

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DA REGIÃO SUL – CERES
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

ANA CAROLINA DE SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MEIO DE CULTURA DE MENOR CUSTO PARA A
PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE MICROALGA *Nannochloropsis oculata*.**

LAGUNA

2022

ANA CAROLINA DE SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MEIO DE CULTURA DE MENOR CUSTO PARA A
PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE MICROALGA *Nannochloropsis oculata*.**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca do Centro de Educação Superior da Região Sul, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Farias Neves.

LAGUNA

2022

ANA CAROLINA DE SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MEIO DE CULTURA DE MENOR CUSTO PARA A
PRODUÇÃO DE CONCENTRADO DE MICROALGA *Nannochloropsis oculata*.**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca do Centro de Educação Superior da Região Sul, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Banca Examinadora

Orientador: _____

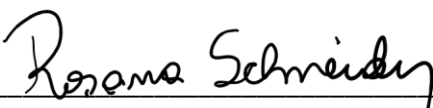
Prof. Dr. Fábio de Farias Neves

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____

Aline Brum Figueredo

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:  _____

Rosana de Cássia de Souza Schneider
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Laguna, 18 de fevereiro de 2022.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por sempre me dar força e me abençoar, aos meus pais, meu irmão que sempre foram inspiração para mim, e a minha Vó Ana (em memória).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as vezes que me deu força para seguir em frente e sempre ilumina meu caminho.

Aos meus pais, Sandro e Cristiane, por sempre estarem ao meu lado, sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, agradeço ao meu irmão por ser um motivo de inspiração para mim, e a minha cunhada por dividir comigo vários momentos de aflição de uma vida de universitárias. Obrigada por tudo, amo vocês.

A todos meus amigos (principalmente Fernanda, Ingrid e Diego) por sempre estarem me dando força, me aconselhando, sempre compreenderam minha ausência em vários momentos e sempre me apoiaram.

A toda minha família que sempre me incentivou a continuar.

Agradeço a todos os colegas e amizades que foram feitas durante toda graduação, principalmente Ramirez e Kaian, por me ajudarem diversas vezes, Ysadora por me aguentar e me ajudar em diversos momentos durante o curso. Levarei vocês para sempre comigo.

A todos meus colegas de LCBA. Fran, que choramos juntas algumas vezes por nervoso pré prova, uma pessoa que Deus colocou novamente no meu caminho depois do ensino médio, minha eterna gratidão, a Gabi por também me ajudar diversas vezes e aos meninos Vitor e Erickson por toda a parceira e pelos momentos de risada no laboratório. A vocês meus companheiros de rotina, minha gratidão por tudo.

Ao meu orientador e professor Dr. Fábio, por toda paciência e ensinamentos durante a graduação. Agradeço por ter me aberto as portas do LCBA, na qual hoje sou apaixonada pelo mundo das microalgas. Minha gratidão

Ao Rafa, que me ensinou e tem me ensino muito sobre microalgas, agradeço por toda paciência e ensinamentos.

A todos os professores que tive o prazer de ter aula durante toda a graduação, agradeço a todos por todos os ensinamentos.

Gostaria de agradecer a todos que estiveram comigo durante todos esses anos de graduação, que me ajudaram de alguma forma.

Um agradecimento em especial a equipe da Prof^a Rosana pelas análises realizadas na biomassa coletada no experimento.

Minha eterna gratidão!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

As microalgas são microrganismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, normalmente unicelulares. Esses organismos possuem diversas aplicações de importância econômica, nutricional e ambiental. Na área alimentar, algumas espécies de microalgas são fonte de proteínas, carboidratos e lipídeos, tendo potencial para serem implementadas em rações ou alimento vivo, complementando os requisitos nutricionais de organismos aquícolas cultivados. Um dos entraves do cultivo em larga escala de microalgas, é o alto custo dos meios de cultura, devido a isso o uso de meios alternativos de fácil aquisição e que sejam ricos em nutrientes, pode viabilizar o processo. Esse custo está associado principalmente ao meio de cultura, já que as microalgas necessitam de uma vasta gama de nutrientes para o seu crescimento ótimo. O uso de fertilizantes agrícolas é uma alternativa em potencial para a substituição parcial ou total dos sais inorgânicos de pureza analítica (P.A), tendo como objetivo, reduzir os custos de produção do cultivo de microalgas, podendo obter rendimentos iguais ou superior em biomassa em relação ao meio de cultura convencional. A *Nannochloropsis oculata* é uma espécie muito utilizada na aquicultura, visto que se reproduz rapidamente e tem um elevado teor de ácido graxos poli-insaturados (PUFAs), sendo de grande importância na nutrição principalmente de larvas de peixes, moluscos e crustáceos. Mesmo tendo uma vasta gama de aplicações, o custo de produção em larga escala é muito alto, principalmente relacionado ao meio de cultura utilizado. Devido a esse custo, há a necessidade de buscar fontes de nutrientes que sejam de menor custo e rica em nutrientes que possa suprir a necessidade da microalga comparado ao meio convencional utilizado para o cultivo. Desde modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de uso um meio alternativo a base de fertilizante para o cultivo de *Nannochloropsis oculata*. Foi utilizado um meio de cultura alternativo com 0,083 g L⁻¹ de fertilizante hidropônico Fortgreen e o meio de cultura F/2 Guillard (controle), foram analisados parâmetros de densidade celular, turbidez, salinidade, temperatura, pH, biomassa seca e concentração de amônia, nitrito, nitrato e ortofosfato durante 8 dias. A *N. oculata* obteve uma densidade celular de 2582 ± 639 e 3520 ± 1067 x10⁴ cel/mL para o meio F/2 Guillard e o meio Fortgreen (Fg), respectivamente, não havendo diferença significativas (p>0,05). Para os dados de turbidez, salinidade, temperatura e pH, as condições se mantiveram constantes durante todo o experimento. Em relação ao custo de produção o uso de fertilizante teve uma redução de 92% no custo de produção em relação ao meio F/2.

Palavra-chave: *Nannochloropsis oculata*; fertilizante; custo de produção.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic, eukaryotic or prokaryotic microorganisms, usually single-celled. These organisms have several applications of economic, nutritional, and environmental importance. In the food area, some species of microalgae are a source of proteins, carbohydrates, and lipids, and have the potential to be implemented in feed or live food, complementing the nutritional requirements of cultured aquaculture organisms. One of the obstacles to large-scale cultivation of microalgae is the high cost of culture media. Because of this, the use of alternative media that are easy to acquire and rich in nutrients can make the process feasible. This cost is mainly associated with the culture medium, since microalgae need a wide range of nutrients for optimal growth. The use of agricultural fertilizers is a potential alternative for the partial or total replacement of inorganic salts of analytical purity (P.A), aiming to reduce the production costs of microalgae cultivation, being able to obtain equal or higher yields in biomass in relation to conventional culture medium. *Nannochloropsis oculata* is a species widely used in aquaculture, since it reproduces quickly and has a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), being of great importance in the nutrition mainly of fish larvae, mollusks and crustaceans. Even though it has a wide range of applications, the cost of large-scale production is very high, mainly related to the culture medium used. Due to this cost, there is a need to search for sources of nutrients that are lower cost and rich in nutrients that can meet the needs of the microalgae compared to the conventional medium used for cultivation. Thus, the objective of the present work was to evaluate the potential use of an alternative fertilizer-based medium for the cultivation of *Nannochloropsis oculata*. An alternative culture medium with 0.083 g L⁻¹ of Fortgreen hydroponic fertilizer and F/2 Guillard culture medium (control) was used. Parameters of cell density, turbidity, salinity, temperature, pH, dry biomass and concentration of ammonia, nitrite, nitrate and orthophosphate were analyzed during 8 days. *N. oculata* obtained a cell density of 2582 ± 639 and 3520 ± 1067 x10⁴ cel/mL for F/2 Guillard medium and Fortgreen medium (Fg), respectively, with no significant difference (p>0.05). For turbidity, salinity, temperature and pH data, the conditions remained constant throughout the experiment. Regarding production cost, the use of fertilizer had a 92% reduction in production cost when compared to F/2 medium.

Keywords: *Nannochloropsis oculata*; fertilizer; cost of production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem microscópica da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	19
Figura 2: Raceways comerciais.	22
Figura 3: Cilindros verticais tipo “ <i>bag</i> ” descartáveis.	22
Figura 4: Sistema de cultivo para o teste preliminar com meios alternativos para cultivo de <i>N. oculata</i>	27
Figura 5: Sistema de cultivo tipo bolsa - <i>bag</i> para produção de biomassa.....	28
Figura 6: Biomassa filtrada em filtro de fibra de vidro GF-1 47mm nos dias 0, 4 e 8 de cultivo.	30
Figura 7: Preparação e floculação da biomassa com Hidróxido de Sódio (NaOH) e Floculante	33
Figura 8: Curva de crescimento da <i>Nannochloropsis oculata</i> nos diferentes meios de cultivo. Meio F/2 Guillard convencional e meio Fg (Fortgreen fertilizante) alternativo.	37
Figura 9: Variação de turbidez durante o cultivo <i>Nannochloropsis oculata</i> nos diferentes meios, F/2 Guillard convencional e meio Fg (Fortgreen – fertilizante) alternativo.	39
Figura 10: Cultivo da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> em sistema de reator tipo bolsa - <i>bag</i> no 2 dia de cultivo.	58
Figura 11: Cultivo da microalga <i>N. oculata</i> em sistema de reator tipo bolsa - <i>bag</i> no 8 (último) dia de cultivo.	58
Figura 12: Preparo para floculação da biomassa de <i>N. oculata</i>	59
Figura 13: Biomassa resultante após a floculação da biomassa de <i>N. oculata</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de nutrientes e suas respectivas funções.....	21
Tabela 2: Comparação entre os sistemas de fotobiorreatores e sistemas abertos.	23
Tabela 3: Percentagem garantia de presença de cada nutriente presente na composição do Fertilizante Fortgreen.....	29
Tabela 4: Metodologias utilizadas pela Alfakit para cada análise. Baixa concentração (B/C) e alta concentração (A/C).	32
Tabela 5: Dados de DC (densidade celular) e custo de produção em larga escala de meio de cultura alternativo para <i>N. oculata</i>	36
Tabela 6: Valores dos parâmetros de crescimento. Densidade Celular Máxima (DCM), Taxa de Crescimento Específico (μ), Velocidade de Crescimento (K), Tempo de Duplicação (T), Produtividade (P), Biomassa acumulada (X) e Biomassa Seca (BS) (g/L).	39
Tabela 7: Resultados na literatura do uso de meio alternativo para o cultivo de microalgas.....	41
Tabela 8: Valores das concentrações (mg L ⁻¹) e consumo para nitrito, nitrato, amônia total e ortofosfato no dia 0 e dia 8 para cada tratamento e percentual (%) de remoção ou incremento de cada nutriente.....	43
Tabela 9: Quantidade fornecida de nitrogênio (N) e fósforo (P) para cada meio de cultura analisado.	43
Tabela 10: Predominância (%) de ácidos graxos presente na biomassa de cada meio de cultivo.	46
Tabela 11A: Custo de produção (R\$/m ³) para o meio F/2 Guillard.	47
Tabela 11B: Custo de produção (R\$/m ³) para o meio Fortgreen.	47
Tabela 12: Valores do custo de produção para o meio F/2 Guillard e para o meio Fortgreen.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
2.1	MICROALGAS	17
2.1.1	<i>Nannochloropsis oculata</i>	18
2.2	MEIO DE CULTIVO	19
2.3	CUSTOS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS E RELAÇÃO COM O MEIO DE CULTURA	21
2.4	SISTEMA DE CULTIVO	21
2.5	APLICAÇÕES	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	27
4	HIPÓTESE	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	Material Biológico	27
5.2	Teste preliminar e escolha da fonte de nitrogênio	27
5.3	Delineamento Experimental e Obtenção da Biomassa	38
5.4	Parâmetros de Crescimento e Produtividade	29
5.5	Análises físico-químicas	31
5.6	Separação da Biomassa	33
5.7	Análise de rendimento	33
5.8	Extração de lipídios e determinação de ácidos graxos	34
5.9	Análise de Custo de Produção	35
5.10	Análise Estatística	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	Teste preliminar e escolha da fonte de nitrogênio	36
6.2	Parâmetros de Crescimento	36
6.3	Dados de lipídios e caracterização ácidos graxos poli-insaturados	44
6.4	Custo de Produção	46
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	50
	ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, normalmente unicelulares (PORTUGAL, 2010), podem viver em ambientes dulcícolas, marinhos ou estuarinos (OLIVEIRA, 2019; PEREIRA, 2009; PORTUGAL, 2010). Esse grupo de organismos apresenta diferentes adaptações e relações ecológicas em resposta aos fatores ambientais. São produtores primários, sendo afetados diretamente por alterações de fatores químicos e físicos no ambiente. Necessitam de requisitos básicos para um bom crescimento, tais como: luz, água, nutrientes, pH e temperatura (TEIXEIRA, 2015). Esses organismos apresentam uma sensibilidade a alguns poluentes sendo sujeitos a alterações no metabolismo, tendo a capacidade de bioacumularem alguns poluentes ambientais, atuando como indicadores ambientais. Na área alimentar, a biomassa de algumas espécies de microalgas pode ser utilizada como fonte de proteínas, carboidratos e lipídeos, servindo como suplemento nutricional. Algumas moléculas de alto valor agregado também pode ser produzidas pelas microalgas como pigmentos, antioxidantes e ácido graxos poli-insaturados. Fornecem polissacarídeos, aminoácidos, enzimas e proteínas que variam em relação à quantidade de acordo com cada espécie, as quais tem potencial para serem implementadas em rações, assim complementando os requisitos nutricionais de organismos cultivados como peixes e crustáceos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Uma das vantagens do cultivo de microalgas, é que as mesmas podem ser cultivadas em solos inadequados para a agricultura e aquicultura, ou em terras inóspitas (AVERSARI *et al.*, 2018). As microalgas não necessitam de água potável para o crescimento, podendo ser utilizada águas salinas e hipersalinas, água de produção industrial, esgoto sanitário, efluentes de refinaria e outros tipos, desde que, não apresentem compostos tóxicos para as microalgas (TEIXEIRA, 2015). As microalgas são consideradas de grande importância na aquicultura, pois servem como principais fontes de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA) como, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3). A presença de LC-PUFA fornecido aos animais do cultivo, direta ou indiretamente, desempenha um fator fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso, crescimento e qualidade desses organismos cultivados (PEREIRA, 2016).

Um dos entraves do cultivo em larga escala de microalgas, é o alto custo dos meios de cultura (OLIVEIRA, 2019), devido a isso o uso de meios alternativos de fácil aquisição e que sejam ricos em nutrientes, pode viabilizar o processo (COSTA, 2018). O custo elevado está associado principalmente ao uso de nutrientes na água, já que as microalgas necessitam de uma vasta gama de nutrientes para o seu crescimento ótimo (OLIVEIRA, 2019).

O uso de fertilizantes agrícolas é uma alternativa em potencial para a substituição parcial ou total dos sais inorgânicos de pureza analítica, que são usados em escala laboratorial para a formulação dos meios, tendo como objetivo, reduzir os custos de produção do cultivo de microalgas, podendo obter rendimentos iguais ou superior em biomassa em relação ao meio de cultura padrão (OLIVEIRA, 2019; SOARES, 2012; VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 1999). Existem vários meios de culturas alternativos que fornecem a concentração de nutrientes ideal para o crescimento das microalgas. Estes servem de base para o desenvolvimento de baixo custo na produção onde o objetivo é a substituição dos elementos mais importantes como o nitrogênio e fósforo. A concentração de nutrientes é um dos fatores importantes para o meio, pois influencia na taxa de crescimento, composição celular, na composição de clorofila, além do rendimento final da biomassa algal (VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 1999).

O uso de meios alternativos aliado com a inclusão de carbono orgânico como de fonte de manganês e as vitaminas B₁ e H, podem alcançar uma rentabilidade que torne os cultivos em larga escala economicamente viáveis (OLIVEIRA, 2019). Existem estudos que afirmam que meios de cultura alternativos são mais baratos e produzem biomassa igual ou até maior que cultivos que usam meio de cultura padrão (VALENZUELA-ESPINOZA *et al.*, 1999). Soares (2012) utilizou diferentes tipos de fertilizantes agrícolas para a produção de duas espécies de microalgas marinhas (*Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.), na qual o fertilizante se mostrou uma boa fonte de nutrientes sendo uma alternativa potencial para substituição do meio de cultivo convencional.

Alguns nutrientes são necessários em uma maior quantidade, como os macronutrientes, esses que podem ser fornecidos por meios de cultivo alternativos, como fertilizantes agrícolas e efluentes, propiciando um crescimento satisfatório de várias espécies cultivadas (OLIVEIRA, 2019).

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser classificados pela sua estrutura ou pelo seu mecanismo de circulação, aeração e interação com o ambiente (GRESSLER, 2016). As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos (tanques ao ar livre) ou fechados (fotobiorreatores tubulares ou bolsas – “bags”). Os sistemas abertos são sistemas simples e antigos, apesar de ser um sistema de baixo custo e fácil de implantação e operação, são sistemas sujeitos a contaminantes, variações nos parâmetros de cultivo, por exemplo, luz, temperatura (KOCHEM, 2010). Possuem diversas variações, desde uma única unidade ou várias unidades, podem não ter nenhum mecanismo de agitação da cultura ou mecanismos com agitação produzidas por meio de uma roda de pás, hélices ou bombas. Podem ser tanques circulares com

um braço mecânico central rotativo para mistura da cultura, ou longos canais em formato de circuito único ou múltiplo agitado por rodas de pás (*raceway ponds*) (GRESSLER, 2016)

Os fotobiorreatores tubulares (PBRs) são sistemas, construídos de materiais transparentes, permitindo assim a passagem de luz, para o desenvolvimento das microalgas em condições autotróficas, dependendo da sua classificação podem ter vários tamanhos, tanto em altura quanto comprimento e diâmetro, por exemplos, reatores tubulares verticais que podem medir 1,8 m de altura e 10 cm de diâmetro (FORTES, 2015). Nos PBRs, a aeração é um fator importante, pois impede o auto sombreamento das microalgas, permitindo assim, que todas fiquem em contato com a luz. Esse tipo de cultivo geralmente é mais caro do que o realizado em *raceways*, porém apresentam uma maior produtividade (TEIXEIRA, 2015). Em sistemas fechados permite uma maior proteção das culturas contra contaminantes e um maior controle de todos os parâmetros de cultivo. Apesar de ainda não ser muito desenvolvido no Brasil, este mercado está em expansão (GERALDES, 2007).

Uma opção de menor custo para um cultivo em sistema fechado, são os reatores verticais descartáveis, na qual são construídos com tubos de polietileno transparentes selado nas extremidades, a cultura é misturada por borbulhamento de ar na parte inferior, com iluminação artificial ou ao ar livre sob a luz solar. Devido ao acúmulo de biofilme nas paredes, esse sistema tem um menor tempo de vida, porém são mais baratos e de fácil manuseio (figura 3) (FORTES, 2015).

A escolha do modelo de cultivo é feita através da avaliação sobre o produto final, na qual a biomassa produzida irá ser empregada, investimento e produtividade.

Em sistemas de produção em larga escala, os meios de cultivo utilizados devem ser simples em relação a concentração e quantidade de nutrientes que supra a necessidade das microalgas. A otimização dos meios de cultivo se dá devido a aplicação de estudos sobre a seleção dos nutrientes e suas respectivas concentrações (TEIXEIRA, 2015). Para a produção de biomassa com uma determinada característica, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que as microalgas adaptem seu metabolismo e seus componentes para a nova condição (MARTINS, 2014). Fatores como temperatura e pH também devem estar na faixa ótima para o cultivo de cada tipo de microalgas. A agitação, causadas por turbulência mecânica ou bolhas de ar, são utilizadas para minimizar problemas relacionados com a baixa transferência de CO₂. Essa baixa transferência pode acarretar uma diminuição na produtividade. Além de que, a agitação evita o auto sombreamento das microalgas. Quando há uma falta de agitação em cultivos de alta densidade celular, acaba dificultando a absorção de luz por cada célula (TEIXEIRA, 2015).

Muitos estudos tem sido realizados nas mais diversas áreas para aplicações relacionadas ao uso das microalgas e do seu produtos extraídos, tais como: tratamentos de efluentes industriais, detoxificação biológica e remoção de metais pesados no ambientes, podem ser usadas como bioindicadores e na detecção de nutrientes (para as microalgas) e substâncias tóxicas; na agricultura, a biomassa pode ser usada como biofertilizante de solo; na indústria farmacêutica as microalgas podem sintetizar toxinas, além de produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades antibióticas, anticâncer, anti-inflamatórias, antivirais, redutoras de colesterol entre outras atividades. Além disso, podem ser usadas para diminuir o efeito estufa, pela assimilação de CO₂. Ainda, é possível usar a biomassa para a produção de biocombustíveis (biodiesel, por exemplo) (DERNER *et al.*, 2006 SCHMITZ *et al.*, 2012).

A microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981 é uma Eustigmatophyceae, da família Monodopsidaceae. É uma microalga marinha de forma esférica e diâmetro entre 2 e 4 µm (PEREIRA, 2009), autotrófica. Esta é uma espécie muito utilizada na aquicultura, visto que se reproduz rapidamente e tem um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da série n-3 (GERALDES, 2007; OLIVEIRA, 2019). Esse gênero é composto atualmente por seis espécies reconhecidas e apresenta organismos unicelulares, eurialinos, predominantemente planctônicos. Possui clorofila-a e seu principal carotenoide é a violaxantina (PEREIRA, 2009), pigmento acessório na captação de luz e faz a fotoproteção celular (KANEMOTO, 2012). Além de ser rica em ácido eicosapentaenoico (EPA) (PEREIRA, 2009), a *N. oculata* é rica em ácido araquidônico (ARA), sendo de grande importância na nutrição principalmente de larvas de peixes, moluscos e crustáceos (PEREIRA, 2009; SÁNCHEZ-TORRES *et al.*, 2008). Além de ser de grande interesse para a indústria farmacêutica e alimentícia (ARRIADA & ABREU, 2014).

A *N. oculata* é muito utilizada na produção de peixes marinhos, sendo cultivada para vários fins. É utilizada na produção e/ou enriquecimento dos organismos filtradores de modo que transfira os nutrientes para as larvas através do zooplâncton que serve de intermediário. Pode também ser usada para cultivo em “água verde”, no qual é adicionado diretamente as microalgas nos tanques de cultivos, servindo de alimento tanto para as larvas de peixes marinhos como para os organismos filtradores, além de melhorar a qualidade da água (GERALDES, 2007).

Mesmo tendo uma vasta gama de aplicações da *N. oculata* de importância econômica e ambiental, a produção de biomassa em grandes volumes possui um alto custo, principalmente devido ao meio de cultura utilizado, quanto mais complexo em termos nutricionais maior será o custo, acarretando assim em um produto final de custo elevado (TEIXEIRA, 2015). Devido

a esse custo, há a necessidade de buscar meios de cultura que sejam de menor custo e ricos em nutrientes que possam se assemelhar, em relação à produtividade, ao meio de cultura convencional. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produtividade e crescimento de um meio alternativo (fertilizante) para o cultivo de *Nannochloropsis oculata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

Microalgas são organismos fotossintetizantes, realizam processo que fixa o carbono atmosférico (GRIS *et al.*, 2010), são unicelulares e microscópicas, eucariontes ou procariontes possuem clorofila, produzem o oxigênio e convertem a luz solar em energia química (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SCHMITZ *et al.*, 2012). Além disso, constituem a base das cadeias alimentares da maior parte dos ambientes aquáticos (ARRIADA & ABREU, 2014).

Podem apresentar ampla tolerância a fatores ambientais extremos (BORGES *et al.*, 2007). Além da rápida taxa de crescimento em comparação as plantas terrestres, as microalgas podem ser cultivadas em água salobra costeira e água do mar, em terras impróprias para agricultura, esses organismos podem absorver uma alta concentração de nutriente de águas residuais municipais, agrícolas e industriais. Um desafio no cultivo de microalgas é diminuir os custos de produção, uma alternativa pode ser o uso de águas residuais como meio de produção (GANI *et al.*, 2020).

Para ter um cultivo eficiente, é fundamental o conhecimento de fatores que influenciam o desenvolvimento. É importante que o meio de cultivo esteja balanceado conforme a exigência nutricional das microalgas, já que uma mesma espécie pode ter variação na sua composição celular conforme as concentrações de nutrientes no cultivo (PORTUGAL, 2010). Fatores como temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes são de extrema importância para a produção das microalgas, uma vez que na ausência ou alteração da quantidade desses fatores pode alterar a qualidade nutricional da biomassa e até mesmo diminuir a taxa de crescimento. O tempo da cultura e fase de crescimento também podem afetar a composição bioquímica das microalgas. Devido as dificuldades relacionadas a todo o processo de cultivo e ao elevado custo de produção, tem sido cada vez mais realizado estudos para viabilizar economicamente a utilização da biomassa de microalgas (GERALDES, 2007).

Para a escolha da espécie a ser cultivada é importante se atentar a fatores que podem influenciar seu metabolismo, como fatores biológicos, ambientais e concentrações disponíveis de CO₂ e O₂. Assim, a produtividade será consequência da interação destes fatores (PORTUGAL, 2010).

A produção de microalgas possui diversas vantagens além da produção de biomassa e alimento vivo para diversas espécies de organismos aquáticos, a sua produção pode ser feita durante todo o ano em regiões com boa disponibilidade de luz e temperatura ideal para o cultivo, necessitam de uma menor quantidade de água, reduzindo o uso de água doce, podem ser

cultivadas em terras não-aráveis, diminuindo os impactos ambientais e não competem com a produção de alimentos (GRIS *et al.*, 2010; AVERSARI *et al.*, 2018). Muitas espécies podem produzir e acumular grandes concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios entre outros, através da manipulação das condições ambientais de cultivo. Alguns destes compostos apresentam um elevado valor comercial. Além de que o ciclo de vida das microalgas se completa em poucas horas, o que ajuda na escolha das cepas e no melhoramento genético das espécies (DERNER *et al.*, 2006; MARIANO, 2014).

Esses microrganismos têm importantes aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêuticas (ARRIADA & ABREU, 2014). As microalgas são usadas como fonte suplementar tanto na alimentação humana quanto animal, devido ao seu alto teor de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas e outras substâncias (BORGES *et al.*, 2007). Na aquicultura, é necessário observar diversas características dentre as espécies utilizadas, como o tamanho celular, a distribuição da coluna d'água, digestibilidade, perfil bioquímico e velocidade de crescimento (PORTUGAL, 2010). Sendo de grande importância na dieta da fase larval de camarões, lagostas, ostras, peixes e diversas outras espécies de interesse econômico (AVERSARI *et al.*, 2018). Além de servir como alimento, as microalgas podem fornecer uma melhor qualidade de água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito), colonizam a coluna d'água e combate bactérias patogênicas oportunistas que se instalam no trato digestório das larvas devido a presença de substâncias antibióticas (BORGES *et al.*, 2007). Esse sucesso das microalgas na aquicultura está relacionado ao potencial desses microrganismos de aumentar a sustentabilidade e custo-benefício na produção de alevinos devido ao seu alto valor nutricional (OSORIO *et al.*, 2020).

As microalgas são capazes de produzir vários compostos que podem ser usados na indústria farmacêutica, como pigmentos naturais (RIZWAN *et al.*, 2018a). Além das aplicações com alimentação e farmacêutica, recentemente esses microrganismos têm sido direcionados a produção de biocombustíveis, principalmente biodiesel (ARRIADA & ABREU, 2014).

2.1.1 *Nannochloropsis oculata*

A *Nannochloropsis oculata* (Figura 1) é uma microalga verde que pertence a classe Eustigmatophyceae (BEZZERA, 2020; ARRIADA, 2014; SÁNCHEZ-TORRES *et al.*, 2008), é uma microalga unicelular de forma esférica, eurialina, de hábito principalmente planctônico (KANEMOTO, 2012), possui de 2 a 4 µm de diâmetro (RICHMOND, 2004). Possui clorofila-a como pigmento dominante junto com violaxantina (NETO, 2018) e outros pigmentos fotossintéticos que vão do verde ao amarelo (SÁNCHEZ-TORRES *et al.*, 2008) e tem como

principal carotenoide a violaxantina, pigmento acessório na captação de luz e que oferece fotoproteção à célula. Seu metabolismo é considerado muito rápido e resistente a contaminações (CORREIA, 2013).

Figura 1: Imagem microscópica da microalga *Nannochloropsis oculata*.



Fonte: Malakootian et al. (2016).

Essa espécie apresenta altas taxas de crescimento, resistente a variações ambientais e produz uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (ARRIADA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020), principalmente ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido araquidônico (ARA) e docosahexaenóico (DHA) (SÁNCHEZ-TORRES *et al.*, 2008).

A *N. oculata* também apresenta uma ampla variação de pigmentos de interesse comercial, como zeaxantina, betacaroteno e outros carotenoides com potencial para diversas aplicações industriais (BEZERRA, 2020).

Muito utilizada na aquicultura devido ao seu rápido crescimento, facilidade de cultivo e tamanho reduzido (PEREIRA, 2016), a *Nannochloropsis* pode ser utilizada na alimentação de rotíferos (OSORIO *et al.*, 2020) ou nas fases iniciais de diversas espécies aquícolas cultivadas. Além do uso na aquicultura, também pode ser usada para alimentação humana (OLIVEIRA *et al.*, 2020) e produção de fármacos (ARRIADA, 2014). Também, devido à alta concentração de lipídios é considerada uma espécie promissora para a produção de biodiesel (BEZERRA, 2020).

2.2 MEIO DE CULTIVO

Para um cultivo de microalgas adequado é necessário que o meio de cultura contenha as necessidades nutricionais das microalgas, uma vez que uma mesma espécie pode ter variação na sua composição celular de acordo com as condições do cultivo (PORTUGAL, 2010). O

crescimento do cultivo é representado por uma curva de crescimento, na qual é inversamente proporcional à concentração de nutrientes presentes (PEREIRA, 2009). Essa necessidade de cada nutriente pode limitar o crescimento da microalga. Nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, são fundamentais para a manutenção e crescimento das culturas microalgais. Essa demanda de nutrientes pode variar de acordo com cada espécie. O meio de cultura F/2 é um dos mais citados na literatura de aquicultura de algas, principalmente para fitoplâncton marinho. O uso desse meio F/2, assim como suas modificações têm contribuído para o avanço nas pesquisas do cultivo de microalgas (PORTUGAL, 2010).

Para haver um desempenho adequado é necessário que tenha um conhecimento das necessidades nutricionais das microalgas. Nutrientes como o nitrogênio e o fósforo são fundamentais para os organismos marinhos, pois são utilizados para a síntese de matéria orgânica na fotossíntese. Ainda, apresentam função essencial na constituição estrutural das biomoléculas, das membranas e do meio intracelular. A falta desses nutrientes pode comprometer o desenvolvimento das células durante o cultivo (LOURENÇO, 2006), além de poder fazer com que as microalgas adaptem seu metabolismo à novas condições (MARTINS, 2014). Diversos outros fatores podem influenciar no crescimento das microalgas, na absorção dos nutrientes, como a concentração de nutrientes (PEREIRA, 2016), fonte de energia, pH e temperatura (TEIXEIRA, 2015).

O meio de cultura tem um papel fundamental no sucesso dos cultivos microalgais, devendo fornecer todos os nutrientes necessários para o seu crescimento. Portanto, as culturas algais têm de ser enriquecidas de forma a compensar a falta de nutrientes existentes na água. Os meios de cultura são constituídos de nutrientes dos quais são divididos em três grupos: macronutrientes – que necessitam de maior concentração como Fe, Mg, K, S, N, P, O, H e C ; e micronutrientes – são necessários em baixas concentrações, porém ainda sim são importantes no metabolismo das microalgas, como Cu, Mn, Mo, V, Ca, Co (LOURENÇO, 2006); e vitaminas – são usadas para melhorar a produtividade das culturas, apesar de aumentarem o custo de produção, porém em larga escala, as vitaminas não são usadas (PEREIRA, 2009). Na Tabela 1 estão apresentados alguns nutrientes e suas respectivas funções.

Tabela 1: Lista de nutrientes e suas respectivas funções.

Nutrientes	Funções
Nitrogênio	Compõe diversas substâncias celulares, como os aminoácidos e a clorofila.
Ferro	Grupos ativos e enzimas, participando do nitrato e nitrito reductase.
Fósforo	Composição estrutural e transferência de energia, presente no ATP, ácidos nucleicos e fosfolipídeos.
Magnésio	Presente na clorofila e outras enzimas, tem função enzimática e como co-fator no transporte de íons.
Manganês	Presente nas proteínas de tilacóides, participando da manutenção da estrutura da membrana do cloroplasto.
Tiamina (Vitamina B₁)	Coenzima. Atua nos processos de fermentação e respiração celular.
Cianocobalamina (Vitamina B₁₂)	Co-fator de enzimas que participam da síntese de metionina.

Fonte: LOURENÇO, 2006.

2.3 CUSTOS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS E RELAÇÃO COM O MEIO DE CULTURA

Em meios de cultivos tradicionais, como por exemplo, o meio F/2 (GUILLARD, 1975) utilizam todos os nutrientes em condições laboratoriais com grau Para Análise (PA). O uso de fertilizantes agrícolas na formulação dos meios de culturas tem sido uma alternativa eficiente para a redução do custo final de produção (TEIXEIRA, 2015). Os fertilizantes possuem valor de mercado inferior do que os conhecidos reagentes PA, podendo ser encontrados com maior facilidade e em maiores quantidades, viabilizando os cultivos em larga escala (BEZERRA, 2020).

A otimização dos meios de culturas ocorre devido a aplicação de conhecimentos adquiridos em relação aos nutrientes e suas concentrações, pois esses meios de cultivos em larga escala devem ser simples em termos de nutrientes. Estes conhecimentos auxiliam no aumento de biomassa. Essa otimização se torna uma estratégia para melhorar a eficiência dos cultivos, contribuindo também para uma maior economia dos processos produtivos (TEIXEIRA, 2015).

2.4 SISTEMA DE CULTIVO

Além dos nutrientes oferecidos, um cultivo de microalgas bem-sucedido ainda depende do sistema de cultivo (GANI *et al.*, 2020). Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser caracterizados em dois tipos, os sistemas de cultivo aberto (*raceway*) (Figura 2) e os sistemas de cultivo fechado (fotobiorreatores – “PBR”) (Figura 3) (GANI *et al.*, 2020; DIAS, 2017; ARAUJO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2009).

Figura 2: Raceways comerciais.



Fonte: FORTES, 2015.

Figura 3: Cilindros verticais tipo bolsa - *bag* descartáveis.

Fonte: FORTES, 2015.

Os sistemas abertos são os mais utilizados atualmente devido ao seu menor valor de construção e operação, uma vez que os materiais utilizados para construir podem variar de areia, a tijolos ou cimento, entre outros o que acaba tornando relativamente mais econômico. Apesar dessa maior facilidade em comparação aos sistemas fechados (ARAUJO *et al.*, 2012), Dener *et al* (2006) afirma que esse tipo de sistema possui limitações, principalmente, as perdas por evaporação, difusão de CO₂ para a atmosfera, contaminação e exige uma grande área de terra. Esse tipo de sistema gera uma produtividade inferior às obtidas nos sistemas fechados, os controles de parâmetros são mais difíceis, pois as culturas estão sujeitas a fatores externos, além da possibilidade de contaminação com outras espécies de organismos que possam se alimentar das microalgas (PEREIRA, 2009).

Já os PBR são fechados como uma serie de tubos transparentes geralmente de plástico, em formato de espiral ou alinhados, atuam como coletores solares e permitem o fornecimento de luz, nutrientes, CO₂ do ar e regulação da temperatura, impedem ou pelo menos minimizam a contaminação (SOUZA, 2015), facilitando o cultivo da uma única cepa de algas. Apesar de o cultivo em fotobiorreatores ser maior em relação a produtividade volumétrica e a concentração celular, esse tipo de sistema possui limitações, sendo as quais o superaquecimento, entupimento, acumulação de oxigênio, alto preço de instalação, funcionamento e manutenção (ARAUJO *et al.*, 2012). O uso de PBR ajuda a minimizar a preocupação com o uso de terras (MARIANO, 2014), assim não competindo com outros tipos de produção que necessitam de terras aráveis. São empregados diversos tipos de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas, porém os mais comuns são os cilindros verticais, painéis verticais achatados e os tubulares (serpentinhas verticais ou horizontais) (DERNER, 2017).

Esse tipo de sistema é usado principalmente para cultivos de microalgas para produtos de alta qualidade, como produtos farmacêuticos e suplemento alimentar, seja humana ou animal (DERNER, 2017). Em fotobiorreatores não há troca direta de gases entre o sistema e o ambiente externo. Ao invés, a troca gasosa – que é importante para a mistura do cultivo, é fornecida usando gás filtrado para evitar e minimizar a contaminação dentro do sistema. (GANI *et al.*, 2020). A Tabela 2 compara os principais fatores analisados entre um cultivo em fotobiorreator e em sistema fechado (FORTES, 2015).

Tabela 2: Comparação entre os sistemas de fotobiorreatores e sistemas abertos.

Item de comparação	Fotobiorreator	Sistemas abertos
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Controle de processo	Fácil	Difícil
Controle de espécies	Fácil	Difícil
Agitação	Uniforme	Baixa
Razão área/volume	Alto (20-200 m ⁻¹)	Baixo (5-10 m ⁻¹)
Concentração celular	Alto	Baixo
Investimento	Alto	Baixo
Custo de operação	Alto	Baixo
Eficiência de utilização luminosa	Alta	Baixa
Controle de temperatura	Alcançável	Difícil
Produtividade	Alta (3-5 vezes maior)	Baixa
Tensão hidrodinâmica sobre as células	Baixa-alta	Muito baixa
Evaporação	Baixa	Alta
Controle de transferência gasosa	Alto	Baixo

Fonte: FORTES, 2015.

2.5 APLICAÇÕES

As microalgas podem ser aplicadas em diversas áreas, principalmente em dietas na aquicultura tanto como alimento vivo, biomassa úmida ou seca, ou ainda, como aditivos em rações. Por conter altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, é considerada essencial para o crescimento e sobrevivência de animais marinhos principalmente nas fases larvais e juvenis (VOLKMAN et al., 1993).

Devido ao grande crescimento da aquicultura nos últimos anos, tem favorecido ainda mais o desenvolvimento do cultivo de microalgas (MARIANO, 2014). Elas são empregadas como fonte direta de alimento para a fase larval de crustáceos e moluscos bivalves, estes podendo consumi-las até a fase adulta, ainda servem indiretamente como alimento para larvas de peixes marinhos através de organismos forrageiros como rotíferos, copépodes e artêmias. O uso de alimento vivo pode representar aproximadamente 30% do custo de produção, por esta razão a produção de microalgas ainda é um componente crítico na aquicultura. Entretanto, a disponibilidade de PUFA nas microalgas fornecidas direta ou indiretamente aos animais de cultivo, ainda tem um papel vital no desenvolvimento do sistema nervoso, crescimento e qualidade dos organismos aquáticos cultivados, além de apresentar maior eficiência do que a utilização de outros insumos como o óleo de peixe (PEREIRA, 2016). Segundo FAO (2004), a produção de biomassa algal certamente crescerá cada vez mais, por ser uma matéria prima para a elaboração de rações e alimento vivo para muitas espécies aquícolas, como exemplo do camarão marinho, que prefere consumir alimentos vivos (MARIANO, 2014).

Muitos estudos têm sido realizados com aplicação das microalgas em diversos campos, tais como: no tratamento de águas residuais de processos industriais, para a detoxificação biológica e remoção de metais pesados, bioindicadores - na detecção de nutrientes e substâncias. Na agricultura essa biomassa pode ser empregada como biofertilizante. Além da mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO₂, resultado do processo de queima de combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias e ainda pode ser aplicada na produção de biocombustíveis (DERNER *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho, produtividade e crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata* em meio a base de fertilizante agrícola comercial como alternativa para diminuir o custo de produção.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Analisar com base nos dados de densidade celular e custo de produção do meio, uma diferente fonte de nutrientes no meio de cultivo de *N. oculata* a fim de diminuir o custo de produção;
- Avaliar os parâmetros de crescimento e produtividade em cada meio de cultivo testado;
- Analisar o custo de produção de cada meio de cultura utilizado;
- Quantificar os parâmetros físico-químicos, como temperatura, salinidade, pH e nutrientes para cada meio de cultura.
- Avaliar a composição de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados da biomassa de *N. oculata*.

4 HIPÓTESE

A microalga apresentará rendimento similar ou superior quando cultivada no meio de cultura proposto em comparação ao meio de cultura convencional F/2 Guillard.

A *N. oculata* cultivada no meio alternativo terá seu teor de lipídios e ácidos graxos similar ao da *N. oculata* cultivada no meio convencional.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material Biológico

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo e Biotecnologia de Algas (LCBA), na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). A espécie de microalga *Nannochloropsis oculata* (cedida pelo Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina UFSC) foi a escolhida para o desenvolvimento da pesquisa.

5.2 Teste preliminar e escolha da fonte de nitrogênio

Para a escolha da fonte de nitrogênio que representasse diminuição nos custos, foi realizado um teste preliminar de 6 dias com três fontes de nitrogênio distintas e para tratamento experimental controle foi utilizado o meio cultura F/2 Guillard (modificado – sem sílica). As fontes de nitrogênio analisadas foram fertilizantes hidropônico Fortgreen, ureia (Agroadubo) e sulfato de amônio (Agroadubo) (Figura 4).

Figura 4: Sistema de cultivo para o teste preliminar com meios alternativos para cultivo de *N. oculata*.



5.3 Delineamento Experimental e Obtenção da Biomassa

Inicialmente foi preparado um fotobiorreator do tipo bolsa – “*bag*” plano de 100 litros, com 85 litros de meio de cultura e 15 litros de inóculo. Esse primeiro cultivo serviu para inocular 6 novos cultivos em sistemas de fotobiorreatores do tipo bolsa (Figura 5) que foram usadas para o experimento. Nestas 6 bolsas foram utilizados também os mesmos volumes de meio de cultura e inóculo utilizado para a produção do inóculo. O experimento foi dividido em dois tratamentos, o primeiro tratamento (T1), o meio de cultura utilizado foi o meio F/2 Guillard (modificado) (controle), já no segundo tratamento (T2), o meio de cultura utilizado foi elaborado com fertilizante hidropônico (Fortgreen). Os cultivos foram realizados em triplicata. O experimento foi realizado sob iluminação constante (fotoperíodo de 24h luz), cada bolsa estava sob iluminação de 12 lâmpadas tubulares do tipo led (40W). com intensidade luminosa em torno de $3617,25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, O experimento foi realizado em 8 dias. Amostras da biomassa após coletadas, foram enviadas para análise de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados para a Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

Figura 5: Sistema de cultivo tipo bolsa - *bag* para produção de biomassa.



A temperatura da sala de cultivo na qual o experimento foi realizado se manteve em $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante todo o período da realização do experimento com o auxílio de ar condicionado. As *bags* foram submetidas a aeração constante por meio de um soprador de ar.

Antes de serem inoculados, os fotobiorreatores e a água utilizada para preparo dos meios de cultura foram desinfetados com solução de cloro na concentração final de 0,02% e após 24h o cloro foi neutralizado com solução de tiosulfato de sódio.

Após a desinfecção os meios de cultura foram preparados com a adição dos nutrientes. O preparo do meu F/2 Guillard modificado, 1 mL L⁻¹ de fosfato de sódio (NaH₂PO₄ H₂O), 0,5 ml de solução de vitaminas, 1 mL L⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO₃) e 1 mL L⁻¹ de solução de metais traços. Já o meio Fortegreen (Fg) foi preparado com 0,083 g L⁻¹ de fertilizante, na qual suas matérias primas consistem em: nitrato de amônio, nitrato de potássio, sulfato de amônio, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio e fosfato monoamônico cristal, com garantia de percentagem de cada nutriente solúveis em água presentes na Tabela 3. Essa concentração foi baseada na tentativa de equilibrar as concentrações de P no meio. Todas as 6 *bags* foram preparadas para uma salinidade 20.

Tabela 3: Percentagem garantia de presença de cada nutriente presente na composição do Fertilizante Fortgreen.

Garantias	Presença (%)
Nitrogênio (N)	18,00
Fósforo (P₂O₅)	6,00
Potássio (K₂O)	18,00
Cálcio (Ca)	1,00
Magnésio (Mg)	1,50
Enxofre (S)	2,00

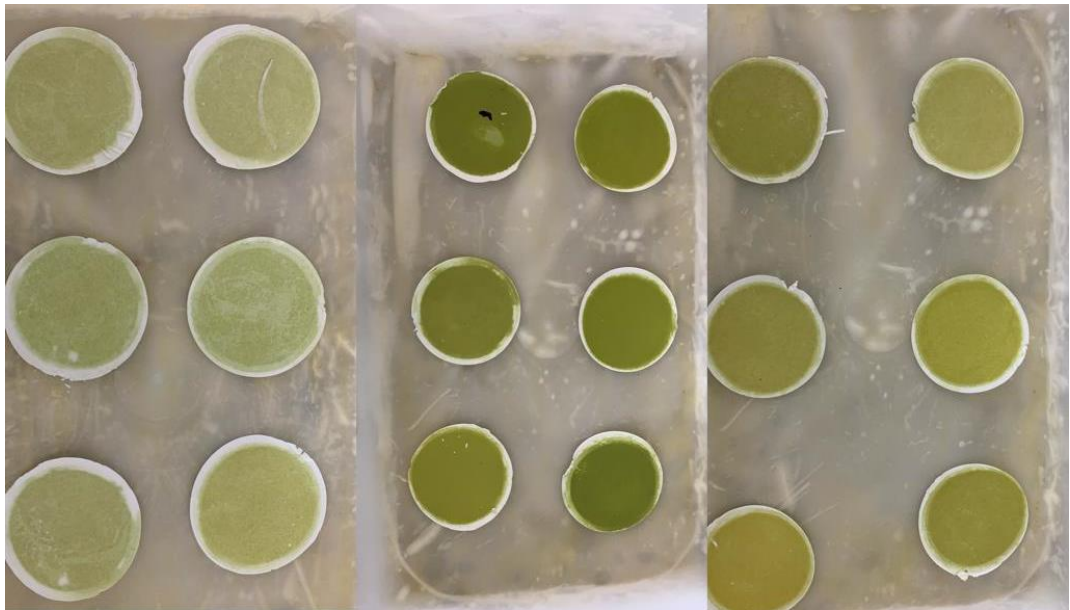
Fonte: Conforme presente no rótulo do fertilizante Fortgreen.

5.4 Parâmetros de Crescimento e Produtividade

Para obtenção da curva de crescimento, foram coletadas diariamente amostras das *bag*. A densidade de células de *N. oculata* foi monitorada diariamente através da contagem pela câmara de Neubauer.

Para o cálculo de massa seca (g L⁻¹) foram realizados no dia inicial e a cada quatro dias de experimento, testes gravimétricos utilizando filtros de fibra de vidro GF-1 47mm da marca MACHEREY-NAGEL. No dia 0 (início do cultivo), dia 4 e dia 8 (último dia de cultivo) (Figura 6), amostras filtradas foram secas em estufa à temperatura de 40 °C por 12 horas e pesados em balança analítica. O resultado da biomassa foi determinado pela diferença do peso da amostra filtrada e o filtro seco antes da filtragem.

Figura 6: Biomassa filtrada em filtro de fibra de vidro GF-1 47mm nos dias 0, 4 e 8 de cultivo.



Foram analisados dados de Densidade Celular Máxima (DCM) para *N. oculata*, Tempo de Duplicação (T), Taxa de Crescimento Específico (μ), Velocidade de Crescimento (k), Biomassa acumulada (X) e Produtividade (P) para cada unidade experimental.

O tempo de Cultivo (T) mede em dias, o intervalo de tempo desde o dia em que foi inoculado até o dia que o cultivo obtém a DCM. Nesse mesmo intervalo, a Taxa de Crescimento Específico (μ) foi determinada através da Equação 1, citada por Lourenço (2006).

$$\mu = \frac{\ln (N_t - N_0)}{\Delta t}$$

Onde:

μ = taxa de crescimento específico;

\ln = logaritmo natural;

t = tempo em dias;

N_0 = massa seca inicial;

N_t = massa seca final.

Foram determinados valores de Velocidade de Crescimento (k) e Tempo de Duplicação (T) conforme Derner (2006).

$$k = \left(\frac{3,322}{\Delta t} \right) \times \text{Log} \left(\frac{N_t}{N_0} \right)$$

Onde:

k = Velocidade de Crescimento;

3,322 = fator de conversão do logaritmo em base 2 a base 10;

t = tempo em dias (tempo de cultivo);

N_0 = densidade de células inicial;

N_t = densidade de células final;

Log = logaritmo em base 10.

$$T = \frac{1}{k}$$

Onde:

T = tempo de duplicação;

K = velocidade de crescimento.

A biomassa acumulada (X) e a Produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foram calculadas de acordo com Arredondo-Veja e Voltolina (2007).

$$X = X_i - X_0$$

$$P = \frac{X_i - X_0}{T_i}$$

Onde:

X = biomassa acumulada;

P = produtividade;

X_0 = biomassa inicial;

X_i = biomassa final;

T_i = intervalo de tempo (dia) entre X_0 e X_1 .

5.5 Análises físico-químicas

Diariamente foram coletadas amostras de cada unidade experimental. Os parâmetros monitorados foram potencial de hidrogeniônico (pH), com o auxílio de um pHmetro de bancada CienlaB, turbidez através de um turbidímetro de bancada (Alfakit), salinidade por refratômetro portátil e a temperatura da sala de cultivo com um termômetro analógico.

Nos dois tratamentos, foram realizadas análises para quantificar amônia (NH₃), ortofosfato (PO₄³⁻), nitrito (N-NO₂⁻) e nitrato (N-NO₃⁻). As análises foram feitas seguindo a metodologia de Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 21^o edição (APHA, 2005). Para realização dessas análises, foram coletadas amostras de unidade experimental no início (meio de cultura) e no final (após separação da biomassa) de cada tratamento. Foi feito um cálculo para estimar o percentual de remoção dos nutrientes, se baseando nos dados obtidos no primeiro e último dia de cultivo, utilizando a equação.

$$X = \left(\frac{(Ci - Cf)}{Ci} \right) * 100$$

Onde:

Ci = concentração inicial;

Cf = concentração final.

Os testes foram feitos conforme a metodologia indicada pela Alfakit, expressadas na Tabela 4.

Tabela 4: Metodologias utilizadas pela Alfakit para cada análise. Baixa concentração (B/C) e alta concentração (A/C).

Análise	Método	Referência
Nitrito B/C	N-(1-naftil)-etilenodiamina	(APHA; AWWA; WEF, 2012)
Nitrito A/C	Naftilamina	(FRIES, 1971)
Nitrato B/C	N-(1-naftil)-etilenodiamina	(APHA; AWWA; WEF, 2012)
Nitrato A/C	N-(1-naftil)-etilenodiamina	(APHA; AWWA; WEF, 2012)
Amônia B/C	Indofenol	(APHA; AWWA; WEF, 2012)
Ortofosfato B/C	Ácido Ascóbico	(APHA; AWWA; WEF, 2012)

5.6 Separação da Biomassa

Para a separação da biomassa, o processo foi feito em duas etapas, floculação seguido de filtração. Primeiramente, foi adicionado à cultura uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 5 mmol L^{-1} (concentração final) e uma solução de floculante da marca Flopam a 5 ppm. Foi coletado de cada bolsa um volume de 45 litros e foi usado um volume de 180 mL de NaOH para o ajuste do pH do meio de cultura e agitado manualmente para mistura completa, após a mistura, foi colocado 90 mL de floculante e agitado por 30 segundos (Figura 7). Após a adição desses reagentes no meio de cultura, foi aguardado um tempo de 30 minutos em repouso para a biomassa flocular e decantar para a coleta da biomassa (SALES, 2015). Este procedimento foi realizado em todas as 6 bolsa. Na segunda etapa foi feita a filtragem da biomassa floculada através de um filtro com porosidade de $45\mu\text{m}$ para maior concentração da biomassa.

Figura 7 : Preparação e floculação da biomassa com Hidróxido de Sódio (NaOH) e floculante.



5.7 Análise de rendimento

A biomassa obtida foi congelada, previamente pesados, congelada a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h e posteriormente submetida ao processo de liofilização por 72 h. A partir da biomassa seca obteve-se o percentual de rendimento.

5.8 Extração de lipídios e determinação de ácidos graxos

A extração de lipídios foi realizada através da adaptação do método de Bligh e Dyer (1959), realizada em triplicata. Foi adicionado 300 mg de biomassa seca em tubos de polipropileno de 50 mL, seguindo com a adição de clorofórmio e metanol (2:1), foi feita a ultrassonificação em banho de gelo por 45 min e incubação a -20°C por 4 horas, sendo posteriormente ultrassonificada novamente em banho de gelo por mais 30 min e centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min. A fase lipídica foi removida para outro tubo e as amostras de biomassa foram submetidas novamente ao ciclo de lavagem adicionando clorofórmio:metanol (1:2), ultrassom por mais 15 min e centrifugação por 15 min, recuperando o sobrenadante (fase lipídica) junto ao tubo do primeiro ciclo de extração. Na fração lipídica foi adicionado 4 mL de água deionizada e 2 mL de clorofórmio, repetindo o ciclo de centrifugação. A fase lipídica foi reservada em balões de fundo redondo, previamente pesados, e seca em estufa até a total evaporação do solvente. Após esse procedimento, o balão foi pesado, obtendo-se o rendimento lipídico.

O teor lipídico foi calculado em relação a biomassa seca:

$$L_b = (F2 - F1) * 100\% / P_{amostra}$$

Onde:

L_b = lipídios totais (%)

$F1$ = peso frasco vazio (mg)

$F2$ = peso final do frasco (mg)

$P_{amostra}$ = quantidade de amostra (mg)

$$L_c = (L_B \times B_L) 100\%$$

Onde:

L_C = lipídios totais (mg/L)

B_L = biomassa seca

Para determinar o perfil de ácidos graxos, foi realizado a derivatização dos balões de fundo redondo, o restante da etapa anterior para determinação do teor de lipídio total. Foram adicionados nos balões 6 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (1 g de NaOH em 50 mL de metanol) seguida de refluxo com aquecimento por 20 min. Posteriormente foram adicionados 7 mL de solução BF_3 através do condensador por gotejamento. As amostras foram mantidas em refluxo por 4 min, e em seguida foi adicionado 5 mL de heptano, via condensador com refluxo por mais 2 min.

Em seguida, foi retirado os balões e aguardado para atingir a temperatura ambiente. Após, adicionou-se aos balões 2 mL de solução saturada de NaCl, e agitou-se para a visualização de duas fases, em que fase superior foi recuperada em tubo de ensaio. Para a remoção de água residual, foi acrescentado 0,5 g de Na₂SO₄ anidro previamente seco em estufa à 100°C. Por fim, os extratos foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS) (BRODNJAK-VONCINA; KODBA; NOVIC, 2005).

5.9 Análise de Custo de Produção

Os custos de produção foram calculados com base nas pesquisas de preço de mercado dos nutrientes utilizados na elaboração dos meios de cultura.

A pesquisa de preço de mercado foi feita através de site e contato com as empresas, e alguns valores foram obtidos através da ferramenta Google.

5.10 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros de crescimento, produtividade e análise dos nutrientes foram submetidas à análise de variância (Teste T-student), na qual analisou o nível de significância de cada tratamento (ZAR, 1996).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Teste preliminar e escolha da fonte de nitrogênio

Além do crescimento da microalga, foi analisado o custo para produção em larga escala de cada meio. Os dados de densidade celular e custo de produção estão apresentados na Tabela 5.

A ureia e o sulfato de amônio foram utilizados substituindo nitrato de sódio do meio F/2 convencional. Já o fertilizante (Fortegreen), por ser um mix de nutrientes, foi utilizado apenas junto à água já salinizada.

Tabela 5: Dados de DC (densidade celular) e custo de produção em larga escala de meio de cultura alternativo para *N. oculata*.

Tratamento	DC (x10⁴ cel/mL)	Custo (R\$/m³)
Controle (F/2 Guillard)	3550	R\$ 34,19
Fertilizante	3083	R\$ 2,48
F/2 Guillard c/ ureia	3275	R\$ 29,99
F/2 Guillard c/ sulfato de amônio	3658	R\$ 29,99

Com base nestes dados, o uso do fertilizante foi considerado a melhor opção de fonte alternativa de nitrogênio, relacionando a densidade celular obtida e o custo de produção.

6.2 Parâmetros de Crescimento

Um parâmetro muito importante para um cultivo de microalgas é a curva de crescimento, na qual apresenta 5 fases, fase lag (fase de adaptação), fase log (fase de crescimento exponencial), fase de redução de crescimento, fase estacionária (a relação de organismos que se multiplica é a mesma que morre) e a fase de declínio (fase de morte) (LOURENÇO, 2006).

Na figura 8 é apresentada a curva de crescimento ao longo de 8 dias de cultivo (duração do experimento), onde é apresentado o valor de densidade celular (DC) durante o cultivo, sendo possível observar a curva de crescimento nos dois tratamentos experimentais avaliados.

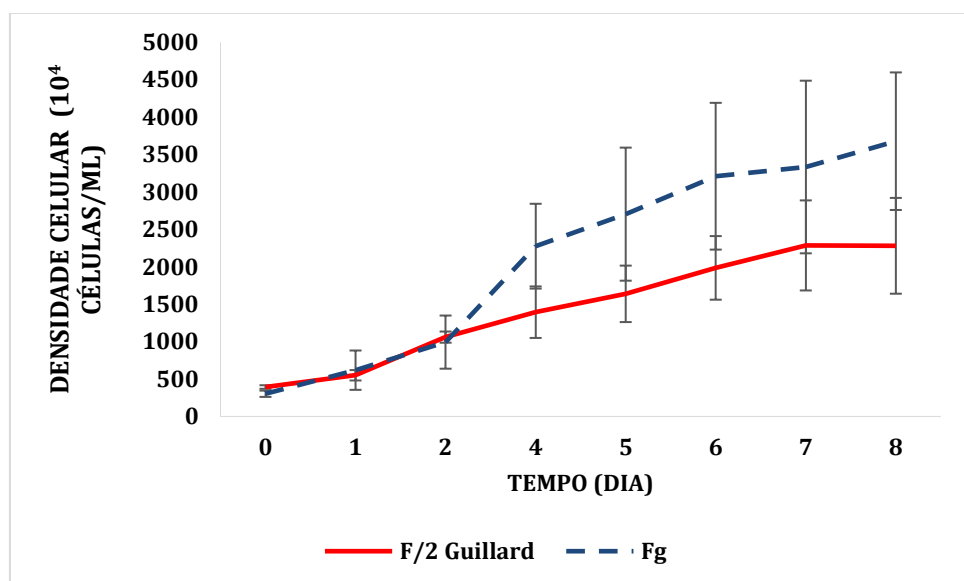
Pode-se observar que nos dois primeiros dias, tanto no meio de cultivo padrão (F/2) e no meio alternativo (Fg), tiveram crescimento semelhantes, e apenas no quarto dia de cultivo que a densidade celular começou a se diferenciar. As células que foram inoculadas no meio

alternativo tiveram uma boa adaptação e um bom crescimento comparado às células no meio convencional.

É possível observar que tanto no meio alternativo quanto no meio convencional a microalga cresceu como o esperado, mostrando um bom desenvolvimento. Ao último dia de cultivo pode se observar que cada cultivo continuou a crescer, sendo necessário um experimento com mais tempo para poder confirmar em qual dia exato que as microalgas entrariam em uma fase estacionária.

No quarto dia de cultivo a *Nannochloropsis oculata* apresentou um aumento na densidade celular máxima no meio Fg comparado ao meio F/2. Porém, conforme a análise estatística não houve diferença significativa nos dados de densidade celular máxima entre os meios comparando ($p > 0,05$).

Figura 8: Curva de crescimento da *Nannochloropsis oculata* nos diferentes meios de cultivo. Meio F/2 Guillard convencional e meio Fg (fertilizante Fortgreen) alternativo.



Acredita-se que esse bom desempenho da *N. oculata* no meio Fg, deve a concentração de nutrientes contidos na composição do meio Fg, foi feito um balanceamento feito em relação a quantidade de P na composição do fertilizante que se assemelhasse ao meio de cultivo F/2. O meio alternativo possui uma composição de 18-6-18% de N-P-K, porém não se sabe ao certo a sua composição em relação a quantidade de cada nutriente por ser um fertilizante já pronto.

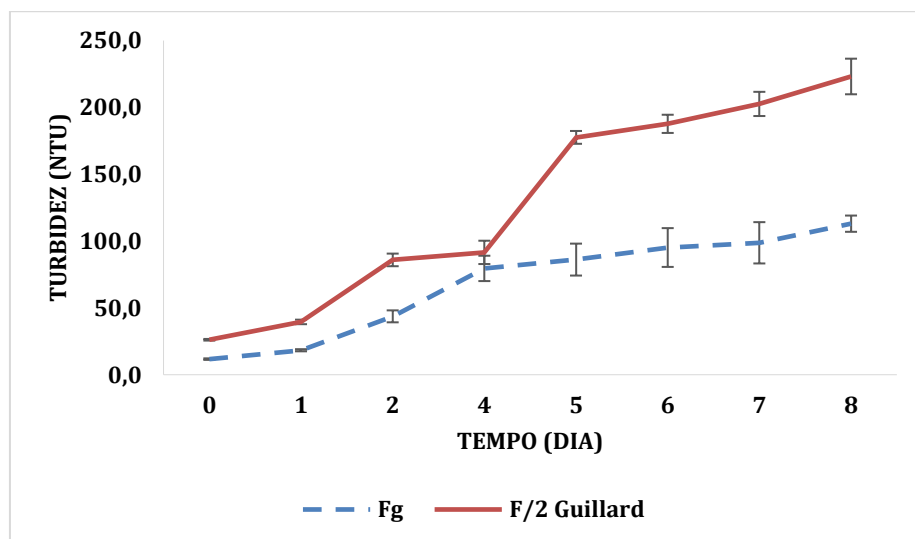
Soares (2012) testou o uso de diferentes tipos de fertilizantes no crescimento de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. comparado ao meio de cultura controle BG11. Esses meios

alternativos foram complementados com uma solução de micronutrientes (ácido bórico: 0,0029 g L⁻¹, cloreto de magnésio: 0,0018, sulfato de zinco: 0,00022, sulfato de cobre: 0,000079, molibdato de sódio: 0,00039 e nitrato de colbato: 0,000049). A *Chlorella* sp. não teve um bom rendimento em relação a massa seca, o que impediu que fosse observado diferenças entre os meios utilizados. Já para *Scenedesmus* sp. teve um rendimento similar ou melhor ao meio de cultura controle.

Assim, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, o uso de fertilizantes para a produção de microalgas se mostrou uma alternativa em potencial para a substituição de reagentes de grau analítico, não interferindo no crescimento do cultivo.

Na figura 9, é apresentado os valores de turbidez para ambos os tratamentos. Desta forma, contrariando ao que foi apresentado na DC, os valores de turbidez para o meio alternativo Fg obteve menores valores em relação ao meio convencional F/2 Guillard. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o meio F/2 acaba sendo mais turvo pelo fato do tamanho celular e quantidade de pigmento na mesma, o que pode ter influenciado numa maior turbidez, No meio Fg, as células apresentaram ser menor que no cultivo F/2 o que pode ter interferido na turbidez do meio. Ou uma outra hipótese para essa diferença entre a turbidez e a densidade celular, seja uma variação de erro experimental.

Figura 9: Variação de turbidez durante o cultivo *Nannochloropsis oculata* nos diferentes meios, F/2 Guillard convencional e meio Fg (Fortgreen – fertilizante) alternativo.



Fonte: Produção própria do autor (2021).

Griffiths et al. (2011) testou o a interferência do conteúdo de pigmento das células de microalgas na absorção de luz. Foi usada a *Chlorella vulgares*, na qual o teor de pigmentos

variou entre 0,5 e 5,5%, variando com as condições da cultura e a idade. É de conhecimento que a turbidez está ligada com a concentração de biomassa, porém em célula pigmentadas, essa variação no teor do pigmento pode levar a erros.

Os parâmetros de crescimento avaliados para cada tratamento experimental são apresentados na Tabela 6. Para todos os parâmetros de crescimento não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas. O alto valor de desvio padrão pode explicar os dados de DCM e turbidez, pois o cultivo em meio Fg teve uma maior concentração celular em relação ao meio F/2, porém com células em menores tamanhos, o que influencia na turbidez do meio. Já no meio F/2 o desvio padrão foi menor, o que pode justificar uma menor curva no crescimento, porém relacionando com a turbidez, as células estavam em um tamanho padrão, tendo assim uma alta na turbidez. Conforme os resultados de Taxa de Crescimento Específico (μ), o uso do fertilizante foi eficiente, tendo um resultado similar ao resultado obtido no meio F/2. O que demonstra que a *N. oculata* cultivada no meio Fg teve um bom crescimento e produtividade, comparado ao meio F/2 Guillard, sendo viável o uso do meio alternativo para a produção de biomassa.

Tabela 6: Valores dos parâmetros de crescimento. Densidade Celular Máxima (DCM), Taxa de Crescimento Específico (μ), Velocidade de Crescimento (K), Tempo de Duplicação (T), Produtividade (P), Biomassa acumulada (X) e Biomassa Seca (BS).

Parâmetros de crescimento	Meio F/2 Guillard	Meio Fortgreen
DCM (10^4 células/mL)	2582 \pm 639 a*	3520 \pm 1067 a
Taxa de Crescimento Específico (μ) (dia^{-1})	1,00 \pm 0,07 a	1,05 \pm 0,12 a
Velocidade de Crescimento (K)	0,35 \pm 0,051 a	0,45 \pm 0,113 a
Tempo de Duplicação (T) (dias)	2,93 \pm 0,461 a	2,33 \pm 0,609 a
Produtividade (P) ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}$)	19,1 \pm 7,2 a	22,7 \pm 1,42 a
Biomassa Acumulada (X) (Kg/reator)	0,0152 \pm 0,00576 a	0,0181 \pm 0,00114 a
Biomassa Seca (BS) (Kg L)	0,191 \pm 0,00514 a	0,211 \pm 0,00180 a

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

*As letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Gutiérrez et al. (2017) cultivaram *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis* sp. para alimentação de peixes, em meio alternativo composto por fertilizantes agrícolas composto por 0,02 mL de nutrifoliar completo, 0,065g de uréia, 0,05 mL de triplo 15 e 1 mL de vitamina – nueróbio e complexo B para cada litro de água, a fim de reduzir os custos de produção. O crescimento foi alcançado entre o terceiro e oitavo dia de cultivo, atingindo uma densidade celular de $7,5 \times 10^6$ cel/mL para *Nannochloropsis* em 1000 L e $0,265 \times 10^6$ cel/mL de *I. galbana* em 250 L. Conclui-se que o meio utilizado a base de fertilizante é uma alternativa viável para a produção de microalgas. Assim como no presente trabalho que apresentou um crescimento a partir do segundo dia de cultivo até o oitavo dia. Corroborando os resultados obtidos neste estudo com o presente trabalho, é possível afirmar que o uso de fertilizantes para a produção da *Nannochloropsis* é eficiente, tendo uma boa produtividade. Isso pode ser devido a facilidade da microalga em se adaptar em diferentes meios de cultura com diferentes concentrações de nutrientes.

Oliveira (2019), cultivou *Nannochloropsis oceanica* em meio alternativo composto por fertilizante agrícola suplementado com melaço de cana para cultivos autotróficos, mixotrófico e heterotróficos. Foram feitos 13 tratamentos em triplicatas, variando a concentração do melaço (0 ; $0,25 \text{ g L}^{-1}$; $0,50 \text{ g L}^{-1}$ e $0,75 \text{ g L}^{-1}$) ao longo de 6 dias, utilizando o meio F/2 como controle, foram medidos diariamente parâmetro de pH, densidade celular e peso seco. O meio que não foi usado o melaço não obteve bons resultados comparado ao meio controle. Já o meio que utilizou $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de melaço obteve os melhores resultados de crescimento no cultivo, atingindo valores estatisticamente iguais ao meio controle. Os meios que utilizaram maior concentração de melaço não obtiveram um aumento no crescimento da microalga. Isso pode ser explicado devido ao escurecimento do meio de cultivo e conseqüentemente a diminuição da luminosidade sobre as células. O melaço atuou no meio como uma fonte alternativa de nutrientes, como o manganês e as vitaminas B₁ e H, suprindo as necessidades nutricionais da microalga testada. Foi possível concluir que o uso do meio fertilizante com adição de melaço de cana se mostrou uma opção viável na substituição do meio F/2. Sendo assim, o uso do melaço de cana sendo uma fonte alternativa de carbono orgânico, se mostrou uma outra forma de substituição para o meio convencional de produção para microalgas.

Conforme autores da literatura (Tabela 7), obteve-se os seguintes resultados para o cultivo de microalgas em meio de cultura alternativo.

Tabela 7: Resultados na literatura do uso de meio alternativo para o cultivo de microalgas.

Referência	Espécie	Meio de Cultura testado	Resultado
Oliveira et al. (2012)	<i>S. platensis</i>	Meio de cultura controle Zarrouk com diferentes concentrações de N e P.	O cultivo adicionado de 0,50 g L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ e sem adição de NaNO ₃ apresentou maior produtividade.
Bertoldi et al. (2007)	<i>C. vulgares</i>	Solução hidropônica residual (SHR); Solução hidropônica residual diluída em água deionizada à concentração de 50% (SHR50); Solução hidropônica residual diluída em água deionizada à concentração de 25% (SHR25)	A taxa de crescimento celular foi de 5,7x10 ⁶ cel/mL para o cultivo em SHR, 4,2 x10 ⁶ cel/mL no cultivo em SHR50 e 10,15x10 ⁶ cel/mL para SHR25.
Valenzuela-Espinoza et al. (1999)	<i>Isochrysis aff. galbana</i> (Cone T-ISSO)	Meio F/2 e meio a partir de fertilizante agrícola e sais.	A biomassa final no meio F/2 foi de 2,81 10 ⁶ cél/mL, enquanto no fertilizante agrícola foi de 3,03 10 ⁶ cél/mL.
Soares (2012)	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	Diferentes tipos de fertilizantes e meio de cultura controle BG11.	A <i>Chlorella</i> sp. não teve um bom rendimento com fertilizantes em relação a massa seca. Já para <i>Scenedesmus</i> sp. teve um rendimento similar ou melhor ao meio de cultura controle.
Gutiérrez et al. (2017)	<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Nannochloropsis</i> sp.	fertilizantes agrícolas e meio F/2	Obteve uma densidade celular de 7,5 x10 ⁶ cel/mL para <i>Nannochloropsis</i> em 1000 L e 0,265 x10 ⁶ cel/mL de <i>I. galbana</i> em 250 L.
Oliveira (2019)	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Meio alternativo composto por fertilizante agrícola suplementado com melaço de cana e meio de cultura controle F/2 Guillard.	Melhor crescimento foi alcançado com a utilização do melaço de cana-de-açúcar em uma concentração de 0,25 g/L.
Euclides (2013)	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp	Meio de cultura Illman a base de fertilizante e meio Illman a partir de reagentes analíticos, meio de cultura controle BG11	O uso de fertilizantes agrícolas teve resultado semelhante em relação a concentração de biomassa final, 1,833 ± 0,061 g L ⁻¹ para o meio de cultivo a base de fertilizante agrícola e 1,70 ± 0,031 g L ⁻¹ para meio de cultivo formulado a partir de reagentes analíticos.

Os valores de temperatura, pH e salinidade foram controlados para se manter constante para não haver diferença entre os tratamentos, na qual a temperatura se manteve em $23,3 \pm 0,2$ °C, pH $10,0 \pm 0,07$ e salinidade $22 \pm 0,0$. A microalga estudada é considerada uma microalga rustica, conseguindo se adaptar a uma ampla variação de temperatura, salinidade e pH (BORGES, 2007).

Meinerz (2007) analisou o crescimento de duas espécies de microalgas marinhas (*Thalassiosira weissflogii* e *Nannochloropsis oculata* em diferentes condições de temperatura (20, 25 e 30°C), salinidade (10, 20 e 30), em meio F/2. A *T. weissflogii* cresceu em todos os parâmetros testados, com melhores resultados de crescimento entre 25 e 30°C. Porém seu tempo de duplicação e rendimento celular foi menor comparado a outra espécie testada, sendo ideal fazer seu cultivo durante a primavera e verão. Já a *N. oculata* atingiu maior crescimento e rendimento em menor tempo. Além disso, não apresentou restrições na variabilidade de temperatura, salinidade, podendo ser cultivada ao longo de todo o ano, em uma ampla faixa de temperatura e salinidade.

Muitas espécies de microalgas têm seu pH ideal de crescimento em valores neutros, porém algumas espécies são tolerantes a altos valores de pH, como a *Spirulina* que pode crescer em meios com o pH 9,0. Porém deve-se atentar aos valores de pH, pois ele influencia na disponibilidade de nitrogênio nas células, pois o pH abaixo de 8,0 há aumento de íon amônio e em pH acima de 11,0 o nitrogênio encontra-se na forma de amônia, o que pode ser assimilada pelas microalgas, porém quando há a disponibilidade de íon amônio no meio, irá exigir um maior gasto energético da célula (ROSA, 2012).

O nitrogênio no meio de cultivo pode ser assimilado pelas microalgas na forma de nitrato, nitrito e amônia, sendo que cada espécie possui uma forma preferencial de assimilação. Essas reações de assimilação do nitrato tem uma relação direta com o pH do meio de cultivo, que por sua vez, acaba influenciando nas taxas de crescimento das microalgas (TEIXEIRA, 2015). Os valores das concentrações (mg L^{-1}) de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), amônia total (NH_3) e ortofosfato (PO_4^{3-}) para o dia 0 e dia 8, além do valor de consumo para cada nutriente e tratamento se encontra na Tabela 8.

Tabela 8: Valores das concentrações (mg L^{-1}) e consumo para nitrito, nitrato, amônia total e ortofosfato no dia 0 e dia 8 para cada tratamento e percentual (%) de remoção ou incremento de cada nutriente.

Parâmetro	Meio F/2 Guillard			Meio Fortgreen		
	Dia 0	Dia 8	Remoção (%)	Dia 0	Dia 8	Remoção (%)
Nitrito (NO_2^-)	$0,21 \pm 0,24$	$0,31 \pm 0,12$	- 47	$0,18 \pm 0,19$	$7,71 \pm 9,09$	- 4183
Nitrato (NO_3^-)	$33,17 \pm 28,75$	$0,03 \pm 0,01$	100	$20,53 \pm 18,15$	$0,06 \pm 0,03$	99,7
Amônia total (NH_3)	$0,35 \pm 0,36$	$1,53 \pm 1,41$	- 337	$2,24 \pm 0,63$	$0,21 \pm 0,26$	90,6
Ortofosfato (PO_4^{3-})	$2,23 \pm 1,92$	$0,02 \pm 0,03$	99,1	$4,5 \pm 1,52$	$0,2 \pm 0,18$	95,5

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Pode se observar que tanto para o meio F/2 quanto para o meio Fortgreen (Fg) os valores para nitrito tiveram um aumento. Esse aumento possivelmente se deve pela remoção parcial de uma parte da concentração de amônia não consumida pela microalga em nitrito. Ao fim do cultivo foi observado um aumento na concentração de amônia no meio F/2, e esse aumento pode estar ligado a produção de matéria orgânica (EMBRAPA, 2007). Já o nitrato e o ortofosfato foram absorvidos pela *N. oculata* nos dois tratamentos, sendo fundamentais para o crescimento da microalga, pois são nutrientes essenciais para o desenvolvimento de microalgas (LARSDOTTER, 2006).

Foi fornecido uma quantidade de 31,87 mg de N e 2,21 mg de P para o meio F/2 e 14,97 mg e 4,42 mg de N e P respectivamente para o meio Fg (tabela 9). Essa diferença pode estar associada a fonte de nitrogênio em cada meio, não se tem sabe ao certo quais fontes de nitrogênio possui no meio Fg e a quantidade, já no meio F/2 sabemos as fontes e quantidade, porém foi possível notar que essa diferença de quase o dobro de N no meio não afetou o crescimento da microalga.

Tabela 9: Quantidade fornecida de nitrogênio (N) e fósforo (P) para cada meio de cultura analisado.

	Meio F/2 Guillard	Meio Fortgreen
Nutriente		
Nitrogênio (N) (mg)	31,87	14,97
Fósforo (P) (mg)	2,21	4,42

Já a concentração de P foi o dobro no meio Fg devido ao balanceamento foi feito na tentativa de equilibrar essa concentração no meio alternativo. É possível que essa concentração maior de P tenha suprida a baixa concentração de N no meio. Como o meio alternativo iniciou com menor concentração de nitrogênio em comparação ao meio convencional, pode ser possível uma suplementação de nitrogênio possa aumentar aos dados obtidos de produtividade. Futuros trabalhos podem responder tal hipótese, além da busca por fertilizantes com uma composição mais balanceada que supra a necessidade da microalga cultivada, podendo obter resultados de crescimento e produtividade ainda melhor o que obtido nesse trabalho.

Corroborar com os dados obtidos com a curva de crescimento, pode se supor que de fato ao final do experimento o cultivo já estava atingindo a fase estacionária, já que no oitavo dia de experimento já havia sido consumido quase que o total de N e P nos meios de cultura.

Oliveira et al. (2012) cultivou *Spirulina platensis* a fim de avaliar seu crescimento em diferentes concentrações de N e P. Os cultivos foram realizados em meio com 0,25 g L⁻¹, 0,50 g L⁻¹ e sem adição de KH₂PO₄ (fonte de P) e com 1,25 g L⁻¹, 2,50 g L⁻¹ e sem adição de NaNO₃ (fonte de N). O consumo de P e N foi acompanhado a cada 48h. Ao variar a concentração de P verificou-se efeito positivo em relação à concentração celular máxima. Pode-se verificar ainda que o aumento da concentração de N apresentou efeito negativo na concentração celular máxima, sendo esse resultado maior que o proporcionado pela variação da concentração de P. A interação entre essas variáveis apresentou efeito significativo na concentração celular máxima, verificando-se que com a diminuição de N e aumento de P atingiu-se a maior resposta. Deste modo, o cultivo adicionado de 0,50 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e sem adição de NaNO₃ apresentou maior produtividade.

Bertoldi et al. (2007) analisou a biorremediação de N e P pela microalga *Chlorella vulgaris* em solução hidropônica residual (SHR) (Amônia - 26,60 mg L⁻¹; Nitrato - 226,50 mg L⁻¹; Nitrito - 0,27 mg L⁻¹; Fósforo total - 35,00 mg L⁻¹; Cálcio - 99,17 mg L⁻¹; Magnésio - 22,12 mg L⁻¹; Ferro - 1,95 mg L⁻¹; Manganês - 0,26 mg L⁻¹; Cobre - 0,04 mg L⁻¹; e Zinco - 0,11 mg L⁻¹), originário do cultivo de alface, em três concentrações diferentes: solução hidropônica residual (SHR); solução hidropônica residual diluída em água deionizada à concentração de 50% (SHR50); e solução hidropônica residual diluída em água deionizada à concentração de 25% (SHR25). Os cultivos foram analisados quanto a absorção de amônia, nitrito e nitrato, obtendo um percentual médio de absorção de cada nutriente para SHR, SHR50 e SHR25 respectivamente: amônia (82,2%; 82,4%; 65,7%), nitrato (80,5%; 81,4%; 87,0%), nitrito (84,2%; 83,6%; 83,5%) e fósforo total (51,9%; 46,0%; 43,1%). Conforme esses dados foi possível observar que essa absorção teve um efeito positivo no crescimento celular até o final

do cultivo chegando a $5,7 \times 10^6$ cel/mL para o cultivo em SHR, $4,2 \times 10^6$ cel/mL no cultivo em SHR50 e $10,15 \times 10^6$ cel/mL para SHR25. Foi possível concluir que essa solução residual foi uma boa fonte de nutrientes, já que foi possível observar um aumento na densidade celular e uma absorção dos nutrientes efetiva.

Valenzuela-Espinoza et al. (1999) cultivou *Isochrysis aff. galbana* (Cone T-ISO) em meio F/2 e um meio a partir de fertilizante agrícola e sais ($\text{NH}_4\text{NO}_3 - 36,6 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{P}_2\text{O}_5 - 5,6 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Fe}.\text{EDTA} - 5,4 \text{ mg L}^{-1}$; Fe quelado - $70,7 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{MnSO}_4 - 1,09 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 - 1,09 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$; Enxofre - $45,84 \text{ mg L}^{-1}$), afim de comparar a produção de biomassa e a absorção de nitrato, fosfato e amônio nos dois tratamentos, por 7 dias. Foi possível analisar que os meios utilizados não tiveram diferença significativas em relação a densidade celular. A biomassa final no meio F/2 foi de $2,81 \times 10^6$ cél/mL, enquanto no fertilizante agrícola foi de $3,03 \times 10^6$ cél/mL. No consumo de fosfato, nitrato e amônia, pode se observar que o fosfato foi consumido mais rápido em meio com fertilizante do que no meio F/2, já a amônia comparada ao nitrato foi consumida mais rápido. Por ser uma fonte de nutrientes de rápida assimilação, os fertilizantes agrícolas tornam-se uma alternativa viável para a produção de microalgas, tendo bons resultados em um menor tempo.

Corroborando com os dados de velocidade de crescimento e taxa de crescimento (tabela 7), a microalga teve uma velocidade de crescimento mais rápido e uma melhor taxa de crescimento no meio alternativo Fg. No presente estudo comparado aos estudos apresentados, também não houve diferença significativa de densidade celular entre os meios.

6.3 Dados de lipídios e caracterização ácidos graxos poli-insaturados

A partir da liofilização da biomassa de cada tratamento do presente estudo, foi possível determinar o teor de lipídios (%). Para a *N. oculata* cultivada no meio de cultura Fortgreen, obteve um rendimento médio de $7,08 \pm 0,77$ e para a cultivada no meio F/2 Guillard, o rendimento foi de $5,97 \pm 0,79\%$.

Gris (2011) cultivou a *N. oculata* em fotobiorreator *airlift* com o objetivo de determinar as melhores condições de crescimento. A microalga foi cultivada no meio F/2 (25 a $125 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaNO}_3$), a uma temperatura entre 19 a $29 \text{ }^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de 3636 a 10364 lux . Os melhores resultados foram de $482,7 \text{ mg L}^{-1}$ para concentração máxima de biomassa, nas condições de $21 \text{ }^\circ\text{C}$, 105 mg L^{-1} de NaNO_3 e 9000 lux , o percentual de lipídios na biomassa liofilizada de $30,36\%$ nas condições de $21 \text{ }^\circ\text{C}$, 45 mg L^{-1} de NaNO_3 e 5000 lux .

A partir da análise cromatográfica foi possível obter o teor de ácidos graxos presentes na porcentagem lipídica, sendo possível identificar 8 tipos de diferentes ácidos graxos.

Ocorreu a predominância do ácido palmítico (C16:0) nas amostras, com 38% nas amostras de biomassa do cultivo Fg e 27% nas biomassas do cultivo F/2, seguido pelo ácido palmítico (C16:1), com 24 e 15% para meio F/2 e Fg, respectivamente, e do ácido timnodônico (C20:5) com 22% para o meio F/2 e 14% para o meio Fg, sendo esses dois ácidos graxos (C16 e 20:5) considerados numericamente menores no meio Fg. A lista de predominância (%) de ácidos graxos presentes na biomassa de cada meio de cultivo estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10: Predominância (%) de ácidos graxos presente na biomassa de cada meio de cultivo.

Ácidos graxos	Meio F/2 Guillard	Meio Fg
C14:0	9,04 ± 0,52	9,06 ± 0,40
C16:0	27,09 ± 0,04	37,84 ± 0,37
C16:1	24,71 ± 0,24	15,07 ± 0,14
C18:0	2,46 ± 0,10	5,50 ± 0,12
C18:1	5,87 ± 0,61	10,87 ± 0,02
C18:2	5,95 ± 0,22	5,39 ± 0,30
C20:4 (ARA)	3,92 ± 0,39	2,23 ± 0,12
C20:5 (EPA)	21,59 ± 1,97	14,03 ± 0,56
Saturados	38,59 ± 0,38	52,41 ± 0,90
Insaturados	62,03 ± 0,50	47,59 ± 0,90

Valores expressos como média ± desvio padrão da determinação em duplicata.

Sales (2021) testou diferentes concentrações de extratos lipídicos e ácidos graxos, sendo substitutos parcialmente do óleo de peixe na alimentação de peixes. Foi preparado os extratos da microalga *N. gaditana*, a partir da liofilização da biomassa concentrada. Este extrato apresentou altas concentrações de ácido eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) – 22,1%, ácido palmítico (16:0) – 23,5% e ácido palmitoleico (16:1) – 18,8%. Com base nos resultados, pode se afirmar que o extrato de *N. gaditana* é adequado para substituição parcial do óleo de peixe.

Os ácidos graxos mais encontrados nas microalgas são C16:0, C16:1 e C18:0, esses foram os principais ácidos graxos encontrados no estudo de Marella et al. (2019), assim como C20:5 que se destaca nos cultivos de diatomáceas.

6.4 Custo de Produção

Conforme os dados de teste preliminar expressados anteriormente foi escolhido o meio Fortgreen para o experimento, devido ao seu baixo custo e boa produtividade, tendo melhor custo-benefício comparado aos outros meios. O custo para cada meio de cultivo utilizados estão expressos na Tabela 11A e 11B.

Tabela 11A: Custo de produção (R\$/m³) para o meio F/2 Guillard.

Nutriente	Quantidade (Kg/m³)	Valor Kg	Custo final (R\$/m³)
Fosfato de sódio	0,00005	90,94*	0,0045
Nitrato de sódio	0,075	56,00*	4,20
Sol. metais traço	1 L	41,96*	29,98
Sol. vitaminas	0,5 L	6,03*	0,00081
Total		194,93*	34,19

Tabela 11B: Custo de produção (R\$/m³) para o meio Fortgreen.

Nutriente	Quantidade (Kg/m³)	Valor Kg	Custo final (R\$/m³)
Fertilizante	0,000083	29,90*	2,48
Total		29,90	2,48

*Valores médios encontrados na pesquisa de preço.

Esse alto custo de produção do meio F/2 está ligado principalmente ao alto valor que cada nutrientes de grau de pureza analítica (P.A) possuem, pois são nutrientes utilizados em laboratório. Já o fertilizante é um composto de rico em nutrientes utilizados para finalidades que não exige uma pureza como os nutrientes utilizados em laboratório e por ser encontrado no mercado em grande volume, o torna um produto mais barato.

O custo de produção por quilograma para o meio F/2 Guillard e para o meio Fortgreen estão apresentados na Tabela 12.

Para a produção de $191 \pm 51,4$ gramas de biomassa em 100 litros de cultivo foi gasto um total de R\$ 178,19 reais por quilograma para o meio F/2 Guillard e para $211 \pm 18,0$ gramas de biomassa em meio Fg foi gasto um total de R\$ 11,75 por quilograma.

Tabela 12: Valores do custo de produção* para o meio F/2 Guillard e para o meio Fortgreen.

Tratamento	Biomassa (Kg/L)	Valor meio de cultura (R\$/m³)	Custo Produção R\$/Kg
F/2 Guillard	0,191 \pm 0,00514	34,19	178,98
Fortgreen	0,211 \pm 0,00180	2,48	11,75

Valores de biomassa e expressos como média e desvio padrão.

Valores de custo expressos como média.

*Valores em relação ao custo de produção do meio de cultura.

Conforme os dados obtidos pode ser concluir que o meio Fg apresenta um menor custo de produção comparado ao meio convencional F/2 Guillard. Sendo uma boa fonte de nutrientes e com menor custo de produção em larga escala.

Euclides (2013), usou diferentes meios de cultura afim de selecionar o melhor meio mais adequado nutricionalmente para o cultivo de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. Foi escolhido seis meios de cultura sintéticos (BG11, MDM, MBM, BBM, MC e Illman). Foram elaborados dois meios Illman, um foi elaborado a partir de fertilizantes agrícolas e outro meio Illman a partir de reagentes analíticos. O uso de fertilizantes agrícolas teve resultado semelhante em relação a concentração de biomassa final, $1,833 \pm 0,061 \text{ g L}^{-1}$ para o meio de cultivo a base de fertilizante agrícola e $1,70 \pm 0,031 \text{ g L}^{-1}$ para meio de cultivo formulado a partir de reagentes analíticos, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. O fertilizante agrícola se mostrou uma boa alternativa para redução de custos, apresentando uma economia de 77% no custo total do meio de cultura, sendo considerado economicamente viável para o cultivo de microalgas em escala comercial.

Afirmando os resultados obtidos no presente trabalho, com o uso de fertilizante em diferentes cultivos de diferentes espécies tem bons resultados em relação ao crescimento celular e redução dos custos de produção.

O presente trabalho teve uma redução de 92% dos custos de produção em relação ao meio F/2. Na qual se mostrou viável para o cultivo da microalga *N. oculata* para a produção dela.

7 Conclusão

Com base dos dados obtidos para crescimento, a *Nannochloropsis oculata* cultivada em meio Fortgreen apresentou um bom crescimento comparada a cultivada em meio F/2 Guillard, não havendo diferenças significativas entre os meios.

Em relação ao custo, o meio Fortgreen teve uma redução de 92% do valor de produção do meio F/2 Guillard. O meio alternativo Fortgreen, se mostrou uma alternativa de meio mais viável e com bom crescimento celular comparado ao meio F/2 Guillard, tendo uma elevado potencial de uso para cultivos em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th. ed. Washington D. C: [s. n.], 2005. E-book. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Standard_Methods_for_the_Examination_of.html?id=buTn1rmfSI4C&redir_esc=y. Acesso em: 23 dez. 2020.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. [S. l.]: American Public Health Association, American Water Works Association e Water Environment Federation, 2012. *E-book*.

ARAÚJO, F. P.; PAZ, G. M.; OLIVEIRA, Y, L.; LEITE, C. H. P. **Estudo da Viabilidade de Microalgas para Produção de Biodiesel**. 2012. ISBN 978-85-62830-10-5. 2012.

ARREDONDO-VEGA, B. O.; VOLTOLINA, D. **Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal**. La Paz: [s. n.], 2007. *E-book*. Disponível em: <https://www.cibnor.gob.mx/libro-de-microalgas>. Acesso em: 23 jan 2021.

ARRIADA, A. **Cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) em água de produção de petróleo: Viabilidade de crescimento, produção de lipídeo e açúcares**. 2014. Tese (Pós-Graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2014.

ARRIADA, A. A.; ABREU, P. C. ***Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production**. 2014. Brazilian Journal of Petroleum and Gas. Rio Grande. v. 8n. 3. p. 119-125. ISSN 1982-0593. DOI:10.5419/bjpg2014-0011. 2014.

AVERSARI, M.; NASCIMENTO, B. L. A.; MARTINS, N. C.; LUCENA, R. F. P.; BONIFÁCIO, K. M. **Cultivo de microalgas em meio alternativo e de baixo custo, enriquecido com resíduos de compostagem: uma proposta para melhoria de vida dos pescadores da Paraíba**. 2018. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade. 5(11):969-985. ISSN 2359-1412. DOI: 10.21438/rbgas.051113. 2018.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. REBELO, A. M. **Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris***. 2007. Evidência, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, jul./dez. 2007. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/1862/934>. Acesso em: 30 jan. 2022.

BEZERRA, J. H. C. **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* e seu uso como aditivo na ração do camarão *Litopenaeus vannamei***. 2020. Tese (Pós-graduação em Ciências Marinhas) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2020.

BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. **Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de “mecanismo de desenvolvimento limpo”**. 2007. Atlântica, Rio Grande, 29(1): 35-46, 2007.

BRONDNJAK-VONCINA, D., KODBA, Z. C., NOVIC, M. **Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids**. 2005. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. v. 75. 1: 31-43. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.04.011>. 2005.

CORREIA, C. A. S. R. **Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas**. 2013. Tese. (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria. 2013.

COSTA, A. G. **Efeitos de diferentes condições físicas e efluentes agrícolas sobre o cultivo de microalgas da família Scenedesmaceae como subsídio à aplicação biotecnológica**. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2018.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DIAS, B. P. L. **Influência de diferentes regimes de cultivo na produção de biomassa da microalga *Acutodesmus obliquus* em sistema laminar de cultivo de algas.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

DERNER, R. B. **Sistemas de Cultivo de Microalgas.** 2017. Biotecnologia de Algas. Aquaculture Brasil. Florianópolis. Set/Out. 2017.

FAO 2004. **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.**

FORTES, M. M. **Fotobiorreatores para o cultivo de microalgas destinadas à produção de biodiesel.** 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2015.

FRIES, J. **Analisis de trazas: metodos fotometricos comprobados.** [S. l.: s. n.]. E-book.

GANI, P.; SUNAR, N. M.; MATIAS-PERALTA, H. M. **Cultivation sytem and harvesting techniques in microalgae biomass production.** 2020. Quantum Journal Of Engineering, Science and Technology 1(1): 33-44. 2020. Disponível em: <https://www.qjoest.com/index.php/qjoest/article/view/4>. Acesso em: 02 nov 2021.

GERALDES, V. S. M. **Utilização da *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1981 (viva, concentrada e liofilizada) no cultivo dolinguado, *Solea senegalensis* Kaup, 1858: Enriquecimento do alimento vivo e cultivo em "água verde".** 2007. Dissertação (Mestrado em Pescas e Aquacultura) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. DOI: 10.13140/RG.2.1.4261.9041. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/278243101>. Acesso em: 02 nov 2021. 2007.

GRESSLER. P. D. **Desenvolvimento de sistema para cultivo de microalgas e ensaio ecofisiológico para aplicação em biotecnologia ambiental.** 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.

GRIFFITS, M. J., GARCIN, C., HILLE, R. P., HARRISON, S. T. **Interferência por pigmento na estimativa da concentração de biomassa de microalgas por densidade óptica.** 2011. Journal of Microbiological Methods. v.85. Issue 2. 119-123p. 2011. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770121100056X?casa_token=MAhj-LHJOesAAAAA:EvCL7a9dqD9ssJtpopMJIfO9FZm45JRdmh31B9KhaCOVRE5O_Ni-0qZUIxkBejrzrXcSALJrkI. Acesso em: 02 fev. 2022.

GRIS, L. R. S. **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator *Airlift***. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.

GRIS, L. R. S.; PAIM, A. C.; DOMENEGHINI, E. C.; BRUM, C.; TRIERWEILER, J. O.; FARENZENA, M. **Produção de microalgas em fotobiorreator air-lift**. 2010. Seminário (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

GUILLARD, R. R. L. eds. Smith, W. L & Chanley, M. H. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: Culture of Marine invertebrates Animals. Plenum Publishing, New York. 29-60p. 1975.

GUTIÉRREZ, M. F.; ROMERO, G. A. J.; BARROS, A. D.; RUIZ, J. R. **Cultivo de microalgas *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis* sp. para alimentación de larvas de peces marinos**. MUTIS. Technical Report. Colombia. 7(2), 81-85, julio-diciembre de 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1246>. Disponível em: <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1246>. Acesso em: 04 nov 2021.

KANEMOTO, F. T. **Otimização de sistema de cultivo de baixo custo de *Nannochloropsis gaditana* Lubián 1982 para produção de biodiesel**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

KOCHEM, L. H. **Caracterização de fotobiorreatores air-lift para cultivo de microalgas**. 2010. Monografia (Conclusão de curso de Engenharia Química) – Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

LARSDOTTER, K. **Wastewater treatment with microalgae – A literature review**. 2006. *Vatten*. v. 62. 31-38. 2006.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. E-book. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=cFWnNAAACAAJ>.

MARELLA, T. K. *et al.* **Biodiesel production through algal cultivation in urban wastewater using algal floway**. *Bioresource Technology*, v. 280, p. 222-228, 2019.

MARIANO, V. L. B. **Aquicultura de microalgas**. 2014. Monografia (Curso de Especialização em educação do Campo) – Universidade Federal do Paraná. Matinhos. 2014.

MARTINS, R. G. **Síntese, extração e caracterização de biopolímeros de origem microalgal para desenvolvimento de nanofibras**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimento) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2014.

MEINERZ, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. 2007.

NETO, W. A. F.; MENDES, C. R. B., ABREU, P. C. **Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media**. 2018. *Aquaculture Research*. v.49. 2527–2535. DOI: 10.1111/are.13715. 2018.

OLIVEIRA, I. B. R.; SILVA, A. C. T.; SANTOS, S. F. M.; LOPES, D. N. M.; FREITAS, M. C. O.; MACIEL, R. L.; MELO, I. M.; SILVA, J. W. **Influência da depleção da fonte de nitrogênio no meio de cultura sobre o rendimento de biomassa da *Nannochloropsis oculata***. 2020. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 5670-5675, ISSN 2525-8761. feb. 2020.

OLIVEIRA, M. S; CARVALHO, L. F.; COSTA, J. A. V. **Cultivo de *Spirulina platensis* paracas em Diferentes Concentrações de Fósforo e Nitrogênio**. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 4, n. 2, 15 mar. 2013.

OLIVEIRA, N. G. **Cultivo da microalga de alto valor econômico *Nannochloropsis oceânica* em meio alternativo utilizando melão de cana como substrato orgânico.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Oceanografia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

OSORIO, K.; PALACIOS K.; LUMBI, D.; HSIEH, P.; ZUNIGA-GONZÁLEZ, C.; AGUILAR, A. **Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y fertilizante: Una contribución a la Bioeconomía acuícola.** 2020. Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático. vol. 6. num 11. pág. 1440-1457 ISSN 2410-7980. 2020.

PEREIRA, G. H. M. **Cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* em batelada alimentada.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.

PEREIRA, H. **Desenvolvimento e otimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala.** 2009. Tese (Tese em Aquicultura e Pescas) – Universidade de Algarve. Portugal. 2009.

PORTUGAL, I. C. **Avaliação do crescimento de microalgas importantes para aquicultura cultivadas com diferentes concentrações de nutrientes.** 2010. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2010.

QUEIROZ, J. F.; BOEIRA, R. C. **Boas Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aquicultura.** Comunicado Técnico. EMBRAPA. São Paulo. Dezembro. 2007

ROSA, A. P. C. **Produção de biomassa e ácidos graxos por diferentes microalgas e condições de cultivo.** 2012. Tese (Pós-graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2012.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** 2004. Blackwell. Science. 566p. ISBN 0632059532.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G., MEMON, S. A.; LEE, K., RASHID, N. **Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review.** 2018. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 92. 394–404. 2018. ISSN 18790690. DOI: 10.1016/j.rser.2018.04.034.

SALES, R. O. J. **Effects of dietary use of two lipid extracts from the microalga *Nannochloropsis gaditana* (Lubián, 1982) alone and in combination on growth and muscle composition in juvenile gilthead seabream, *Sparus aurata*.** 2021. *Algae Research*. v. 53. 102162. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102162>. Acesso em: 03 fev. 2022.

SALES, R. O. J. **Cultivo de juvenis de cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* usando uma pasta da microalga *Nannochloropsis oculata* produzida por floculação.** 2015. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SÁNCHEZ-TORRES, H.; JUSCAMAITA-MORALES, J.; VARGAS-CÁRDENAS, J.; OLIVEROS-RAMOS, R. **Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado.** 2008. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina. *Ecología aplicada*. Vol. 7 Nos 1 y 2, pp. 149-158. ISSN 1726-2216. Perú. Lima. 2008.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. **Aplicações ambientais de microalgas.** 2012. *Revista CIATEC – UPF*, vol.4 (1), p.p.48-60. 2012.

SOARES, J. **Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes agrícolas para o cultivo de microalgas.** 2012. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SOUZA, T. C. **Avaliação da produção de biomassa a partir de microalgas sob a influência de temperatura e nutrientes.** 2015. Monografia (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2015.

TEIXEIRA, D. A. **Processo de simplificação de meio de cultura para a produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas.** 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2015.

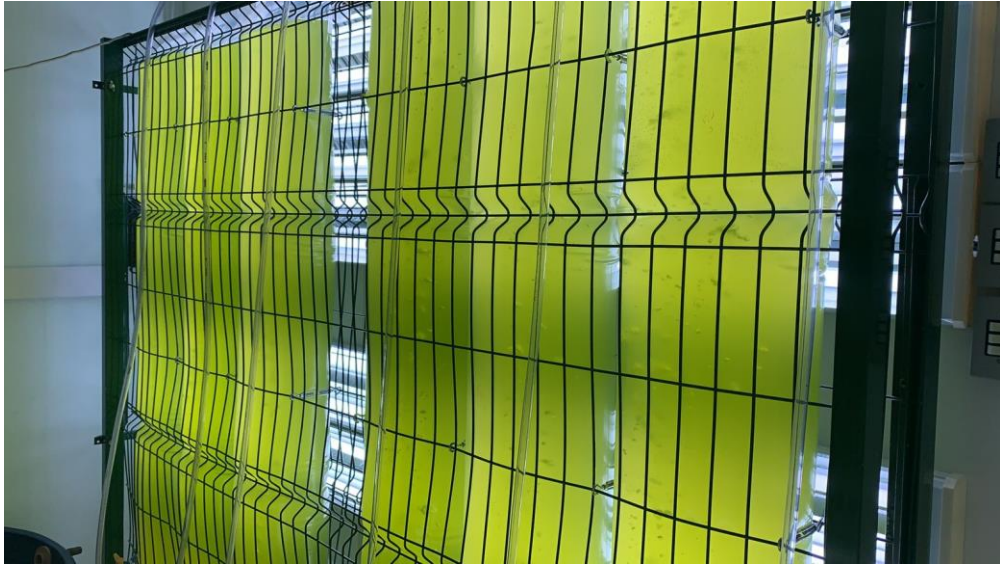
VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. **Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium.** 1999. *Aquacultural Engineering* 20. Elsevier. 135-147. Disponível em: <https://www.elsevier.nl/locate/aqua-online>. Acesso em: 03 nov. 2021. 1999.

VOLKMAN, J. K.; BROWN, M. R.; DUNSTAN, G. A.; JEFFREY, S. W. **The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae.** 1993. *Journal Phycol.* v.29. 69-78. 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 3rd ed. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. E-book.

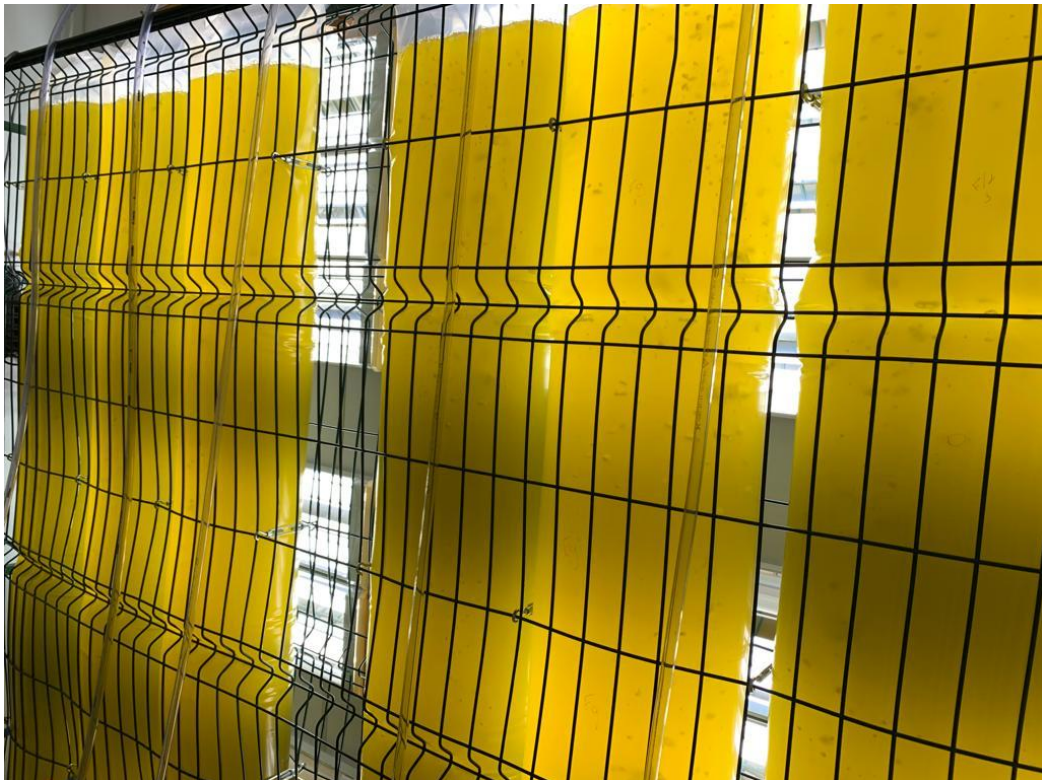
ANEXOS

Figura 10: Cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* em sistema de reator tipo *bag* no 2 dia de cultivo.



Fonte: Autor (2021).

Figura 11 Cultivo da microalga *Nannochloropsis oculata* em sistema de reator tipo *bag* no 8 (último) dia de cultivo.



Fonte: Autor (2021).

Figura 12: Preparo para floculação da biomassa de *N. oculata*.



Fonte: Autor (2021).

Figura 13: Biomassa resultante após a floculação da biomassa de *N. oculata*.



Fonte: Autor (2021).