Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BASEADAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALTO VALOR AGREGADO EM MICROALGAS

SAMUEL NUNES LIMBERGER

MARCELO OLIVEIRA RODRIGUES

LETÍCIA JUNGMANN CANÇADO

Brasília
2024

Samuel Nunes Limberger

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BASEADAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALTO VALOR AGREGADO EM MICROALGAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração Química Inorgânica, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues e coorientação da Dra. Letícia Jungmann Cançado

Brasília
2024

Samuel Nunes Limberger

AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS BASEADAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALTO VALOR AGREGADO EM MICROALGAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química na área de concentração Química Inorgânica, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues e coorientação da Dra. Letícia Jungmann Cançado

Aprovado em 19 de Novembro de 2024:

_____
Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues (IQ/UnB)
Orientador

_____
Dra. Sarah Silva Brum (IQ/UnB)

_____
Dr. Luiz Fernando Roncaratti Júnior (IF/UnB)

Brasília
2024

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho de mestrado ocorreu em meio a uma pandemia, uma greve na UnB, um casamento, um trabalho formal, entre outras coisas. Todas essas mudanças, em um intervalo de pouco menos de três anos, foram sem dúvidas difíceis de conciliar com o trabalho. Então nada mais justo do que agradecer a todos que estiveram comigo ao longo do percurso.

Agradeço imensamente a minha família pela paciência de aguentar os dias e noites no laboratório, em especial minha esposa Sofia. Também agradeço aos meus amigos da vida e da Igreja que volta e meia me deram um empurrãozinho que faltava.

Agradeço ao meu orientador Marcelo que sempre me atendeu quando precisei.

Agradeço a minha coorientadora Letícia que me aguentou no dia a dia do laboratório entre os ires e vires de acordo com as demandas do trabalho e da vida.

Agradeço a todos os colaboradores do grupo de algas da Embrapa Agroenergia que me acolheram e ensinaram técnicas e processos que eram distantes da minha área de origem. Também agradeço aos analistas e colaboradores do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis pelo apoio para caracterizar a biomassa.

Agradeço as instituições UnB e Embrapa pela oportunidade e pelo apoio para desenvolver a pesquisa. Também a FAP-DF por um ano de bolsa de fomento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 1
1.1. Objetivo Geral 2
1.2. Objetivos específicos 2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. Microalgas 3
2.2. Pontos Quânticos e Microalgas 6
3. MATERIAIS E MÉTODOS 10
3.1. Materiais 10
3.2. Experimentos de cultivo 10
3.3. Monitoramento do Cultivo e Colheita de Biomassa 14
3.4. Análise de Biomassa 15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 16
4.1. Interação Microalga e CQDs 16
4.2. Ensaio de Meios 29
5. CONCLUSÕES 41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de artigos de Microalgas e Biorrefinarias 5
Figura 2 – Absorbância e Curva de Crescimento – CS5 x CDA32.....17
Figura 3 – Diagrama de Biomassa Seca – CS5 x CDA32..... 18
Figura 4 – Curva de Crescimento – LBA39 x CDA32 – Inicial.....19
Figura 5 – Diagrama de Biomassa Seca – LBA39 x CDA32 – Inicial..... 19
Figura 6 – Curva de Crescimento – LBA39 x CDA32 – 1x.....20
Figura 7 – Diagrama de Biomassa Seca – LBA39 x CDA32 – 1x.....20
Figura 8 – Curva de Crescimento – LBA39 x CDA32 – 3x.....21
Figura 9 – Diagrama de Biomassa Seca – LBA39 x CDA32 – 3x.....21
Figura 10 – Curva de Crescimento – LBA39 x CDP.....22
Figura 11 – Diagrama de Biomassa Seca – LBA39 x CDP.....22
Figura 12 – Teor de Proteínas – Microalgas e CQDs 24
Figura 13 – Cromatograma LBA39 25
Figura 14 – Teor de Pigmentos – Microalgas e CQDs 27
Figura 15 – Curva de Crescimento – Ensaio de Meios I.....31
Figura 16 – Curva de Crescimento – Ensaio de Meios II.....32
Figura 17 – Registro Fotográfico – Ensaio de Meios II.....34
Figura 18 – pH por Dia de Cultivo – Ensaio de Meios II.....34
Figura 19 – Condutividade Elétrica Média – Ensaio de Meios II.....35
Figura 20 – Diagrama de Biomassa Seca – Ensaio de Meios I e II 36
Figura 21 – Curva de Crescimento – Ensaio de Meios III.....36
Figura 22 – Registro Fotográfico – Ensaio de Meios III.....36
Figura 23 – Diagrama de Biomassa Seca – Ensaio de Meios III 37
Figura 24 – Teor de Proteínas – Ensaio de Meios III 38
Figura 25 – Teor de Pigmentos – Ensaio de Meios III 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos Meios de Cultura.....11
Tabela 2 – Testes Estatísticos – Proteínas – Microalgas e CQDs.....23
Tabela 3 – Testes Estatísticos – Pigmentos – Microalgas e CQDs.....25
Tabela 4 – Testes *post-hoc* – Pigmentos – LBA39 x CDA32 – 1x.....26
Tabela 5 – Testes *post-hoc* – Pigmentos – LBA39 x CDA32 – 3x.....26
Tabela 6 – Testes *post-hoc* – Pigmentos – LBA39 x CDP.....27
Tabela 7 – Dados Consolidados de Microalgas e CQDs.....28
Tabela 8 – Comparação da Composição dos Meios de Cultura.....30
Tabela 9 – Descrição do Cálculo de Diluição.....30
Tabela 10 – Dados Consolidados de Meios de Cultura.....39
Tabela 11 – Comparativo Produtividade e Preço do Meio de Cultura.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância
CDA32 – Carbon Dot Krill A32
CDP – Carbon Dot Krill A32 dopado com Fósforo
CQD – Carbon Quantum Dots - Pontos Quânticos de Carbono
CS5 – Cepa de microalga *Dunaliella salina* da Embrapa Agroenergia
BG11 – Meio de cultura “Blue-Green Medium”
BG11- – Meio de cultura “Blue-Green Medium” sem micronutrientes
BG11/100 – Meio de cultura “Blue-Green Medium” diluído 100 vezes
BGNIM – Meio de cultura “Blue-Green Nitrogen Mix”
BGNIM- – Meio de cultura “Blue-Green Nitrogen Mix” sem micronutrientes
BGNIM/100 – Meio de cultura “Blue-Green Nitrogen Mix” diluído 100 vezes
J/L – Meio de cultura “Johnsons Modified Culture Medium”
LBA39 – Cepa de microalga *Chlorella sorokiniana* da Embrapa Agroenergia
NPK – Meio de cultura a base de fertilizante NPK
NPK+ – Meio de cultura a base de fertilizante NPK com micronutrientes
QD – Quantum Dots - Pontos Quânticos

RESUMO

Há vários esforços para tornar o cultivo de microalgas economicamente viável. Isso porque esses organismos são fontes de diversas biomoléculas de valor econômico, como lipídeos, proteínas e enzimas. Entretanto, há desafios na produção que dificultam a lucratividade da atividade. Alguns estudos indicam que tratamentos com pontos quânticos de carbono podem incrementar a produtividade e/ou a qualidade da biomassa microalgal produzida. Essa interação ainda é pouco estudada e pode gerar resultados interessantes e oferecer uma possível solução para gargalos industriais envolvendo possível baixa produtividade e a qualidade da biomassa. Além disso, meios de cultura mais baratos também podem contribuir para diminuir o custo da grama de biomassa microalgal. O estudo testou dois pontos quânticos de carbono e duas microalgas (*Chlorella sorokiniana* e *Dunaliella salina*) e não houve impacto na produtividade de biomassa, mas a adição de nanopartículas conseguiu um aumento de até 3 vezes na produção de pigmentos. Também foram propostos alguns meios de cultura alternativos, um deles a base do fertilizante NPK obteve biomassa e proteína cerca de 57% mais baratas em relação ao meio BG11.

Palavras-chave: Carbon Quantum Dots, Meios de Cultura, Microalgas, Biomassa.

ABSTRACT

There are several efforts to make the cultivation of microalgae economically viable. This is because these organisms are sources of various biomolecules with economic value, such as lipids, proteins, and enzymes. However, there are challenges in production that hinder the profitability of the activity. Some studies indicate that treatments with carbon quantum dots can enhance the productivity and/or quality of the produced microalgal biomass. This interaction is still not well studied and may yield interesting results, offering a potential solution to industrial bottlenecks related to low productivity and biomass quality. Additionally, cheaper culture medium can also help reduce the cost of microalgal biomass. The study tested two types of carbon quantum dots and two microalgae (*Chlorella sorokiniana* and *Dunaliella salina*), finding no impact on biomass productivity. However, the addition of nanoparticles achieved up to a threefold increase in pigment production. Some alternative culture medium were also proposed, one of which, based on NPK fertilizer, resulted in biomass and protein that were about 57% cheaper compared to the BG11 medium.

Keywords: Carbon Quantum Dots, Culture Medium, Microalgae, Biomass.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A emergência climática está relacionada com o grande consumo de combustíveis fósseis e de derivados de petróleo. O aumento das emissões de gases do efeito estufa, como o CO_2, acarreta o aumento da temperatura média global. No entanto, fontes de combustíveis não renováveis ainda ocupam uma grande fração da matriz energética global. Em 2019, carvão ocupava 27% de toda a energia utilizada, ainda mais agravante é que há um aumento de 1,3 % em demanda por carvão a cada ano (IEA, 2018, 2019). Dessa forma, é imperativa a pesquisa de novas fontes renováveis de energia e de matérias primas alternativas ao petróleo para a indústria química.

A biomassa algal podem ser uma das soluções para o problema, porque entre as vantagens, incluem-se: emissões de CO_2 praticamente neutralizadas pela fotossíntese algal, não há competição com terra arável para alimentos, microalgas ocupam menos espaço que outras culturas e água potável pode ser preservada ao utilizar na cultura água salgada ou residual (Brasil *et al.*, 2017).

Além de combustíveis, a pesquisa de microalgas para impactar áreas de tecnologia de alimentos, de nutrição animal, de biorremediação de efluentes, de materiais, farmacêutica e de cosméticos. As microalgas contêm uma grande variedade de metabólitos secundários, alguns de alto valor agregado, para as mais diversas aplicações, como lipídeos, carboidratos, pigmentos, antioxidantes, enzimas e proteínas. Sendo assim, estes micro-organismos podem ser utilizados como base para biorrefinarias e podem prover moléculas complexas sem a necessidade de procedimentos sintéticos ineficientes e dispendiosos de energia e de reagentes (Enzing *et al.*, 2014).

Apesar das vantagens, alguns gargalos precisam ser superados para que a produção comercial de microalgas seja economicamente viável. O cultivo, a colheita e o pós-tratamento de microalgas demandam muitos recursos financeiros. A literatura indica que o preço da biomassa algal varia entre 5 e 1 €/kg, mas para a viabilidade comercial, preços abaixo de 1 €/kg devem ser obtidos (Fernández; Sevilla; Grima, 2019).

Para a diminuição do custo da biomassa, aumentar a capacidade de produção e diminuir o preço dos nutrientes utilizados, há um número crescente de estudos que indicam que o uso de pontos quânticos de carbono, carbono quantum dots, pode melhorar a produção de microalgas (Zhang *et al.*, 2018), bem como o uso de meios de cultura que utilizem matérias-primas mais baratas (Ribeiro *et al.*, 2020).

O presente estudo almeja investigar o impacto do uso de pontos quânticos de carbono e de meios diferentes na produtividade de microalgas. A qualidade da biomassa produzida foi medida utilizando a produção de pigmentos e de proteína, já que ambos são substâncias de interesse no contexto de biorrefinarias

1.1. Objetivo Geral

Investigar os impactos na produtividade e na qualidade de biomassa de microalga pela aplicação de pontos quânticos de carbono e pelo desenvolvimento de meios de cultura alternativos mais acessíveis.

1.2. Objetivos específicos

a) Elaborar experimentos que investiguem o impacto da aplicação dos pontos quânticos de carbono em cultivos de microalgas e realizar a coleta da biomassa;
b) Desenvolver meios de menor custo, realizar experimentos para comparar com outros meios já estabelecidos e coletar a biomassa;
c) Análise de proteínas e de pigmentos das biomassas coletadas;
d) Realizar análises de produtividade e qualidade da biomassa com os dados coletados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microalgas

Microalgas podem ser encontradas em diferentes tamanhos que variam de 0.95 µm a 1000 µm, além disso vivem em colônias, cadeias ou individualmente, podem ser móveis, ao utilizar um flagelo, ou deslizam em superfícies. Os habitats são variados: oceanos, lagos, rios e termas (Hopes; Mock, 2015). Esses seres, como parte da comunidade de fitoplanctons, são a base da cadeia alimentar dos oceanos ao servirem de presa para zooplanctons, krills e outros organismos. Dessa forma, as microalgas impactam o fluxo de carbono dos oceanos ao fixar carbono inorgânico na forma de carbono orgânico dissolvido (Field, 1998). Na mesma medida da variação fenotípica das microalgas, há uma grande diversidade de metabolismo entre as espécies, então a viabilidade de determinada cepa depende do conhecimento da atividade biológica de cada célula.

As microalgas são uma fonte muito interessante de biomassa, que é material produzido pelos seres vivos por meio de seu metabolismo, esse recurso é renovável e pode ser utilizado em diversas cadeias produtivas: energia, alimentos, farmacêuticos, entre outros (Okeke *et al*. 2022). Nos últimos anos, houve um crescente interesse pelas microalgas, ainda mais em um contexto de biorrefinaria. Este conceito trata da conversão da biomassa coletada desses micro-organismos em outros produtos de interesse a indústria, chamados de bioprodutos. As biorrefinarias são importantes para avançar a discussão para uma bioeconomia, em que os meios para obtenção de energia, materiais e químicos são de fontes renováveis e biológicas (Saral; Ajmal; Ranganathan, 2022). As pesquisas com os termos “microalgae” e “biorefinery” estão em constante expansão na literatura, como indicado na Figura 1.

As microalgas são uma boa alternativa para produção de biomassa pois: não competem com a áreas de terra agricultável para produção de alimentos; águas residuais podem ser utilizadas para a cultura; fixam gases do efeito estufa como o CO_2 por meio da fotossíntese e são uma fonte de lipídeos, proteínas, carboidratos, enzimas e pigmentos (Yen *et al.*, 2013). Em especial, os carotenoides são produtos

de alto valor agregado, estima-se que podem representar um mercado global de 1168 milhões de dólares até 2026. Os pigmentos e as proteínas podem ser úteis para a indústria alimentícia, tanto para suplementos nutricionais humanos como para alimentação animal (Kuo *et al.* 2021).

Entretanto, alguns gargalos na produção dificultam tornar a cultura lucrativa e competitiva. Estimativas indicam que o custo de biomassa pode variar de 5 €/kg até 50 €/kg, sendo que para algumas iniciativas produtivas o custo deveria estar mais próximo de 1 €/kg. Os principais custos estão na fase de cultivo e de colheita, representando juntos 50-65% do gasto para produção, só o custo de matéria prima pode figurar entre 25-40% (Fernández; Sevilla; Grima, 2019; Chen *et al.*, 2018). Como esse custo de materiais não é desprezível, há uma busca por meios de cultura que sejam mais baratos e mais acessíveis.

Há diferentes receitas para meios para a cultura de microalga, a literatura indica que os principais componentes de um meio devem ser: concentração de sal de acordo com a origem da microalga, composição de componentes iônicos majoritários (K^+, Mg^{2+}, Na^+, Ca^{2+}, SO_4^{2-} e Cl^-), fontes de nitrogênio (NO_3^-, NH_4^+ e ureia), fontes de carbono (CO_2, HCO_3^-), pH compatível, elementos traço com algum agente quelante (EDTA) e vitaminas. Esses fatores podem se alterar um pouco a depender do intuito do cultivo, estressando ou não os organismos com excesso ou falta de algum nutriente (Grobbelaar, 2013). Ribeiro *et al.* (2020) desenvolveram o meio BGNIM com insumos agrícolas que teve produtividade semelhante ao meio BG11 com uma diminuição de custo de 95%.

Assim, novas tecnologias que procurem maximizar a produtividade das microalgas ou diminuir os custos de produção estão em constante desenvolvimento e pesquisa para contribuir com uma economia mais renovável.

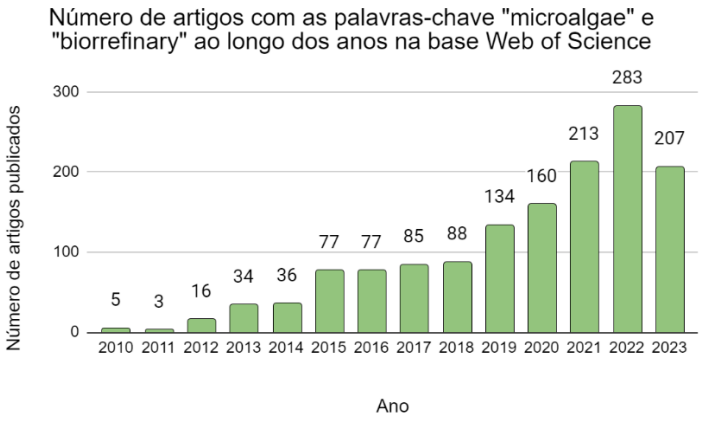
Esses organismos crescem sob diferentes fontes de energia e de carbono, em razão de mudanças no ambiente, podem mudar seu metabolismo. Este pode ser encaixado em quatro categorias. A primeira é fotoautotrófica em que a luz é única fonte exógena de energia e o carbono inorgânico do CO_2 é utilizado, juntamente com a água, para o crescimento na atividade fotossintética (Grobbelaar, 2007). A segunda é a heterotrófica, em que as microalgas são capazes de crescer na ausência de luz, ao utilizar compostos orgânicos como fonte de energia e substrato para o seu crescimento (Endo; Hosoya; Koibuchi, 1977). A terceira, fotoheterotrófica, ocorre quando microalgas utilizam exclusivamente carbono orgânico como fonte de carbono,

mas o ATP, adenosina trifosfato, usado na ação metabólica provém da transferência de elétrons do fotossistema 1, que utiliza luz como fonte de energia (Zhang; Zhang; Chen, 1998). O último, no regime mixotrófico, as CO_2 e fontes orgânicas de carbono são utilizadas simultaneamente, o metabolismo respiratório e o fotossintético operam simultaneamente (Lee Y. K., 2004).

Em cultivos fotoautotróficos e/ou mixotróficos, microalgas requerem luz para a realização da fotossíntese. A luz é uma radiação eletromagnética, o espectro visível da luz varia do violeta (380 nm) ao vermelho profundo (750 nm), essa faixa também é a utilizada na fotossíntese, também chamada de radiação fotossinteticamente ativa (Pattanaik; Behari; Pradhan, 2018). Para coleta da luz, as microalgas possuem diferentes pigmentos, a Clorofila A é a principal molécula responsável em absorver a energia dos fótons e transferi-la para os complexos coletores de luz (Masojídek; Torzillo; Koblízek, 2013). Clorofilas B, C e carotenoides são pigmentos acessórios que absorvem outros comprimentos de onda e o excesso de luz, o que aprimora a coleta de luz e protege a integridade da clorofila A (Carvalho *et al.*, 2011). As Clorofilas possuem dois principais picos de absorção, entre 450 e 475 nm e entre 630 e 675 nm, enquanto o pico dos carotenoides está entre 400 e 550 nm (Carvalho *et al.*, 2011 Masojídek; Torzillo; Koblízek, 2013).

Uma abordagem que tem sido utilizada para aumentar a produtividade ou qualidade da biomassa coletada de microalgas, é o uso de nanopartículas de carbono conhecidas como Carbon Quantum Dots, que serão exploradas na próxima seção.

Figura 1: Número de artigos publicados sobre microalgas e biorrefinaria ao longo dos anos



2.2. Pontos Quânticos e Microalgas

Pontos Quânticos

Pontos quânticos (QDs) são uma classe de materiais que agrupam de centenas a milhares de átomos em um pequeno aglomerado, formando particulados com dimensões de aproximadamente dezenas de nanômetros. Pelo pequeno tamanho das partículas, o fenômeno do confinamento quântico ocorre, propriedades óticas e elétricas únicas surgem causadas pela compressão de energias de transição ligeiramente diferentes em uma banda de transição forte. Originalmente, esses QDs eram feitos com semicondutores de diferentes elementos metálicos, chamados de pontos quânticos de metais (Alivisatos, 1996). Xu e colaboradores ao tentar purificar nanotubos de carbono por eletroforese descobriram novas nanopartículas fluorescentes de carbono (Xu *et al.*, 2004). Esse novo material foi chamado de ponto quântico de carbono (CQD), dado os tamanhos na ordem dos nanômetros.

Suas características de fluorescência são relacionadas a transições de banda de domínios π conjugados e defeitos de superfície que retem essa energia. CQDs podem ser produzidos a partir de uma variedade de materiais orgânicos de partida, como proteínas, ácidos orgânicos e carboidratos. Os tratamentos utilizados para a produção também são muito variáveis, na literatura, utilizam-se processos hidrotérmicos, ultrassônicos e eletroquímicos. A depender dos materiais de partida e dos processos de produção, as partículas poderão ter grupos funcionais de superfície distintos que ocasionarão características de fluorescência diferentes. Com essas propriedades óticas únicas dados os efeitos quânticos das pequenas partículas, CQDs são aplicados em diversas áreas, como sensores, catalisadores, placas fotovoltaicas, imageamento celular entre outros (Lim; Shen; Gao, 2015).

Pontos Quânticos e Plantas

Com a crescente necessidade de produção de alimentos para a população global, tecnologias para aumentar a produtividade no campo estão em constante desenvolvimento. Nesse aspecto, tentar aumentar a atividade fotossintética dos vegetais era uma possibilidade para incremento pouco pesquisada. Alguns pesquisadores tentaram utilizar pontos quânticos de metais como antenas de radiação

fotossinteticamente ativa, em que os pontos quânticos seriam responsáveis por captar comprimentos de onda não utilizados e transformá-los para úteis por meio da fluorescência. Entretanto, pontos quânticos de metais podem ser tóxicos e de difícil degradação, os mais comuns são compostos de Cádmio e Selênio (Kang et al., 2008).

Estudos então foram feitos com CQDs dada a toxidade mais baixa e características óticas semelhantes. Resultados promissores foram encontrados, plantas tratadas com CQDs tiveram uma maior atividade fotossintética e resistência a estresse, com um aumento na produção de enzimas antioxidantes. Não só isso, mas as plantas tratadas também tiveram uma maior resistência a doenças bacterianas. Além de que a funcionalização da superfície dos CQDs pode ser utilizada para adsorver nutrientes, pesticidas, hormônios, entre outros (Li *et al.*, 2008).

Rodrigues *et al.* (2023) conseguiram desenvolver uma nanopartícula com resultados expressivos no estímulo a fotossíntese, obtendo aumento no crescimento de caules, raízes e plantas. Essa nanopartícula é a Krill A32 e será utilizada neste trabalho.

Pontos Quânticos e Microalgas

Na medida em que QDs ficaram mais populares, preocupações com a toxicidade desses materiais em ecossistemas marinhos cresceu, assim, inicialmente a interação dos QDs com as microalgas foi investigada por artigos de toxicologia (Brayner *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009). Depois alguns estudos encontraram que pode haver um tipo de interação benéfica entre os nanomateriais e esses microrganismos. Apesar dessa interação não ter sido completamente elucidada, fontes da literatura sugerem dois mecanismos distintos: uma interação fótica ou uma interação metabólica.

Na fótica, os benefícios dos CQDs são originados pela conversão de luz fotossinteticamente inativa para ativa por meio da fluorescência desses nanomateriais, o que aprimora a coleta de luz das microalgas e aumenta a atividade fotossintética (assim como o estudado com plantas). Isso foi sugerido em trabalhos como Choi *et al.*, 2020; e Xue *et al.*, 2020.

Aferir se as nanopartículas são internalizadas ou não pelas células é importante para testar essa hipótese, já que em plantas a melhora no crescimento está relacionada com CQDs internalizados nas células (Loukanov *et al.*, 2018; Wang *et al.*,

2018). Além disso, foi relatado na literatura que cloroplastos isolados tiveram um aumento significante da fotossíntese quando CQDs foram aderidos a sua superfície (Chandra *et al.*, 2014).

Já a interação metabólica ocorre pela degradação dos CQDs, o carbono inorgânico gerado próximo a microalga facilita a captura do CO_2 o que aumenta a atividade fotossintética. Isso é sugerido por Zhang et al., 2018. Para aferir essa hipótese, CQDs foram degradados com uma enzima de peroxidase importante, peroxidase de rábano (HRP), o produto dessa degradação foi CO_2 verificado por cromatografia gasosa. Como a atividade das peroxidases das microalgas aumentou com a presença dos CQDs, foi proposto que a microalga *Chlorella vulgaris* degradava os CQDs e utilizava o CO_2 produzido na fotossíntese.

Com esses dois mecanismos em mente e as experiências da literatura, é possível escolher CQDs com as melhores características para melhorar a performance da cultura microalgal. A solubilidade em água é extremamente importante, já que os CQDs precisam entrar em contato com as microalgas (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, a concentração dos CQDs deve ser tal que não há impactos tóxicos nesses microorganismos, como o aumento de espécies reativas de oxigênio, ao mesmo tempo, os produtos da degradação devem ser úteis ao metabolismo, como o CO_2 (Zhang *et al.*, 2018). Alguns trabalhos inclusive colocam pequenas quantidades de algum elemento nas nanopartículas para causar pequenas deformações ou grupos funcionais, isso é chamado de dopagem. Ghosh *et al.*, 2017, utilizou CQDs dopados com nitrogênio e obteve aumento na quantidade produzida de Astaxantina para a microalga *Haematococcus pluvialis*.

Vale ressaltar que a escolha da espécie de microalga utilizada impacta drasticamente nos resultados, Morelli *et al.*, 2013 comparou a diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum* e a alga verde *Dunaliella tertiolecta.* Enquanto a diatomácea foi sensível a QDs de CdSe/ZnS com uma queda drástica na taxa de crescimento, a alga verde obteve um aumento de taxa de crescimento ou nenhum efeito adverso. Além disso, é necessário que a emissão de fluorescência dos CQDs esteja dentro da radiação fotossinteticamente ativa (Xue *et al.*, 2020), a conversão de radiação ultravioleta (UV) para azul 450 nm é benéfica já que a radiação UV pode danificar a viabilidade celular (Rak *et al.*, 2015).

O presente estudo tem como objetivo encontrar soluções na composição de meios de cultura com ou sem aditivos que possam incrementar a produtividade ou

qualidade de biomassa. Isso foi feito com a testagem de meios mais baratos e pela adição de CQDs no meio de cultura.

Para a avaliação dos CQDs, foi escolhido o CQD Krill A32 desenvolvido pela empresa Krilltech em parceria com a Universidade de Brasília e a Embrapa, um protótipo do Krill A32 com dopagem de fósforo (CDP) também foi testado. Foram utilizadas duas microalgas diferentes, com a intenção de serem modelos distintos. A *Chlorella sorokiniana* é um organismo de água doce que tem parede celular. Já a *Dunaliella salina* é um micro-organismo de água salgada, sem parede celular e flagelado. (Guiry; Guiry, 2024). Já para os meios de cultura alternativos, foram só estudados usando como modelo a *Chlorella sorokiniana.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

O CQD utilizado será o Krill A32 (CDA32) e o Krill A32 dopado com Fósforo (CDP), material produzido pela empresa Krilltech em parceria com o Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA) do Instituto de Química da Universidade de Brasília.

A microalga utilizada será a cepa LBA39 da espécie *Chlorella sorokiniana* da coleção “Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias – CMMAABio da Embrapa Agroenergia. Essa cepa de microalga é geralmente a espécie mais utilizada em estudos já realizados nesse laboratório (RIBEIRO et al., 2020). Também foi usada a cepa CS5 da espécie *Dunaliela salina* como modelo de uma microalga salina.

Os meios utilizados foram preparados com os reagentes e concentrações conforme a Tabela 1.

3.2. Experimentos de cultivo

Preparo dos Pré-Inóculos

O preparo do pré-inóculo da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa (LBA39) foi feito em condições estéreis, uma colônia isolada da microalga foi adicionada a um reator de 2 L com meio BG11, que cresceu durante 14 dias com um fotoperíodo de 12:12h e aeração de ar em um fluxo de 4 L/min antes de ser adicionada aos experimentos. O pré-inóculo da microalga *Dunaliella salina* (CS5) foi feito com o mesmo protocolo utilizando o meio de cultura J/L.

Cultivo CS5 e CDA32 - Inicial

Para o experimento de teste inicial, aproximadamente 500 mL do inóculo da microalga CS5 em 7,5 L de meio J/L, que foram distribuídos para 15 reatores de 500 mL, resultando em um volume de 500 mL por reator, em triplicata. Os tratamentos foram feitos nas concentrações de CDA32 500 ng/L e 500 µg/L, com uma aplicação para o cultivo todo, ou em três aplicações semanais. cultivos foram conduzidos sob aeração de 2 L/min de ar com fotoperíodo de 12:12h, durante 21 dias.

Tabela 1: Composição dos diferentes meios de cultura estudados. O asterisco (*) indica reagentes utilizados a partir de insumos agrícolas, os outros reagentes são analíticos grau P.A.

		J/L (mg/L)	BG11 (mg/L)	BG11 – (mg/L)	BG11/100 (µg/L)	BGNIM (mg/L)	BGNIM – (mg/L)	BGNIM/100 (µg/L)	NPK (mg/L)	NPK + (mg/L)
Nitrato de Sódio	$NaNO_3$	–	1500	1500	15000	–	–	–	–	–
Nitrato de Potássio	KNO_3	1000	–	–	–	–	–	–	–	–
Ureia*	CH_4N_2O	-	–	–	–	510	510	5100	–	–
Cloreto de Sódio	NaCl	35000	–	–	–	–	–	–	–	–
Fosfato Monopotássico	KH_2PO_4	35	40	40	400	–	–	–	–	–
Fosfato Monoamônico*	$NH_4H_2PO_4$	–	–	–	–	35	35	350	–	–
Sulfato De Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	500	75	75	750	–	–	–	–	–
Sulfato De Magnésio Heptahidratado*	MgSO4·7H2O	–	–	–	–	75	75	750	–	–
Cloreto De Cálcio Dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	200	36	36	360	–	–	–	–	–
Nitrato De Cálcio*	$Ca(NO_3)_2$	–	–	–	–	40	40	400	–	–
Carbonato De Sódio	Na_2CO_3	–	20	20	200	–	–	–	–	–
Bicarbonato De Sódio	$NaHCO_3$	43	–	–	–	–	–	–	–	–
Cloreto De Potássio	KCl	200	–	–	–	–	–	–	–	–
NPK 10-10-10*		–	–	–	–	–	–	–	250	250
EDTA Dissódico	EDTA Na_2	0,0189	1	–	10	–	–	–	–	–
Nitrato de Cobalto (II) Hexahidratado	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	–	0,05	–	0,5	–	–	–	–	–
Cloreto de Cobalto (II) Hexahidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,00051	0,05	–	0,5	–	–	–	–	–
Molibdato de Sódio Dihidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	–	0,39	–	3,9	–	–	–	–	–
Molibdato de Amônio Tetrahidratado	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,0038	–	–	–	–	–	–	–	–
Ácido Bórico	H_3BO_3	0,006	2,86	–	28,6	–	–	–	–	–
Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado	CuSO4.5H2O	0,0006	0,08	–	0,8	–	–	–	–	–
Cloreto de Manganês Tetrahidratado	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,0004	1,81	–	18,1	–	–	–	–	–
Sulfato de Zinco Hexahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	–	0,22	–	2,2	–	–	–	–	–
Cloreto de Zinco	ZnCl	0,0004	–	–	–	–	–	–	–	–
Citrato Férrico amoniacal	$C_6H_8FeNO_7$	–	6	–	60	–	–	–	–	–
Cloreto de Ferro (III) hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,024	–	–	–	–	–	–	–	–
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	–	6	–	60	–	–	–	–	–
Rexolin CXK*		–	–	–	–	100	–	1000	–	100

Cultivo CS5 e CDA32 – Varredura 1x

Para o experimento de varredura de concentrações com uma aplicação, foi adicionado aproximadamente 1 L de inóculo da microalga CS5 em 14 L de meio J/L, que foi depois distribuído em 15 reatores, resultando em um volume de 1 L por reator, os tratamentos foram feitos com as concentrações de CDA32: 100 µg/L; 500 µg/L; 1 mg/L e 10 mg/L. cultivos foram conduzidos sob sob aeração de 2 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, durante 21 dias.

Cultivo LBA39 e CDA32 - Inicial

Para o experimento de teste inicial, aproximadamente 500 mL do inóculo da microalga LBA39 em 7 L de meio BG11, que foram distribuídos para 15 reatores de 500 mL, resultando em um volume de 500 mL por reator, em triplicata. Neste experimento, os tratamentos corresponderam às concentrações de CDA32 500 ng/L e 500 µg/L, com uma aplicação para o cultivo todo ou em três aplicações semanais. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 2 L/min de ar, com um fotoperíodo de 12:12h, durante 21 dias.

Cultivo LBA39 e CDA32 – Varredura 1x

Para o experimento de varredura de concentrações com uma aplicação, foram adicionados aproximadamente 2 L de inóculo da microalga LBA39 em 34 L de meio BG11, que foi depois distribuído em 24 reatores, resultando em um volume de 1,5 L por reator, em triplicata. Foram escolhidas para os cultivos as concentrações de CDA32: 500 ng/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L; 500 µg/L; 1 mg/L e 10 mg/L. Os cultivos foram conduzidos sob sob a aeração de 4 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, durante 21 dias.

Cultivo LBA39 e CDA32 – Validação 1x

Para o experimento de validação, foram adicionados aproximadamente 2 L de inóculo da microalga LBA39 em 22 L de meio BG11, que foi depois distribuído em 12 reatores, resultando em um volume de 2 L por reator, em quadruplicata. Foram

avaliadas as concentrações de CDA32: 10 µg/L e 100 µg/L. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 4 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, durante 19 dias.

Cultivo LBA39 e CDA32 – Varredura 3x

Para o experimento de varredura de concentrações com uma reaplicação, foram adicionados aproximadamente 4 L de inóculo da microalga LBA39 em 44 L de meio BG11, que foi depois distribuído em 24 reatores, resultando em um volume de 2 L por reator. O experimento foi conduzido em triplicata. Foram avaliadas as concentrações de CDA32: 250 ng/L; 500 ng/L; 750 ng/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L e 500 µg/L. Os cultivos foram conduzidos sob sob a aeração de 4 L/min de ar e, sob fotoperíodo de 12:12h. Nos dias 7 e 14 do cultivo, uma dose igual a inicial foi aplicada aos reatores. Os cultivos foram conduzidos por 21 dias.

Cultivo LBA 39 e CDP – Varredura

Foram testadas diferentes concentrações do Carbon Dot Krill A32 dopado com Fósforo (CDP). Foram adicionados aproximadamente 2 L de inóculo da microalga LBA#39 em 28 L de meio BG11, que foi depois distribuído em 15 reatores, resultando em um volume de 2 L por reator, em triplicata. Foram avaliadas as concentrações de CDP: 10 µg/L; 100 µg/L; 500 µg/L e 1 mg/L. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 4 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, por 21 dias.

Ensaio de Meios I

Foram testados diferentes meios de cultura, em quadruplicata. Os meios avaliados foram: BG11, BG11-, BG11/100, BGNIM, BGNIM-, BGNIM/100, NPK e NPK+. Para cada meio de cultura foram preparados aproximadamente 4 L, aos quais foram adicionados 40 mL de inóculo da microalga LBA39. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 2 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, por 21 dias.

Ensaio de Meios II

Foram testados diferentes meios de cultura, em quadruplicata. Os meios avaliados foram: BG11, BG11-, BG11/100, BGNIM, BGNIM-, BGNIM/100, NPK, NPK+

e Residual (apenas água destilada). Para cada meio de cultura foram preparados aproximadamente 4 L, aos quais foram adicionados 10 mL de inóculo da microalga LBA39. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 2 L/min de ar, fotoperíodo de 12:12h por 21 dias.

Ensaio de Meios III

Foram testados diferentes meios de cultura, em triplicata. Os meios avaliados foram: BG11, BG11-, BGNIM, BGNIM-, NPK e NPK+. Para cada meio de cultura foram preparados aproximadamente 6 L, aos quais foram adicionados 100 mL de inóculo da microalga LBA39. Os cultivos foram conduzidos sob aeração de 4 L/min de ar, com fotoperíodo de 12:12h, por 15 dias.

3.3. Monitoramento do Cultivo e Colheita de Biomassa

Monitoramento do Cultivo

Os cultivos foram monitorados com amostragens de 200 µL de cada meio, os quais foram transferidos para placa de 96 poços, posteriormente analisada em espectrofotômetro UV/Vis SpectraMax M3 da marca Molecular Devices. A absorbância foi medida de 350 nm a 750 nm. Medidas de pH e condutividade foram feitas em pHmetro e condutívimetro marca Hanna.

Colheita de Biomassa

Ao final de cada cultivo, a colheita foi realizada por centrifugação a 9.000 g por 5 minutos, seguida de liofilização para obtenção da biomassa seca, que foi pesada para obter os dados de produtividade.

3.4. Análise de Biomassa

Análise de Proteínas

A análise de proteínas foi feita com os dados de teor de nitrogênio obtidos em analisador elementar Perkin Elmer CHNS/O modelo PE2400. Os dados dos teores de nitrogênio encontrados foram multiplicados pelo valor de 4,78 conforme procedimento de laboratório analítico do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) de 2013.

Análise de Pigmentos

Os pigmentos foram analisados conforme procedimento de laboratório analítico do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) de 2022. Um total de 30 mg de biomassa liofilizada foram macerados com 5 µL de beads de zircônia de 1.4 mm em 400 µL de tampão fosfato de sódio e potássio (1 mol/L) durante 5 minutos. 200 µL do sobrenadante foram diluídos em 800 µL de acetona, com posterior agitação no escuro por 15 minutos e subsequentes centrifugação a 9000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado para análise em HPLC. Dados do equipamento: Coluna: HSS-T3 150x2.1mm 1.8 µm com pré-coluna da Waters, forno da coluna: 40 °C. Detecção: 450 nm para Luteína, 460 nm para clorofila B, 430 nm para clorofila A. Fase A : Acetato de Amônio 10 mM. Fase B: Acetronitrila/Metanol/Éter Metil-Terc-Butílico (70/20/10). Gradiente: Inicial = 25% Fase A e 75% Fase B, 10 a 16 min = 100% Fase B, 20 min = 25% Fase A e 75% Fase B. Fluxo: 0 a 13,5 min = 0,500 mL/min, 13,50 a 16 min = 0,700 mL/min, 16 a 20 min = 0,500 mL/min.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas no programa IBM SPSS 6. Para diferença das médias foi feita Análise de Variância (ANOVA) com 5% de significância, com teste *post-hoc* de Tukey com também 5% de significância. Caso as amostras não fossem homogêneas, foi feito ANOVA com correção de Welch e teste *post-hoc* de Games-Howell com os mesmos 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram conduzidos experimentos em duas linhas principais:

- A interação entre microalgas e CQDs;
- Investigação de novos meios de cultivo com foco em identificar meios de menor custo com potencial para suplementação com CQDs em estudos futuros.

Isso foi feito tanto pela avaliação da produtividade de biomassa, como pela qualidade dessa biomassa obtida. Os resultados da pesquisa em cada uma dessas linhas são discutidos nas próximas duas sessões.

4.1. Interação Microalga e CQDs

Uma das principais motivações para o estudo era avaliar os impactos tanto na produtividade quanto na qualidade de biomassa das microalgas cultivadas com CQDs. Assim, foram desenhados diferentes experimentos com a intenção de verificar efeitos de diferentes CQDs. Com base em resultados anteriores (Limberger *et al.*, 2020), verificou-se que os CQDs podem degradar consideravelmente no tempo de uma semana. Por esta razão, foi necessário testar com uma aplicação (representado como 1x) e com três aplicações (representado como 3x) ao longo do cultivo. A produtividade da biomassa foi avaliada pela absorbância do cultivo em diferentes comprimentos de onda, bem como pela massa de biomassa seca colhida.

Os experimentos tiveram três focos principais de interação, de maneira a avaliar duas microalgas distintas e dois CQDs distintos:

- Microalga CS5 e Carbon Dot Krill A32;
- Microalga LBA39 e Carbon Dot Krill A32;
- Microalga LBA39 e Carbon Dot Krill A32 dopado com fósforo.

Cultivo microalga CS5 e Carbon Dot Krill A32

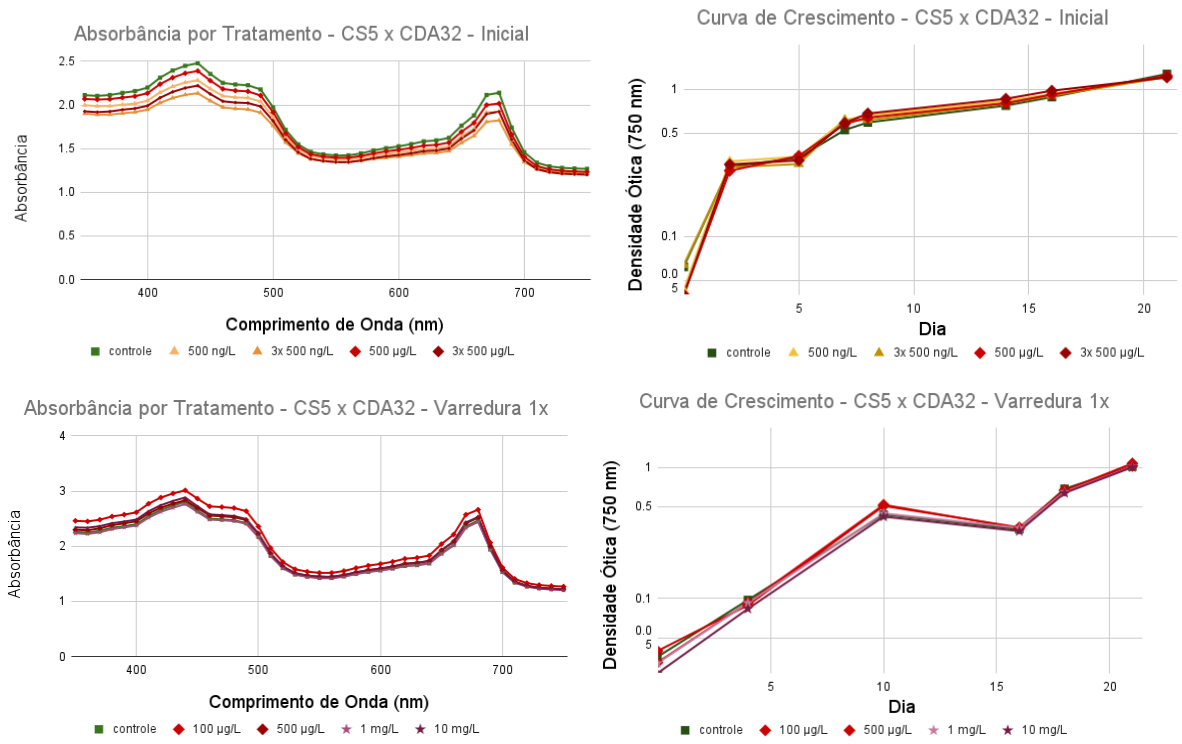
Para analisar a interação entre a microalga CS5 e o CQD CDA32, inicialmente foi feito um experimento para avaliação da comparação entre uma aplicação só (x1) e

três aplicações (x3) em duas faixas de concentração, nanogramas por litro (ng/L) e microgramas por litro (µg/L) em reatores de 500 mL.

A curva de crescimento e a absorbância no dia de colheita apresentadas na Figura 2 não indicaram diferenças claras entre os tratamentos e o controle. Inclusive, o controle teve uma maior absorbância em relação aos tratamentos. Em relação a massa seca foram feitos testes estatísticos. O teste de Levene para homogeneidade das variâncias em relação a mediana ($p = 0,479 > 0,05$), o que permitiu realizar a Análise de Variância (ANOVA). O resultado indicou que as diferenças obtidas entre as médias dos tratamentos não são estatisticamente significativas ($p = 0,124 > 0,05$).

A análise do diagrama de caixa, Figura 3, das massas secas desse experimento inicial indica que alguns tratamentos poderiam ter um desempenho melhor, como 3x 500 µg/L e 500 µg/L. Para sanar essa dúvida, optou-se por fazer um experimento com uma varredura de concentrações com uma aplicação (x1) na faixa de µg/L e mg/L em reatores de 1 L.

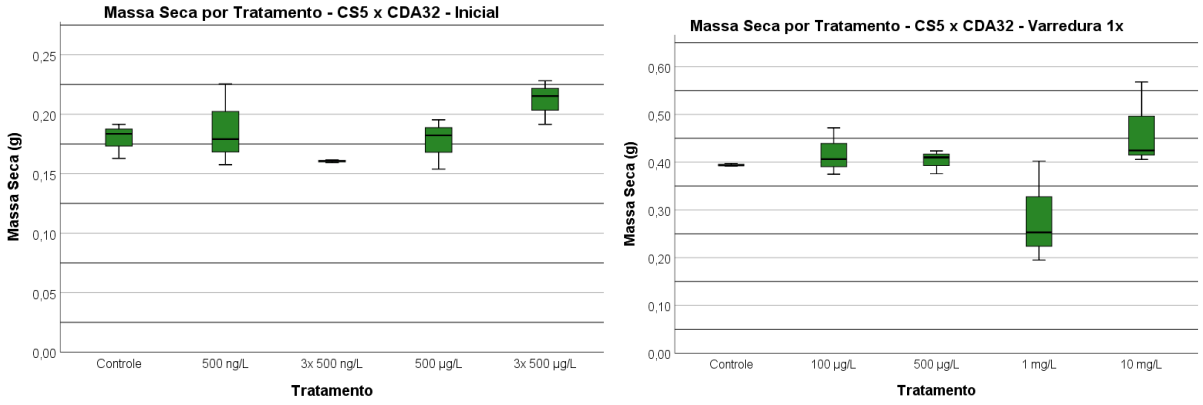
Figura 2: Absorbância por Tratamento no dia da colheita e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) para o experimento inicial e de Varredura 1x da CS5 e do CDA32



Nesse experimento, da mesma forma que o anterior, não houve diferenças visíveis (Figura 2) entre as absorbâncias dos diferentes tratamentos, tanto na curva

de crescimento como na absorbância em vários comprimentos de onda. Para a massa seca, o teste de Levene permitiu realizar a ANOVA (p = 0,523 > 0,05), que indicou que as médias dos tratamentos são estatisticamente iguais (p = 0,071 > 0,05). Na Figura 3 que não há uma indicação clara relação entre dose e resposta. Assim, optou-se por não realizar mais experimentos com a microalga CS5, concluindo-se que o uso do CDA32 resulta em um impacto neutro na produtividade da microalga CS5.

Figura 3: Diagrama de caixa da biomassa seca do experimento Inicial e de Varredura 1x da CS5 e do CDA32.



Cultivo microalga LBA 39 e Carbon Dot Krill A32

Da mesma forma que nos testes com a microalga CS5, os testes de interação da microalga LBA39 e o CDA32 se iniciaram com uma avaliação entre uma aplicação (1x) e três aplicações (3x) em duas faixas de concentração diferentes ng/L e µg/L usando reatores de 500 mL.

A curva de crescimento, na Figura 4, apresenta uma grande sobreposição entre as curvas dos diferentes tratamentos. Já em relação à biomassa seca da Figura 5, o teste de Levene em relação as medianas (p = 0,764 > 0,05) permitiu realizar a ANOVA, que indicou que as médias eram iguais (p = 0,061 > 0,05). Como a diferença na porcentagem era pequena e análise visual indicava que os tratamentos tiveram médias maiores em relação ao controle, optou-se por testar tanto a interação LBA39 e CDA32 tanto com uma aplicação só como com três aplicações.

Figura 4: Curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) para o experimento inicial da LBA39 e do CDA32

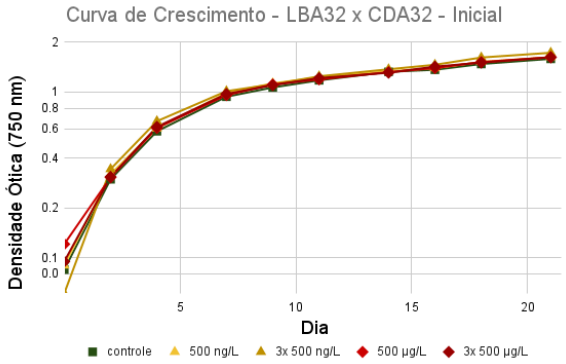
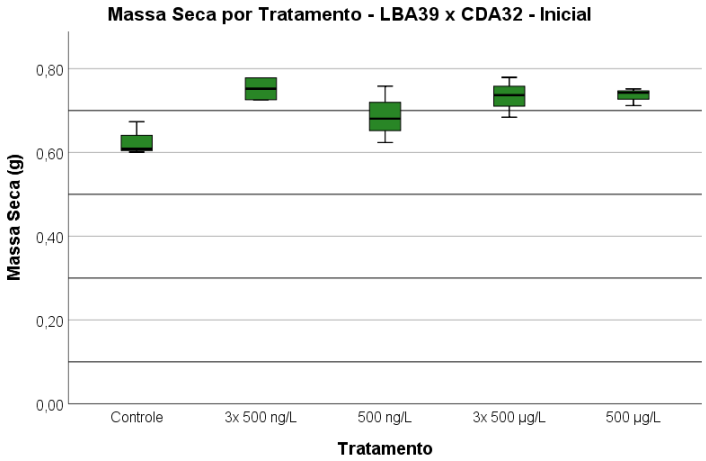


Figura 5: Diagrama de caixa da biomassa seca do experimento Inicial da LBA39 e do CDA32



Os experimentos com uma aplicação (1x) se iniciaram com uma varredura de concentrações nas faixas de ng/L, µg/L e mg/L utilizando volumes de 1,5 L. As curvas de crescimento da Figura 6 não apresentaram diferenças nítida entre os tratamentos. Já nas de absorbância, o tratamento de 100 µg/L esteve acima das demais, enquanto o tratamento de 500 ng/L, ligeiramente abaixo das demais. Para as biomassas secas coletadas, foi realizado o teste de Levene ($p = 0,88 > 0,05$) que permitiu realizar a ANOVA, que indicou que as médias não são estatisticamente diferentes ($p = 0,171 > 0,05$).

Os rendimentos finais das biomassas observados na Figura 7 indicaram que os tratamentos de 10 µg/L e de 100 µg/L tenham resultado em produtividade maior que os demais. Por esta razão, foi realizado um experimento de validação com apenas as duas condições, em reatores de 2 L e em quadruplicata. Tanto o gráfico de absorbância como o de crescimento apresentaram uma grande sobreposição entre os

tratamentos (Figura 6). O teste de Levene indicou que as amostras não são homogêneas (p = 0,007 < 0,05) então foi feita uma ANOVA com correção de Welch que indicou que as médias não são estatisticamente diferentes (p = 0,602 > 0,05), fato esse visível no diagrama de caixa da Figura 7. Concluiu-se que o CDA32 não impacta a produtividade de biomassa da microalga LBA32 com uma aplicação (1x).

Figura 6: Absorbância por Tratamento no dia da colheita e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) para o experimento de Varredura 1x e de Validação 1x da LBA39 e do CDA32

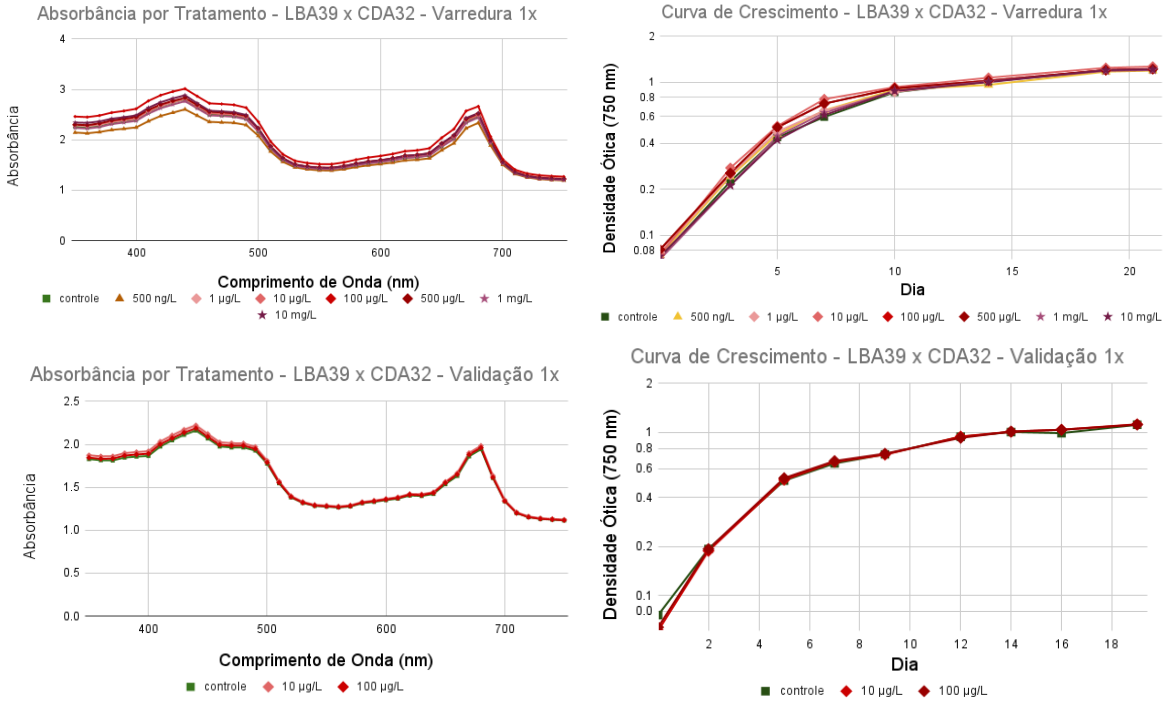
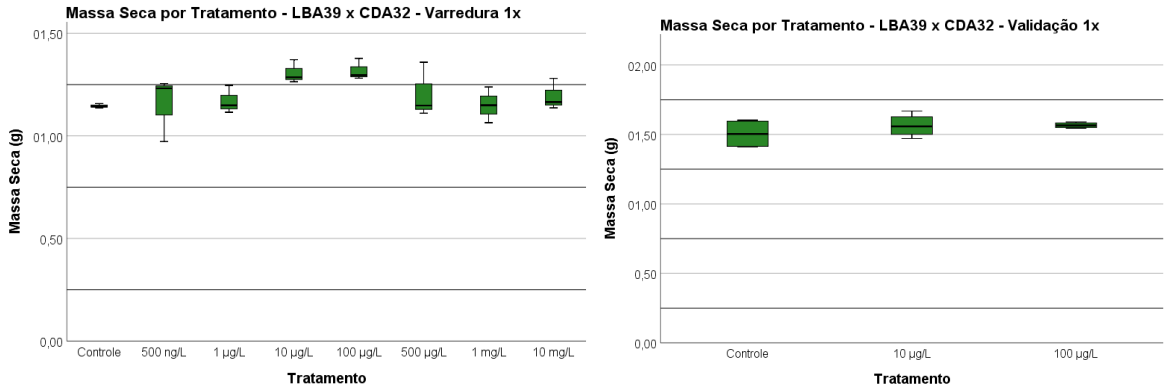


Figura 7: Diagrama de caixa da biomassa seca do experimento de Varredura 1x e de Validação 1x da LBA39 e do CDA32



Foi conduzido um experimento para avaliar a interação da microalga LBA39 com três aplicações (3x) do CDA32. Esse experimento focou na faixa de concentração de ng/L, já que foi a de maior destaque no experimento inicial. Foram ainda incluídos tratamentos também nas concentrações de µg/L, utilizando volumes de 2 L de cultivo.

A absorbância por tratamento e a curva de crescimento (Figura 8) não apresentaram condições que se destaquem significativamente de outras. Já no rendimento da biomassa seca (Figura 9), o teste de Levene (p = 0,387 > 0,05) permitiu realizar a ANOVA, que indicou que as médias são iguais (p = 0,632 > 0,05). Dessa forma, concluiu-se que não há impacto na produtividade de biomassa da microalga LBA32 ao ser exposta ao tratamento com três aplicações de CDA32.

Figura 8: Absorbância por Tratamento no dia da colheita e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) para o experimento de Varredura 3x da LBA39 e do CDA32

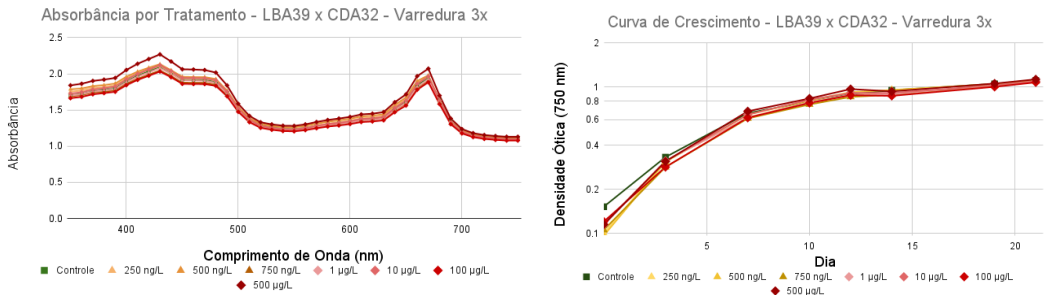
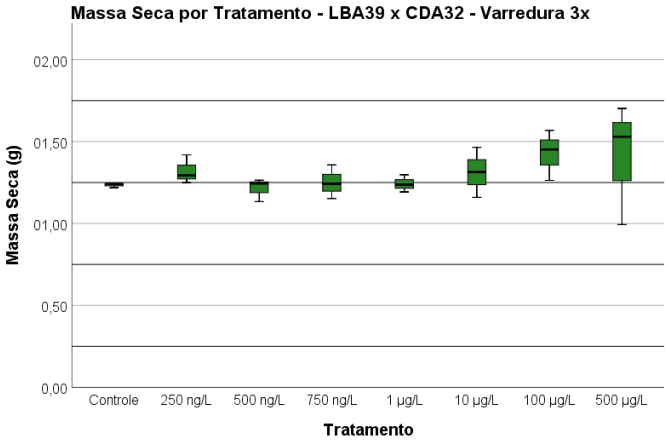


Figura 9: Diagrama de caixa da biomassa seca do experimento de Varredura 3x da LBA39 e do CDA32



Cultivo microalga LBA 39 e Carbon Dot Krill A32 dopado Fósforo

A avaliação da interação entre a microalga LBA 39 e o CQD Krill A32 dopado com Fósforo (CDP) foi realizada por meio de um experimento de varredura com diferentes concentrações de CDP com apenas uma aplicação (1x) em reatores de 2 L. As concentrações escolhidas foram da faixa de µg/L, por ter sido a faixa mais estudada para o CDA32 com uma aplicação. Foi possível observar visível diferença entre os tratamentos, conforme mostram as curvas de absorbância e de crescimento (Figura 10), enquanto no controle verificou-se maior absorbância, similar à observada nos tratamentos de 100 µg/L e 1 mg/L. Já nas biomassas secas (Figura 11), o comportamento foi parecido, o controle teve a média quantitativamente maior. Na análise estatística, o teste de Levene ($p = 0,902 > 0,05$) permitiu realizar a ANOVA, que indicou que as médias são iguais ($p = 0,238 > 0,05$). Concluiu-se que não há impactos na produtividade de LBA32 com uma aplicação do CQD Krill A32 dopado com fósforo (CDP) nas concentrações avaliadas.

Figura 10: Absorbância por Tratamento no dia da colheita e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) – LBA39 x CDP – Varredura.

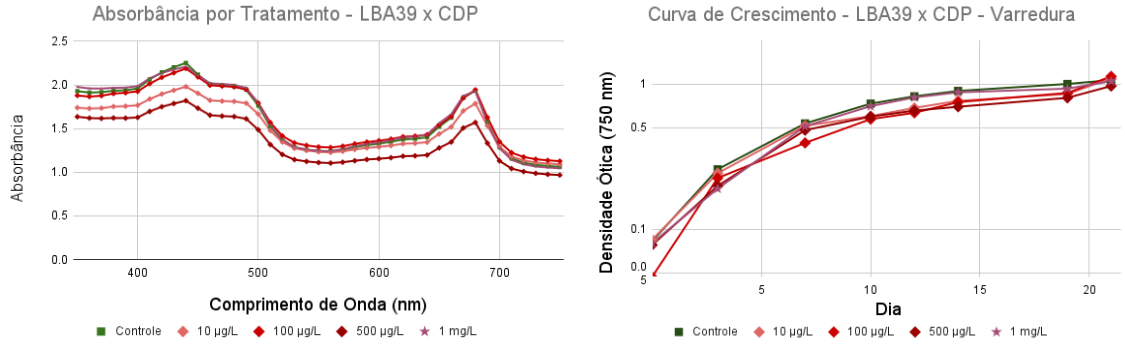
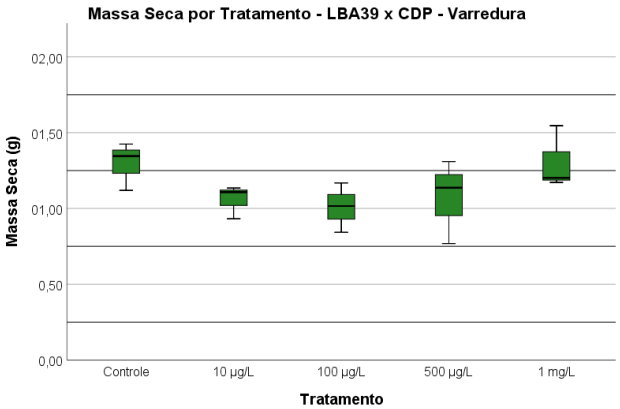


Figura 11: Diagrama de caixa da biomassa seca do experimento de Varredura 1x da LBA39 e do CDP.



Análise da Qualidade de Biomassa

A fim de verificar se os tratamentos com os CQDs poderiam causar algum impacto na qualidade da biomassa, foram feitos testes de caracterização. Como a quantidade de amostras era muito grande, escolheu-se três experimentos com muitos tratamentos diferentes e com quantidade de massa suficiente para análise:

- Microalga LBA39 e Carbon Dot Krill A32 – Varredura 1x;
- Microalga LBA39 e Carbon Dot Krill A32 – Varredura 3x;
- Microalga LBA39 e Carbon Dot Krill A32 dopado com fósforo - Varredura.

Para caracterização da biomassa, foram realizadas as análises de teor de proteínas e quantificação de pigmentos. As duas avaliam importantes componentes da biomassa das microalgas com significativo valor agregado e potencial tecnológico (Enzing, 2014).

Em relação ao teor protéico, as análises estatísticas podem ser encontradas na Tabela 2. A análise visual pode ser feita na Figura 12.

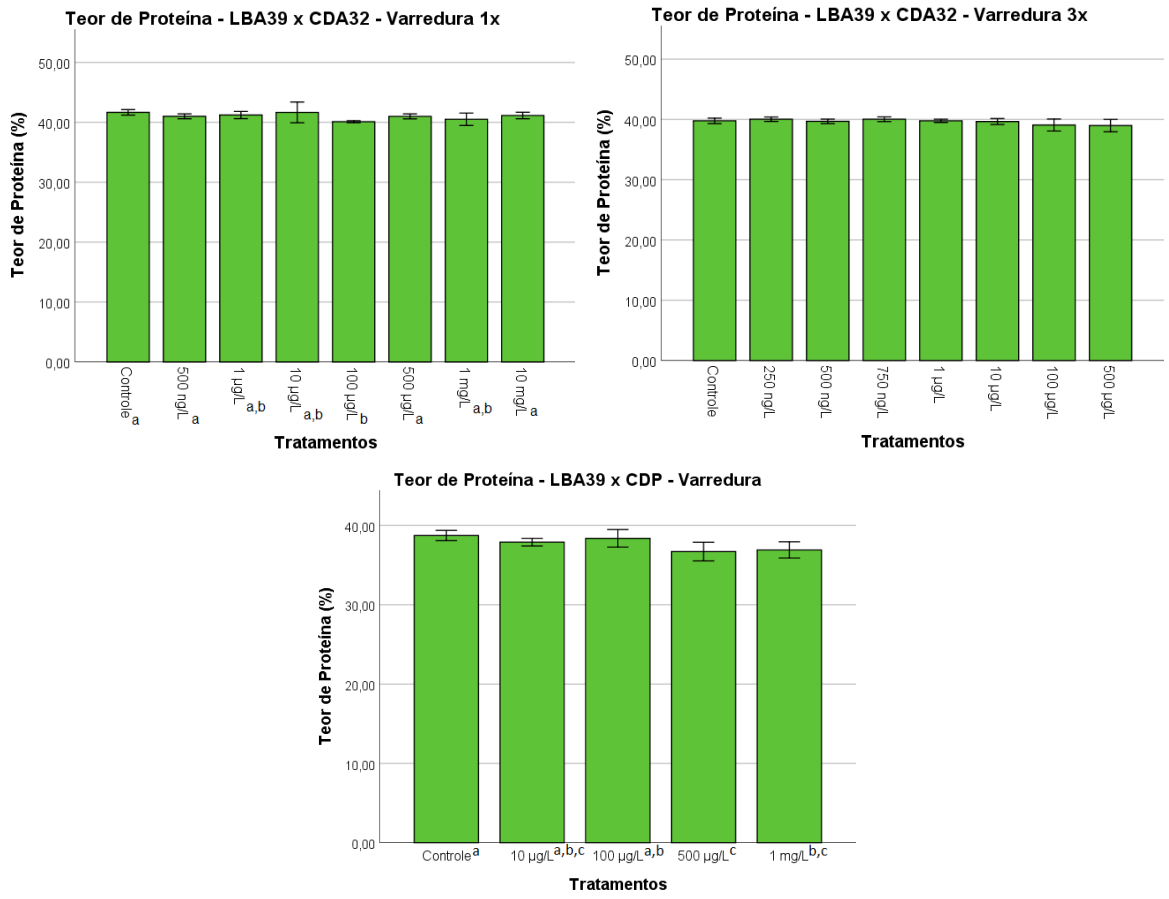
Tabela 2: Testes Estatísticos do Teor de Proteínas das Amostras dos Experimentos de Microalgas e CQDs.

Experimento	*Teste de Levene*	*ANOVA*	*Conclusão*
LBA39 X CDA32 Varredura 1x	p = 0,039 < 0,05	p = 0,000* < 0,05 (Welch)	Há diferença nas médias
LBA39 X CDA32 Varredura 3x	p = 0,043 < 0,05	p = 0,205 < 0,05 (Welch)	Médias são iguais
LBA39 X CDP Varredura	p = 0,485 > 0,05	p = 0,003 < 0,05	Há diferença nas médias

Só os experimentos “LBA39 x CDA32 – Varredura 1x” e “LBA39 x CDP - Varredura” apresentaram diferença nas médias de teor proteico em relação ao controle.

Para o experimento com uma aplicação, o teste de Games-Howell separou nos grupos conforme os da Figura 12. A análise indica que há um grupo com todos os tratamentos menos o 100 µg/L e outro grupo com tratamentos semelhantes a esse, sendo que o teor de proteína desse foi menor do que o dos outros tratamentos, média de 40,1%. A condição de 1 mg/L teve média de 40,5% e todos os outros foram acima de 41%. A variação é muito pequena para indicar qualquer mudança no teor protéico ou alguma vantagem ou desvantagem promovida pela aplicação do CDA32.

Figura 12: Teor de Proteínas das Amostras dos Experimentos LBA 39 x CDA32 Varredura 1x, LBA 39 x CDA32 Varredura 3x e LBA39 x CDP Varredura. Condições com mesmo sobrescrito são estatisticamente iguais.



Já no experimento “LBA39 x CDP - Varredura”, o teste *post-hoc* de Tukey indicou os separou conforme na Figura 12. De forma semelhante ao outro experimento analisado, a aplicação do CDP resultou em menores teores de proteína. O controle teve média de 38,7%, enquanto os tratamentos tiveram pelo menos 1 ponto percentual a menos. Diferença quantitativamente maior do que do outro experimento, mas ainda proporcionalmente pequena para indicar algum benefício ou prejuízo dos tratamentos para proteínas.

Já em relação a análise dos pigmentos, foram dosados quantitativamente: Luteína, Clorofila A e Clorofila B, os quais são os principais encontrados na *Chlorella sorokiniana,* conforme o cromatograma da extração na Figura 13. Praticamente todos os tratamentos tiveram médias diferentes, análises na Tabela 3.

Figura 13: Cromatograma de pigmentos da LBA39 (*Chlorella sorokiniana*)

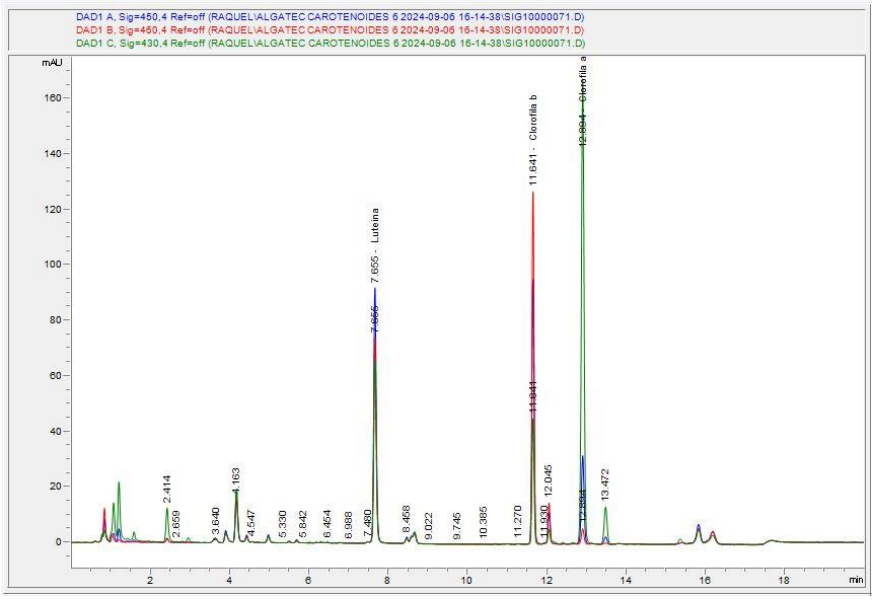


Tabela 3: Testes Estatísticos do Teor de Pigmento das Amostras dos Experimentos de Microalgas e CQDs. Dados com asterisco (*) indicam uso de ANOVA com correção de Welch para amostras não homogêneas.

Experimento	*Pigmento*	*Teste de Levene*	*ANOVA*	*Conclusão*
LBA39 X CDA32 Varredura 1x	Luteína	p = 0,434 > 0,05	p = 0,056 > 0,05	Médias são iguais
	Clorofila A	p = 0,116 > 0,05	p = 0,000 < 0,05	Há diferença nas médias
	Clorofila B	p = 0,018 < 0,05	p = 0,000* < 0,05	Há diferença nas médias
LBA39 X CDA32 Varredura 3x	Luteína	p = 0,039 < 0,05	p = 0,000* < 0,05	Há diferença nas médias
	Clorofila A	p = 0,049 < 0,05	p = 0,001* < 0,05	Há diferença nas médias
	Clorofila B	p = 0,012 < 0,05	p = 0,002* < 0,05	Há diferença nas médias
LBA39 X CDP Varredura	Luteína	p = 0,739 < 0,05	p = 0,000 < 0,05	Há diferença nas médias
	Clorofila A	p = 0,465 < 0,05	p = 0,000 < 0,05	Há diferença nas médias
	Clorofila B	p = 0,582 < 0,05	p = 0,000 < 0,05	Há diferença nas médias

Para o experimento LBA 39 x CDA32- Varredura 1x, o teor de Luteína foi igual entre os tratamentos. A Clorofila A teve média diferentes, a separação dos grupos basicamente separou o Controle e 500 ng/L de todos os tratamentos, conforme a Tabela 4. O teor do tratamento de 10 µg/L (9,70 mg/g) foi quase o dobro do Controle (5,16 mg/g). Os testes estatísticos da Clorofila B também separaram o Controle e 1 µg/L dos outros tratamentos. O teor do tratamento de 10 µg/L (3,63 mg/g) foi o triplo

do Controle (1,15 mg/g). A comparação visual pode ser feita na Figura 14. Logo, para esse experimento, a aplicação de 10 µg/L de CDA32 foi um grande indutor da produção dos pigmentos avaliados na microalga LBA39.

Tabela 4: Testes Estatísticos *post-hoc* do Teor de Pigmento das Amostras dos Experimento LBA39 x CDA32 – Varredura 1x. Dados com asterisco (*) indicam uso do teste de Games-Howell e sem asterisco o de Tukey

Pigmento	*Grupo A*	*Grupo B*	*Grupo C*
Luteína	-	-	-
Clorofila A	Controle, 500ng/L	500ng/L, 1µg/L, 100µg/L, 500µg/L, 1mg/L, 10mg/L.	10µg/L,100µg/L, 500µg/L, 1mg/L, 10mg/L
Clorofila B*	Controle, 1µg/L	500ng/L, 1µg/L, 100µg/L, 500µg/L, 1mg/L, 10mg/L.	1µg/L, 1mg/L, 10mg/L

No experimento LBA39 x CDA32 – Varredura 3x, todos os tratamentos tiveram médias diferentes, conforme observado na Tabela 3 e na Tabela 5. Mas, diferentemente do experimento anterior, todos os grupos incluem o Controle, além disso, os tratamentos tiveram resultados menores ou inferiores ao Controle. A análise visual pode ser feita na Figura 14. Então, no caso do tratamento com três aplicações do CDA32 com a microalga LBA39, a produção de pigmentos não foi alterada ou foi até prejudicada.

Tabela 5: Testes Estatísticos *post-hoc* de Games-Howell para o Teor de Pigmento das Amostras dos Experimento LBA39 x CDA32 – Varredura 3x.

Pigmento	*Grupo A*	*Grupo B*
Luteína	Controle, 1µg/L, 10 µg/L, 100µg/L, 500µg/L.	Controle, 250ng/L, 500ng/L, 750ng/L, 1µg/L, 10 µg/L.
Clorofila A	Controle, 250ng/L, 500ng/L, 750ng/L, 1µg/L, 10µg/L.	Controle, 250ng/L, 500ng/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L, 500µg/L.
Clorofila B	Controle, 250ng/L, 500ng/L, 750ng/L, 1µg/L, 10µg/L.	Controle, 250ng/L, 500ng/L, 1µg/L, 10µg/L, 100µg/L, 500µg/L.

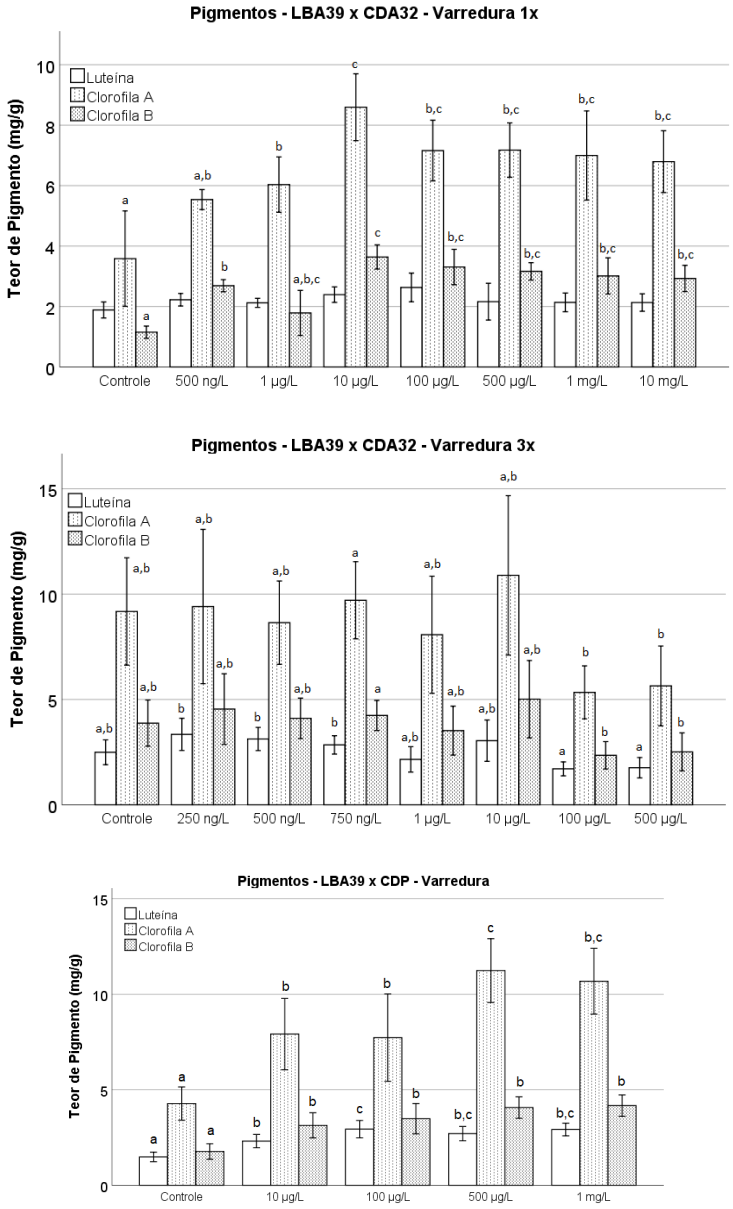
O experimento “LBA39 x CDP – Varredura” também teve médias diferentes para todos os pigmentos, o que pode ser verificado nas Tabelas 3 e 6. O interessante dos grupos separados é que todos os tratamentos foram distintos e com teores maiores que o Controle. Para Luteína, a condição com maior média foi 100 µg/L (2,94 mg/g) que foi quase o dobro do Controle (1,49 mg/g), um achado altamente relevante deste trabalho, uma vez que a luteína consiste em um carotenoide de elevado valor agregado e com inúmeras aplicações médicas, farmacêuticas e na indústria de cosméticos. Para Clorofila A, a condição de 500 µg/L (11,24 mg/g) foi mais que o

dobro do Controle (4,28 mg/g). Já para Clorofila B, a condição de 1 mg/L (4,17 mg/g) também foi mais que o dobro em relação ao Controle (1,77 mg/g). A comparação visual pode ser feita na Figura 14.

Tabela 6: Testes Estatísticos *post-hoc* de Tukey para o Teor de Pigmento das Amostras dos Experimento LBA39 x CDP – Varredura.

Pigmento	*Grupo A*	*Grupo B*	*Grupo C*
Luteína	Controle	10µg/L, 500µg/L, 1mg/L	100mg/L, 500µg/L, 1mg/L
Clorofila A	Controle	10µg/L, 100µg/L, 1mg/L	500µg/L, 1mg/L
Clorofila B*	Controle	10µg/L, 100µg/L, 500µg/L, 1mg/L	-

Figura 14: Teor de Pigmentos das Amostras dos Experimentos LBA 39 x CDA32 Varredura 1x, LBA 39 x CDA32 Varredura 3x e LBA39 x CDP Varredura.



Comparação Final

Os diferentes experimentos demonstraram que, nas condições testadas, não há indícios de que os CQDs testados possam impactar na produtividade das microalgas. Por outro lado, a análise da biomassa demonstrou um grande diferencial na produção de pigmentos, com algumas condições triplicando o teor de pigmentos. A Tabela 7 compara os diferentes resultados de produtividade e qualidade de massa para os experimentos em que todas as análises foram feitas.

Tabela 7: Comparativo entre os experimentos de CQD testados. Variação calculado a partir do Intervalo de Confiança 95%. Tratamentos com o mesmo sobrescrito são estatisticamente iguais. Resultados em destaque indicam vantagens no tratamento.

Experimento	*Condição*	*Massa Seca (mg)*	*Teor de proteína (%)*	*Luteína (mg/g)*	*Clorofila A (mg/g)*	*Clorofila B (mg/g)*
LBA39 X CDA32 Varredura 1x	Controle	1146 ± 26,8^{a}	41,67 ± 0,46^{a}	1,87 ± 0,27^{a}	3,58 ± 1,58^{a}	1,15 ± 0,20^{a}
	500 ng/L	1152 ± 389^{a}	41,01 ± 0,40^{a}	2,23 ± 0,21^{a}	5,54 ± 0,33^{ab}	2,69 ± 0,20^{b}
	1 µg/L	1170 ± 169^{a}	41,23 ± 0,60^{a}	2,12 ± 0,15^{a}	6,03 ± 0,92^{b}	1,79 ± 0,75^{ac}
	10 µg/L	1307 ± 141^{a}	41,66 ± 1,74^{ab}	2,39 ± 0,26^{a}	8,59 ± 1,11^{bc}	3,64 ± 0,40^{b}
	100 µg/L	1318 ± 129^{a}	40,11 ± 0,17^{b}	2,63 ± 0,47^{a}	7,16 ± 1,00^{bc}	3,31 ± 0,59^{b}
	500 µg/L	1206 ± 333^{a}	41,00 ± 0,41^{a}	2,16 ± 0,61^{a}	7,18 ± 0,90^{bc}	3,16 ± 0,29^{b}
	1 mg/L	1151 ± 217^{a}	40,52 ± 1,03^{ab}	2,14 ± 0,31^{a}	7,00 ± 1,48^{bc}	3,01 ± 0,60^{bc}
	10 mg/L	1193 ± 189^{a}	41,14 ± 0,54^{a}	2,13 ± 0,29^{a}	6,79 ± 1,02^{bc}	2,93 ± 0,43^{bc}
LBA39 X CDA32 Varredura 3x	Controle	1234 ± 33,1^{a}	39,76 ± 0,45^{a}	2,49 ± 0,59^{ab}	9,18 ± 2,55^{ab}	3,88 ± 1,10^{a}
	250 ng/L	1321 ± 218^{a}	40,02 ± 0,37^{a}	3,34 ± 0,76^{b}	9,41 ± 3,66^{ab}	4,54 ± 1,68^{ab}
	500 ng/L	1214 ± 175^{a}	39,67 ± 0,37^{a}	3,12 ± 0,55^{ab}	8,64 ± 1,98^{ab}	4,10 ± 0,96^{ab}
	750 ng/L	1251 ± 256^{a}	40,02 ± 0,40^{a}	2,84 ± 0,43^{b}	9,71 ± 1,83^{a}	4,24 ± 0,71^{a}
	1 µg/L	1242 ± 131^{a}	39,76 ± 0,27^{a}	2,16 ± 0,60^{ab}	8,07 ± 2,78^{ab}	3,52 ± 1,16^{ab}
	10 µg/L	1313 ± 379^{a}	39,64 ± 0,49^{a}	3,04 ± 0,98^{ab}	10,9 ± 3,79^{ab}	5,01 ± 1,84^{ab}
	100 µg/L	1427 ± 382^{a}	39,07 ± 0,99^{a}	1,71 ± 0,33^{a}	5,34 ± 1,26^{b}	2,35 ± 0,65^{b}
	500 µg/L	1408 ± 918^{a}	38,97 ± 1,02^{a}	1,76 ± 0,49^{ab}	5,64 ± 1,89^{b}	2,51 ± 0,90^{b}
LBA39 X CDP Varredura	Controle	1296 ± 394^{a}	38,73 ± 0,65^{a}	1,49 ± 0,25^{a}	4,28 ± 0,87^{a}	1,77 ± 0,40^{a}
	10 µg/L	1058 ± 273^{a}	37,89 ± 0,49^{abc}	2,31 ± 0,35^{b}	7,92 ± 1,87^{b}	3,14 ± 0,66^{b}
	100 µg/L	1009 ± 403^{a}	38,37 ± 1,11^{ab}	2,94 ± 0,45^{c}	7,73 ± 2,29^{b}	3,49 ± 0,79^{b}
	500 µg/L	1071 ± 686^{a}	36,70 ± 1,18^{c}	2,71 ± 0,37^{bc}	11,2 ± 1,67^{c}	4,07 ± 0,56^{b}
	1 mg/L	1306 ± 517^{a}	36,91 ± 1,02^{bc}	2,92 ± 0,33^{bc}	10,7 ± 1,72^{bc}	4,17 ± 0,56^{b}

4.2. Ensaio de Meios

De acordo com o já discutido na revisão bibliográfica, há um grande problema na produção de biomassa microalgal, impasse atrelado principalmente ao alto custo de produção. Assim, a pesquisa por diferentes formulações de meios de cultivo, que sejam mais baratas e mais simples, representam um auxílio para solucionar esse problema (Fernández; Sevilla; Grima, 2019). Um avanço nesse campo foi o desenvolvimento do meio BGNIM no trabalho de Ribeiro *et al.* (2019), em que o meio de cultivo é produzido a partir de preparados de micronutrientes e fertilizantes. Uma das maiores diferenças é o uso de ureia e de fosfato monoamônico (MAP) como fonte de nitrogênio ao contrário de nitrato de sódio ($NaNO_3$) utilizado no meio BG11.

A fim de investigar as limitações dos meios e dispor de uma referência de meios mais ricos ou pobres em nutrientes, propôs-se modificar os meios BG11 e BGNIM utilizados, em relação a presença de micronutrientes e da concentração dos nutrientes. Além disso, pensou-se em uma nova formulação de meio que utilizasse apenas o fertilizante NPK 10-10-10 com e sem os micronutrientes em uma quantidade suficiente, mas a menor possível. Obtendo-se as formulações da Tabela 8. Os meios sem os micronutrientes usam o sufixo “-”, já o NPK com micronutrientes adicionado usa o sufixo “+”.

Para modificar a concentração dos nutrientes do meio de cultura, pensou-se em realizar uma diluição. Então, precisou-se avaliar uma maneira que os nutrientes presentes no inóculo não pudessem interferir significativamente na composição do meio. Considerando que se utilizasse 2,5 mL de inóculo para 1 L de meio, então há um fator de diluição de 400 vezes. Ou seja, o meio precisa ser significativamente mais concentrado para que a concentração desses nutrientes não cause um impacto significativo. Dessa forma, foi utilizada uma diluição de 100 vezes, de maneira que a diluição total, soma dos nutrientes do inóculo e do meio, resulta em uma diluição final efetiva de 80 vezes. Esse cálculo é mais bem explicado na Tabela 9. Como é um cálculo do balanço de massa dos nutrientes e não é possível dizer com certeza quanto já foi internalizado pelas microalgas, os meios diluídos utilizarão o sufixo “/100” por mais que não seja essa a concentração efetiva.

Tabela 8: Composição dos diferentes meios de cultura estudados. O asterisco (*) indica produtos de fertilizantes. Tabela adaptada de Ribeiro *et al.* (2019)

		BG11 (mg/L)	**BG11 – (mg/L)**	**BGNIM (mg/L)**	**BGNIM – (mg/L)**	**NPK (mg/L)**	**NPK + (mg/L)**
Macronutrientes	Composição Química						
Nitrato De Sódio	$NaNO_3$	1500	1500	–	–	–	–
Ureia*	CH_4N_2O	–	–	510	510	–	–
Fosfato Monopotássico	KH_2PO_4	40	40	–	–	–	–
Fosfato Monoamônico*	$NH_4H_2PO_4$			- 35	35	–	–
Sulfato De Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	75	75	–	–	–	–
Sulfato De Magnésio Heptahidratado*	MgSO4·7H2O	–	–	75	75	–	–
Cloreto De Cálcio Dihidratado	$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	36	36	–	–	–	–
Nitrato De Cálcio*	$Ca(NO_3)_2$	–	–	40	40	–	–
Carbonato De Sódio	Na_2CO_3	20	20	–	–	–	–
Cloreto De Potássio	KCl	–	–	–	–	–	–
NPK 10-10-10*		–	–	–	–	250	250
Micronutrientes							
EDTA Dissódico	EDTA Na_2	1	–	–	–	–	–
Nitrato de Cobalto (II) Hexahidratado	$Co(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$	0,05	–	–	–	–	–
Molibdato de Sódio Dihidratado	$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	0,39	–	–	–	–	–
Ácido Bórico	H_3BO_3	2,86	–	–	–	–	–
Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado	CuSO4.5H2O	0,08	–	–	–	–	–
Cloreto de Manganês Tetrahidratado	$MnCl_2{\cdot}4H_2O$	1,81	–	–	–	–	–
Sulfato de Zinco Hexahidratado	$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	0,22	–	–	–	–	–
Citrato Férrico amoniacal	$C_6H_8FeNO_7$	6	–	–	–	–	–
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	6	–	–	–	–	–
Rexolin CXK*		–	–	100	–	–	100

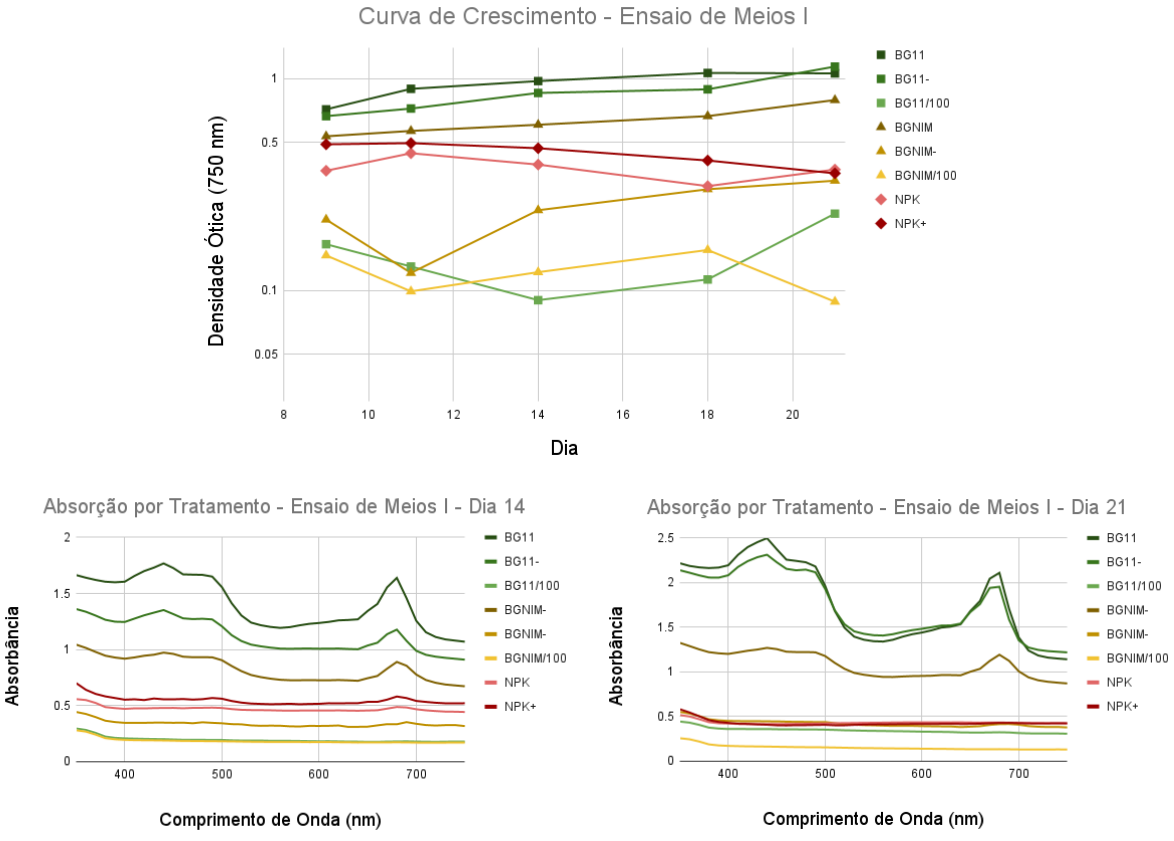
Tabela 9: Descrição dos Cálculos de Diluição. O fator de diluição é obtido dividindo-se a concentração original pela concentração obtida após a diluição.

	Meio	*2,5 mL de Inóculo em 1 L de meio*	*Meio Diluído 100 vezes*	*Inóculo + Meio Diluído*
Concentração	1	0,0025	0,0100	0,0125
Fator de Diluição	-	400	100	80

Execução dos Cultivos

Assim, no Ensaio de Meios I, foram analisados os meios: BG11, BG11-, BG11/100, BGNIM, BGNIM/100, NPK e NPK+. Obtendo-se a curva de crescimento e as Absorbâncias da Figura 15. O comportamento geral observado foi de maiores absorbâncias nos cultivos realizados com os meios BG11 e BG11-, seguidos pelos realizados no meio BGNIM. Os cultivos realizados nos meios BGNIM-, NPK e NPK+, bem como os meios diluídos BG11/100 e BGNIM/100 foram os que resultaram em menores absorbâncias ao longo dos dias do experimento. Durante os cultivos, observou-se que entre os dias 14 e 21, os meios de cultura baseados em NPK tiveram um decréscimo de absorbância, fato nítido entre os gráficos de absorbância da Figura 15, o que indica déficit de crescimento por falta de macro e micronutrientes. Isso também foi observado nos reatores que, pouco a pouco, perderam a cor verde, indicando morte da microalga.

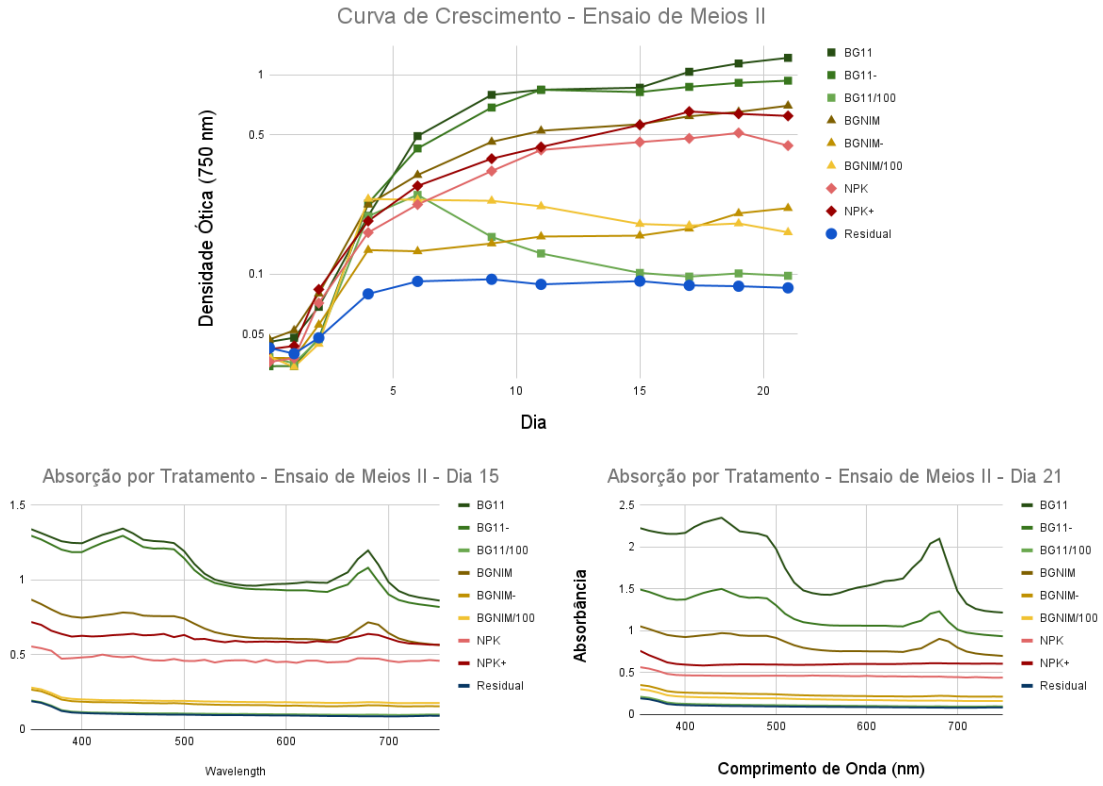
Figura 15: Absorbância por Meio de Cultura e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) do Ensaio de Meios I



Para testar a repetibilidade dos meios propostos foi feito um novo experimento, em que foram testados os mesmos meios (BG11, BG11-, BG11/100, BGNIM, BGNIM/100, NPK e NPK+). Além desses, para testar melhor a influência dos nutrientes restantes no inóculo, foi feito um cultivo chamado de Residual. Neste, o inóculo foi colocado em água destilada, ou seja, os nutrientes utilizados foram apenas os já existentes no inóculo. Obteve-se então os gráficos de absorbância e da curva de crescimento da Figura 16. O comportamento foi parecido do Ensaio de Meios I. Dessa vez, a principal diferença foi que o meio BGNIM- teve absorbância parecida aos meios diluídos (BG11/100 e BGNIM/100). Além disso, reforçou a tendência esperada de desempenho da microalga no meio BG11, seguido do BGNIM e, por fim, NPK. É interessante notar que o BG11- teve produtividade semelhante ao BG11. O meio residual não teve crescimento de microalga, atestado tanto pela absorbância como pelas massas secas.

O decréscimo dos meios NPK entre os dias 15 e 21 se mantiveram nesse experimento. Isso pode ser notado nos registros fotográficos dos reatores da Figura 17, que demonstram de forma mais visual as diferenças de absorbância apresentadas nos gráficos.

Figura 16: Absorbância por Meio de Cultura e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) do Ensaio de Meios II.



Ao longo do cultivo, o pH foi monitorado, obteve-se o gráfico da Figura 18. Essa medida é relevante pois é um indicativo do metabolismo realizado pelas microalgas. No caso dos meios em que a fonte de nitrogênio é nitrato (NO_3^-), quanto maior a intensidade da fotossíntese, mais básico, já que há o consumo de CO_2 pelas microalgas. Pode-se sugerir que o meio BG11 proporcionou melhores condições para atividade fotossintética, seguido pelos meios BG11- e BG11/100. No entanto, esta inferência precisa de confirmação pela medição do oxigênio dissolvido no meio, que poderia ser realizada em trabalhos futuros.

Por outro lado, os meios a base de ureia (CH_4NO) e de amônio (NH_4^+) tem uma fonte de nitrogênio diferente que causa uma queda no pH, causada pela absorção eletrogênica de amônio. Foi reportado que o pH do meio BGNIM apresenta uma queda e depois fica próximo da neutralidade (Ribeiro *et al.*, 2019; Drabold, 2021). Ou seja, a acidez é um indicativo metabólico, o que leva a interpretar que as microalgas cultivadas no meio BGNIM podem ter sido mais ativas que as cultivadas nos meios BGNIM- e BGNIM/100. Por fim, os meios à base de NPK, cuja fonte de nitrogênio também é ureia (CH_4NO) resultaram em pHs ainda mais ácidos nos cultivos e nenhuma diferença foi observada entre os pHs obtidos nos cultivos realizados meios NPK e o NPK+. A causa do meio NPK apresentar uma queda de pH maior que o BGNIM precisaria de mais estudos, já que ambos usam ureia como fonte de nitrogênio.

Meios ácidos que usam ureia como fonte de nitrogênio e de carbono já foram reportados na literatura, com bom desempenho de produtividade e qualidade de biomassa. Uma das principais vantagens é que a acidez dificulta o crescimento de micro-organismos indesejados. Por outro lado, o baixo pH piora a solubilidade de CO_2 no meio (Casal *et al.*, 2010).

Também foi medida a condutividade dos meios de cultura ao longo do cultivo. As membranas celulares de microalgas apresentam baixas condutividades elétricas, na ordem de µS/cm (Gallo-Villanueva *et al.*,2011). Um meio com maior condutividade elétrica garante maior mobilidade e até evita autofloculação (Beltrán-Rocha *et al.*, 2021). Além da falta de nutrientes, a baixa condutividade elétrica nos meios BG11/100, BGNIM/100 e Residual pode ter sido a causa das células formarem agregados no fundo dos reatores e não se dispersarem no líquido como nos outros meios de cultura. A comparação visual das condutividades está na Figura 19.

Figura 17: Registros Fotográfico do experimento Ensaio de Meios II.

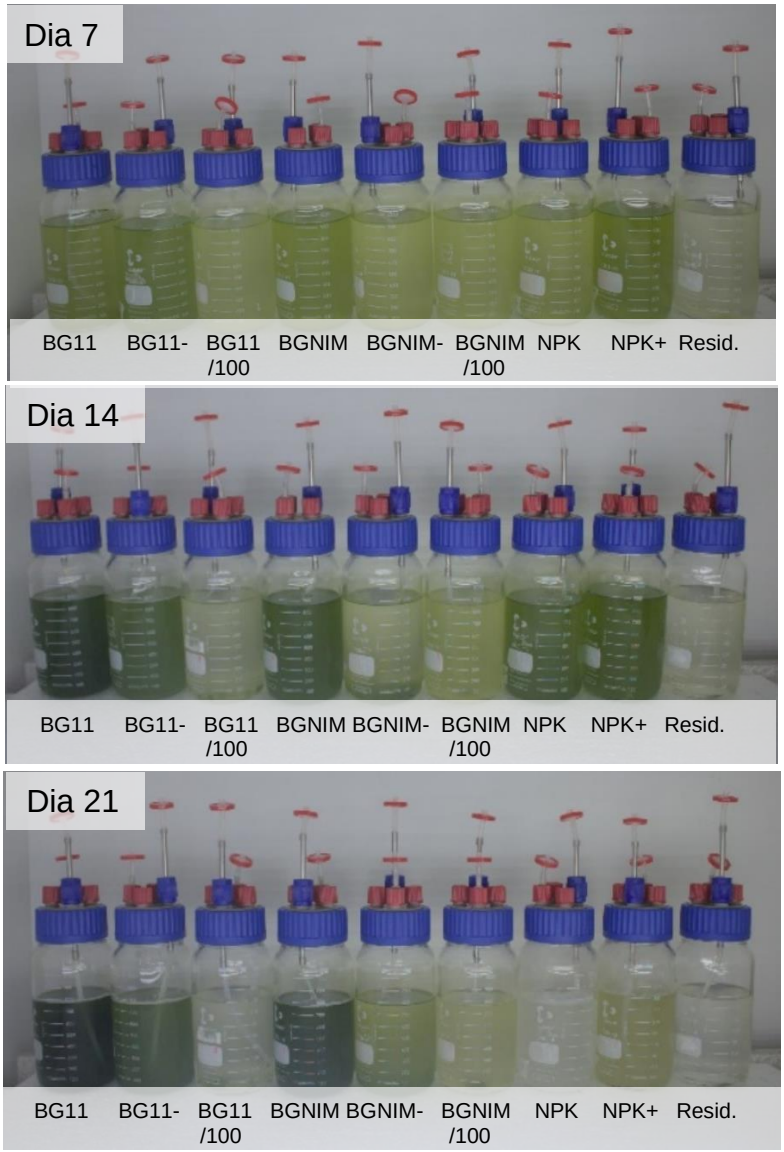


Figura 18: pH por dia – Ensaio de Meios II

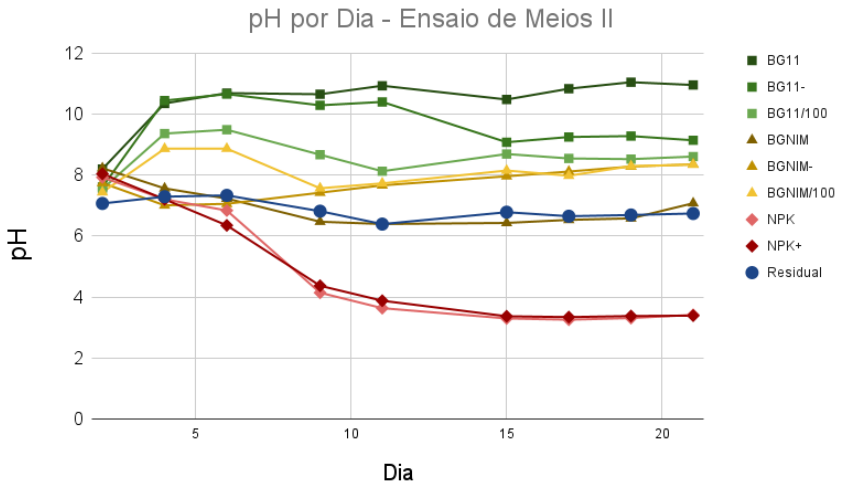
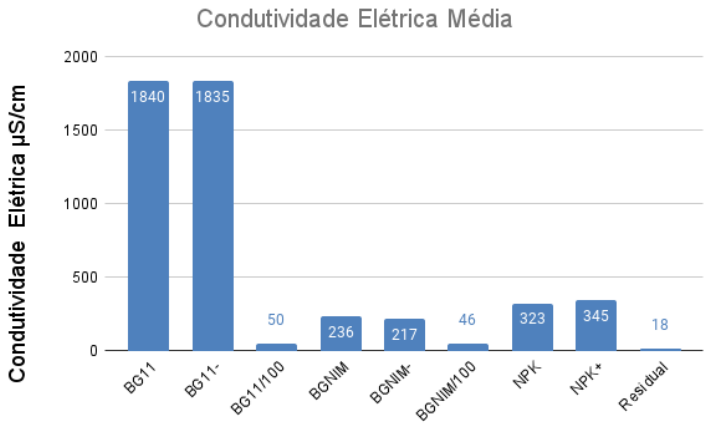


Figura 19: Condutividade Elétrica média – Ensaio de Meios II



Em relação a massa seca coletada, os experimentos de ensaio de meios I e II tiveram resultados semelhantes, observados na Figura 20. No primeiro, as massas das amostras não eram homogêneas pelo teste de Levene ($p = 0{,}009 < 0{,}05$) então foi feita a ANOVA com correção de Welch que indicou que as médias eram diferentes ($p = 0{,}000 < 0{,}005$). O teste *post-hoc* de Games-Howell separou as médias em quatro grupos, indicados na Figura 20.

Já no segundo experimento, as biomassas das amostras também não estavam homogêneas pelo teste de Levene ($p = 0{,}023 < 0{,}05$, logo, realizou-se a ANOVA com correção de Welch que avaliou que as médias eram diferentes ($p = 0{,}000 < 0{,}005$). O teste *post-hoc* de Games-Howell separou as médias em quatro grupos, indicados na Figura 20.

O conjunto dos experimentos ajuda a estruturar um certo padrão na quantidade de biomassa produzida, que foi também observado nas absorbâncias. Os meios BG11 e BG11- resultaram nas maiores produtividades, seguidos pelos meios BGNIM e BGNIM- e, por fim, NPK+, NPK e os meios diluídos BG11/100 e BGNIM/100. O meio de cultura residual não resultou em crescimento considerável da microalga e a biomassa seca coletada média foi de 0,016 g.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por realizar mais um experimento com reatores com 2 L de volume, de modo a gerar biomassa suficiente para ser caracterizada. Foi decidido que esse cultivo duraria 15 dias, de modo que não houvesse perda de viabilidade celular nos meios a base de NPK, conforme observado nos dois primeiros experimentos. Além disso, foram utilizados apenas os meios com as maiores produtividades de biomassa: BG11, BG11-, BGNIM, BGNIM, NPK e NPK+.

Assim, foram coletados os dados de absorbância ao longo do cultivo, conforme pode ser observado na Figura 21.

Figura 20: Massa Seca de Biomassa por Tratamento – Ensaio de Meios I e II. Cultivos de 21 dias.

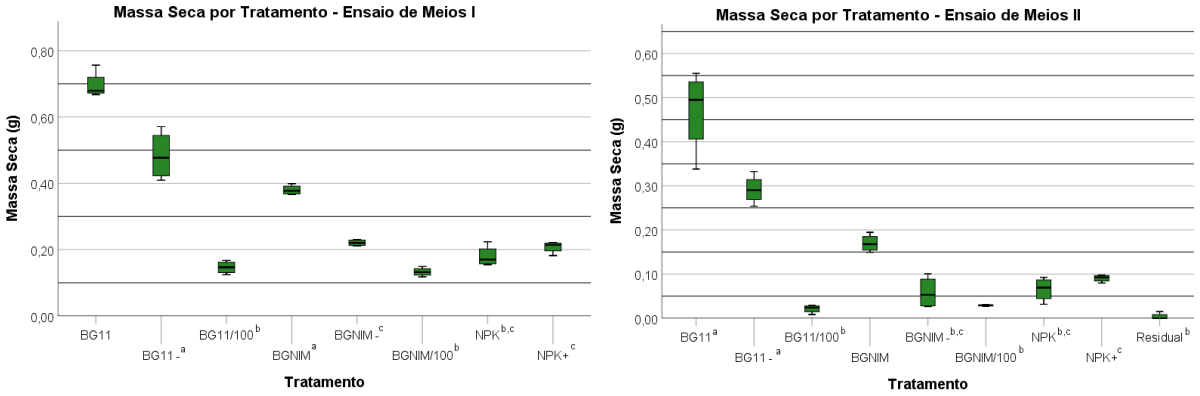
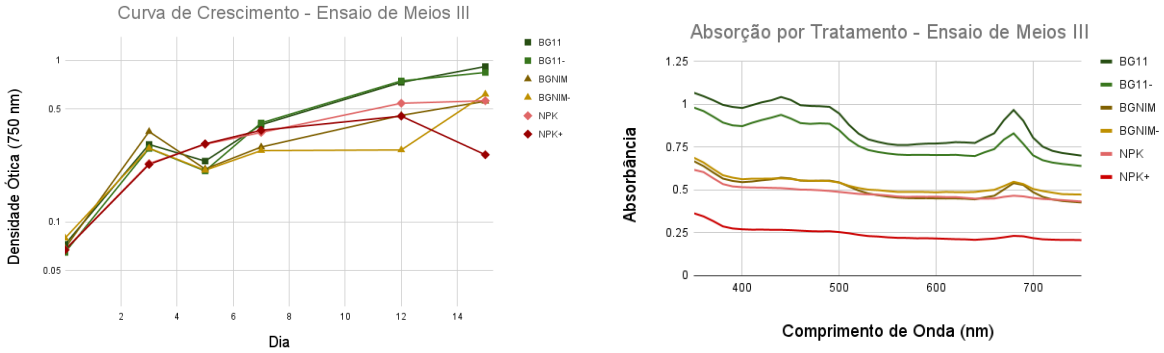
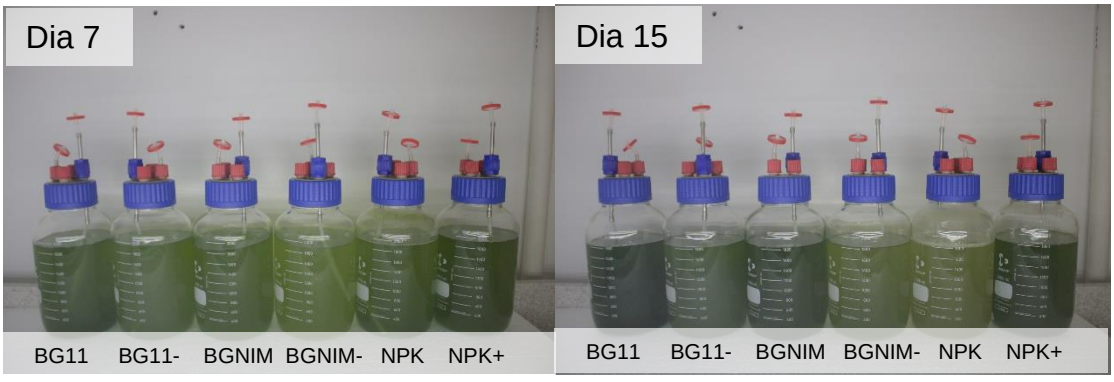


Figura 21: Absorbância por Meio de Cultura e curva de crescimento por densidade ótica (750 nm) do Ensaio de Meios III



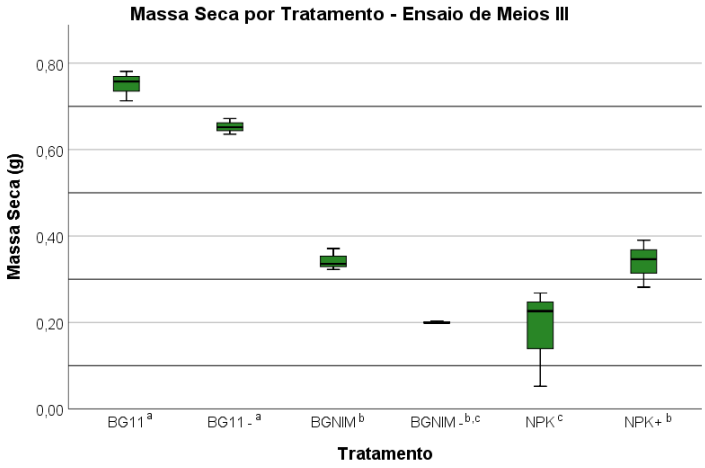
O comportamento evidenciado foi concordante com os experimentos anteriores, confirmando a reprodutibilidade das condições avaliadas. A Figura 22 ilustra o registro fotográfico dos meios ao longo do cultivo. As intensidades de cor dos cultivos foram semelhantes experimente às observadas nos experimentos anteriores.

Figura 22: Registros Fotográfico do experimento Ensaio de Meios III.



As biomassas secas coletadas foram pesadas. O teste de Levene (p = 0,417 > 0,05) permitiu realizar a ANOVA que avaliou que as médias eram diferentes (p = 0,000 < 0,005). O teste *post-hoc* de Tukey separou as médias nos três grupos indicados na Figura 23. Esses dados indicam que os meios NPK+ e BGNIM resultaram em produções de biomassa estatisticamente iguais, ou seja, o meio de cultura desenvolvido nesse trabalho tem um potencial viável em relação ao outro meio projetado com esse mesmo intuito, oferecer um meio mais barato para a produção de biomassa microalgal.

Figura 23: Massa Seca de Biomassa por Tratamento – Ensaio de Meios III



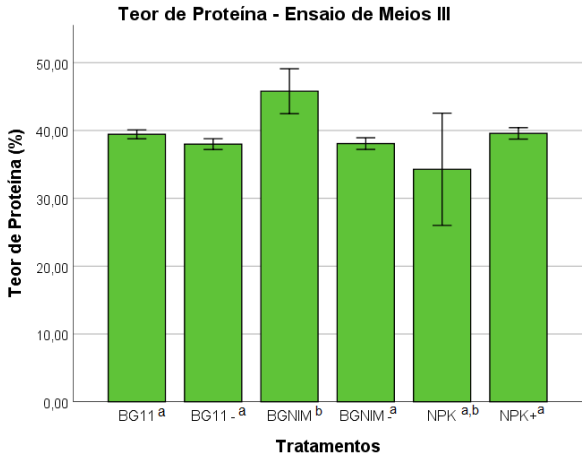
Análise da Biomassa

Para caracterização das biomassas obtidas, foram realizadas, novamente, as dosagens de teores de proteínas e de pigmentos. Só foi possível realizar os testes para o experimento “Ensaio de Meios III” porque teve quantidade de biomassa suficiente para as análises.

Em relação a proteínas, o teste de Levene indicou que as amostras não são homogêneas (p = 0,010 < 0,05), então foi feita a ANOVA com correção de Welch (p = 0,000 < 0,05), que indicou que as médias de teor de proteínas são diferentes. Foi então realizado o teste *post-hoc* de Games-Howell que separou nos grupos expressos na Figura 24. Nesta, o grupo b contém os grupos com maiores teores de proteína, como o BGNIM (45,8%), o NPK (34,3%) só está nesse grupo pela grande variância. Por outro lado, os outros grupos tiveram médias com cerca de 39%. Então, fica claro

que o meio BGNIM teve uma produção de proteínas cerca de 5% superior aos outros meios.

Figura 24: Teores de Proteínas por tratamento – Ensaio de Meios III

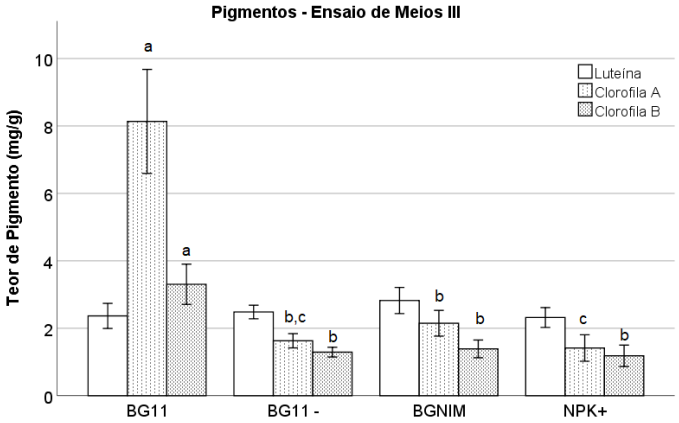


Já para pigmentos, só foram analisados os meios BG11, BG11-, BGNIM e NPK+ porque foram os únicos que resultaram em biomassa suficiente para serem analisados. Para Luteína, o teste de Levene indicou que são homogêneas (p = 0,339 > 0,05), então foi feita ANOVA que indicou que as médias são iguais (p = 0,066 > 0,05).

A Clorofila A não tinha médias homogêneas pelo teste de Levene (p = 0,000 < 0,005), logo, a ANOVA com correção de Welch indicou que as médias são diferentes (p = 0,000 < 0,05). Os grupos separados pelo teste *post-hoc* de Games-Howell, conforme a Figura 25. Nesta, o teor de Clorofila A do meio de cultura BG11 (8,13 mg/g) teve um teor maior do que os outros meios, que ficaram em cerca de 2 mg/g.

A Clorofila B teve amostras não homogêneas no teste de Levene (p = 0,027 < 0,05) então foi feita a ANOVA com correção de Welch que indicou que as médias são diferentes (p = 0,000 < 0,05). Os grupos semelhantes foram separados pelo teste *post-hoc* de Games-Howell apresentados na Figura 25. O meio BG11 também teve teores bem maiores para Clorofila B (3,31 mg/g) do que os outros meios que ficaram em aproximadamente 1,2 mg/g. Podem-se afirmar então que, da mesma maneira que na produtividade, o meio BG11 apresentou um desempenho bem acima dos outros meios. Mas vale notar que, em questão de pigmentos, o desempenho do NPK+ foi semelhante ao do BGNIM, o que é mais um indicativo de sua viabilidade.

Figura 25: Teor de Pigmentos por tratamento – Ensaio de Meios III



Comparação Final

Os experimentos de meios de cultura realizados mostraram que ainda há muitas possibilidades para o desenvolvimento de meios de mais baixo custo e mais acessíveis. O meio NPK+ é feito de apenas dois reagentes e teve resultados semelhantes a outro meio desenvolvido para ser mais barato, o BGNIM, que utiliza 5 reagentes. A Tabela 10 compara os diferentes meios de cultura testados do Ensaio de Meios III, já que foi o experimento com maior caracterização das amostras. Para justificar a viabilidade dos meios de cultura propostos, a Tabela 11 faz um comparativo de custo e de produtividade entre os meios estudados.

Tabela 10: Comparativo entre os meios de cultura do Ensaio de Meios III. Variação calculado a partir do Intervalo de Confiança 95%. Tratamentos com o mesmo sobrescrito são estatisticamente iguais.

Condição	*Massa Seca (mg)*	*Teor de proteína (%)*	*Luteína (mg/g)*	*Clorofila A (mg/g)*	*Clorofila B (mg/g)*
BG11	750 ± 86,0^{a}	39,44 ± 0,66^{a}	2,37 ± 0,37^{a}	8,14 ± 1,54^{a}	3,31 ± 0,60^{a}
BG11-	653 ± 45,2^{a}	37,99 ± 0,80^{a}	2,48 ± 0,20^{a}	1,63 ± 0,21^{bc}	1,29 ± 0,14^{b}
BGNIM	343 ± 62,1^{b}	45,79 ± 3,31^{b}	2,82 ± 0,39^{a}	2,15 ± 0,38^{b}	1,39 ± 0,26^{b}
BGNIM-	200 ± 7,29^{bc}	38,07 ± 0,86^{a}	-	-	-
NPK	182 ± 284^{c}	34,28 ± 8,27^{ab}	-	-	-
NPK+	339 ± 136^{b}	39,18 ± 0,84^{a}	2,32 ± 0,29^{a}	1,41 ± 0,39^{c}	1,18 ± 0,32^{b}

Tabela 11: Comparativo de preços e produtividade entre os meios de cultura estudados. Preços pesquisados com reagentes da marca Êxodo Científica e fertilizantes agrícolas da marca Vittaplan e Yaratera em outubro de 2024. Valores estimados com as médias de massa, proteína e pigmentos obtidas.

	R$/L de meio	*Produtividade (mg L^{-1} dia^{-1})*	*Custo do meio por grama de biomassa (R$/g)*	*Custo do meio por grama de proteína (R$/g)*
BG11	0,0920	21,77	4,228	10,721
BG11-	0,0895	21,77	4,110	10,820
BGNIM	0,0279	11,44	2,440	5,329
BGNIM-	0,0109	6,67	1,635	4,294
NPK	0,0034	6,07	0,559	1,632
NPK+	0,0204	11,31	1,803	4,556

	Custo do meio por miligrama de Luteína (R$/mg)	*Custo do meio por miligrama de Clorofila A (R$/mg)*	*Custo do meio por miligrama de Clorofila B (R$/mg)*
BG11	82,094	18,118	58,770
BG11-	76,047	17,452	146,036
BGNIM	75,549	40,034	153,710
NPK+	68,692	37,113	134,600

Observando as estimativas, os meios alternativos são soluções interessantes para produção de biomassa e de proteínas, já que todos são significativamente mais baratos que o meio BG11. Vê-se que há uma diferença grande de preço por L de meio entre o NPK e o NPK+, a diferença dos valores é só do fertilizante de micronutrientes, caso seja utilizado um mais barato e mais acessível, o custo tanto do NPK+ e do BGNIM podem diminuir ainda mais. Já para produção de pigmentos, o meio BG11 consegue um rendimento muito maior que compensa o custo por litro mais elevado. Para que os dados encontrados sejam validados, mais experimentos em escalas maiores devem ser testados e com os cultivos monitorados de maneiras que o presente estudo não fez, como o oxigênio dissolvido, bem como análises de biomassa importantes, como lipídios e carboidratos.

Um futuro estudo poderia associar os meios de cultura alternativos com a aplicação de CQDs, de modo a tentar conseguir incremento de produção de pigmentos com baixo custo de insumos para o meio. Tanto as Clorofilas como a Luteína representam pigmentos com grande interesse comercial, com um mercado estimado em mais de um trilhão de dólares até 2026 (Kuo *et al.* 2021).

5. CONCLUSÕES

Microalgas são uma interessante fonte de biomassa, por vantagens como não competir com terras agricultáveis, utilizar a área de forma mais eficiente, ciclo de vida rápido e conter diversos componentes com valor agregado. Biorrefinarias a base de microalgas podem converter essa biomassa em bioprodutos para a indústria, podendo servir de alternativa a algumas áreas da indústria petroquímica. No entanto, o custo da biomassa ainda é muito caro em comparação com outras matérias-primas.

O presente trabalho estudou duas alternativas para diminuir o custo da biomassa, investigar a aplicação de pontos quânticos de carbono (CQDs) e pesquisar meios de cultura mais baratos.

Os dois CQDs estudados (CDA32 e CDP) não impactaram a produtividade de biomassa. Nas condições estudadas, a produção de proteína manteve-se igual ou decaiu em relação ao controle. Já para os pigmentos, algumas condições tiveram um aumento expressivo da produção. O uso do CQD dopado com fósforo foi capaz de dobrar a produção de luteína, triplicar clorofila A e dobrar clorofila B.

Para os meios de cultura, foi pensado em conseguir alternativas baratas ao meio BG11 e também meios com menos nutrientes para algumas condições de estresse das microalgas. Dentre os meios estudados, o NPK+ destacou-se por ser 57% mais barato que o custo por grama de biomassa em relação ao BG11 e 26% em relação ao BGNIM. O uso do NPK+ e do BGNIM diminuem o custo da produção de proteína pela metade em comparação com o BG11. Mas foi encontrado que os meios alternativos são mais caros para produção de pigmentos em relação ao BG11.

As duas iniciativas poderiam ser utilizadas simultaneamente em trabalhos futuros para agregar o baixo valor dos meios alternativos com a melhora da produção de pigmentos dos CQDs estudados. Mais análises sobre o impacto dos meios alternativos no metabolismo das algas são necessárias para entender como influenciam a biomassa coletada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIVISATOS, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933–937, 16 fev. 1996.

BELTRÁN-ROCHA, Julio César *et al*. Some implications of natural increase of pH in microalgae cultivation and harvest by autoflocculation. **Latin American Journal Of Aquatic Research**, [S.L.], v. 49, n. 5, p. 836-842, 31 out. 2021.

BRASIL, B.s.A.F; SILVA, F.C.P.; SIQUEIRA, F.G.. Microalgae biorefineries: the brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 39, p. 90-98, out. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007.

BRAYNER, R. et al. Ecotoxicological studies of CdS nanoparticles on photosynthetic microorganisms. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1852–1858, 2011.

CARVALHO, A. P. et al. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1275–1288, 2011.

CASAL, Carlos et al. Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 29-42, 24 dez. 2010. Disponível em: https://www.mdpi.com/1660-3397/9/1/29. Acesso em: 01 out. 2024.

CHANDRA, S. et al. High throughput electron transfer from carbon dots to chloroplast: A rationale of enhanced photosynthesis. **Nanoscale**, v. 6, n. 7, p. 3647–3655, 2014.

CHEN, Jiaxin *et al*. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 90, p. 336-346, jul. 2018.

CHOI, S. A. et al. Biocompatible liquid-type carbon nanodots (C-paints) as light delivery materials for cell growth and astaxanthin induction of Haematococcus pluvialis. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, p. 110500, 2020.

DRABOLD, Edward T.; BAYLESS, David J.. Quantitative Photoresponse of the First Photosynthetic Biomaterials: physical measurements and analysis of microalgae systems. **Physica Status Solidi (B)**, [S.L.], v. 258, n. 9, p. 1-7, 24 fev. 2021.

ENDO, H.; HOSOYA, H.; KOIBUCHI, T. Growth Yields of Chlorella regularis in Dark-heterotrophic Continuous Cultures Using Acetate : Studies on Chlorella regularis, Heterotrophic Fast-Growing Strain (III). **Journal of fermentation technology**, v. 55, n. 4, p. 369–379, 1977.

ENZING, C. et al. **Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe**. [s.l: 2014.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Costs analysis of microalgae production. p. 551–566. In: **Biofuels from Algae**. 2nd. ed. Almería, Espanha: Elsevier B.V., 2019.

FIELD, C. B. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. **Science**, v. 281, n. 5374, p. 237–240, 10 jul. 1998.

GALLO-VILLANUEVA, Roberto C. et al. Assessment of microalgae viability employing insulator-based dielectrophoresis. **Microfluidics And Nanofluidics**, v. 10, n. 6, p. 1305-1315, 9 jan. 2011.

GHOSH, S. A. et al. Nitrogen-doped carbon dots prepared from bovine serum albumin to enhance algal astaxanthin production. **Algal Research**, v. 23, p. 161–165, 2017.

GROBBELAAR, Johan U. Algal Nutrition - Mineral Nutrition. **Handbook of Microalgal Culture**, 1 Ed., p. 95–115, 2007.

GROBBELAAR, Johan U.. Inorganic Algal Nutrition. **Handbook Of Microalgal Culture**, 2 Ed., p. 123-133, 2013.

HOPES, A.; MOCK, T. Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems. **eLS**, p. 1–9, 2015.

IEA. **Coal 2018**. Paris: [s.n.]. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/coal-2018e>.

IEA. **World Energy Outlook 2019**. Paris: [s.n.]. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2019>.

KANG, Soonchul *et al*. Light Harvesting and Energy Transfer in Multiporphyrin-Modified CdSe Nanoparticles. **Chemsuschem**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 254-261, 25 mar. 2008.

KUO, Chiu-Mei *et al*. Cultivation and Biorefinery of Microalgae (Chlorella sp.) for Producing Biofuels and Other Byproducts: a review. **Sustainability**, [S.L.], v. 13, n. 23, p. 13480, 2021.

LEE Y.K. Algal Nutrition: Heterotrophic Carbon Nutrition. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, p. 116–121, 2004.

LI, Yadong *et al*. A review on the effects of carbon dots in plant systems. **Materials Chemistry Frontiers**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 437-448, 2020.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.

LIMBERGER, S. N. et al. **Caracterização de fluorescência de carbon dots visando sua aplicação no cultivo de microalgas**. VI Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia. **Anais**...Brasília: Embrapa, 2020.

LIN, S. et al. Effects of quantum dots adsorption on algal photosynthesis. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 25, p. 10962–10966, 2009.

LOUKANOV, A. et al. Real time monitoring and quantification of uptake carbon nanodots in eukaryotic cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 12, p. 1541–1547, 2018.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍZEK, M. Photosynthesis in Microalgae. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**, p. 21–36, 2013.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase. World-wide electronic publication**, Universidade de Galway, 2024. Disponível em: https://www.algaebase.org.

MORELLI, E. et al. Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom Phaeodactylum tricornutum and the green alga Dunaliella tertiolecta: A biophysical approach. **Biophysical Chemistry**, v. 182, p. 4–10, 2013.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **TP-2700-87514**: Summative Mass Analysis of Algal Biomass – Integration of Analytical Procedures. Denver, 2013.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **TP-5100-84170**: Identification and Quantification of Photosynthetic Pigments in Algae. Denver, 2022.

OKEKE, Emmanuel Sunday *et al*. Microalgae biorefinery: an integrated route for the sustainable production of high-value-added products. **Energy Conversion And Management**: X, [S.L.], v. 16, p. 100323, 2022.

PATTANAIK, A.; BEHARI, S. L.; PRADHAN, D. Effect of LED Lights on the Growth of Microalgae. **Inglomayor**, v. 14, p. 14–24, 2018.

RAK, J. et al. Mechanisms of Damage to DNA Labeled with Electrophilic Nucleobases Induced by Ionizing or UV Radiation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 26, p. 8227–8238, 2015.

RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for Chlorella sorokiniana production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, n. October 2019, p. 100354, 2020.

RODRIGUES, Marcelo Oliveira *et al*. **Photosynthesis stimulator based on hybrid carbon nanoparticles, related production method and related use as nanobiostimulants and nanofertilizers in agricultural crops**. Titular: Krilltech Solucoes Sustentaveis em Engenharia Ltda Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria Embrapa Fundacao Universidade de Brasilia. US n. 20230339823A1. Depósito: 26 jan. 2021. Concessão: 29 jul. 2023.

SARAL, Janakan S.; AJMAL, R.s.; RANGANATHAN, Panneerselvam. Bioeconomy of hydrocarbon biorefinery processes. **Hydrocarbon Biorefinery**, Elsevier, [S.L.], p. 355-385, 2022.

SCHENK, P. M. et al. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research**, v. 1, n. 1, p. 20–43, 2008.

WANG, H. et al. Carbon dots promote the growth and photosynthesis of mung bean sprouts. **Carbon**, v. 136, p. 94–102, 2018.

XU, X. et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

XUE, R. et al. Promoting Chlorella photosynthesis and bioresource production using directionally prepared carbon dots with tunable emission. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 569, p. 195–203, 2020.

YEN, Hong-Wei *et al*. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 135, p. 166-174, 2013.

ZHANG, M. et al. Pristine carbon dots boost the growth of chlorella sorokiniana by enhancing photosynthesis. **ACS Applied Bio Materials**, v. 1, n. 3, p. 894–902, 2018.

ZHANG, M. et al. Biotoxicity of degradable carbon dots towards microalgae: Chlorella sorokiniana. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 11, p. 3316–3323, 2019.

ZHANG, X.-W.; ZHANG, Y.-M.; CHEN, F. Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga Spirulina platensis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6, 1 dez. 1998.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 19 de Novembro de 2024

gov.br Documento assinado digitalmente
SAMUEL SILVA NUNES LIMBERGER
Data: 28/11/2024 11:13:36-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do/a discente: _____

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química da UnB

Nome completo: Samuel Nunes Limberger

Título do Trabalho: Avaliação de Estratégias Baseadas na Composição Química Meios de Cultivo para Produção de Metabólitos Secundários de Alto Valor Agregado em Microalgas

Nível: (x) Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Marcelo Oliveira Rodrigues