fases distintas que são (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001):

- *Fase de indução ou lag*: maioria das células é considerada viável, porém não estão em condições para se dividirem. Neste caso necessita-se do equilíbrio do ácido glicólico ($\text{CH}_2\text{OH.COOH}$) no meio para que os produtos da fixação do carbono se tornem disponíveis ao crescimento;
- *Fase exponencial ou log*: as células estão se dividindo de forma regular em uma taxa constante, sendo que esta taxa varia de acordo com a espécie e nesta fase a taxa de crescimento é máxima;
- *Fase de redução do crescimento*: as células desses organismos requerem nesta fase maior tempo para a duplicação celular, e isso faz com que reduza a taxa de crescimento. Principalmente, devido à diminuição na disponibilidade de nutrientes do meio, fatores ambientais (pH, temperatura, etc.) reduzindo por consequência a atividade fotossintética. Esta fase também poderá ocorrer por conta da elevação da densidade populacional, o que acarreta um auto-sombreamento por conta da disponibilidade de luz para cada unidade celular;
- *Fase estacionária*: a população microalgal não aumenta, por conta da taxa de crescimento ser compensada pela taxa de mortalidade. Podemos considerar que a exaustão de nutrientes (Nitrato, Ferro e Fosfato), ou até mesmo por conta da diminuição do CO_2 ou do O_2 , além disso, até mesmo a alteração no pH do meio.
- *Fase senescente ou de declínio*: fase que apresenta maior taxa de mortalidade do que a taxa de reprodução.

Na Figura 4 segue o desenho esquemático da curva de crescimento das microalgas com as diferentes fases e a demonstração da biomassa algal ao longo da curva de crescimento.

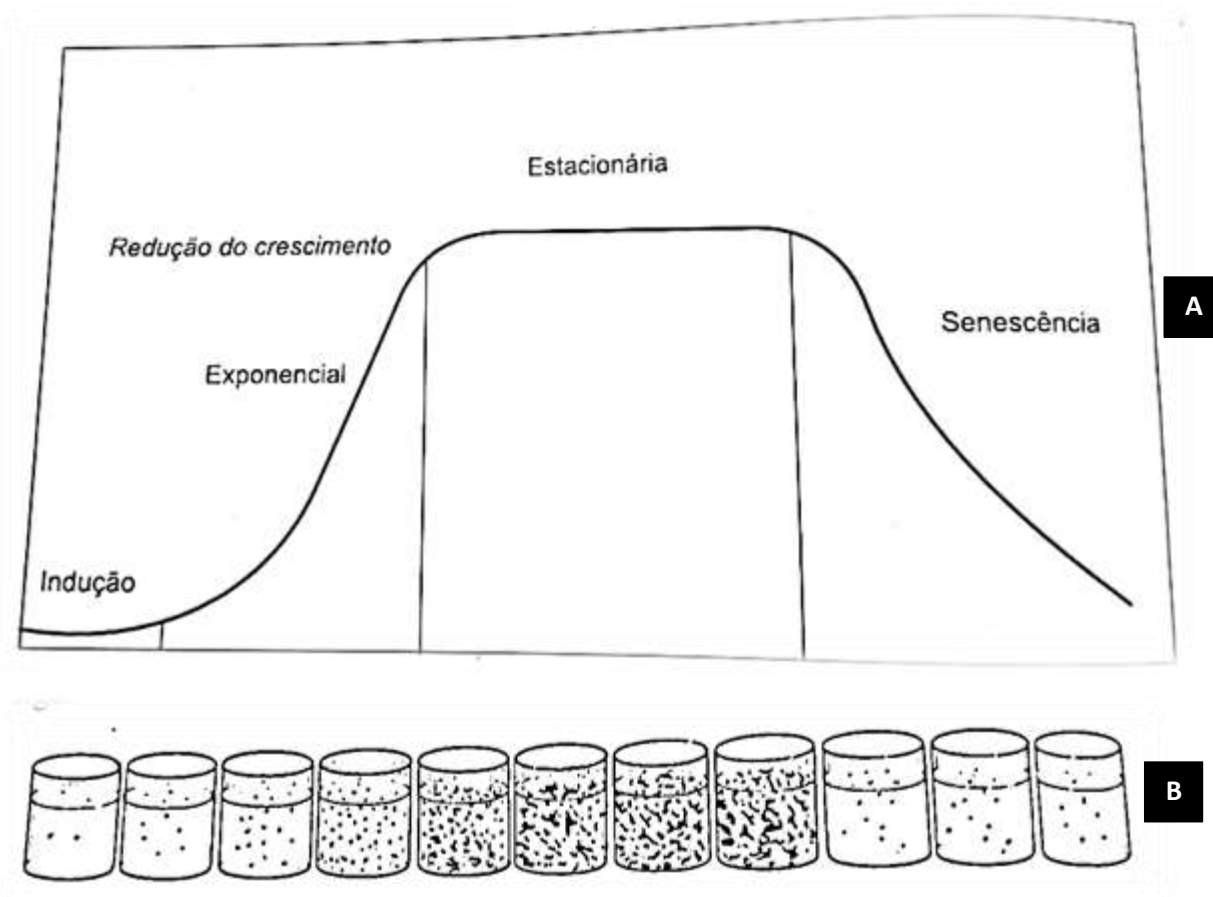


FIGURA 4. Diferentes fases da curva de crescimento da microalga (A); e a respectiva biomassa em cada fase da curva (B). (Adaptado de Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001).

2.4. Meio de cultura

A produção biotecnológica de microalgas é mundialmente conhecida como uma das maiores fontes de diferentes produtos naturais, na produção de proteínas, vitaminas, e minerais entre outros. Para isso, são necessários meios de cultura em larga escala, equipamentos adequados e pessoas qualificadas para atingir uma ótima produção, aumentando cada vez mais o custo da produção. Visando isso, faz-se necessário estudos que investigam a utilização de formas alternativas capazes de disponibilizar diversos nutrientes para o cultivo microalgal, reduzindo o custo da produção (CABRALES & GONZÁLES, 2004).

Um dos maiores problemas nos sistemas de cultivo de microalgas é o elevado custo de produção dos meios de cultura utilizados, sendo assim, o uso

de meios de cultura alternativos têm sido propostos como forma de reduzir os custos de produção e substituir as formulações comerciais que são produzidas a partir de reagentes, obtendo condições similares em relação ao desenvolvimento, crescimento e valor nutricional. Algumas técnicas e metodologias podem ser empregadas no cultivo de microalgas afim de reduzir o tempo e manter uma densidade celular adequada. O uso de meios de cultura alternativos além de reduzir os custos de produção, pode fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento da microalga e auxiliar na máxima produtividade. Alguns autores evidenciam que o uso de fertilizantes inorgânicos na formulação de meios de cultura é uma fonte viável e de baixo custo, atuando de forma eficiente no desenvolvimento de algumas espécies de Chlorophyceae, uma vez que estes fertilizantes apresentam concentrações conhecidas e elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio (CAMPAÑA-TORRES et al., 2012).

Existem cerca de 30 elementos essenciais para o crescimento e composição química das microalgas, sendo que a quantidade e os elementos irão variar conforme a espécie cultivada (SANTOS & PIRES, 2018).

O meio específico para cada espécie de microalga, vendido no mercado denominado meio comercial, irá depender do tipo de ambiente que a espécie provém. Àquelas provenientes de ambientes mais eutróficos como algumas Chlorophyceae, o meio comercial CHU₁₂ contém nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2020).

Mesmo que cada espécie tenha um requerimento de macro e micronutrientes diferentes nos diversos sistemas de cultivo existentes, de modo geral os compostos limitantes em relação ao crescimento celular das microalgas são carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e ferro (Fe) (GONÇALVES et al., 2019).

O balanço de nutrientes varia de acordo com as condições de cultivo, podendo ou não serem considerados fatores limitantes ou controladores. A microalga utilizada neste trabalho, *Messastrum gracile* (Chlorophyceae), comumente cultivada em meio CHU₁₂, também pode ser cultivada em meio de fertilizante inorgânico (20:5:20) de extrato de macrófita (ME) (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2011; 2017; 2018; TEDESQUE et al., 2021).

Meios a base de fertilizantes inorgânicos como o NPK, tem sido utilizado amplamente com resultados similares ou melhores que o meio CHU₁₂, promovendo elevada biomassa e valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999, 2011, 2015, 2017, 2020; TEDESQUE et al., 2021).

Outro meio alternativo que tem promovido um ótimo crescimento, valor nutricional e de baixo custo, é o meio com extrato de macrófita (ME) desenvolvido no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

O uso de planta aquática em substituição aos meios de cultura comerciais pode ser uma ferramenta adotada por conter elevadas concentrações de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco entre outros compostos, disponibilizando diretamente para às células das microalgas e possibilitando o seu uso como meio de cultura (SAHU, 2002; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2015, 2017).

Vários trabalhos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011, 2015, 2017, 2018, 2020; TEDESQUE et al., 2021) demonstraram a eficácia da planta aquática *Eichhornia crassipes* como meio de cultura para as microalgas *Messastrum gracile* e *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae).

As plantas aquáticas possuem uma diversidade de funções atuando como produtores primários; servem de alimento para peixes, aves, mamíferos aquáticos; liberadores de nutrientes no ambiente por meio da sua decomposição; são berçário para uma vasta diversidade de organismos e microrganismos aquáticos ou que vivem na coluna d'água; proporcionam sombreamento, o que é fundamental para a proteção dos organismos contra as altas intensidades de radiação solar; possuem importância econômica (fertilizantes, meios de cultura, recuperação de ambientes eutrofizados, matéria prima para remédios e utensílios, plantas ornamentais em lagos artificiais, etc.); podem ser hospedeiras de bactérias fixadoras de nitrogênio e por fim são fundamentais para a manutenção da biodiversidade de diversos ambientes presentes nos ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 2011).

A planta aquática *Eichhornia crassipes* pertence à família Pontederiaceae, sendo característica das regiões tropicais e, particularmente conhecida como aguapé, baronesa e ou camalote (MUKUNO, 1985) (Figura 5).



Figura 5. Imagem da planta *Eichhornia crassipes*. Fonte: <<https://www.ufrgs.br/flora/Campestre/eichhornia-crassipes-aguape/>>.

Microalgas crescidas em meio de cultura com disponibilidade ampla de nutrientes são bem diferentes de ambientes com nutrientes limitados. O crescimento das microalgas e o valor nutricional são resultados do tipo de condição de cultivo com um meio de cultura que forneça nutrientes suficientes para o desenvolvimento de elevada biomassa (UGWU et al., 2008).

O uso do meio de macrófita tem que levar em conta alguns cuidados como o local de coleta da planta, pois como produtora primária absorve da água grande parte dos compostos presentes. Assim, recomenda-se o cultivo desta planta em local apropriado e limpo para uso como meio de cultura. Em relação ao meio com extrato de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009) e o meio CHU₁₂ (CHU, 1942) segue na Tabela 3 a composição dos macro e micronutrientes.

TABELA 3. Composição (gL⁻¹) dos nutrientes e vitaminas nos meios CHU12 e extrato de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Constituintes	NPK (gL ⁻¹)	CHU12 (gL ⁻¹)	*Macrófita + NPK (gL ⁻¹)
P ₂ O ₅	2,5	-	-
K ₂ O	10	-	-
N	10	-	0,095
P	-	-	0,091
C	-	-	0,199
Mn	-	-	0,06
Mg	-	-	0,003
Fe	-	-	2,18
K	-	-	0,056
Ca	-	-	0,001
Cu	-	-	0,05 mg
Vit B ₁ (tiamina)	0,007	-	0,007
Vit B ₂	0,007	-	0,007
Vit B ₆	0,005	0,085	0,005
Vit B ₁₂	33 µg	-	33 µg
Vit H (biotina)	0,01 mg	-	0,01 mg
Ca(NO ₃) ₂	-	3,0	-
Na ₂ CO ₃	-	2,0	-
KCL	-	0,5	-
K ₂ SiO	-	0,5	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	7,5	-
K ₂ HPO ₄	-	0,5	-
FeCl ₃	-	0,05	-

- = Não presente no meio.

Existem uma enorme diversidade de meios de cultura no entanto, o meio a ser utilizado é aquele em que a microalga cultivada melhor se adapta. Alguns meios alternativos utilizados no cultivo como: resíduos de vinhaça da cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1995), esgoto doméstico (PIPES & GOTAAS, 1960), despejos industriais tratados (JUSSIAC et al., 1984), resíduos de suinocultura (FIORESI & SIPAÚBA-TAVARES, 2008; TRAVIESO et al., 2006), efluentes de biodigestores (RODULFO, 1980), entre outros.

Em cultivos controlados, os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento de cada espécie, sendo o nitrogênio, fósforo e potássio, fundamentais na maioria dos meios, tanto para espécies de água doce como para as espécies marinhas (YAMAGUCHI, 2008).

2.5 Aplicações e produção de microalgas

A cultura de microalgas em laboratório tem cerca de 140 anos (BOROWITZKA, 2013), e na década de 50 o cultivo microalgal em larga escala começou a se estabelecer, com o objetivo na produção de proteína, sendo que um dos primeiros pesquisadores a cultivar microalgas para uso na alimentação foram Spoehr & Milner (1949) e Cook (1951). Já nos anos 1955 e 1970, houve um impulso no cultivo microalgal, em função das pequenas construções de laboratórios, com cultivo dos gêneros *Chlorella* sp. e *Senedesmus* sp. de fácil produção de biomassa e posteriormente a produção microalgal foi ganhando espaço em várias partes do mundo. (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

O Brasil, além do fato de apresentar rica diversidade de microalgas, possui uma área extremamente favorável para o cultivo desses microrganismos, sendo importante na bioprodução, incrementando a economia deste setor (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016).

Para se obter sucesso no cultivo de microalgas é necessário conhecer a morfofisiologia, o metabolismo e as condições ideais de cultivo para cada espécie, visando otimizar o cultivo (processo ou produto), determinando especialmente os fatores que controlam o crescimento e o metabolismo (SOUZA, 2016).

Visando a produção em massa de microalga em sistema fotoautotrófico, na década de 70, Goldman impulsionou a tecnologia na produção de microalgas marinhas. No Japão, a produção microalgal cresceu após a segunda guerra mundial, trazendo subsídios para a bioengenharia no cultivo de *Chlorella* (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Israel, na década de 50 adicionou no cultivo em larga escala a utilização de CO₂, a circulação e a luz artificial. Na França, a produção esteve voltada para a obtenção de pigmentos excretados pela *Spirulina* sp. Na Rússia, há uma maior produção de *Chlorella* sp., juntamente com as algas azuis tais como a *Anabaena variabilis* e *Spirulina platensis*. Já no Brasil, o cultivo de microalgas marinhas inicialmente ocorreu por volta da década de 80, e, no caso das espécies de água doce grande parte estão voltadas para o cultivo laboratorial, dando suporte para inúmeras pesquisas (GIANI, 1991; SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; MACEDO, 1999).

No ano de 1999, a produção microalgal com destino à utilização na aquicultura alcançou 1.000 t em relação à produção mundial de organismos aquáticos, esta produção proporcionou um total de 43×10^6 t para animais e plantas (MULLER-FEUGA, 2004).

Diante do amplo mercado de produtos derivados das microalgas, por volta dos anos de 2004 a 2013, a produção anual mundial de biomassa microalgal triplicou, atingindo uma marca de 15 mil toneladas/ano (peso seco) (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016).

As microalgas devido sua ampla utilização podem ser fornecidas como, alimento à porcos, aves domésticas, ruminantes, componentes para rações, auxiliam na cultura microbiológica, cultivos industriais, além de serem excelentes estimulantes do crescimento de plantas (principalmente, por conta da presença de hormônios: auxinas, giberelinas, citoquinina, entre outros). Diante dos diversos exemplos, os gêneros mais utilizados são *Chlorella* e *Scenedesmus* na estimulação do crescimento de leveduras (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Há diversas alternativas na utilização da cultura microalgal, além de fins alimentícios, podemos destacar a biologia da conservação da energia solar (estocagem de energia), fermentação (produção de metano), tratamento de águas residuais, extração de diversos produtos, tais como alginas, pigmentos, e somado a isso podemos destacar a aquicultura (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Uma outra aplicabilidade das microalgas é a produção de biocombustível que já vem se desenvolvendo desde 1970, em função da alta produção de lipídeos pelas microalgas. Os óleos sintetizados no interior das células algais ao serem extraídos podem ser utilizadas em processos de transesterificação e obtenção de biodiesel (GONG & JIANG, 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Em princípio, a queima dos biocombustíveis não interfere no balanço do gás carbônico da atmosfera, pois as plantas consomem, em sua formação, através da fotossíntese, a mesma quantidade de CO₂ que irão liberar quando de sua utilização como combustível. (CARVALHO, 2006). Com isso, a emissão líquida de gases do efeito estufa, por meio dessa forma de combustível, pode ser próxima de zero, destacando, sua importância (DEFANTI et al., 2010).

A Figura 6 evidencia alguns produtos que podem ser extraídos do cultivo de microalgas, sendo que a cada dia novas descobertas são encontradas devido ao uso múltiplo desses microrganismos.

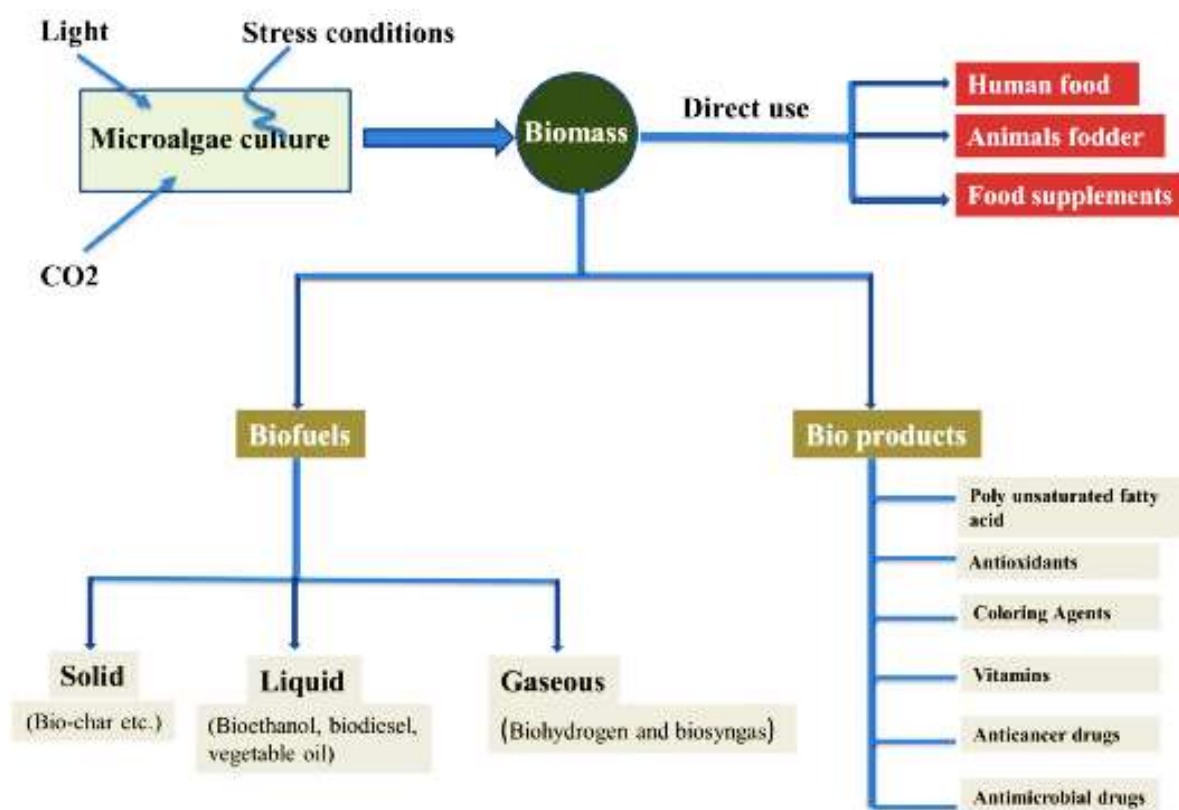


FIGURA 6. Bioprodutos provindos do cultivo de microalgas (KHAN et al., 2018).

Outros benefícios provindos desta produção, podem ser a menor área de cultivo em relação a outras culturas (como a soja), a ausência de competição com a produção de alimentos e a possibilidade de usar efluentes industriais e urbanos na produção (SCHENK, et al., 2008).

A maior parte da biomassa microalgal tem sido uma ótima fonte para a produção de diversificados produtos, como por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), carotenóides, ficobiliproteínas, polissacarídeos e fitotoxinas. Entretanto, a alta capacidade de produção de proteína por meio das microalgas, tem servido de base para a suplementação e nutrição humana, aquicultura e fins nutracêuticos (DEL CAMPO et al., 2007).

A expectativa é que a produção de microalgas no mundo continue a crescer nos próximos anos, levando ao aumento de escala dessa indústria e à superação

dos gargalos atuais. O ganho de escala, por sua vez, possibilitaria o abastecimento de mercados maiores (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016).

Com o desenvolvimento da ciência por meio de pesquisas e tecnologias, espera-se que muitas microalgas possam em sistema fechado se tornar cada vez mais produtivas e especializadas para atender às demandas biotecnológicas. Os desafios tecnológicos atuais consistem principalmente, no melhoramento genético de cepas, no desenvolvimento de métodos eficientes de cultivo e na otimização dos processos de colheita (COLLINS & CRITCHLEY, 2005).

Algumas microalgas mostram elevadas eficiências em retirar nutrientes ou outros elementos químicos do meio aquoso, apresentando potencial para sua aplicação em ensaios de recuperação de ambientes aquáticos (MIASHIRO, 2008). As microalgas podem ser utilizadas na recuperação de águas residuais e, posteriormente, a sua biomassa utilizada em outras aplicações industriais, agrícolas, na produção de biodiesel dentre muitos outros destinos (SILVA, 2007; EIBL et al., 2014) (Figura 7).

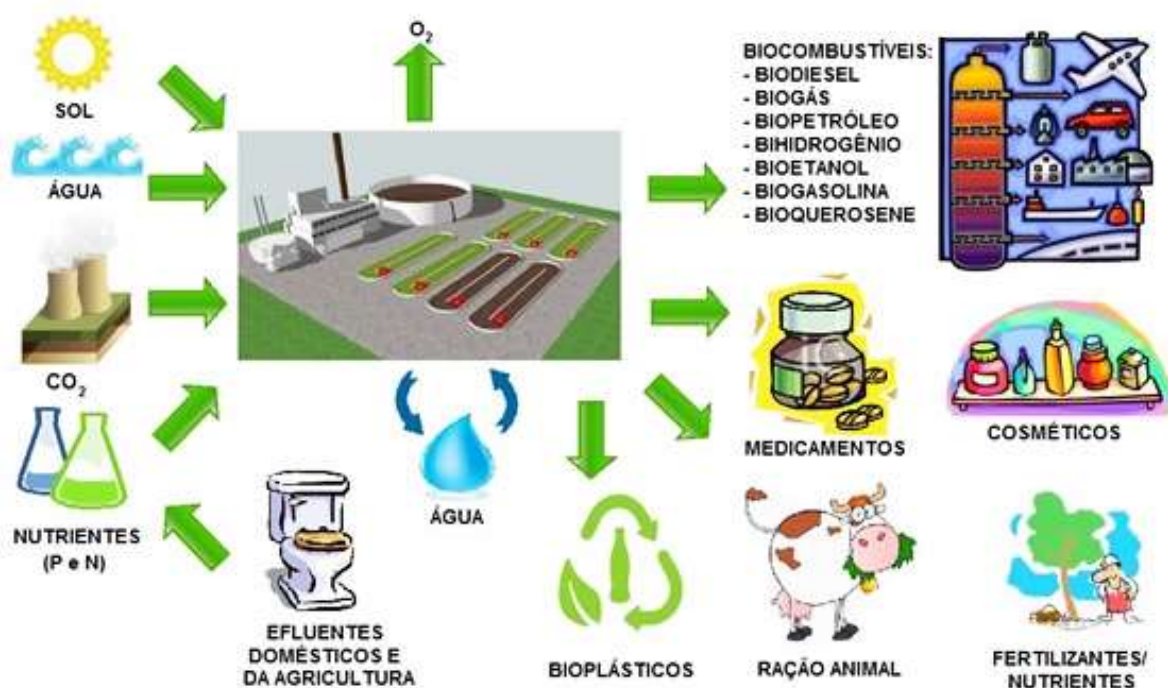


FIGURA 7. Processos e aplicações a partir da produção microalgal. Fonte: <Imed.edu.br>.

Todavia, a viabilidade econômica do cultivo em larga escala de microalgas para produção de componentes com baixo valor agregado (como commodities

químicas, biomateriais e energia) tem sido efetivada com sucesso. Assim, embora já tenha sido demonstrada a viabilidade técnica de se produzir bioplásticos, polímeros e biocombustíveis, como biodiesel, etanol e bioquerosene, por meio de microalgas, tais processos ainda não apresentam custos de produção competitivos com derivados da indústria petroquímica (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016).

Além dos produtos acima mencionados o mercado consumidor também utiliza a microalga na produção de surfactantes, compostos nitrogenados, borracha, revestimentos de superfície, graxa, têxteis, plastificantes, aditivos alimentares, cosméticos como também, para produtos fármacos utilizadas em compostos bioativos como antioxidantes e astaxantina com elevado valor econômico e muito almejado pelas indústrias (HARUN et al., 2010; ARONSON & DUBINSKY, 1982). A Figura 8 apresenta os derivados extraídos das algas e suas aplicações nos diversos mercados.

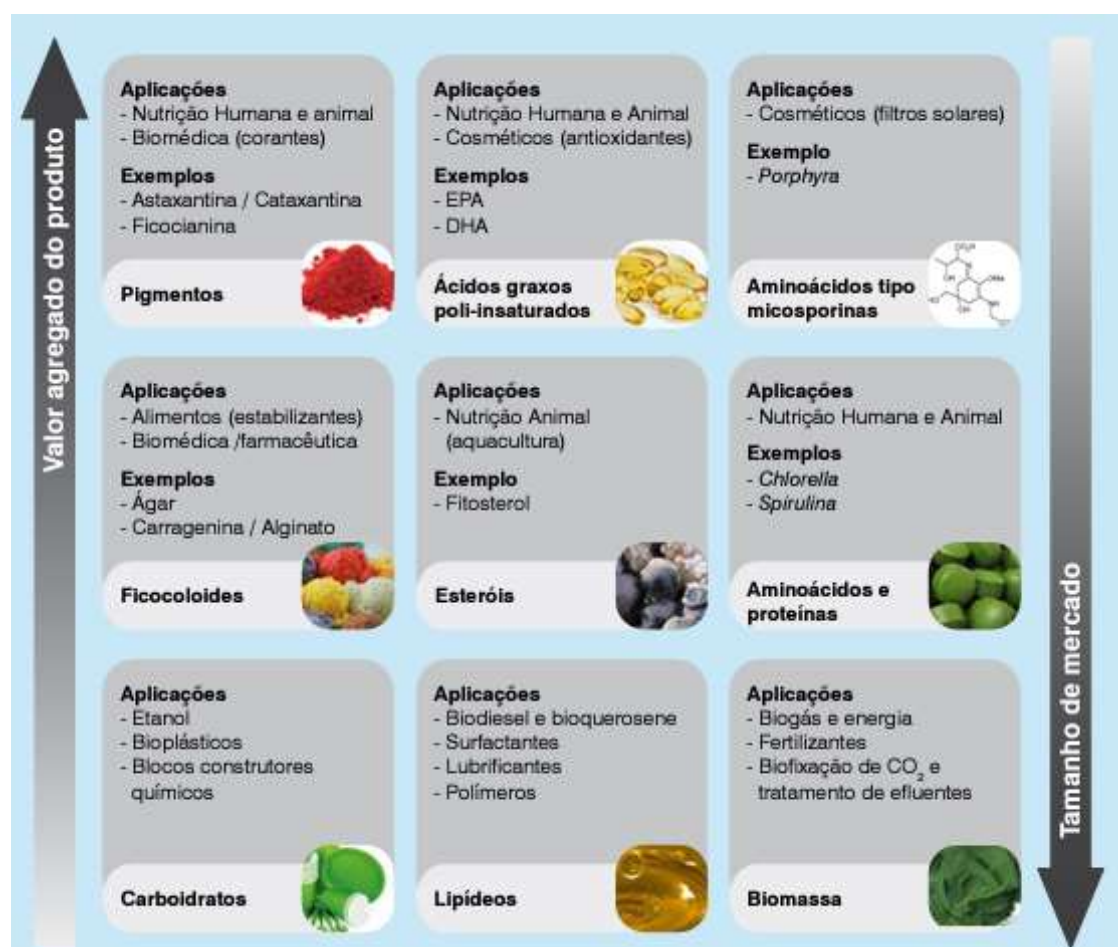


FIGURA 8. Mercado para produtos derivados de algas. Fonte: EMBRAPA AGROENERGIA (2016).

2. MICROALGA ESTUDADA – *Messastrum gracile*

A microalga *Messastrum gracile* é uma alga verde, Chlorophyceae, cuja classificação já sofreu várias mudanças. Esta espécie anteriormente, era denominada de *Ankistrodesmus gracilis*. Abaixo segue a identificação atualizada proposta por Guiry & Guiry (2021).

Domínio Eukaryota

Reino Plantae

Subreino Viridiplantae

Infrareino Chlorophyta

Filo Chlorophyta

Subfilo Chlorophytina

Classe Chlorophyceae

Ordem Sphaeropleales

Família Selenastraceae

Gênero *Messastrum*

Espécie *Messastrum gracile*

Selenastraceae, Blackman & Tansley (1903) desde sua descrição em 1903, passou por diversas mudanças taxonômicas, sendo reconhecido como: Scenedesmaceae (BOHLIN, 1897), Selenastraceae (WEST & FRITSH, 1927), Ankistrodesmaceae (KORSHIKOV, 1953), Oocystaceae (BOURRELLY, 1972), Chlorellaceae – Ankistrodesmoidea (KOMARÉK & FOTT, 1983). Entretanto, a partir dos primeiros estudos no gene 18S rDNA (SILVA, 2007) dois novos gêneros: *Messastrum* gen. nov. e *Curvastrum* gen. nov. mostraram que formam um grupo monofilético dentro das Chlorophyceae (FAWLEY et al. 2006; KRIENITZ et al., 2001, 2011; GARCIA DA SILVA, 2017).

Selenastraceae (Chlorophyceae, Sphaeropleales) é composta por algas verdes comum em corpos de água doce em todo o planeta, apresentando uma alta diversidade morfológica (KRIENITZ, et al. 2001). Inclui os membros mais comuns do fitoplâncton em quase todos os tipos de águas interiores, e composta por organismos bioindicadores. A Figura 9 mostra a árvore filogenética da microalga (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

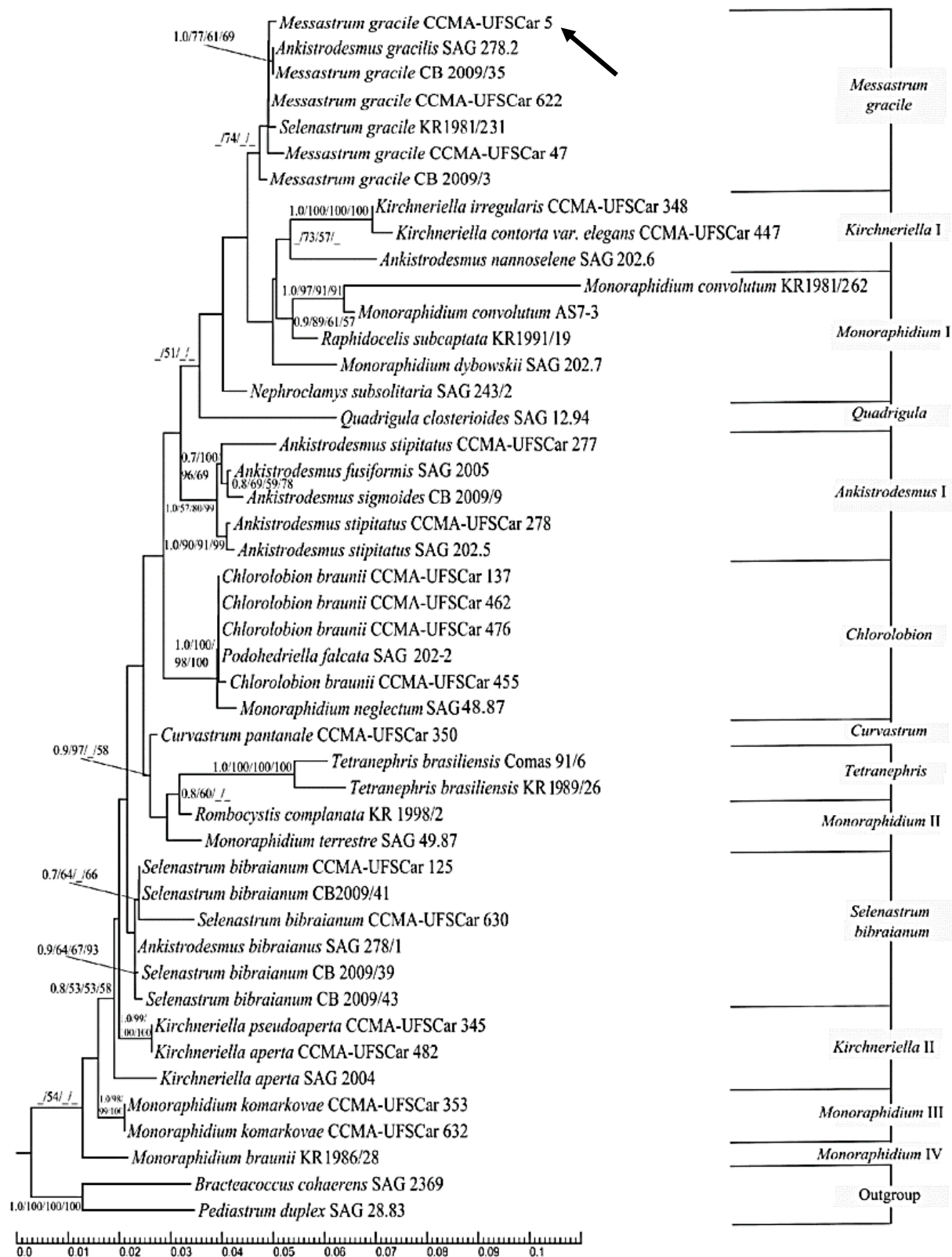


FIGURA 9. Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida das sequências do gene 18S rDNA de alguns membros de Selenastraceae (GARCIA DA SILVA et al., 2017). A seta em destaque indica a microalga estudada *Messastrum gracile* CCMA-UFSCar 5.

Morfologicamente, esta família é composta por organismos que apresentam uma variedade de formas: cocóide a alongada, cilíndrica a fusiforme, em forma de foice a curvada em espiral, com extremidades afiadas ou arredondadas, onde os arranjos celulares variam das formas solitárias às coloniais (KOMÁREK & FOOT, 1983; KORSHIKOV, 1987; KOMÁRKOVÁ LEGNEROVÁ, 1969; COMAS, 1996; HINDÁK, 1977, 1980, 1988; SANT'ANNA, 1984).

Messastrum gracile é uma Chlorophyceae planctônica que possui células fusiformes a semilunadas, extremidades gradualmente pontiagudas, arqueado. Pode ser observada em colônias com 2 – 4 – 8 ou mais células múltiplas arranjadas de forma irregular, principalmente com o lado convexo em direção ao centro da colônia. O cloroplasto é parietal, contendo um pirenoide, sem cobertura de amido. A reprodução assexuada é feita por meio de auto esporulação (2 – 4 – 8 auto esporos por esporângio). Geralmente, as células em cultura são unicelulares. Uma fina camada difusa de mucilagem é frequentemente concentrada como um anel no meio das células em ambas as colônias e indivíduos livres. Em relação ao tamanho das células, variam de 19-55 x 1-6µm, com uma distância entre as extremidades opostas da célula de 6-34µm. Por fim, o gênero *Messastrum* se difere de outros gêneros da sua família com base em diferenças no gene 18S rDNA e sequências do gene rbcL (GARCIA DA SILVA et al., 2017). A Figura 10 mostra uma vista frontal da colônia de *Messastrum gracile*.

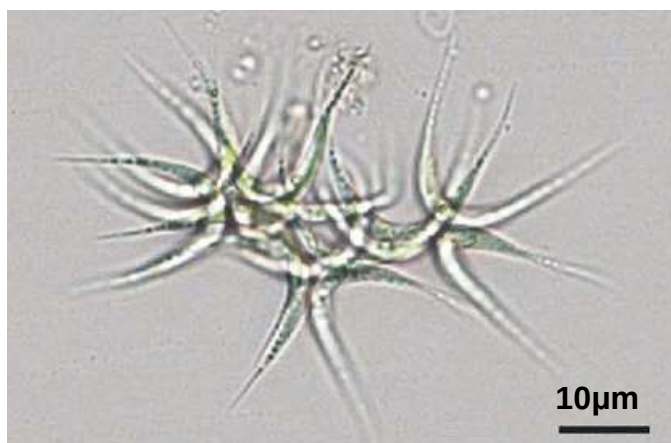


FIGURA 10. Vista frontal da colônia da microalga *Messastrum gracile*. Foto original da linhagem CCMA-UFSCar 622. Barra de escala: 10µm (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

Embora ocorram comumente em habitats de água doce, algumas espécies também toleram habitats salinos moderados, ou seja, podem ser relatados em

áreas salobras e salinas baixas do mar Báltico, além de serem capazes de se desenvolver em lagos, lagoas, piscinas e rios (PANKOW, 1990).

Messastrum gracile representa uma fonte importante na produção de lipídios, pigmentos e polissacarídeos (NASCIMENTO et al. 2013; KILHAM et al., 1997; CHU et al., 1995) e também, como um organismo modelo para estudos sobre crescimento e divisão celular (KOBAYASHI & ITO, 1977). Segundo Sipaúba-Tavares & Braga (2007), esta espécie de microalga se apresenta como uma boa fonte de alimento para peixes devido ao seu rápido crescimento, valor nutricional e fácil cultivo.

A etimologia que se aplica à espécie estudada é: do latim *mess* (= bagunça) e *astrum* (= estrela). O Holótipo: espécie única, descrição original *Selenastrum gracile* REINSCH, 1866, e o epítipo: (antigênico) um formaldeído fixado na amostra da cepa CCMA-UFSCar 622 está depositada no Instituto de Botânica de São Paulo, sob a designação SP 469319. O Isotipo: Material da Cepa autêntica CCMA – UFSCar 622 está mantido na Coleção de Culturas da Freshwater Microalgae, que se encontra na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil (GARCIA DA SILVA et al., 2017).

A Figura 11 mostra a microalga *Messsastrum gracile* no meio de cultura em laboratório onde apresenta na forma unicelular possivelmente devido à aeração do meio e falta de competidor, o que não ocorre no ambiente no qual é encontrada na forma colonial.



FIGURA 11. Vista da microalga *Messastrum gracile* no meio de cultivo que ficam em formas unicelulares. (Microscópio no aumento: (x10). Fonte: Própria.

Chlorophyceae na qual *Messastrum gracile* está inserida possui cerca de 17.000 espécies distribuídas em ambientes dulcícolas, salobros e marinhos, além de outros habitats tais como neve, troncos de árvores, folhas, plantas terrestres, dentre outros diversos locais (LOURENÇO, 2006).

Nesta classe, os organismos possuem além da clorofila-*a*, clorofila *b*, o β -caroteno e várias xantofilas, como a luteína, a violaxantina, a zeaxantina, a anteraxantina, a neoxantina, a astaxantina e a cantaxantina, dentre outras, ocorrem em plastos. Mesmo havendo uma diversidade de carotenoides, os plastos das Chlorophyceae são verdes, por conta de que a maioria das espécies apresentam concentrações dos carotenoides que não suplantam as das clorofilas. Em muitas algas, o amido é um dos produtos de reserva, sendo este produzido dentro dos plastos das algas verdes, como o que ocorre nas plantas com flores. Apresentam uma gigantesca diversidade morfológica contemplando formas unicelulares cocóides, unicelulares monadais, colônias pequenas, colônias de tamanho intermediário, colônias grandes e filamentos abrangendo tanto formas macroscópicas como microscópicas (LOURENÇO, 2006).

4. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO DE CULTIVO DE MICROALGAS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (UNESP, Centro de Aquicultura) em Jaboticabal – SP, com o objetivo de promover o cultivo estático não axênico, e aeração constante de microalgas (Figura 12).



FIGURA 12. Área externa do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton.
Fonte: Própria.

O laboratório consiste de duas partes, uma voltada para o cultivo onde são mantidas duas espécies de Chlorophyceae, *Messastrum gracile* e *Haematococcus pluvialis*. O outro setor é de análises de água (limnologia) dos diversos tanques e viveiros da fazenda de aquicultura (Caunesp). Os padrões de assepsia na sala de cultivo, são mantidos durante o manejo das microalgas, para que o cultivo seja feito de maneira adequada. Padrões de biossegurança são implementados como forma de prevenção à acidentes laboratoriais.

A sala de cultivo microalgal (Figura 13), foi especificamente construída com piso de cerâmica, paredes brancas, azulejos brancos, composto por equipamentos em constante utilização e manutenção, com prateleiras vazadas com o intuito de promover uma melhor distribuição da luz nos cultivos. A sala também é equipada com um sistema tubular de aeração e temperatura controlada por ar condicionado. Vale ressaltar que a água utilizada no laboratório é armazenada em caixa d'água de 5000L.



FIGURA 13. Vista panorâmica da sala de cultivo e Produção de Plâncton. Microalga em cultivo de 2L e 13 L. Fonte: Própria.

A microalga *Messastrum gracile* é cultivada em meio comercial o CHU12, meio com fertilizante inorgânico (NPK, 20:5:20) e o meio com extrato de macrófita (ME – *Eichhornia crassipes*) em vidrarias específicas, e armazenada em um ambiente controlado, continuamente monitorado, com temperatura mantida entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob iluminação de lâmpadas led, com intensidade de $60 \mu\text{mol}_{\text{Photon}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$,

e com ciclo de luz contínuo (24hrs). No caso do experimento realizado neste estudo a manutenção da luminosidade foi controlada por um aparelho específico com variação do fotoperíodo (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

Na Figura 14 a microalga *Messastrum gracile* está exposta em meio de cultura CHU12 e de extrato de macrófita (ME – *Eichhornia crassipes*) (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009) os quais foram utilizados para o experimento deste trabalho.



FIGURA 14. Microalga *Messastrum gracile* em meio comercial CHU12 (A) e de extrato de macrófita (B) na sala de cultivo. Fonte: Própria.

A Figura 15 mostra a microalga *M. gracile* cultivada em condições controladas dentro do cepário, sob luz de led, aeração constante para evitar a sedimentação das células e temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).



FIGURA 15. *Messastrum gracile* mantida no laboratório de cultivo para experimento de ciclo de luz. Fonte: Própria.

Todo o manuseio da vidraria e da microalga na sala de cultivo procede por meio do uso da câmara de assepsia com bico de bunsen. Antes de qualquer manuseio do cultivo o material é colocado nesta câmara permanecendo aproximadamente 20' sob luz UV e posteriormente, todo o procedimento é realizado próximo ao bico de bunsen. Além disso, uma estufa é mantida no local pois o material que não pode ser autoclavado permanece após a lavagem nesta estufa para evitar excessiva contaminação. A Figura 16 mostra a câmara de assepsia e a estufa.

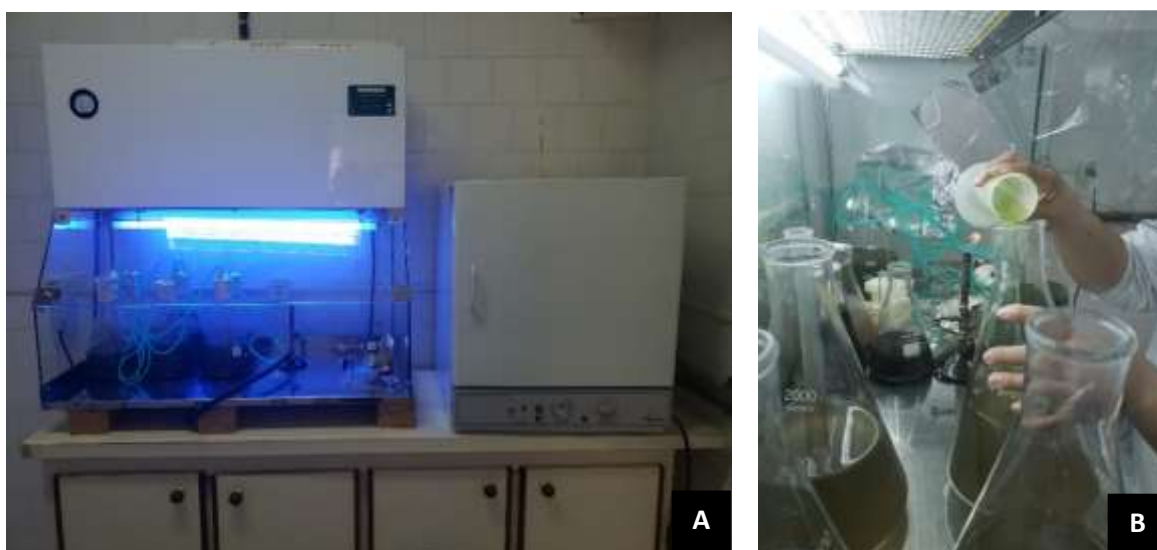


FIGURA 16. Câmara de assepsia com luz UV ligada e estufa (A); Vista interna da câmara de assepsia com o material utilizado para a repicagem e manutenção da microalga para cultivo (B). Fonte: Própria.

A cepa da microalga *Messastrum gracile* é proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem CCMA-UFSCar 5, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil), posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton. Para a manutenção das cepas a repicagem é feita semanalmente de acordo com o protocolo existente desde 1989 (informação cedida pela Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).

A Figura 17 mostra o aparelho utilizado para regular o fotoperíodo (luz claro/escuro) no cultivo de microalga, modelo Lukma – 188 e a câmara de Neubauer para contagem de células.

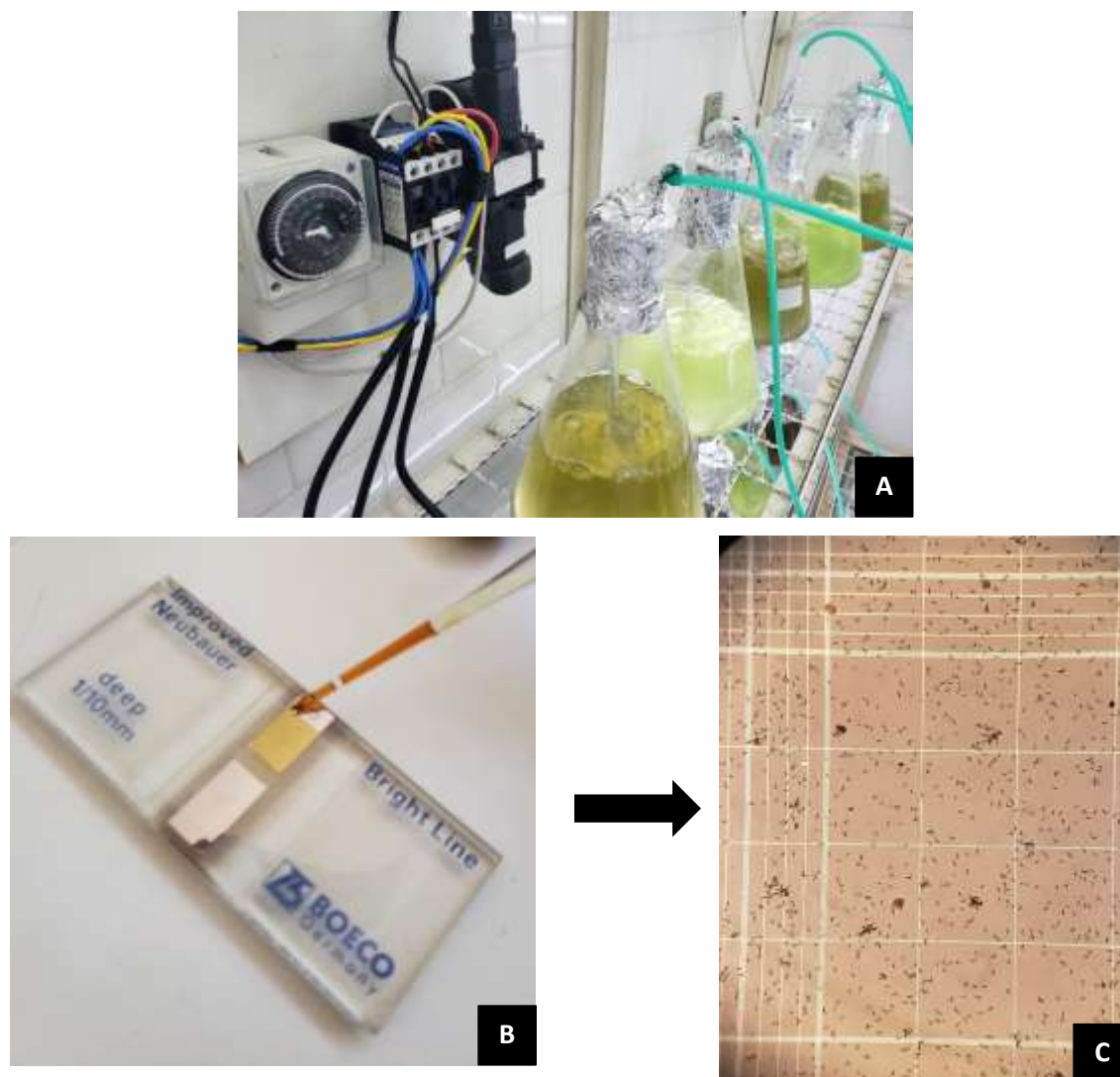


Figura 17. Cultivo da microalga destacando o aparelho utilizado para controle do fotoperíodo no Laboratório (A). Câmara de Neubauer para a contagem das células no crescimento da microalga (B) e vista sob microscópio das microalgas na câmara de contagem (C), aumento: (x5). Fonte: Própria.

5. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESTE ESTUDO

No laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton são utilizados quatro meios de cultura 2 comerciais WC (*Haematococcus pluvialis*) e CHU12 (*Messastrum gracile*) e dois alternativos o NPK (20:5:20) e o de extrato de macrófita (ME) - *Eichhornia crassipes*, os quais foram adotados após diversos estudos de

crescimento algal (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999; 2009; 2011; 2015; 2018) (Figura 18).



FIGURA 18. Meios de cultura utilizados no cultivo da Chlorophyceae *Messastrum gracile* sendo CHU₁₂ e WC (*Haematococcus pluvialis*) meios comerciais e, NPK e ME meios alternativos. (Imagens cedidas pela Prof^a. Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares).

Neste estudo foram adotados o meio CHU₁₂ (CHU, 1942) e o meio de extrato de macrófita – ME (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2009).

A figura 19 mostra o preparo em laboratório das concentrações adequadas do meio CHU₁₂ para o cultivo de *M. gracile*.

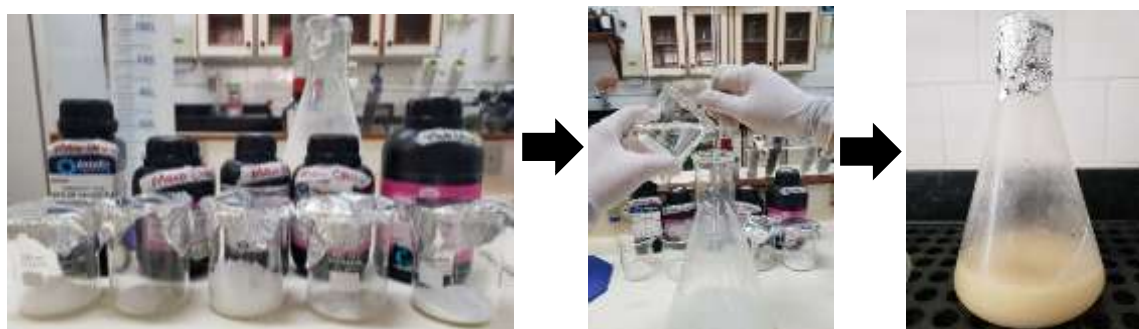


FIGURA 19. Preparo do meio de cultura CHU₁₂. Fonte: Própria.

Para o preparo do meio alternativo com extrato de macrófita (ME), componentes do extrato foram diluídos em 1.400 L de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos à 1 atm. O meio ME foi preparado com cerca de 5kg das plantas úmidas e, posteriormente, secas inicialmente ao sol e depois em estufa a 60°C. Após esta fase, as plantas foram moídas e o pó foi fervido em

água destilada por uma hora. O líquido ainda quente foi filtrado e auto clavado a 120°C durante 20 minutos. Cerca de 70mL de amostra foi coletada e depois de fria, diluída em 1.400 L e adicionado 2,5mL de NPK (20:5:20) (Figura 20) (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

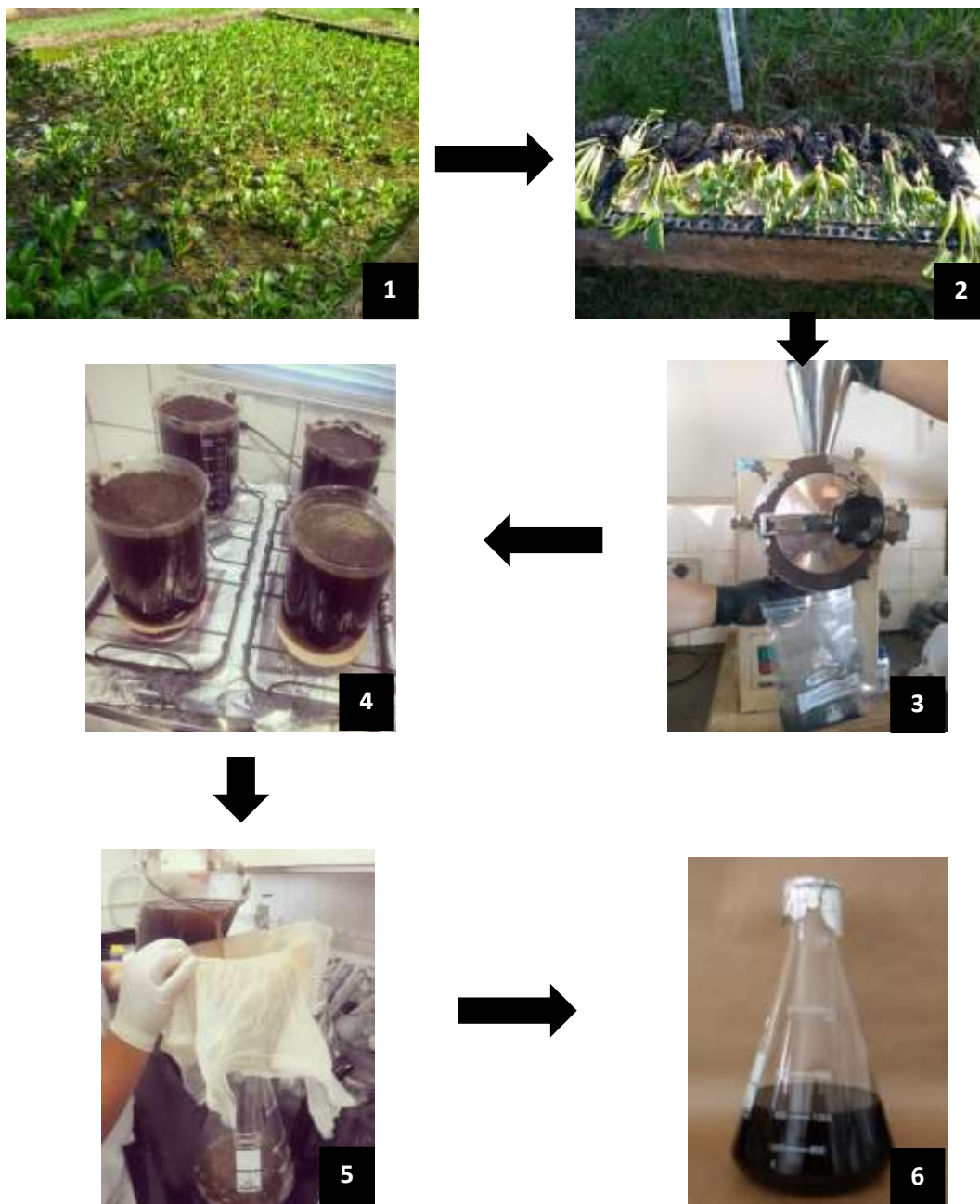


FIGURA 20. Preparo do meio com extrato de macrófita (ME): (1) Tanque específicos para o cultivo de *Eichhornia crassipes*; (2) Fase de secagem da *E. crassipes* ao sol; (3) *E. crassipes* em processo de moagem; (4) Fase de fervura do meio; (5) Fase de filtragem do meio; (6) Meio de cultura do extrato de macrófita (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Fontes: Própria.

A Figura 21 mostra o procedimento de centrifugação da biomassa algal para posterior análise, através de uma desnatadeira que centrifuga todo o material transformando o meio líquido em pasta, contendo somente a biomassa algal. Esse tipo de procedimento é utilizado para análises bioquímica das microalgas que posteriormente, é liofilizado (perda total do líquido) para a efetivação da análise bioquímica.

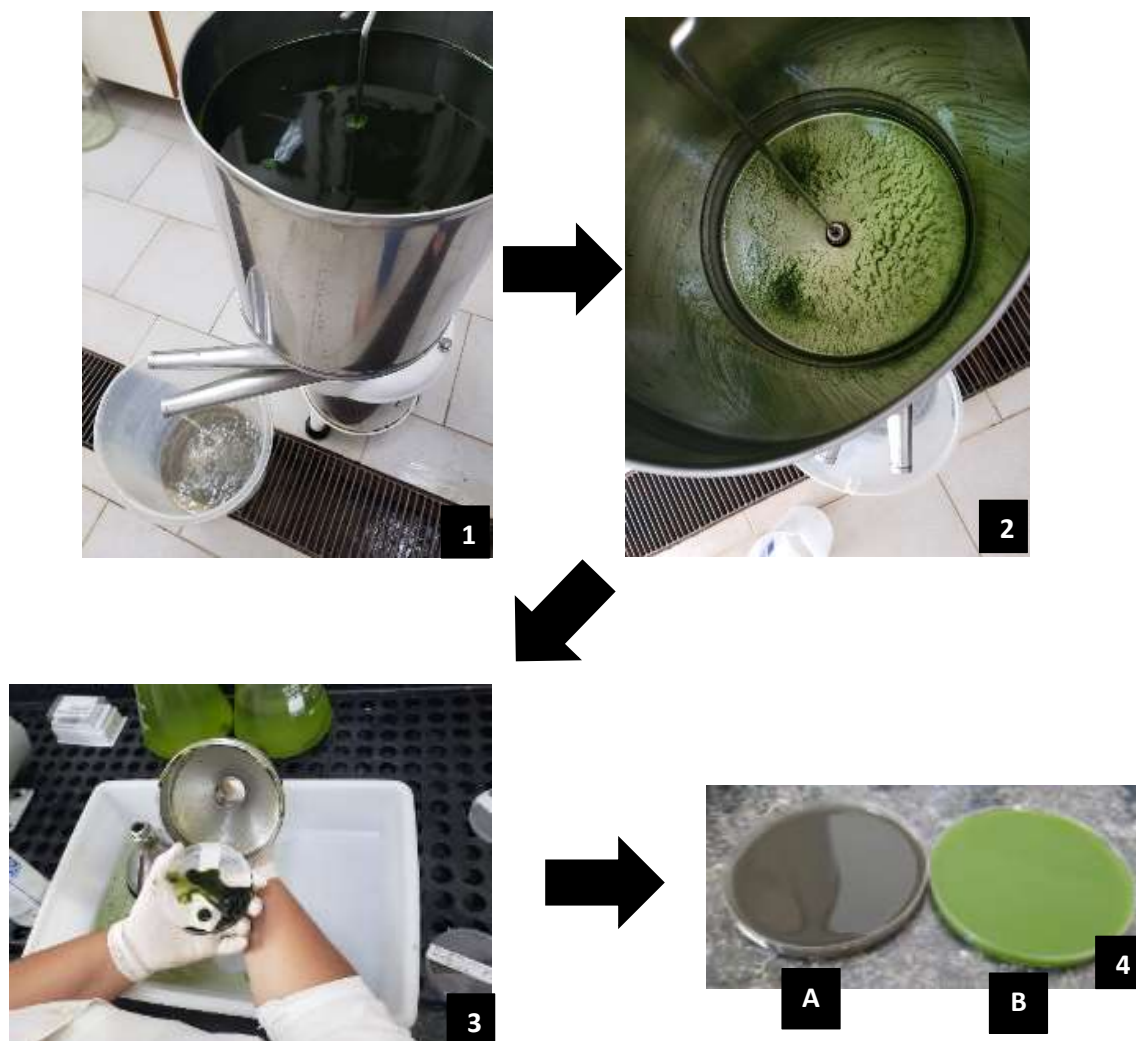


FIGURA 21. Procedimento de centrifugação da biomassa algal. (1) desnatadeira, aparelho utilizado para retirar o excesso de líquido; (2) visão dentro da desnatadeira mostrando a biomassa da alga; (3) local do aparelho onde fica retida a biomassa concentrada; (4) Biomassa final onde (A) da microalga *Messastrum gracile* cultivada em meio ME e (B) em meio CHU12. Fonte: Própria.

6. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes ciclos de luz (claro/escuro) e meios de cultura CHU₁₂ e ME (*Eichhornia crassipes*) no crescimento da microalga *Messastrum gracile* sob condição fotoautotrófica.

6.1 Objetivos específicos

- Verificar qual ciclo de luz é o melhor no desempenho de *Messastrum gracile*.
- Avaliar qual ciclo de luz é economicamente mais viável para a produção, crescimento e desenvolvimento da microalga *Messastrum gracile*;
- Avaliar se o protocolo de 24 horas contínua de luz (24 h:0 h) para a microalga *Messastrum gracile* é necessário para seu melhor desenvolvimento.
- Avaliar a eficácia dos meios de cultura para o crescimento e desenvolvimento da microalga *Messastrum gracile* de acordo com os diferentes ciclos de luz.
- Avaliar se as condições físico-químicas do meio se alteram em relação aos diferentes ciclos de luz.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Meios de cultura e montagem experimental

A microalga *Messastrum gracile* é proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem CCMA-UFSCar 5, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil), posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (UNESP, Centro de Aquicultura) em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante. Os experimentos foram conduzidos em volume de 2L, com temperatura mantida entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sobre iluminação de lâmpadas led, com intensidade de $60 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no topo da cultura e fotoperíodo de 24 horas. O protocolo de cultivo é usualmente utilizado para a avaliação desta microalga (Figura 22).

Neste estudo foram adotados dois meios de cultura, um comercial CHU₁₂ (CHU, 1942) e outro alternativo de macrófita (*Eichhornia crassipes* - ME) de acordo com a metodologia proposta por Sipaúba-Tavares et al. (2009). A escolha da planta aquática como meio de cultura é pela fácil ocorrência em nossa região e cultivada em tanques específicos para este fim, e também em função dos

resultados anteriores mostrando elevada biomassa e valor nutricional adequado para esta microalga (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). O meio de cultura CHU₁₂ é um meio comercial preparado à base de vários reagentes químicos e preparado diluindo em 1.400 L de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos. O efeito dos diferentes meios de cultura no crescimento de *M. gracile* foram investigados durante 15 dias com experimentos executados sob as mesmas condições de cultivo de acordo com a intensidade de luz objetivada.

O experimento foi iniciado com 10 mL a densidade de $0,75 \times 10^5$ célula mL⁻¹ contendo meio CHU₁₂. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento (7 dias), aproximadamente 140 mL da amostra com densidade 2×10^5 célula mL⁻¹ foi adicionada à 2 L contendo os diferentes meios de cultura CHU₁₂ e NPK. Após 7 dias de crescimento a cultura com densidade de aproximadamente $4,5 \times 10^5$ célula mL⁻¹ foram transferidas para recipientes esterilizados de 2 L contendo os diferentes meios de cultura (CHU₁₂ e ME) e diferentes ciclos de luz (claro/escuro) (Figura 22). Foram adicionados ao meio de macrófita, vitamina do complexo B na taxa de 0,01g L⁻¹ (7 mg – B₁; 7 mg – B₂; 5 mg – B₆; 33 µg – B₁₂) mais vitamina H (0,01 mg).

7.2 Condição de iluminação para o crescimento de *Messastrum gracile*

A iluminação fornecida foi por lâmpadas de led na intensidade de em $60 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ programadas com um sistema automático claro/escuro para simular o período de luz. Quatro condições foram utilizadas para testar os efeitos dos ciclos de luz (claro/escuro), as escolhas realizadas foram baseadas em metodologias aplicadas com as seguintes iluminações: 24 h:0 h; 20 h:4 h; 16 h:8 h e 12 h:12 h. Durante as horas de luz, a intensidade foi mantida em $60 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

7.3 Crescimento da microalga

Para avaliação do crescimento de *M. gracile* nos diferentes iluminações e meios de cultura, alíquotas de 1mL foram removidas diariamente, durante 15 dias consecutivos e 2x1µL de sub amostra foi contada em hemocitômetro de Neubauer, expresso em número de células mL⁻¹ x 10⁵.

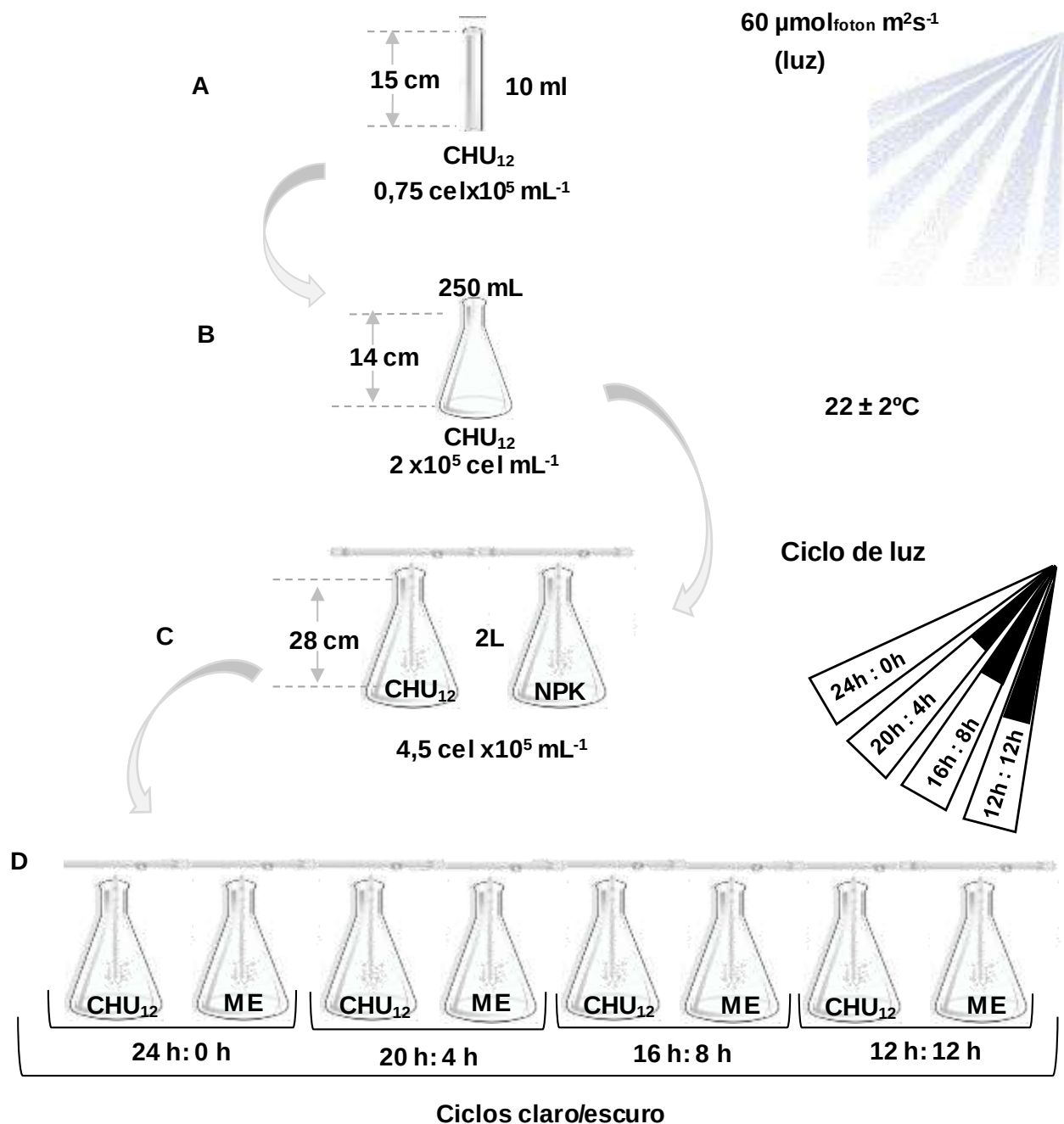


Figura 22. Diagrama esquemático do cultivo de *Messastrum gracile* durante o período experimental, onde: A = manutenção da cepa 10 ml; B = cultivo em 250 mL; C = cultivo em meio de cultura CHU₁₂ e NPK; D = experimento nos diferentes ciclos claro/escuro de luz nos meios de cultura CHU₁₂ e ME.

A taxa de crescimento k (divisão por dia) foi calculada usando a fórmula: $k = (3.322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$ (t = tempo; N = número de células; $t_2 - t_1$ = diferença entre o tempo) (GUILLARD, 1973). Tempo de duplicação (tempo de divisão

celular ou tempo de geração) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, usando a fórmula: $T_d = 1/k^{-1}$ (T_d = tempo de duplicação, $1K^{-1}$ = divisão por dia) (GUILLARD, 1973). Para análise do comprimento total, cerca de 50 indivíduos foram mensurados em microscópio Leica DFC 295 com imagens analisadas em sistema LAS core (LAS V3.8) e objetiva de 400 vezes. O cálculo do volume celular foi determinado pelo tamanho médio com o uso de fórmula geométrica, correspondente, no caso de *M. gracile* a forma da célula (esfera) de acordo com Vollenweider (1974) e Bottrel et al. (1976). O carbono orgânico total foi calculado a partir da fórmula $C = 0,1204 \cdot V^{1,051}$ (C = teor de carbono em pg célula⁻¹; V = volume celular) usando a regressão proposta por Rocha & Duncan (1985). Para a obtenção do peso seco (pg cel⁻¹) 10mL dos meios de cultura experimentais foram coletados e filtrados em filtro de fibra de vidro GF/C 0,7mm de tamanho de poro. Posteriormente, os filtros foram secos em estufa a 60°C. Após este processo, foi realizada a pesagem até peso constante. A determinação do conteúdo de cinza (pg cel⁻¹) da microalga foi obtida pelo incineramento dos filtros em mufla a 500°C, por 4 horas.

7.4 Parâmetros do meio de cultura

Os parâmetros físicos e químicos dos meios de cultura foram amostrados semanalmente (1, 5, 10 e 15 dias). A temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram avaliados com sonda multi-parâmetros YSI 556MPS. Os compostos nitrogenados e fósforo total foram quantificados por espectrofotometria de acordo com a metodologia descrita em Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978). A clorofila-a foi determinada extraíndo os pigmentos com álcool 90% e quantificada em espectrofotômetro (663 e 750nm) e processada de acordo com a metodologia proposta por Nusch (1980).

7.5 Biomassa da microalga *Messastrum gracile*

A biomassa da microalga foi centrifugada e liofilizada para análise de proteína, carbono, nitrogênio e lipídio semanalmente de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2012).

7.6 Considerações econômicas

A produção operacional dos custos foi determinada através da análise econômica dos componentes dos meios de cultura, custo de energia, mão de obra, manutenção e água. Os custos foram analisados para o volume de 2 L com produção mensal de 100.000 L⁻¹ (g L⁻¹ massa seca) de meio de cultura (MATSUNAGA et al., 1976).

7.7 Análise estatística dos dados

Foi aplicada a análise de variância considerando um modelo fatorial (4x4) onde os fatores de variação foram os ciclos de luz (4) e os dias de cultivo (4) a fim de descrever o comportamento do crescimento da microalga e das variáveis biótica e abiótica do cultivo (SOKAL & ROHLF, 1981). Os resultados da análise de variância e as médias foram comparados pelo teste de Fisher (LSD) a 5% de probabilidade (p=0,05). Todas as análises estatísticas foram efetuadas utilizando o programa AgroEstat (v.1.1.0.694) (BARBOSA & MALDONADO-JUNIOR, 2015). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e, todos os experimentos foram em triplicata.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através deste experimento, a partir dos quatro diferentes ciclos de luz e dos dois meios de cultura utilizados para o desenvolvimento da microalga *Messastrum gracile*, demonstraram diferentes resultados em relação ao crescimento, tempo de duplicação, clorofila-a, densidade celular média, biomassa, carbono orgânico total, volume celular e comprimento total. Os parâmetros dos meios de cultura, como condutividade, pH, oxigênio dissolvido, temperatura e nutrientes apresentaram diferentes variações. O custo/benefício para a produção da microalga *Messastrum gracile* também apresentou diferenças em relação aos ciclos de luz e meios de cultura.

Os dados foram divididos em três etapas distintas: dados biológicos, dados do meio de cultura e custo/benefício da produção.

8.1 Dados biológicos da microalga *Messastrum gracile*

Não existe um meio de cultura único para todas as espécies de microalgas, uma vez que cada uma tem suas necessidades específicas (RICHMOND, 2004).

O crescimento das microalgas depende unicamente das propriedades intrínsecas das células algais, somadas às condições laboratoriais adequadas, como por exemplo a luz, que atua no metabolismo das microalgas, principalmente, na síntese de carboidratos e lipídios (MESECK et al., 2005). Na curva de crescimento da microalga, a fase exponencial é considerada o período ideal para fornecimento em forma de alimento aos organismos aquáticos, pois as células encontram-se em divisão com elevado número de indivíduos, tendo como produto final a proteína (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

A irradiância e o fotoperíodo são, de fato, determinantes no metabolismo desses microrganismos, sendo que um dos principais desafios na produção de microalgas é a intensidade luminosa que irá proporcionar melhores taxas de absorção de energia aumentando a eficiência fotossintética (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011). O crescimento das microalgas é positivamente afetado pela irradiação da luz até que a saturação seja atingida, a partir deste ponto, o crescimento diminui devido aos efeitos da fotoinibição (GONZÁLEZ-CAMEJO et al. 2019). Segundo Yan (2011) é necessário que ocorra um equilíbrio, pois sob baixa iluminação, a energia disponível é insuficiente, enquanto sob excesso de luz ocorre fotoinibição.

Em relação a este estudo, observou-se que a microalga *Messastrum gracile*, nos ciclos claro/escuro de luz (12 h:12 h e 16 h:8 h ciclo de luz), o crescimento foi afetado, quando comparado aos ciclos de luz 24 h:0 h; 20 h:4 h.

Em geral o meio de extrato de macrófita (ME) *M. gracile* apresentou as maiores densidades, exceto no ciclo de luz 16 h:8 h que a partir do 7º dia no meio CHU₁₂ foi superior ao ME até o final do experimento. Tanto para o meio CHU₁₂ quanto o meio de ME o crescimento foi baixo no ciclo de 12 h:12 h, no entanto, a taxa de crescimento (k) no 2º dia com k= 1,32 foi similar ou mais elevada do que nos outros ciclos de luz, no meio ME (Figura 23).

As menores taxas de crescimento foram encontradas no ciclo de luz 16 h:8 h variando de k= 0,26 a k= 0,55 no meio CHU₁₂ e de k= 0,18 a k= 0,31 no meio ME. Nos ciclos de luz 24 h:0 h e de 12 h:12 h, k foi maior no meio ME com pico de k= 1,19 (3º dia de crescimento) e de k=1,32 (2º dia de crescimento), respectivamente (Figura 23).

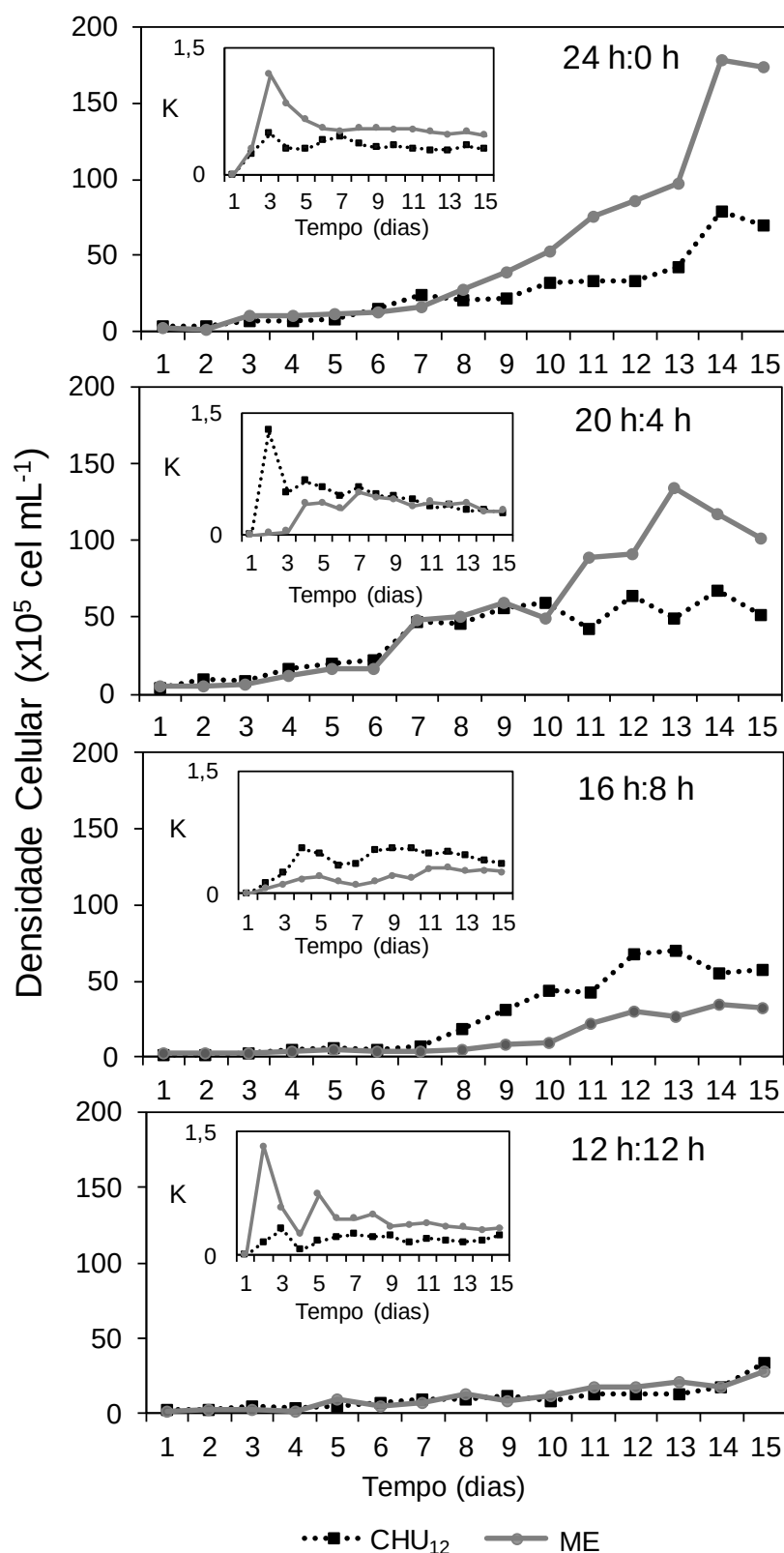


Figura 23. Curvas de crescimento e taxa de crescimento (tempo - dias) para a microalga *Messastrum gracile* em meio de cultura comercial (CHU₁₂) e de extrato de macrófita (ME) para os diferentes ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante os 15 dias de experimento. Fonte: Própria.

Nos ciclos de luz de 20 h:4 h e de 16 h: 8 h a taxa de crescimento foi maior no meio CHU₁₂, e no ciclo de luz 20 h:4 h do 1° ao 6° dia de crescimento com $k=1,28$, no segundo dia de crescimento, sendo similar ao ciclo de luz 12 h:12 h para o mesmo dia da curva de crescimento, só que no meio ME (Figura 23). Maior rendimento algal em ciclo de luz 24 h:0 h para a microalga está no fato de que o cultivo fototrófico é o tipo mais comumente usado para o crescimento de microalgas (MANDAL & MALLICK, 2009; YOO et al., 2010).

Neste estudo, no ciclo de luz 24 h:0 h foi observado resultados satisfatórios, tanto em relação ao crescimento quanto em relação à taxa de duplicação de *M. gracile*, variando de 0,84 a 2,16 dias no meio ME e de 2,1 a 3,46 dias no meio CHU₁₂. Os ciclos de luz 24 h:0 h e 20 h:4 h apresentaram crescimento aproximado até o 10° dia a partir do que, no ciclo contínuo de luz (24 h:0 h) apresentou densidade celular mais elevada variando de $75,4 \times 10^5$ cels mL⁻¹ (11° dia de crescimento) a 174×10^5 cels mL⁻¹ (15° dia de crescimento) no meio ME (Figura 23).

Nos ciclos de luz claro/escuro 16 h:8 h e 12 h:12 h, a densidade celular foi abaixo de $2,11 \times 10^5$ cels mL⁻¹ e $34,52 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no meio ME e de $2,45 \times 10^5$ cels mL⁻¹ e $33,83 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no meio CHU₁₂, respectivamente. Nestes dois ciclos de luz, as maiores densidades foram obtidas no 15° dia de crescimento indicando aumento de biomassa nos dois meios de cultura utilizados. Somente no meio CHU₁₂ no ciclo de luz 20 h:4 h a maior densidade celular ($60,1 \pm 6,3 \times 10^5$ cels mL⁻¹) foi no 10° dia de crescimento e no meio ME todas ocorreram no 15° dia de crescimento (Tabelas 4 e 5).

O tempo de duplicação foi mais rápido no meio ME coincidindo com as maiores densidades celular. No meio ME o tempo de duplicação foi menor no ciclo de luz 24 h:0 h e maior no ciclo de luz 16 h:8 h, variando de 1,19 dias a 2,21 dias e de 3,11 dias a 4 dias, respectivamente. No meio CHU₁₂ o tempo de duplicação foi mais rápido no ciclo de luz 20 h:4 h no 10° (1,73 dias) e no meio ME no ciclo de luz 24 h:0 h no 5° dia de crescimento (1,19 dias) (Tabelas 4 e 5).

A biomassa apresentou um padrão similar ao exposto acima, com maior biomassa ($0,28$ g L⁻¹) no 15° dia de crescimento no ciclo de luz 24 h:0 h em meio de cultura ME. Em geral, as maiores biomassas foram encontradas nos ciclos de luz 24 h:0 h e 20 h:4 h. No meio de cultura CHU₁₂ as biomassas foram menores que no meio ME (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Dados biológicos da microalga *Messastrum gracile* no meio ME para os diferentes ciclos de luz (24 h: 0h; 20 h:4 h; 16 h:8 h; 12 h:12 h). Fonte: Própria.

Ciclos de Luz	Meio de cultura ME							
	Dados Biológicos da microalga							
	dias	Cloro-a	DCMed	Biomassa	COT	VC	CT	TD
24 h: 0 h	1	0,1±0,001 ^{Ac}	1,9±0,4 ^{Bb}	0,07±0,02 ^{ABc}	2,5±1,5 ^{Ba}	17,4±10,3 ^{Ca}	9,8±2,2 ^{Ca}	-
	5	0,6±0,002 ^{Ab}	11,5±0,9 ^{Ac}	0,14±0,04 ^{Ab}	2,08±1,7 ^{Bb}	14,4±8,5 ^{Cb}	10,7±1,4 ^{ABa}	1,19
	10	1,2±0,002 ^{Aa}	69,6±0,3 ^{Ab}	0,19±0,005 ^{Aab}	1,7±0,7 ^{Bc}	12,4±4,8 ^{Bc}	10,2±1,3 ^{Ba}	1,19
	15	1,7±0,003 ^{Aa}	160±9,1 ^{Aa}	0,28±0,03 ^{Aa}	2,3±1,1 ^{Aab}	15,8±7,8 ^{Aab}	10,6±1,4 ^{ABa}	2,21
20 h: 4 h	1	0,1±0,008 ^{ABc}	3,8±1,2 ^{Ad}	0,05±0,005 ^{Bb}	2,2±1,04 ^{Bb}	16,7±7,1 ^{Cb}	11,2±1,8 ^{Bb}	-
	5	0,2±0,002 ^{Bb}	12,1±1,8 ^{Ac}	0,07±0,03 ^{Bb}	2,6±1,4 ^{Ab}	18,3±9,6 ^{ABb}	11,6±1,7 ^{Ab}	2,20
	10	0,9±0,003 ^{ABa}	49,8±14,5 ^{Ab}	0,22±0,03 ^{Aa}	3,4±0,85 ^{Aa}	23,07±5,8 ^{Aa}	13,2±1,4 ^{Aa}	1,92
	15	0,9±0,004 ^{Ba}	102,2±19,1 ^{Aa}	0,21±0,04 ^{Aa}	1,7±1,2 ^{Bc}	12,1±8,0 ^{Bc}	11,3±1,5 ^{Ab}	2,87
16 h: 8 h	1	0,04±0,002 ^{Bc}	1,9±0,5 ^{Bc}	0,1±0,005 ^{Aa}	3,6±1,8 ^{Aa}	25,4±12 ^{Aa}	14,3±2,4 ^{Aa}	-
	5	0,08±0,06 ^{Cbc}	4,6±1,1 ^{Bc}	0,08±0,01 ^{ABa}	2,7±1,8 ^{Ab}	19,2±12 ^{Ac}	11,5±2,23 ^{Ab}	4,0
	10	0,1±0,03 ^{Cb}	17,1±1,9 ^{Bb}	0,08±0,03 ^{Ba}	3,4±2,2 ^{Aa}	21,3±15 ^{Ab}	12,0±1,71 ^{Ab}	3,11
	15	0,7±0,09 ^{Ba}	32,7±11,9 ^{Ba}	0,12±0,06 ^{Ba}	2,4±1,3 ^{Ab}	17,03±8,8 ^{Ad}	11,3±1,35 ^{Ab}	3,64
12 h: 12 h	1	0,03±0,007 ^{Bc}	1,2±0,8 ^{Bd}	0,09±0,005 ^{ABa}	2,5±1,6 ^{Ba}	21,2±10,9 ^{Ba}	10,6±1,9 ^{BCa}	-
	5	0,1±0,02 ^{BCb}	7,7±4,7 ^{ABc}	0,12±0,01 ^{ABa}	2,3±2,1 ^{Aba}	16,5±4,0 ^{Bb}	9,7±1,9 ^{Ba}	2,95
	10	0,5±0,04 ^{Ba}	17,1±4,6 ^{Bb}	0,12±0,02 ^{Ba}	1,4±0,9 ^{Cb}	10,6±5,8 ^{Cc}	8,5±1,6 ^{Cb}	2,72
	15	0,9±0,08 ^{ABa}	27,5±3,1 ^{Ba}	0,11±0,005 ^{Ba}	2,4±1,2 ^{Aa}	15,3±8,0 ^{Ab}	9,5±1,3 ^{Bab}	3,71

Cloro-a= Clorofila (mg L⁻¹); DCMed= Densidade Celular Média (x10⁵ cel mL⁻¹); Biomassa g L⁻¹; COT= Carbono Orgânico Total (µg L⁻¹); VC= Volume Celular (µm³); CT=Comprimento Total (µm); TD= Tempo de Duplicação (dias). Letras maiúsculas, dentro de cada ciclo de luz. Letras minúsculas, entre os ciclos de luz.

Tabela 5. Dados biológicos da microalga *Messastrum gracile* no meio CHU₁₂ para os diferentes ciclos de luz (24 h: 0h; 20 h:4 h; 16 h:8 h; 12 h:12 h). Fonte: Própria.

Ciclos de Luz	Meio de Cultura CHU ₁₂							
	Dados Biológicos da Microalga							
	dias	Cloro-a	DCMed	Biomassa	COT	VC	CT	TD
24 h: 0 h	1	0,2±0,004 ^{Ab}	3,7±0,08 ^{Ad}	0,1±0,025 ^{ABb}	3,4±1,7 ^{Ab}	23,8±11,5 ^{Ab}	11,1±1,4 ^{Ab}	-
	5	0,1±0,02 ^{Bb}	8,5±2,33 ^{Bc}	0,1±0,04 ^{ABb}	2,4±1,8 ^{Bc}	17,5±12 ^{Bc}	10,3±1,9 ^{Bc}	3,38
	10	0,5±0,05 ^{Aba}	31,8±4,28 ^{Bb}	0,2±0,005 ^{Aa}	3,6±1,6 ^{Bb}	25,8±10,9 ^{Bab}	13,3±1,4 ^{Ba}	2,91
	15	0,7±0,2 ^{Ba}	70±12,13 ^{Aa}	0,2±0,03 ^{Aa}	4,4±2,4 ^{Aa}	28,2±10,9 ^{Aa}	13,3±1,6 ^{Aa}	3,31
20 h: 4 h	1	0,1±0,014 ^{ABb}	4,1±1,38 ^{Ac}	0,07±0,01 ^{Ab}	2,2±1,1 ^{Bc}	14,9±8 ^{Bc}	10,5±1,7 ^{Ac}	-
	5	0,2±0,12 ^{Ba}	20,4±5,39 ^{Ab}	0,18±0,07 ^{Bb}	3,3±3,8 ^{Ab}	23,1±4,1 ^{Ab}	12,4±2,1 ^{Ab}	1,73
	10	0,1±0,05 ^{Cab}	60,1±6,3 ^{Aa}	0,17±0,015 ^{Aba}	4,2±1,5 ^{Aa}	29,6±10,2 ^{Aa}	14,3±1,4 ^{Aa}	2,33
	15	0,2±0,1 ^{Ca}	51,1±5,91 ^{Cb}	0,08±0,045 ^{Bb}	1,8±1 ^{Cc}	13,8±7,1 ^{Cc}	11,7±1,6 ^{Bb}	3,86
16 h: 8 h	1	0,04±0,01 ^{Bc}	1,4±0,46 ^{Bc}	0,12±0,005 ^{Aab}	3,6±2,2 ^{Aa}	24,8±14,8 ^{Aa}	10,8±2,3 ^{Aa}	-
	5	0,1±0,02 ^{Bb}	5,5±1,05 ^{Cb}	0,1±0,04 ^{Bb}	2,4±2,6 ^{Bb}	18,8±17,3 ^{Bb}	9,5±1,9 ^{Cb}	2,03
	10	0,5±0,1 ^{Ba}	43,9±1,61 ^{Aba}	0,1±0,015 ^{Bb}	2,6±1,9 ^{Cb}	18,2±12,6 ^{Cb}	9,4±1,9 ^{Cb}	1,81
	15	0,6±0,03 ^{Ba}	58±6,71 ^{Aba}	0,2±0,015 ^{Aa}	2,7±1,6 ^{Bb}	19±10,8 ^{Bb}	11,1±1,5 ^{Ba}	2,61
12 h: 12 h	1	0,1±0,01 ^{Ad}	3,3±0,2 ^{Ad}	0,1±0,005 ^{Ab}	3,4±2,2 ^{Aa}	24,1±14,6 ^{Aa}	10,5±2,1 ^{Aa}	-
	5	0,4±0,05 ^{Ac}	5,3±0,7 ^{Cc}	0,06±0,02 ^{Bb}	2,6±1,9 ^{Bb}	18,8±12,6 ^{Bb}	9,5±1,8 ^{Cc}	5,97
	10	1±0,1 ^{Ab}	8,1±1,08 ^{Cb}	0,1±0,03 ^{Bb}	2,1±1,9 ^{Cbc}	16,2±12,7 ^{Dc}	9,7±1,6 ^{Cbc}	4,43
	15	1,4±0,2 ^{Aa}	34±3,07 ^{Ba}	0,02±0,04 ^{Bb}	2±1 ^{Cc}	15,1±6,7 ^{Cc}	10,3±1,1 ^{Cab}	4,17

Cloro-a= Clorofila (mg L⁻¹); DCMed= Densidade Celular Média (x10⁵ cel mL⁻¹); Biomassa g L⁻¹; COT= Carbono Orgânico Total (µg L⁻¹); VC= Volume Celular (µm³); CT=Comprimento Total (µm); TD= Tempo de Duplicação (dias). Letras maiúsculas, dentro de cada ciclo de luz. Letras minúsculas, entre os ciclos de luz.

Alguns processos biotecnológicos com microalgas almejam alcançar altos ou baixos rendimentos em biomassa e para isso deve-se escolher os nutrientes e parâmetros físico-químicos adequados, levando em consideração o habitat natural das espécies para determinar as necessidades básicas para seu crescimento. Em contrapartida, algumas aplicações biotecnológicas visam condições de estresse para otimizar a biossíntese de biocompostos específicos, como os ácidos graxos. Os fatores de estresse mais estudados são as concentrações de certos nutrientes, intensidade luminosa, ciclos de luz, além de temperatura, salinidade e pH. A limitação de nutrientes nos meios de culturas afeta em grandes proporções a composição química das algas, assim como taxa de crescimento (RADMANN & COSTA, 2008; YEH & CHANG, 2012).

O tipo de meio de cultura influencia diretamente no desenvolvimento da microalga em função dos nutrientes. Atualmente, os meios alternativos são frequentes para o crescimento da microalga como forma de baratear o custo de produção. Mezzomo et al. (2010) utilizaram efluente de suíno, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos, para a produção de biomassa de microalga *Spirulina platensis*, e verificaram que esta microalga apresentou aumento de biomassa, com remoção de Fósforo (P) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) indicando uma possível solução nestes efluentes e, como suplemento alimentar de peixes.

Estudos comprovaram que os ciclos de luz atuam na fixação de CO₂ e produção de biomassa por microalgas em fotobiorreatores, influenciando na atividade fotossintética e nas taxas de crescimento. A luz é um substrato limitante nesses sistemas, que são afetados por zonas claras/escuras que dependem principalmente, da configuração, agitação e mistura no reator, associadas à possibilidade de culturas com períodos descontínuos de fornecimento de energia luminosa (JANSSEN et al., 1999; JANSSEN et al., 2001). Diferente do nosso estudo em que o sistema é estático com aeração constante.

Segundo Brown et al. (1997), observaram que um dos maiores gastos na produção de microalgas em laboratório está relacionado à luz, em que as melhores condições luminosas foram encontradas no ciclo de luz de 12 h: 12h. Tal observação não coincide com os nossos resultados, onde a luz constante (24 h:0 h) e o ciclo de quatro horas de escuro (20 h:4 h) foram observadas as maiores biomassas e taxas de crescimento.

Cada espécie de microalga requer um determinado ciclo de luz e meio e cultura. Chisti (2007) verificou que valores de intensidade luminosa acima do requerido para a espécie acarreta a redução na taxa de crescimento, sendo este fenômeno denominado fotoinibição. O ponto de inibição varia de acordo com as condições do sistema de cultivo e depende da espécie. Já em casos específicos onde ocorrem condições limitantes de crescimento das microalgas durante o cultivo, foi observado queda na divisão celular, na taxa fotossintética e na síntese de proteínas, uma vez que a energia fotossintética é desviada da divisão celular, acúmulo de carboidratos e síntese de lipídeos, com aumento da síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes (HU et al., 2008; YEH & CHANG, 2012).

A manutenção da cultura em laboratório quanto à luminosidade, temperatura e aeração é fundamental para o desenvolvimento e crescimento exponencial das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999). Para *M. gracile* os ciclos de luz mais adequados para seu crescimento foram 24 h:0 h e 20 h:4 h em meio ME. Considerando que o fotoperíodo certamente influencia na taxa de duplicação da *Messastrum gracile* o que impacta em sua curva de crescimento, além da influência do meio de cultura.

Os pigmentos das microalgas têm um papel importante no metabolismo fotossintético, possuindo atividades biológicas benéficas, como antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório, anti-obesidade, antiangiogênica e neuroprotetora (CICCONI et al, 2013). Pelo menos três classes de pigmentos ocorrem em microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenóides (GUEDES et al, 2011).

Neste experimento, no meio comercial CHU₁₂ a concentração de clorofila-a de *M. gracile* foi elevada no ciclo de luz 12 h:12 h no 15º dia ($1,4 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e a menor no ciclo de luz 16 h:8 h no 1º dia com $0,04 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$. No meio CHU₁₂ a clorofila-a apresentou as maiores concentrações a partir do 10º dia de crescimento nos diferentes ciclos de luz, com exceção do ciclo de luz 20 h:4 h onde a clorofila-a oscilou ao longo do experimento. No meio de cultura ME, a maior concentração foi obtida no ciclo de luz 24 h:0 h com $1,7 \pm 0,003 \text{ mg L}^{-1}$, similar ao meio CHU₁₂ onde as maiores concentrações ocorreram por volta do 15º dia de crescimento (Tabelas 4 e 5).

O carbono orgânico total (COT) da microalga *M. gracile* foram similares nos dois meios de cultura. Em geral, no meio ME as maiores concentrações ocorreram no primeiro dia exceto no ciclo de luz 20 h:4 h que foi no 10° dia de crescimento ($3,4 \pm 0,85 \mu\text{g L}^{-1}$). A maior concentração de COT no meio de cultura ME foi de $3,6 \mu\text{g L}^{-1} \pm 1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (16 h:8 h). No meio CHU₁₂ a maior concentração foi no ciclo de luz 24 h:0 h no 15° dia de crescimento com $4,4 \pm 2,4 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta a maior concentração observada, neste ciclo. No ciclo 20 h:4 h foi no 10° dia de crescimento com $4,2 \pm 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$, os ciclos de luz 16 h:8 h e 12 h:12 h as concentrações foram mais elevadas no primeiro dia de crescimento com $3,6 \pm 2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,4 \pm 2,2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Em geral o COT nos ciclos de luz 24 h:0 h foram mais elevados do que os outros dois ciclos (Tabelas 4 e 5).

O carbono é um elemento essencial para a microalga considerado o macronutriente mais importante nos cultivos constituindo 50% da biomassa seca. O crescimento da microalga pode ser incrementado com adição de fontes orgânicas e inorgânicas de carbono (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988).

O volume celular em geral foi mais elevado no meio CHU₁₂, com o maior valor observado de $29,6 \pm 10,2 \mu\text{m}^3$, e no ciclo de luz 20 h:4 h no 10° dia de crescimento. No meio ME o maior valor foi de $25,4 \pm 12 \mu\text{m}^3$ no ciclo de luz 16 h:8 h no 1° dia e crescimento (Tabelas 4 e 5).

O comprimento total apresentou o maior valor de 14,3 μm nos dois meios de cultura sendo que para o meio ME foi observado no 1° dia de crescimento no ciclo de luz 16 h:8 h e no meio CHU₁₂ no 10° dia de crescimento no ciclo de luz 20 h:4 h (Tabelas 4 e 5).

8.2 Dados do Meio de Cultura

A condutividade foi elevada acima de $338 \pm 19 \mu\text{S/cm}^{-1}$ (24 h:0 h- 1° dia de crescimento) no meio ME e acima de $41,8 \pm 26 \mu\text{S/cm}^{-1}$ (12 h:12 h – 5° dia de crescimento) no meio CHU₁₂ (Tabelas 6 e 7). Elevadas concentrações de condutividade em meio de cultura é esperado em função dos macro e micronutrientes presentes que induzem o crescimento da microalga (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

Neste estudo as concentrações de condutividade mais elevadas foram observadas no meio CHU₁₂ com $951 \pm 31 \mu\text{S cm}^{-1}$ (15° dia de crescimento) no ciclo

de luz 16 h: 8 h. No meio ME o maior valor foi de $661 \pm 21 \mu\text{S cm}^{-1}$ no ciclo de luz 16 h:8 h no 15º dia de crescimento (Tabelas 6 e 7).

Como a condutividade indica a presença de íons presentes no meio, está associada às concentrações de nutrientes, que neste caso foram elevadas principalmente, a amônia no ME (Figura 24).

Tabela 6. Variação dos nutrientes, condutividade e pH no meio de cultura comercial (CHU₁₂) nos ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante o crescimento de *M. gracile*.

Ciclos de Luz	Meio de Cultura CHU ₁₂						
	dias	Cond	pH	NH ₃	NO ₃	NO ₂	FT
24 h: 0 h	1	746±14 ^{Bab}	9,6±0,06 ^{Aba}	0,009±0,000 ^{Bc}	0,2±0,1 ^{Bb}	0,1±0,004 ^{Ac}	1,4±0,01 ^{Aa}
	5	688±20 ^{Bb}	8,9±0,1 ^{Cc}	0,016±0,007 ^{Bc}	0,5±0,2 ^{BCab}	0,1±0,04 ^{Bc}	1,2±0,06 ^{Aa}
	10	748±62 ^{Bab}	9,0±0,1 ^{BCc}	0,2±0,02 ^{Bb}	0,7±0,1 ^{Ca}	0,7±0,06 ^{Bb}	1,1±0,2 ^{Aa}
	15	765±38 ^{Ba}	9,2±0,3 ^{Bb}	0,4±0,03 ^{Ba}	0,5±0,1 ^{Cab}	1,8±0,4 ^{Aa}	1,3±0,09 ^{Aa}
20 h: 4 h	1	462±10 ^{Cb}	9,5±0,15 ^{Bb}	0,003±0,002 ^{Bb}	1,6±0,02 ^{Aa}	0,04±0,005 ^{BCc}	0,6±0,01 ^{Bb}
	5	779±22 ^{Aa}	9,8±0,05 ^{Aa}	0,02±0,001 ^{Bb}	1,5±0,06 ^{Aa}	0,2±0,02 ^{Bb}	0,9±0,1 ^{Ba}
	10	843±44 ^{Aa}	9,8±0,04 ^{Aa}	0,17±0,04 ^{Ca}	1,6±0,006 ^{Ba}	0,4±0,04 ^{Ca}	0,6±0,1 ^{Bb}
	15	798±40 ^{Ba}	9,3±0,06 ^{ABb}	0,17±0,08 ^{Ca}	1,6±0,02 ^{Ba}	0,3±0,1 ^{Bab}	0,7±0,09 ^{Bab}
16 h: 8 h	1	825±33 ^{Ac}	9,7±0,1 ^{Aa}	0,7±0,01 ^{Aa}	1,8±0,3 ^{Aa}	0,02±0,001 ^{Cd}	0,6±0,04 ^{Bc}
	5	853±35 ^{Abc}	8,6±0,06 ^{Dc}	0,7±0,1 ^{Aa}	1,7±0,6 ^{Bb}	0,06±0,03 ^{Cc}	1,0±0,01 ^{ABa}
	10	915±31 ^{Aab}	9,2±0,05 ^{Bb}	0,7±0,007 ^{Aa}	2,1±0,2 ^{Aa}	0,6±0,1 ^{BCb}	0,9±0,1 ^{Aab}
	15	951±31 ^{Aa}	9,2±0,02 ^{Bb}	0,6±0,03 ^{Aa}	2,2±0,09 ^{Aa}	2,1±0,3 ^{Aa}	0,7±0,1 ^{Bbc}
12 h: 12 h	1	698±24 ^{Bb}	8,9±0,01 ^{Cb}	0,005±0,001 ^{Bb}	0,1±0,03 ^{Bb}	0,05±0,01 ^{Bc}	0,6±0,03 ^{Bb}
	5	418±26 ^{Cd}	9,4±0,03 ^{Ba}	0,01±0,008 ^{Bb}	0,5±0,4 ^{Cab}	0,4±0,1 ^{Ab}	0,9±0,2 ^{Ba}
	10	566±4 ^{Cc}	8,8±0,2 ^{Cd}	0,1±0,1 ^{Db}	0,5±0,3 ^{Ca}	2,0±0,09 ^{Aa}	1,0±0,2 ^{Aa}
	15	771±20 ^{Ba}	9,5±0,05 ^{Aa}	0,2±0,02 ^{Ba}	0,3±0,02 ^{Cab}	2,1±0,1 ^{Aa}	1,1±0,2 ^{Aa}

Cond= Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$); NH₃ (Amônia mg L⁻¹), NO₃ (Nitrato mg L⁻¹), NO₂ (Nitrito mg L⁻¹), FT (Fósforo total mg L⁻¹). Letras maiúsculas = dentro de cada ciclo de luz. Letras minúsculas = entre os ciclos de luz.

Tabela 7. Variação dos nutrientes, condutividade e pH no meio de cultura com Extrato de Macrófita (ME) nos ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h, durante o crescimento de *M. gracile*.

Ciclos de Luz	Meio de cultura ME						
	dias	Cond	pH	NH ₃	NO ₃	NO ₂	FT
24 h: 0 h	1	338±19 ^{Cb}	8,6±0,08 ^{Ab}	3,6±0,1 ^{Aa}	0,3±0,09 ^{ABb}	0,04±0,01 ^{Cc}	2,05±1,1 ^{Aa}
	5	393±31 ^{Cab}	8,9±0,1 ^{Ba}	1,4±0,4 ^{Bc}	0,4±0,2 ^{Bb}	0,05±0,01 ^{CC}	2,03±0,8 ^{Ab}
	10	356±26 ^{Cb}	9,05±0,1 ^{Ba}	2,1±0,3 ^{Bb}	0,5±0,3 ^{Bb}	0,2±0,02 ^{Bb}	2,0±0,3 ^{Ab}
	15	443±12 ^{Ba}	8,6±0,06 ^{BCb}	1,7±0,3 ^{Bbc}	1,3±0,3 ^{Aa}	0,7±0,2 ^{Aa}	2,7±0,2 ^{Ab}
20 h: 4 h	1	472±6,5 ^{Ba}	8,6±0,04 ^{Bc}	2,4±0,05 ^{Cb}	0,5±0,1 ^{Ab}	0,06±0,06 ^{Bc}	0,3±0,1 ^{Ca}
	5	459±38 ^{Ba}	9,7±0,1 ^{Aa}	3,5±0,2 ^{Aa}	1,03±0,3 ^{Aab}	0,2±0,06 ^{Aab}	0,3±0,1 ^{Ca}
	10	476±23 ^{Ba}	9,6±0,3 ^{Aa}	1,4±0,6 ^{Aa}	1,5±0,1 ^{Aa}	0,5±0,1 ^{Aa}	0,2±0,05 ^{Ca}
	15	443±22 ^{Ba}	8,9±0,2 ^{Bb}	0,3±0,02 ^{Cc}	1,4±0,1 ^{Aa}	0,2±0,04 ^{Bb}	0,3±0,04 ^{Ca}
16 h: 8 h	1	578±24 ^{Ab}	8,5±0,2 ^{Aa}	2,6±0,1 ^{BCb}	0,2±0,008 ^{Ba}	0,1±0,008 ^{Ab}	0,8±0,1 ^{Ba}
	5	568±19 ^{Ab}	8,6±0,04 ^{Ca}	3,4±0,6 ^{Aa}	0,1±0,03 ^{Ca}	0,1±0,06 ^{Bb}	1,07±0,2 ^{Ba}
	10	588±25 ^{Ab}	8,7±0,2 ^{Ca}	3,2±0,3 ^{Aab}	0,1±0,07 ^{Ca}	0,5±0,01 ^{Cb}	0,8±0,1 ^{Ba}
	15	661±21 ^{Aa}	8,6±0,06 ^{Ca}	3,7±0,1 ^{Aa}	0,2±0,03 ^{Ba}	0,2±0,06 ^{Ba}	1,0±0,1 ^{Ba}
12 h: 12 h	1	571±19 ^{Ab}	8,7±0,01 ^{Ab}	3,3±0,5 ^{ABa}	0,08±0,01 ^{Ca}	0,1±0,01 ^{Ab}	1,1±0,03 ^{Ba}
	5	589±7 ^{Aab}	8,8±0,04 ^{Bcb}	3,5±0,09 ^{Aa}	0,04±0,2 ^{Ca}	0,4±0,02 ^{Aa}	1,02±0,1 ^{Ba}
	10	422±36 ^{Bc}	9,2±0,09 ^{Ba}	3,7±0,1 ^{Aa}	0,05±0,02 ^{Da}	0,3±0,02 ^{ABa}	0,9±0,01 ^{Ba}
	15	640±27 ^{Aa}	8,8±0,05 ^{ABb}	3,7±0,1 ^{Aa}	0,05±0,1 ^{Ca}	0,6±0,03 ^{Aa}	0,8±0,2 ^{Ba}

Cond= Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$); NH₃ (Amônia mg L⁻¹), NO₃ (Nitrato mg L⁻¹), NO₂ (Nitrito mg L⁻¹), FT (Fósforo total mg L⁻¹). Letras maiúsculas = dentro de cada ciclo de luz. Letras minúsculas = entre os ciclos de luz.

As concentrações de amônia foram mais elevadas no meio ME variando de 0,3±0,02 mg L⁻¹ (15° dia de crescimento) no ciclo de luz 20 h:4 h à 3,7±0,1 mg L⁻¹ (no 14° e 15° dia de crescimento) nos ciclos de luz 16 h:8 h e 12 h:12 h (Figura 24; Tabelas 6 e 7). Já no meio CHU₁₂ as concentrações de amônia estiveram abaixo de 0,7±0,01 mg L⁻¹ (Tabela 6).

As microalgas podem assimilar nitrato, amônia e outras fontes orgânicas de nitrogênio, como ureia, e também podem fixar o nitrogênio atmosférico (BECKER & BADDILEY, 1994), onde a amônia é incorporada ao metabolismo através da ação de transaminases, para a formação de aminoácidos (HUNG et al., 2000).

Dentre os nutrientes mais importantes para as microalgas estão o fósforo (P) e o nitrogênio (N), no entanto, apenas a forma dissolvida é diretamente disponível para o crescimento das microalgas. Entretanto, algumas espécies ainda necessitam de concentrações ínfimas de outros compostos para seu crescimento, como as vitaminas (LOURENÇO, 2006).

O excesso de amônia no meio de cultura pode afetar a densidade e o desempenho da microalga, considerando como base o fato de que o acúmulo de amônia inibe o crescimento de biomassa algal (SOLETTO, et al., 2005). Neste estudo, no meio de cultura comercial CHU₁₂ a amônia manteve-se nos 4 ciclos de luz estudados menor do que 1 mgL⁻¹ durante o período experimental. Concentrações expressas em mg e /ou g em cultivo de microalgas são consideradas elevadas, no entanto o meio de cultura tem papel fundamental na maior ou menor presença dos macro e micronutrientes (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999).

Em relação ao efeito das concentrações de amônia no crescimento de *M. gracile*, pôde-se observar que, onde ocorreram as maiores concentrações (ME) o crescimento foi mais elevado (Figuras 23 e 24).

As concentrações de nitrato foram superiores às de nitrito, principalmente no ciclo de luz 20 h:4 h para o meio ME variando de 0,5±0,1mg L⁻¹ a 1,5±0,1mg L⁻¹. No meio CHU₁₂, o nitrato apresentou a maior concentração no ciclo de luz 16 h:8 h, variando de 1,7±0,6mg L⁻¹ a 2,2±0,09mg L⁻¹ (Tabelas 6 e 7).

O Nitrito nos dois meios de cultura esteve abaixo de 2,1±0,3mg L⁻¹ (CHU₁₂) e de 0,7±0,2mg L⁻¹ (ME), no entanto no meio de cultura CHU₁₂ tendeu a crescer até o final do experimento nos ciclos de luz utilizados, cresceu (Figura 24; Tabelas 6 e 7).

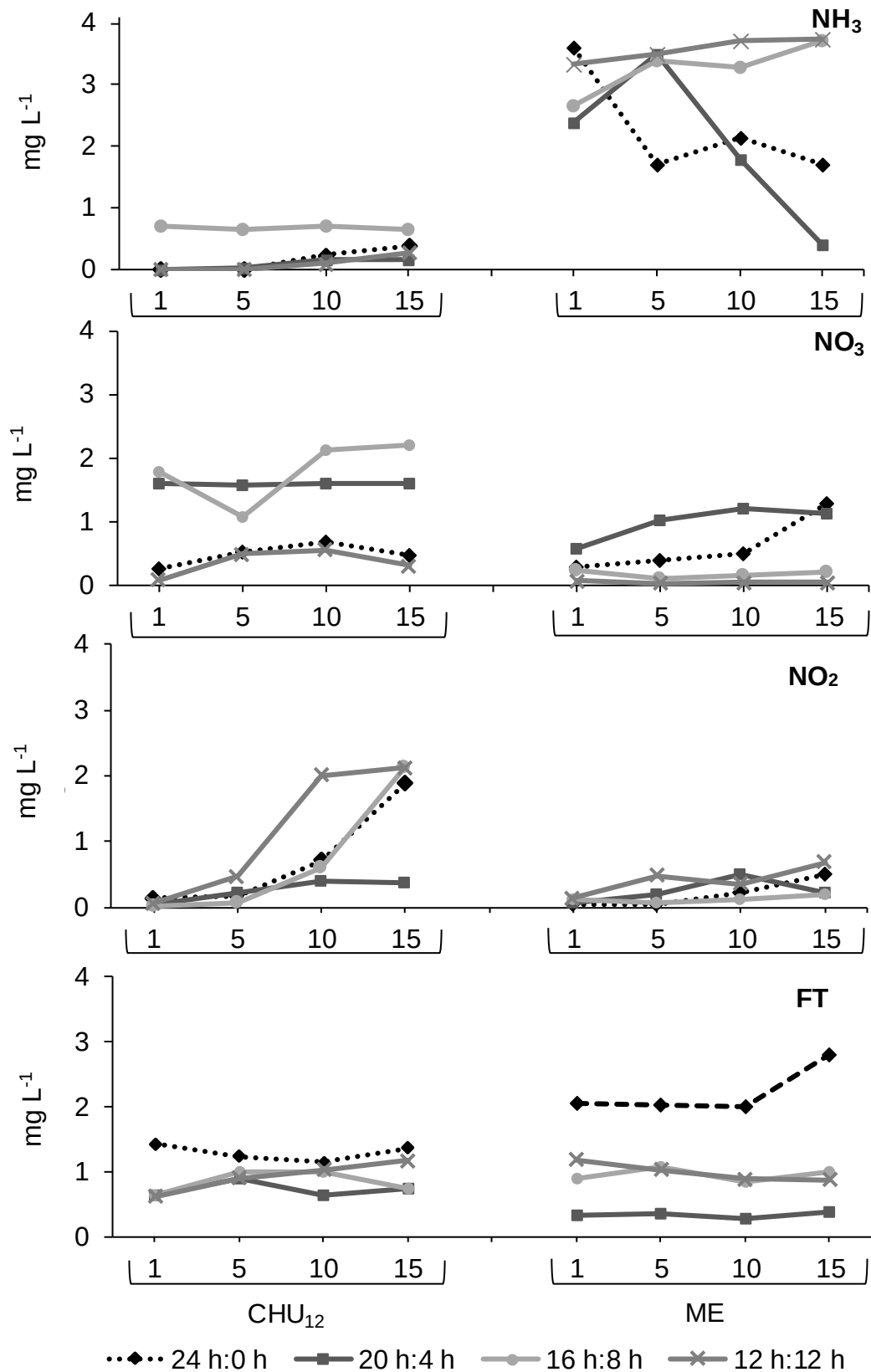


Figura 24. Concentração de nutrientes nos diferentes ciclos de luz: 24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12 h:12 h nos dois meios de cultura: meio comercial (CHU_{12}) e extrato de macrófita (ME), onde: NH_3 (Amônia mg L^{-1}), NO_3 (Nitrato mg L^{-1}) NO_2 (Nitrito mg L^{-1}) FT (Fósforo total mg L^{-1}).

O nitrato é a principal forma assimilável dos compostos nitrogenados pelas microalgas. Em situação de escassez de amônia as microalgas absorvem nitrato (NO_3^-), reduzindo a nitrito (NO_2^-) e posteriormente, à amônia no interior da célula. Entretanto, condições de elevadas concentrações de nitrato, as microalgas excretam nitrito (NO_2^-) para o meio (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1998).

Para a microalga vale ressaltar que o nitrogênio amoniacal tem vantagem em relação ao nitrato, pelo fato de ser mais facilmente absorvido pelas algas, uma vez que não precisa ser reduzido a nitrito e a amônio antes de ser incorporado, gerando uma economia energética (YIN et al., 1998). Considerando que o nitrogênio compõe em média cerca de 7-10% do peso seco da biomassa microalgal e é essencial à constituição das proteínas estruturais e funcionais das células algais (HU, 2004).

O fósforo, como o nitrogênio, é um macronutriente que desempenha um papel vital na célula, visto que este é usado para formar componentes estruturais e funcionais para o bom crescimento, desenvolvimento e manutenção celular da microalga. É preferencialmente, assimilado na forma inorgânica como fosfatos, porém algumas espécies são capazes de usar o fósforo encontrado em ésteres orgânicos para o crescimento (CAREY et al., 2013).

O fósforo, é um elemento limitante para o crescimento das microalgas, sendo essencial aos processos celulares como transferência de energia (ATP) e biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídeos, DNA, entre outros, influenciando na composição da biomassa. O ortofosfato inorgânico (PO_4^{3-}) é a forma iônica de fósforo de uso preferencial pelas microalgas, no entanto, existem outras fontes de fósforo inorgânico que podem ser absorvidas pelas microalgas, como o fosfato diácido (H_2PO_4) e o fosfato ácido (HPO_4^{2-}) que podem ser provenientes do ácido fosfórico (H_3PO_4) (REYNOLDS, 2006).

Neste estudo, o fósforo total nos dois meios de cultura foi mais elevado na luz constante (24 h:0 h) variando de $1,1 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,4 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ no meio CHU₁₂ e de $2,0 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ a $2,7 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ no meio ME. As menores concentrações foram encontradas no ciclo de luz 20 h:4 h para os dois meios de cultura (Figura 24; Tabela 6 e 7). O desenvolvimento de mais estudos ecofisiológicos utilizando não somente o nitrogênio, mas também o fósforo e as vitaminas devem ser investigados (FENG et al., 2011; ZHENG et al., 2012).

O pH, tem importante papel no cultivo de microalgas, quando elevado acarreta a decantação de ferro no meio de cultura podendo ocasionar a precipitação das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Estudos comprovam que o aumento do pH pode ocorrer devido a fixação do dióxido de carbono (CO_2) por meio da respiração das microalgas que proporcionam maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH^-) no meio, acarretando um aumento do pH (MOTA & VON SPERLING, 2009; LI et al., 2011).

Segundo Lourenço (2006), aeração introduzida nos cultivos leva ao enriquecimento de CO_2 , aumentando a eficiência de dissolução de carbono no meio da cultura. Contudo, o excesso de CO_2 também pode acarretar efeitos adversos, relacionados à acidificação do meio de cultura. Se o meio de cultura apresenta nitrato como fonte de nitrogênio, cujo consumo produz alcalinização do meio, a adição de CO_2 pode neutralizar o processo de alcalinização (LOURENÇO, 2006).

No experimento realizado o pH foi alcalino acima de $8,5 \pm 0,2$ no meio ME e de $8,8 \pm 0,1$ no meio CHU_{12} . Em geral, independente do ciclo de luz o pH foi mais elevado no meio CHU_{12} (Tabelas 6 e 7).

Nos cultivos, o pH favorável para o crescimento da maioria das microalgas é sempre próximo da neutralidade, para que os componentes do meio possam ser absorvidos (LOURENÇO, 2006). O baixo valor de pH pode atuar como inibidor enzimático no processo de fotossíntese (YANG et al., 2011). Nossos resultados mostraram pH elevado e não foi observado acidez dos meios de cultura nos diferentes ciclos de luz.

Um dos principais fatores responsáveis por regular as respostas morfológicas e fisiológicas das células é a temperatura (ZENG et al., 2011). Altas temperaturas geralmente aceleram as taxas metabólicas, enquanto as baixas temperaturas inibem o crescimento algal (MUNOZ & GUIEYSSE, 2006). Pequenas flutuações de temperatura no sistema de cultivo não ocasionam problemas sérios no desenvolvimento da microalga, mas temperaturas muito baixas ou muito altas afetam drasticamente o crescimento, levando as microalgas à morte (HOFF & SNELL, 1997).

Um interessante estudo realizado por Breuer et al. (2013) com *Scenedesmus obliquus* observaram o impacto do pH e temperatura na produção de biomassa, sendo que, a maior biomassa final foi obtida em pH 7 e temperatura 27,5°C.

Neste estudo a temperatura foi controlada entre 20°C±3°C em função do protocolo de cultivo da microalga *M. gracile*.

A grande maioria das microalgas desenvolve-se em temperaturas entre 10 e 35°C, tendo ótimo crescimento entre 15 e 25°C (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). A temperatura exerce influência direta sobre a velocidade da fotossíntese e o seu aumento acelera os processos oxidativos (MARGALEF, 1983).

8.3 Custo/benefício da produção da microalga *Messastrum gracile* nas condições aplicadas neste estudo.

As microalgas têm sido foco de inúmeras investigações biotecnológicas em relação a sua importância econômica, nutricional e ecológica (ANTELO et al., 2010). Em relação ao custo para a produção de elevada biomassa, inúmeros estudos visam meios de cultura alternativo que seja economicamente viável e que produza quantidades ótimas de biomassa.

De acordo com Sipaúba-Tavares & Pereira (2008) um dos maiores custos na produção de microalga são a luz e mão de obra. Neste enfoque, é importante avaliar o custo operacional e o gasto de luz para uma produção comercialmente viável.

A Tabela 8 apresenta os custos das diferentes estratégias produtivas avaliadas neste trabalho, sendo que o custo foi avaliado em dólar (US\$). Em relação à mão de obra de trabalho, considerando 2 a 4 horas diárias trabalhadas, o custo anual com 730 horas foi de US\$ 2,239, o que é composto do salário do funcionário acrescido de 74% de encargos sociais e provisionamentos.

O gasto com energia foi em quilowatts (kW), o custo foi de US\$0.17 kW/h, para a bomba de ar foi de US\$268, para a bomba de água de US\$1,042, para o ar-condicionado de US\$5,241, para a centrifugação da microalga de US\$44 e o fluxo de ar necessário para a esterilização do processo foi de US\$ 19, obtendo um custo de produção de US\$8,853.

Em relação às lâmpadas da sala de cultivo, os valores variaram para cada ciclo de luz, onde, o 24 h:0 h foi o mais dispendioso com um custo de US\$1,519;

20 h:4 h de US\$1,266; 16 h:8 h com um total de US\$1,012 e 12 h:12 h com o menor custo de US\$760. Portanto, em relação ao custo por meio da luminosidade em diferentes ciclos de luz, vale ressaltar que o ciclo de luz 12 h:12 h foi o mais econômico para o cultivo da microalga *Messastrum gracile* nas condições utilizadas neste estudo, com baixo rendimento algal (Tabela 8).

Em relação aos meios de cultura, houve uma diferença econômica significativa entre os meios de cultura comercial (CHU₁₂) e alternativo (ME). O CHU₁₂ é composto por: Nitrato de Cálcio, Fosfato de Potássio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Potássio, Carbonato de Sódio e Cloreto de Ferro, totalizando um custo de US\$ 439.84. Já o meio de cultura ME apresenta um custo de US\$ 329, uma vez que o preço da macrófita (*Eichhornia crassipes*) foi considerado nulo, já que são encontradas frequentemente na região em quantidade abundante (Tabela 8).

Os custos com a manutenção da produção anual, de acordo com este experimento foi de US\$ 1,944, enquanto que o custo anual com água foi de US\$1,284.80. A utilização de água ocorreu nas mesmas proporções, independente do sistema de cultivo (Tabela 8).

Os custos totais anuais para cada tratamento mostraram que no meio de cultura CHU₁₂, o ciclo de luz 24 h:0 h (US\$ 11,801.64) foi mais elevado em relação aos outros tratamentos, enquanto que o ciclo de luz 12 h:12 h (US\$ 11,042.64) apresentou os menores custos. Em relação ao custo/benefício observou-se que não foi viável em relação à biomassa, pois de acordo com todos os dados apresentados pelo experimento e principalmente, pela curva de crescimento a que apresentou maior biomassa foi no ciclo de luz 24 h: 0 h. Neste caso, o mais adequado foi o 20 h: 4 h (US\$11,548.64), de acordo com todos os resultados obtidos e o custo/benefício para este meio. O mesmo foi observado para o meio ME com custo de US\$11,662.09 (24 h:0 h) e de US\$10,903.09 (12 h:12 h). O item que mais influenciou o custo total de produção foi a energia elétrica, independente do meio de cultura, e os preços mais dispendiosos foram para o ciclo de luz de 24 h:0 h (Tabela 8).

Tabela 8. Estimativa dos custos de produção (em US\$ dólar)* para 100.000 L⁻¹ ano no cultivo de *Messastrum gracile* em diferentes ciclos de luz (24 h:0 h, 20 h:4 h, 16 h:8 h e 12h:12h) e nos dois meios de cultura CHU₁₂ e de extrato de macrófita (ME).

Produção	Estimativas	Custo (US\$)
(1) Mão de obra	Custo de mão de obra (2 a 4 horas)	-
730 Horas/Ano	-	2,239
(2) Energia em kW	Custo de eletricidade US\$ 0.17 kW/h	
Bomba de ar	0.18 kW x 24 horas/dia x 365 dias/ano	268
Bomba de água	0.70 kW x 24 horas/dia x 365 dias/ano	1,042
Ar-condicionado	3.52 kW x 24 horas/dia x 365 dias/ano	5,241
Centrifugação da alga	0.70 kW x 1 horas/dia x 365 dias/ano	44
Fluxo de ar (esterilização de algas)	0.3 kW x 1 horas/dia x 365 dias/ano	19
Lâmpadas da sala de cultivo (Ciclo de luz 24 h:0 h)	1.02 kW x 24 horas/dia x 365 dias/ano	1,519
Lâmpadas da sala de cultivo (Ciclo de luz 20 h:4 h)	1.02 kW x 20 horas/dia x 365 dias/ano	1,266
Lâmpadas da sala de cultivo (Ciclo de luz 16 h:8 h)	1.02 kW x 16 horas/dia x 365 dias/ano	1,012
Lâmpadas da sala de cultivo (Ciclo de luz 12 h:12 h)	1.02 kW x 12 horas/dia x 365 dias/ano	760
(3) Meio de cultura comercial (kg)	-	
Nitrato de Cálcio	18.83	98.62
Fosfato de Potássio	3.14	23.25
Sulfato de Magnésio	47	246.52
Cloreto de Potássio	3.14	15.88
Carbonato de Sódio	12.55	49.86
Cloreto de Ferro	0.32	5.71
(3) Meio de cultura alternativo (ME)		
<i>Eichhornia crassipes</i> (litros)	3,935.78	-
NPK (20-5-20) (litros)	157.95	0.29
Vitamina B (kg)	1.3	300
(4) Manutenção	-	1,944
(5) Água (730 m³ Ano⁻¹)	Custo da água US\$ 1.76 m ³	1,284,80
(6) Custo anual total para cada tratamento	Ciclos de luz	-
CHU₁₂	24 h:0 h	11,801.64
	20 h:4 h	11,548.64
	16 h:8 h	11,294.64
	12 h:12 h	11,042.64
ME	24 h:0 h	11,662.09
	20 h:4 h	11,409.09
	16 h:8 h	11,155.09
	12 h:12 h	10,903.09

*Taxa de câmbio média (Janeiro de 2022) US\$ 1,00 = R\$ 5,54. Fonte: 14 de jan. 14:19 UTC.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 8, foi possível analisar os custos de produção da biomassa algal (Tabela 9). O meio de cultura CHU₁₂, no ciclo de luz 24 h:0 h no 5º dia de produção foi o que apresentou maior custo para produção da biomassa por gramas, sendo de US\$1.18, enquanto que nos dias consecutivos o custo se estabilizou em US\$0.59 por grama. No ciclo de luz 20 h:4 h, o maior custo foi no 15º dia de US\$1.44, enquanto que o menor foi para o 5º dia US\$0.64. No ciclo de luz 16 h:8 h observou-se uma constância nos dias 5º ao 10º dia de crescimento com o custo de US\$1.13, entretanto, no 15º houve uma queda neste valor para US\$0.56. Para o ciclo de luz 12 h:12 h o maior custo para a biomassa foi no 15º dia, de US\$5.52.

Segundo a Tabela 9, para o meio de cultura ME, os custos para a produção de biomassa de *Messastrum gracile*, de acordo com as condições deste experimento, variaram ao longo dos dias de cultivo. O ciclo de luz 24 h:0 h apresentou maiores custos no 5º dia de produção, de US\$0.83 enquanto que no 15º dia foi de US\$0.42.

O ciclo de luz 20 h:4 h apresentou maiores custos de biomassa em gramas para o 5º dia, de US\$1.63, enquanto que no 10º dia de crescimento observou-se um menor custo (US\$0.52). Já no ciclo de luz 16 h:8 h o maior custo ocorreu no 5º dia (US\$1.39) enquanto que o menor custo foi no 15º dia (US\$0.93). Para o ciclo de luz 12 h: 12 h observou-se maior custo também no 15º dia (US\$0.99). Como a biomassa está estritamente relacionada à intensidade de luz no ciclo 24 h:0 h, vai ser mais elevada.

Estudos de análise do custo/benefício da produção de biomassa algal são extremamente importantes, porque a produção autotrófica é o método tecnicamente e economicamente mais viável para a produção em larga escala de biomassa algal (SALAMA et., 2017). Além disso, segundo Yan et al. (2011) é necessário que ocorra um equilíbrio, pois sob baixa iluminação, a energia disponível é insuficiente, enquanto sob excesso de luz ocorre fotoinibição.

Tabela 9. Custo/benefício da produção de biomassa por grama de *Messastrum gracile*, nos dias de cultivo (5°, 10° e 15°) nos diferentes ciclos de luz (24 h:0 h; 20 h:4 h; 16 h:8 h e 12 h:12 h, e meios de cultura um comercial (CHU₁₂) e outro de extrato de macrófita (ME).

Meio de cultura	Ciclo de luz	Dias	Biomassa (g)	Custo de Produção (g)
CHU ₁₂	24 h:0 h	5	10,000	1.18
	24 h:0 h	10	20,000	0.59
	24 h:0 h	15	20,000	0.59
	20 h:4 h	5	18,000	0.64
	20 h:4 h	10	17,000	0.68
	20 h:4 h	15	8,000	1.44
	16 h:8 h	5	10,000	1.13
	16 h:8 h	10	10,000	1.13
	16 h:8 h	15	2,000	0.56
	12 h:12 h	5	6,000	1.84
	12 h:12 h	10	10,000	1.10
	12 h:12 h	15	2,000	5.52
ME	24 h:0 h	5	14,000	0.83
	24 h:0 h	10	19,000	0.61
	24 h:0 h	15	28,000	0.42
	20 h:4 h	5	7,000	1.63
	20 h:4 h	10	22,000	0.52
	20 h:4 h	15	21,000	0.54
	16 h:8 h	5	8,000	1.39
	16 h:8 h	10	8,000	1.39
	16 h:8 h	15	12,000	0.93
	12 h:12 h	5	12,000	0.91
	12 h:12 h	10	12,000	0.91
	12 h:12 h	15	11,000	0.99

*Taxa de câmbio média (Janeiro de 2022) US\$ 1.00 = R\$ 5,54.

O controle do ciclo de luz faz toda a diferença na produção da biomassa da microalga *Messastrum gracile*, como também no custo/benefício. Segundo Possatto (2009), para que as espécies de microalgas possam produzir satisfatoriamente várias formas de energia, sendo indispensável o cuidado no processo e no sistema de cultivo destes microrganismos, considerando as peculiaridades de cada espécie e adaptação ao cultivo.

9. CONCLUSÃO

Com base neste estudo e nos resultados observados pode-se concluir que a utilização dos meios de cultura para o desenvolvimento da microalga *Messastrum gracile*, tais como o comercial (CHU₁₂) e o extrato de macrófita (ME), juntamente com os diferentes ciclos de luz (claro/escuro) analisados, apresentaram resultados diferenciados no crescimento desta microalga. O meio de cultura apresentou influência direta na produção de *M. gracile* e os períodos de escuro também influenciaram na biomassa algal.

Em relação ao custo/benefício da produção de *M. gracile* nas condições estudadas, o meio ME e o ciclo de luz 20 h:4 h apresentou o menor custo. No entanto, se considerarmos a biomassa (g), o ciclo de luz 24 h:0 h no 15º dia de crescimento de *M. gracile* apresentou a maior biomassa e o menor custo. Quanto mais intensidade de luz consequentemente, vai ocorrer maior biomassa em condições de cultivo controlado. Apesar do meio CHU₁₂ (comercial) conter todos os macro e micronutrientes adequados para o crescimento da microalga, o uso de macrófita (*Eichhornia crassipes*) como meio de cultura é uma alternativa a ser adotada para esta microalga, e com a utilização de ciclos de luz ciclos 24 h:0 h e 20 h:4 h.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, P., THRONDSSEN, J. Estimating cell numbers. Taxonomy of harmful Cyanobacteria. Manual of Harmful Marine Microalgal. UNESCO Publishing. v. 4, p. 19-129, 2004.
- ANTELO, F.S., ANSCHAU, A., COSTA, J.A.V., KALIL, S.J. Extraction and Purification of C-phyococyanin from *Spirulina platensis* in Conventional and

Integrated Aqueous Two-Phase Systems. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 21, n.5, p. 921-926, 2010.

AOAC, Official Method. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method, in: Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed., Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2012.

ARONSON, S., DUBINSKY, Z. Mass production of microalgae. In: New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems. Birkhäuser, Basel, p. 42-46, 1982.

BARBOSA, J.C., MALDONADO JUNIOR, W. AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. FCAV/UNESP. p. 396, 2015.

BECKER, E. W., BADDILEY, J. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. p. 178, 1994.

BEN-AMOTZ, A., POLLE, J.E.W., RAO, D.V.S. The Alga *Dunaliella*: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology. p. 582, 2009.

BICUDO, C., MENEZES, M., FORZZA, R.C. Introdução: As algas do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, n. 13, p. 49-60, 2010.

BICUDO, C.E.M., MENEZES, M. Phylogeny and classification of Euglenophyceae: A brief review. Frontiers in Ecology and Evolution, v. 4, n. 17, p. 1-17, 2016.

BLACKMAN, F.F., TANSLEY, A.G. A Revision of the classification of the green Algae. University College Press, London, p.64, 1903.

BOHLIN, K. Die Algen der ersten Regnell'schen Expedition. I. Protococcoideen. Bihang till Kongl. Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar, v. 23, n. 7, p. 1-47, 1897.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. Microalgal biotechnology. p.477, 1988.

BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae - their development and commercialisation. Journal of applied phycology, v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013.

BOTTREL, H.H., DUNCAN, A., GLIWICZ, Z.M., GRYGIEREK, E., HERZIG, A., HILLBRICH-ILKOWSKA, A., KURASAWA, H., LARSSON, P., WEGLENSKA, T. A. Review of problems in zooplankton production studies. Norway Journal, v. 24, n. 1, p. 419-456, 1976.

- BOULUS, A., SPANEIR, E., FRIEDLANDER, M. Effect of outdoor conditions on growth rate and chemical composition of *Gelidium crinale* in culture. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 5, p. 471-478, 2007.
- BOURRELLY, P. Les Algues d'eau douce. Les Algues vertes. Editions N. Boubée et Cie, Paris, p. 572, 1972.
- BREUER, G.A., LAMERS, P.P.A., MARTENS, D.E.A., DRAAISMA, R.B.B., WIJFFELS, R.H. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 1–9, 2013.
- BROWN, L.M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion and Management*, v. 37, n. 6, p. 1363-1367, 1996.
- BROWN, M.R., JEFREY, S.W., VOLKMAN, J.K., DUSTAN, G.A. Nutritional properties of micro-algae for marine culture. *Aquaculture*, v. 151, n. 1-4, p. 315-331, 1997.
- CABRALES M.M., GONZÁLEZ, M.F. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. *Medisan*, v. 8, n. 3, p. 27-31, 2004.
- CAMPAÑA-TORRES, A., MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R., MARTÍNEZ-PORCHAS, M., LÓPEZ-ELÍAS, J.A., PORCHAS-CORNEJO, M.A. Productive response of *Nannochloropsis oculata*, cultured in different media and their efficiency as food for the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *International Journal of Experimental Botany*, v. 81, n.1, p. 45-50, 2012.
- CAREY, R.O. Evaluating nutrient impacts in urban watersheds: Challenges and research opportunities. *Environmental Pollution*, v. 173, p. 138-149, 2013.
- CARVALHO, J.F. Energia verde. *Revista Ciência Hoje*. v.39, n. 232, p. 28, 2006.
- CECCHIN, M., BENFATTO, S., GRIGGIO, F., MORI, A., CAZZANIGA, S., VITULO, N., BALLOTARI, M. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.
- CHEIRSILP, B., TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 510-516, 2012.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHU, S.P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media. *The Journal of Ecology*, v. 30, n. 2, p. 284-325, 1942.

CHU, S.P., TRUUMES, I., ROTHOFKY, M.L., PATEL, M.G., GENTILE, F., DAS, P. R., PUAR, M.S., LIN, S. L. Inhibition of c-fos Proto-oncogene Induction by Sch 52900 and Sch 52901, Novel Diketopiperazines Produced by *Gliocladium* sp. *The Journal of antibiotics*, v. 48, n. 12, p. 1440-1445, 1995.

CICCONE, M.M., CORTESE, F., GESUALDO, M, CARBONARA, S., ZITO, A., RICCI, G. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care, 2013.

COLLINS, A.F., CRITCHLEY, C. Basic Biology to Industrial Application. Wiley-Verlag & Co. p. 229-240, 2005.

COMAS, G.A. Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba. Berlin, Stuttgart, Gebruder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 1996.

COOK, P.W. Chemical engineering problems in large scale culture of algae. *Indust. and Engng. Chem.* v.43, n.10, p. 2385-2389, 1951.

CORRÊA, D.O. Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em foto-biorreator alimentado por emissões gasosas de motores. Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná. p.100, 2015.

DEFANTI, L.S., SIQUEIRA, N.S., LINHARES, P.C. Produção de biocombustíveis a partir de algas fotossintetizantes. *Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e Instituto Federal Fluminense*. p. 11-21, 2010.

DEL CAMPO, J.A., GARCÍA-GONZÁLEZ, M., GUERRERO, M.G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007.

DERNER, R.B., OHSE, S., VILLELA, M., CARVALHO, S.M.D., FETT, R. et al. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

EIBL, J.K., CORCORAN, J.D., SENHORINHO, G.N., ZHANG, K., HOSSEINI, N.S., MARSDEN, J., ROSS, G.M. Bioprospecting for acidophilic lipid-rich green microalgae solated from abandoned mine site water bodies. *AMB Express*, v.4, p.7, 2014.

EMBRAPA AGROENERGIA. Agroenergia em revista. Ano IV, v. 1, n. 10, p. 60, 2016.

EPPLEY, R.W., RINGER, E.H. Nitrogen assimilation of an ocean diatom in nitrogen-limited continuous culture. *Journal of Phycology*, v. 10, n. 1, p. 15-23, 1974.

EPSTEIN, E., BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2^a Ed. Londrina. p. 403, 2006.

ESTEVEZ, F. de A. Fundamentos de Limnologia. 3^a ed. Interciência. 2011.

FAWLEY, M. W., DIMMER, S.K., FAWLEY, K.P. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) 1. *Journal of Phycology*, v. 42, n. 1, p. 142-154, 2006.

FENG, Y., LI, C., ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 101-105. 2011.

FIORESI, T.B., SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. *Biotemas*, v. 21, n. 1, p. 7-16, 2008.

GARCIA DA SILVA, T., BOCK, C., SANT'ANNA, C.L., BAGATINI, I.L., WODNIOK, S., VIEIRA, A.A.H. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea*, v. 17, n.1, p. 1-19, 2017.

GIANI, A. Implications of phytoplankton chemical composition for zooplankton production: experimental evidence. *Oecologia*, v. 87, n. 3, p. 409-416, 1991.

GOLTERMAN H.L., CLYMO R.S., OHNSTAD M.A. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. IBP. London: Blackwell Scientific publications. p. 213, 1978.

GONÇALVES, C.F., MENEGOL, T., RECH, R. Biochemical composition of green microalgae *Pseudoneochloris marina* grown under different temperature and light conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, n. 10 p. 101-132, 2019.

GONG, Y., JIANG, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology letters*, v. 33, n. 7, p. 1269-1284, 2011.

GONZALEZ-CAMEJO, J., VIRUELA, A., RUANO, M. V., BARAT, R., SECO, A., FERRER, J. Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, v. 40, p. 101511, 2019.

GUEDES, A.C., OLIVEIRA H.M., MALCATA, F.X. Microalgae as source of carotenoids. *Mar Drugs*. v. 9 p. 625-644, 2011

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.

GUIRY, M.D., GUIRY, G.M. *Algae Base*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2021.

GULDHE A., ANSARI F.A., SINGH P., BUX F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, v. 99, n.7, p. 47-53, 2017.

HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G.M., DANGUAH, M.H. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HINDAK, F. Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). I. *Biologické Práce* v. 23, n. 4, p. 1-192, 1977.

HINDAK, F. Three new species of green algae (Chlorophyceae). *Preslia*, v. 52, n. 10, p. 289-298, 1980.

HINDAK, F. Contribution to the taxonomy of some *Cyanophyte* genera. *Preslia*, v. 60, n.4, p. 289-308, 1988.

HOFF, F.H., SNELL, T.W. *Plankton culture manual*. Florida: Florida aqua farms, 1997.

HU, Q. Environment effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. p. 83–93, 2004.

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERG, M., DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, v. 54, p. 621–639, 2008.

HUNG, C. C., WONG, G. T. F., LIU, K. K., SHIAH, F. K., GONG, G. C. The effects of light and nitrate levels on the relationship between nitrate reductase activity and

NO₃-uptake: field observations in the East China sea. *Limnology and Oceanography*, v. 45, p. 836-848, 2000.

JANSSEN, M., KUIJPERS, T.C., VELDHOF, B., TERNBACH, M.B., TRAMPER, J. MUR, L.R., WIJFFELS, R.H. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light:dark cycles: *J. Biotechnol.* v. 70 p.323–333, 1999.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; WINTER, M.; TRAMPER, L. R. M.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, Philadelphia, v. 29, n. 4-5, p. 298-305, 2001.

JANSSEN, M., TRAMPER, J., MUR, L.R., WIJFFELS, R. Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and bioengineering*, v. 81, n. 2, p. 193-210, 2003.

JEFFREY, S., BROWN, M.R. Volkman, J.K., Dunstan, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, v. 151, n. 1-4, p. 315-331, 1997.

JUSSIÁK, M.P., DUSZOTA, K., MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. *Water Research*, v. 140, n. 18, p. 1-7, 1984.

KAEPINTONG, K.K., SHOTIPRUK, A. POWTONGSOOK, S., PAVASANT, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 2, p. 288-295, 2007.

KHAN, M.I., SHIN, J.H., KIM, J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018.

KILHAM, S., KREEGER, D., GOULDEN, C., LYNN, S. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents on *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol.* v.38, n. 3, p. 591-596, 1997.

KOBAYASHI, M., ITO, M. Studies on the control of cell division in a green alga *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorococcales) II. Control by nitrogen compounds. *The Botanical Magazine. Tokyo.* v. 90, n. 3, p. 211-217, 1977.

KOMARÉK, J., FOOT, B. Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 7. Teil, 1. Hälfte. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chroococcales. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obemiller), Stuttgart. p. 1043, 1983.

KOMÁRKOVA-LEGNEROVÁ, J. The systematics and ontogenesis of the genera *Ankistrodesmus corda* and *Monooraphidium* Gen. Nov. Studies in Phycology. v. 22, n. 70, p. 74-144, 1969.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K. (ed.) Methods of seawater analysis. German: Verlag Chemie Weinheim., p. 126-133, 1976.

KORSHIKOV, A.A. Pidklas Protokokovi (Protococcinae). Vyznachnyk Prsnovodnykh Vodorostej Ukrainskoyi RSR, v. 5, p. 1-439, 1953.

KORSHIKOV, O.A. The freshwater algae of the Ukrainian ssr. Bishen Singh Mahendra al Singh and Koletz, 1987.

KRIENITZ, L., USTINOVA, I., FRIEDL, T., HUSS, V.A. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, v. 37, n. 5, p. 852-865, 2001.

KRIENITZ, L., BOCK, C., DADHEECH, P.K., PRÖSCHOLD, T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. Phycologia, v. 50, n. 1, p. 89-106, 2011.

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, n. 1, p. 72-77, 2015.

LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae-a literature review. Vatten, v. 62, n. 1, p. 31, 2006.

LATASA, M. Pigment composition of *Heterocapsa* sp. And *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. Sci. v. 59, n.1, p. 25-37, 1995.

LI, Y., CHEN, Y. F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J., RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. Bioresource Technology, v. 102, p. 5138–5144, 2011.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. Rima. São Carlos, p. 606, 2006.

MACEDO, R.V.T. Estudo da influência de diferentes teores de nitrogênio em dois níveis de temperatura na produção de lipídios e ácido gama-linoleico por *Spirulina* máxima, 1999.

MALLICK, N., MANDAL, S., SINGH, A. K., BISHAI, M., DASH, A. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 87, n. 1, p. 137-145, 2012.

MANDAL, S. & MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. Applied Microbiol Biotechnology, v. 84, p. 281-91, 2009.

MARGALEF, R. Limnología. Ediciones Omega S.A.P., p. 1010, 1983.

MATSUNAGA, M., BEMELMANS, P.F., TOLEDO, P.D., DULLEY, R.D., OKAWA, H., PEDROSO, I.A. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. Agricultura em São Paulo, v. 23, n. 1, p. 123-139, 1976.

MENEZES, M., BICUDO, C.E.M. Algas – Diagnóstico preliminar da biodiversidade no Brasil. In: Simpósio Metas da Convenção da Biodiversidade para 2010: construindo a Lista de Espécies do Brasil. In: 60º Congresso Nacional de Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana: Sociedade Botânica do Brasil. p. 59-64, 2009.

MESECK, S.L., ALIX, J.H., WIKFORS, G.H. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY 429). Aquaculture, v. 246, n. 1-4, p. 393-404, 2005.

METTING, N.F., ROSSI, H. H., BRABY, L. A., KLIAUGA, P. J., HOWARD, J., ZAIDER, M., RAPKIN, M. Microdosimetry near the trajectory of high-energy heavy ions. Radiation research, v. 116, n. 2, p. 183-195, 1988.

MEZZOMO, N., SAGGIORATO, A.G., SIEBERT, R., TATSCH, P.O., LAGO, M.C., HEMKEMEIER, M., COSTA, J.A.V., BERTOLIN, T.E., COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MIASHIRO, L. Avaliação ambiental de um sistema de piscicultura, através do fitoplâncton e de ensaios ecotoxicológicos com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesca, São Paulo, 2008.

MONDAL, M., GHOSH, A., TIWARI, O.N., GAYEN, K., DAS, P., MANDAL, M.K., HALDER, G. Influence of carbon source and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. *Energy Conversion and Management*, v. 145, n. 1, p. 247-254, 2017.

MOTA, F.S.B., VON SPERLING, M. Nutrientes de Esgoto Sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES, p. 428, 2009.

MUKUNO, D.R.O. Efeito de fatores ambientais na morfologia das plantas de Aguapé. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 8, n. 1, p. 231-239, 1985.

MULLER-FEUGA, A. Microalgae for Aquaculture. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, p. 352, 2004.

MUNOZ, R., GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, London, v. 40, n. 15, p. 2799–2815, 2006.

NASCIMENTO, I.A. MARQUES, S.S.I., CABANELAS, I.T.D., PEREIRA, S.A., DRUZIAN, J.I., DE SOUZA, C.O., NASCIMENTO, M.A. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

NUSCH, E.A. Of different methods for Chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 14, n. 1, p. 14-36, 1980.

PANKOW, H.O. *Algenflora*, Gustav Fisher Verlag, Jena, 1990.

PEREZ-GARCIA, O., BASHAN, Y., PUENTE, M.E. Organic carbono supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic Growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. v. 47, n. 1, p.190, 2011.

PIPES, W. O., GOTAAS, H.B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. *Applied microbiology*, v. 8, n. 3, p. 163-169, 1960.

POSSATO, A.R. Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel: uma revisão. Monografia. Pós-graduação latu-sensu em Biocombustíveis. 2009.

PRIYADARSHANI, I., RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae. A review. *Journal Algal Biomass*. v. 3, n.1, p. 89–100, 2012.

- PULZ, O., SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*. p. 123-152, 1998.
- RADMANN, M.E., COSTA, J.A.U. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 6^a ed. Editora. Guanabara Koogan. p. 906, Rio de Janeiro, 2001.
- REYNOLDS C. S. *Ecology of Phytoplankton - Ecology, Biodiversity and Conservation*. Cambridge, 2006.
- RIBEIRO, D.M.A, RONCARATTI, L.F., POSSA, G.C., GARCIA, L.C., CANÇADO, L.J., WILLIAMS, T.C.R., BRASIL, B.D.S.A.F. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. *Bioresource Technology Reports*, v. 9, n.1, p. 100-354, 2020.
- RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Asian pacific phycology in the 21st Century: Prospects and challenges*, p. 33-37, 2004.
- ROCHA, O., DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research*, v. 7, n. 2, p. 279-294, 1985.
- RODULFO, A.C.G. Estudio petrologico del metamorfismo y los granitoides entre ciperez y aldea del obispo (w de la provincia de salamanca). Tese de Doutorado. Universidad de Salamanca, 1980.
- SAHU A., SAHOO S.K., GIRI S.S. Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of Indian major carp. *Labeo rohita*. *Bioresource of Technology*, v. 85, n. 3, p. 309-311, 2002.
- SALAMA, A.F., ABDEL-HAMID, N.M., EL-SHEEKH, M., TOSSON, E., GABR, A.M. *Spirulina platensis* Microalgae Protects against Diethyl Nitrosamine Carcinogenic Effect on Female Albino Rats. *Alexandria Journal of Veterinary Science*, v. 53, n.1, p. 167-179, 2017.
- SANT'ANNA, C.L. Chlorococcales (Chlorophyceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Bibliotheca Phycologica*. v. 67, n.1, p. 1-348, 1984.

SANTOS, F.M., PIRES, J. Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. *Bioresource technology*, v. 267, n. 1. p. 725-731, 2018.

SCHENK, P.M. THOMAS-HALL, S.R., STEPHENS, E., MARX, U.C., MUSSGUNG, J.H., POSTEN, C., HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, v. 1, n. 1, p. 20–43, 2008.

SILVA, S.A.P. Biorremediação em águas residuais: remoção de fosfatos utilizando microalgas *Chlorella vulgaris* imobilizadas em meio de alginato de sódio. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia) – Universidade do Porto. Porto, 2007.

SINGH, P., GUPTA, S.K., GULDHE, A., RAWAT, I., BUX, F. Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques A2–Kim, Se-Kwon. *Handbook of Marine Microalgae*. Chapter 4, Boston: Academic Press. p. 43-54, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Uso racional da água em aquicultura. p.190, 2013.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: l-algas clorofíceas. *Biotemas*, v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., PELICOLI, L. C., OLIVEIRA, A. Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology*, v. 1, p.10-15, Rio Claro, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Editora Rima. p.106, São Carlos, 2001.

SIPAÚBA-TAVARES L.H., BACHION M.A. Population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei* in laboratory. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, p.701-711, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., BRAGA, F.M.D.S. The feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishponds with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, p. 459-466, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES L.H., PEREIRA A.M.L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 4, p. 875-883. 2008.

SIPAÚBA-TAVARES L.H., IBARRA L.C., FIORESI T.B. Cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyceae) in laboratory using CHU₁₂ medium and macrophyte with NPK. Boletim do Instituto de Pesca, v. 35, n. 1, p.111-118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., DONADON, A.R.V., MILAN, R.N. Water quality and plankton populations in an earthen polyculture pond. Brazilian Journal of Biology, v. 71, p. 845-855, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; SCARDOELI-TRUZZI, B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. Brazilian Journal of Biology, v. 75, n. 4, p. 796-803, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H, SEGALI, A.M.D.L., BERCHIELLI-MORAIS, F.A., SCARDOELI-TRUZZI B. Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte, Acta Limnológica Brasiliensia, v. 29, p. 5, 2017.

SIPAÚBA-TAVARES L.H., FLORÊNCIO T., TRUZZI B.S. Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. Brazilian Journal of Biology, v. 78, p. 579-587, 2018.

SIPAÚBA-TAVARES L.H., FERNANDES, JOÃO B.K., MELO-SANTOS G.L., SCARDOELI-TRUZZI B. Microalgae *Ankistrodesmus gracilis* as feed ingredient for ornamental fish *Xiphophorus maculatus*. International Aquatic Research, v. 1, n. 2, p. 1-134, 2019.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., TRUZZI, B.S., FRENERICK, D. C. TEDESQUE, M. G. Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) in alternative culture media Braz. J. Biol., v. 80, n. 4, p. 914-920, 2020.

SOKAL, R.R., ROHLF F.J. Biometry. The principles and practices on statistics in biological research. W.H. Freeman and Company, San Francisco. p. 857,1981.

SOLETTO, D., BINAGHI, L., LODI, A., CARVALHO, JCM. and CONVERTI, A., Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. Aquaculture, v. 243, n. 1-4, p. 217-224, 2005.

SOUZA, L.S. Caracterização morfofisiológica, produção de lipídios e Carotenóides em diferentes condições de cultivo de duas microalgas com potencial biotecnológico. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina,

Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. p. 120, 2016.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SPOEHR, H.A., MILNER, H.W. The chemical composition of *Chlorella*; effect of environmental conditions. *Plant physiology*, v. 24, n. 1, p. 120, 1949.

TAKACHE H., PRUVOST J., MAREC H. Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Research*, v. 8, p. 192–204, 2015.

TEDESQUE, M.G., SCARDOELI-TRUZZI, B., SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) growth using sugarcane molasses-based macrophyte extract culture media. *Journal of Applied Phycology*, p. 1-10, 2021.

THOMAS, W.H., TOMABENE, T.G., WEISSMAN, J. Screening of lipid yielding microalgae: activities for 1983. p. 31, 1984.

TOMASSELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed) *Handbook of the microalgal culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing. p. 3-19, 2004.

TRAVIESO, L., BENÍTEZ, F., SÁNCHEZ, E., BORJA, R., MARTÍN, A., COLMENAREJO, M.F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*, v. 28, n. 2, p. 158-165, 2006.

UGWU, C.U., AOYAGI, H., UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, v. 99, n. 10, p. 4021-4028, 2008.

URQUIAGA, S., RESENDE, A. D., QUEIROZ, J., ALVES, B., OLIVEIRA, O. D., BODDEY, R. Efeito residual, a longo prazo, da queima, aplicações de vinhaça e adubo nitrogenado no rendimento da cana-de-açúcar. *Resumo expandido*. UFV. p. 25, 1995.

VOLLENWEIDER, R.A.A. *Manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. 2^a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. IBP, Handbook, v. 12, p. 225, 1974.

WAGENEN, V.J., FRANCISCI, D., ANGELIDAKI, I. Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile*

(Chlorophyceae) in alternative culture media. *Journal of Applied Phycology*, v. 27, n. 5, p. 1775-1782, 2015.

WAHIDIN, S., IDRIS, A., SHALEH, S.R. The influence os light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp.* *Bioresoure Technology*, v.129, p. 7-11, 2013.

WEST, G.S., FRITSCH, F.E. A treatise on the British freshwater algae in which are included all the pigmented Protophyta hitherto found in British freshwaters. Cambridge, 1927.

WILHELM, C., JAKOB, T. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 92, n. 5, p. 909-919, 2011.

WILSON, E.O. *The Diversity of Life*. Cambridge: Belknap Press, 1992.

YAMAGUCHI, H., SAKAMOTO, S., YAMAGUCHI, M. Nutrition and growth kinetics in nitrogen-and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, v. 7, n. 1, p. 26-32, 2008.

YAN, R. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus sp.* PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, 2011.

YANG, J., XU, M., ZHANG, X., QIANG, HU., SOMMERFIELD, M., CHEN, Y. Lifecycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 159–165, 2011.

YEH, K.L., CHANG, J.S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, v. 105, p. 120-127, 2012.

YIN, K., HARRISON, P.J, DORTCH, Q. Lack of ammonium inhibition of nitrate uptake for a diatom grown under low light conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.228: p.151–165, 1998.

YOO C., JUN S.Y., LEE J.Y., AHN C.Y., OH, H.M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 1, p. 71-74, 2010.

ZENG, X., DANQUAH, M. K., CHENA, X. D., LU, Y. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Kidlington, v. 15, n. 6, p. 3252– 3260, 2011.

ZHENG, Y., CHI, Z., LUCKER, B., CHEN, S. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, v. 103, p. 484-4889, 2012.

Sites:

<<https://www.ufrgs.br/floracampestre/eichhornia-crassipes-aguape/>>. Acesso em: 26 Junho de 2021.

<<https://imed.edu.br/Ensino/sistemas-Informacao/graduacao/Noticia/combustiveis-feitos-de-algas>>. Acesso em: 28 de Junho de 2021.

<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/175843/345763.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 3 de Julho de 2021.

<<https://www.canalbioenergia.com.br/pesquisa-encontra-microalgas-que-crescem-em-residuos-e-geram-biocombustiveis/>>. Acesso em: 7 de Agosto de 2021.

<<https://www.agroestat.com.br/>> Acesso em: 5 de Janeiro de 2022.