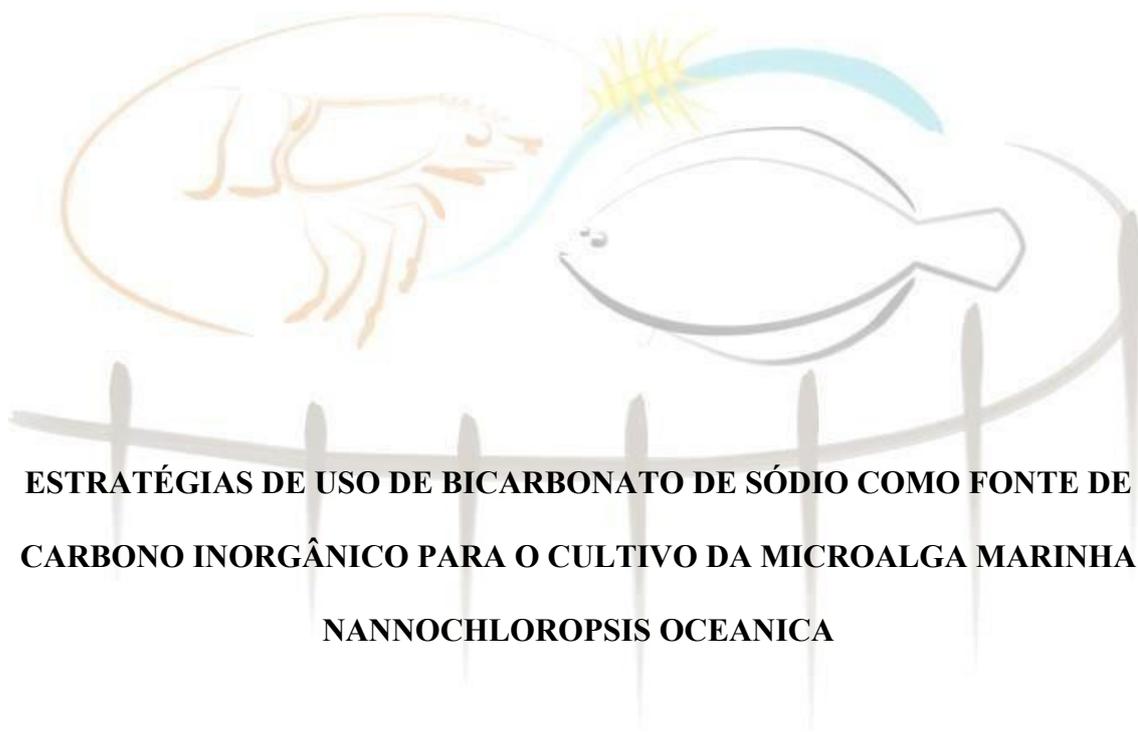


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA - IO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**ESTRATÉGIAS DE USO DE BICARBONATO DE SÓDIO COMO FONTE DE
CARBONO INORGÂNICO PARA O CULTIVO DA MICROALGA MARINHA
NANNOCHLOROPSIS OCEANICA**

Vanessa Evellin Sousa Correa

Rio Grande, RS, Brasil

Setembro de 2024

Universidade Federal do Rio Grande

Instituto de Oceanografia

**ESTRATÉGIAS DE USO DE BICARBONATO DE SÓDIO COMO FONTE DE
CARBONO INORGÂNICO PARA O CULTIVO DA MICROALGA MARINHA
NANNOCHLOROPSIS OCEANICA**

Discente: Vanessa Evellin Sousa Corrêa

Orientador: Prof. Dr. Fabio Roselet

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Yllana Ferreira Marinho

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande, RS

Setembro de 2024

Ficha Catalográfica

C824e Corrêa, Vanessa Evellin Sousa.
Estratégias de uso de bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico para o cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* / Vanessa Evellin Sousa Corrêa. – 2024.
66 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2024.

Orientador: Dr. Fabio Roselet.

Coorientadora: Dra. Yllana Ferreira Marinho.

1. Produtividade 2. Suplementação de bicarbonato
3. Mecanismos de concentração de carbono 4. Fotossíntese
I. Roselet, Fabio II. Marinho, Yllana Ferreira III. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA DE DEFESA

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	ix
AGRADECIMENTOS	x
RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. A importância biotecnológica das microalgas.....	3
1.2. O processo fotossintético	4
1.3. Limitações da fotossíntese.....	9
1.4. Uso de bicarbonato como fonte de carbono inorgânico	12
1.5. A importância de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Cultivo de <i>Nannochloropsis oceanica</i>	16
3.2. Delineamento experimental	18
3.3. Irradiância.....	19
3.4. Avaliação do pH, crescimento e produção de biomassa.....	20
3.5. Análise de nitrato e fosfato.....	21
3.6. Determinação de clorofilas.....	21
3.7. Quantificação de lipídios.....	22
3.8. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Análise da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e temperatura	24
4.2. Avaliação do pH, crescimento e produção de biomassa.....	25
4.3. Análise de nitrato e fosfato.....	30
4.4. Determinação de clorofilas.....	33

4.5.	Quantificação de lipídios	35
5.	DISCUSSÃO	36
5.1.	Efeito no crescimento	36
5.2.	Efeito no pH	39
5.3.	Efeito no consumo de nutrientes	40
5.4.	Efeito na clorofila <i>a</i>	42
5.5.	Efeito na produção lipídica	44
6.	CONCLUSÃO	44
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	45
8.	REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral da fotossíntese. O cloroplasto é revestido por duas membranas, contendo os tilacóides suspensos no estroma. As reações dependentes de luz ocorrem no interior do tilacóide, com a absorção de luz e água e a produção de oxigênio, ATP e NADPH. No estroma, ocorrem as reações independentes da luz, onde o dióxido de carbono é fixado, empregando ATP e NADPH, com a produção de glicose. 5

Figura 2: Visão geral da fase fotoquímica. A energia luminosa atinge o fotossistema II, com a fotólise da água, gerando oxigênio, prótons e elétrons. Os elétrons seguem pela cadeia transportadora de elétrons, permitindo o transporte ativo de prótons para o interior do tilacóide. No fotossistema I, o elétron recebe mais energia, resultando na formação de NADPH. O gradiente de prótons resulta na formação de ATP..... 7

Figura 3: Visão geral da fase bioquímica. Na fase de fixação, três carbonos são fixados pela RuBisCO, formando 6 moléculas de 3-fosfoglicerato, que são fosforiladas em 6 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato. Na fase de redução, as 6 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato são reduzidas em 6 moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, sendo que uma molécula é empregada para a produção de glicose. Na fase de regeneração, as 5 moléculas restantes de gliceraldeído 3-fosfato são fosforiladas em 3 moléculas de ribulose-1,5-bifosfato. 9

Figura 4: Visão geral da fotorrespiração. Na fase de fixação, um oxigênio é fixado pela RuBisCO, formando uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de 2-fosfoglicolato, esta passa por reações no cloroplasto, peroxissoma e mitocôndria para gerar uma molécula de 3-fosfoglicerato, com consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono. 11

Figura 5: Efeitos do pH nas proporções relativas de carbono inorgânico (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) total. A fração molar de um componente é sua fração decimal de todos os mols presentes (BOYD, 2015). 12

Figura 6: Visão geral do mecanismo de concentração de carbono. O bicarbonato é transportado ativamente para o plasmalema ou cloroplasto, e a enzima anidrase carbônica (CA) converte em dióxido de carbono, aumentando sua concentração intracelular. (RAVEN et al., 2020)..... 13

Figura 7: (A) Células de *Nannochloropsis oceanica* (<https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-849-10>). Imagem de microscopia eletrônica de

transmissão de *Nannochloropsis*. C = cloroplasto, M = mitocôndria, N = núcleo, PY = pirenóides, cm = membrana celular, cw = parede celular e cwp = papila da parede celular. A barra de escala é de 1 mm (ZHANG et al., 2019)..... 15

Figura 8: Desenho experimental. 20

Figura 9: Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores expressos como média de 3 repetições \pm desvio padrão. Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), conforme ANOVA seguida pelo teste de Tukey..... 24

Figura 10: Temperatura durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores expressos como média de 3 repetições \pm desvio padrão. Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), conforme ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 25

Figura 11: pH e densidade celular através da absorbância na densidade ótica (DO 750nm) durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey..... 28

Figura 12: Peso seco da biomassa de *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C)

Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 30

Figura 13: Efeito da adição de bicarbonato de sódio no consumo de nitrato e fosfato durante o cultivo de *N. oceanica*. (A, B) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com inóculo não aclimatado. (C, D) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. 31

Figura 14: Efeito da adição de bicarbonato no consumo dos nutrientes nitrato e fosfato no cultivo de *N. oceanica* no experimento 3. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 33

Figura 15: Clorofila a na biomassa de *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 34

Figura 16: Produção de lipídios em *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição final do meio f/2 segundo Guillard (1975). 17

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, deixo meus agradecimentos a Deus e à minha amada família, Claudionor, Alrian e Veronica. Vocês são o meu lar, mesmo a 4000km de distância.

A Sthevan, minha companhia dos dias bons e ruins, que tanto facilitou minha vida prática.

Ao meu orientador, Fabio, por todo o suporte que me deu na realização deste trabalho. E à minha co-orientadora, Yllana, pela sua contribuição no aprimoramento deste texto. Também, e principalmente, agradeço a ambos por se permitirem entender minhas circunstâncias, por todo o incentivo e pela enorme paciência que tiveram comigo.

À toda a equipe de profissionais do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, de docentes à equipe de limpeza, pelo conhecimento que compartilharam comigo, pela assistência que me deram sempre que precisei e pela gentileza que dispensaram a mim. Agradeço especialmente ao Sr. Sandro Fabres pela análise de nutrientes.

Aos meus colegas do PPG, que, muitas vezes, me tiraram dúvidas, ensinaram metodologias de diferentes análises ou me ajudaram a conseguir o que precisava para executar os experimentos. Destaco aqui minhas queridas, Elizabethy e Ana Paula, por algo além: todo o apoio e as interações que aliviavam as tensões dos dias difíceis.

Ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicado à Aquicultura (LEMAQUI) do Instituto de Oceanografia e ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), ambos integrantes da FURG, por disponibilizarem a estrutura e equipamentos necessários para a realização dos experimentos e a análise de lipídeos, respectivamente.

À CAPES e ao CNPq, pelo financiamento que permitiu execução deste trabalho.

RESUMO

As microalgas possuem um elevado potencial biotecnológico devido aos compostos com atividade biológica que produzem, passíveis de diversas aplicações comerciais, como alimentação humana e animal, produção de fármacos e cosméticos, geração de biocombustíveis, além de insumos agrícolas e industriais. As microalgas são organismos fotossintéticos, necessitando de radiação luminosa, água e dióxido de carbono. Apesar de serem mais eficientes que as plantas, a sua eficiência fotossintética é baixa (~8–10 %) pois, em condições normais de cultivo ($\text{pH} > 8,1$), a concentração de dióxido de carbono na água é inferior a 10%, sendo que o bicarbonato é a principal forma de carbono dissolvido (>90%). No entanto, as microalgas possuem a habilidade de converter o bicarbonato em dióxido de carbono, através da enzima anidrase carbônica. Este trabalho teve por objetivo testar três estratégias de adição de bicarbonato como fonte de carbono inorgânico para o cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, visando melhores rendimentos de biomassa e lipídeos. As estratégias testadas foram: (1) adição no início do cultivo e sem aclimação prévia, (2) adição no meio do cultivo e sem aclimação prévia, e (3) adição no início do cultivo e com aclimação prévia. As concentrações adicionadas foram 0, 1, 2 e 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, os experimentos duraram 13 dias e foram mantidos em meio $f/2$, em agitador orbital e sem aeração. Foi observado que a adição de bicarbonato aumentou o crescimento, conforme resultados de densidade ótica e peso seco. Também foi observado aumento na produção de lipídios, pela fluorescência usando o corante Vermelho do Nilo. Quanto à produção de pigmentos, não foi observado aumento na concentração de clorofila *a*. Desta forma, considera-se que as três estratégias testadas foram efetivas para o crescimento e produção de lipídeos de *N. oceanica*,

podendo a estratégia com aclimação prévia ser a menos representativa para obtenção de biomassa, mas também a mais interessante para geração de lipídeos.

Palavras-chaves: Produtividade, Suplementação de bicarbonato, mecanismos de concentração de carbono, fotossíntese.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância biotecnológica das microalgas

As microalgas, termo que designa seres unicelulares microscópicos com estrutura simples, tanto procariontas quanto eucariontas, desempenham um papel crucial na produção primária global devido à sua capacidade de realizar fotossíntese, mediada pela clorofila *a* (MUTANDA *et al.*, 2020). Estima-se que existam aproximadamente 50.589 espécies de microalgas vivas (GUIRY, 2024), adaptadas a diversos ambientes, o que se reflete na vasta gama de compostos bioativos que produzem (IBRAHIM *et al.*, 2023). Devido a essa diversidade, o interesse em suas aplicações biotecnológicas tem crescido consideravelmente (BARBOSA *et al.*, 2023).

Embora apenas algumas espécies sejam exploradas comercialmente (NETHRAVATHY *et al.*, 2019), a biomassa e os compostos bioativos provenientes de microalgas oferecem uma ampla variedade de aplicações. Elas são utilizadas na alimentação humana e animal, produção de fármacos e cosméticos, geração de biocombustíveis, e na fabricação de insumos agrícolas e industriais (MORAIS JUNIOR *et al.*, 2020). Na indústria farmacêutica e cosmeceutica, destacam-se os polissacarídeos, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, esteróis, proteínas, enzimas e pigmentos, devido às suas propriedades terapêuticas, como atividades anticancerígena, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, além de funções em medicamentos, anticorpos e vacinas (KHAVARI *et al.*, 2021; ZHUANG *et al.*, 2022). Os pigmentos, como clorofilas, carotenos, xantofilas e ficobiliproteínas, são altamente valorizados em cosméticos por suas propriedades antioxidantes e estimuladoras de colágeno (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2020).

Além disso, lipídios e seus derivados são utilizados como agentes hidratantes, emolientes, amaciantes, surfactantes, emulsificantes e conservantes (DE LUCA *et al.*, 2021). No campo nutricional, a biomassa de microalgas contribui para alimentos completos e saudáveis, oferecendo benefícios como ação anti-hipertensiva, proteção cardiovascular, efeitos antiobesidade e propriedades antioxidantes e anticancerígenas (TORRES-TIJI; FIELDS; MAYFIELD, 2020). As microalgas também podem ser incorporadas em variados produtos alimentícios, como biscoitos, massas, sopas, pães, bolos, iogurtes e queijos (GOHARA-BEIRIGO *et al.*, 2022; HERNÁNDEZ *et al.*, 2022).

Na produção animal, o uso de microalgas em rações melhora o crescimento e o peso corporal, reduzindo a necessidade de alimentos adicionais e fortalecendo o sistema imunológico contra doenças (KUSMAYADI *et al.*, 2021; BAHY *et al.*, 2023; MUELLER *et al.*, 2023). Na indústria energética, as microalgas são matéria-prima para a produção de biocombustíveis de terceira geração, como bioetanol, biodiesel, biogás e biohidrogênio (ANTO *et al.*, 2020). Elas também têm sido estudadas para o desenvolvimento de bioplásticos (SIMONIC; ZEMLJIC, 2021) e outros insumos industriais, como celulose para o setor têxtil (MACHADO *et al.*, 2024). Por fim, as microalgas são promissoras no tratamento de efluentes, ao reduzir a carga de poluentes e gerar bioprodutos de alto valor comercial com baixo impacto ambiental e menor custo de produção (KALRA; GAUR; GOEL, 2021; MISHRA *et al.*, 2023).

1.2. O processo fotossintético

No interior das microalgas, uma sequência complexa de eventos ocorre a partir da excitação de moléculas de clorofila *a* pela radiação solar. Esses eventos constituem a fotossíntese, que pode ser resumida como a produção de glicose – açúcar energeticamente

rico utilizando luz solar, moléculas de água (H_2O) e de dióxido carbono (CO_2) como fontes de energia, elétrons e carbono inorgânico, respectivamente (Figura 1). Em microalgas eucariotas, a fotossíntese ocorre no cloroplasto, uma organela revestida por duas membranas, externa e interna, que protegem as estruturas imersas no estroma. No estroma, encontram-se os tilacóides, um sistema de membranas dispostas em forma de discos achatados (EVERT; EICHHORN, 2014).

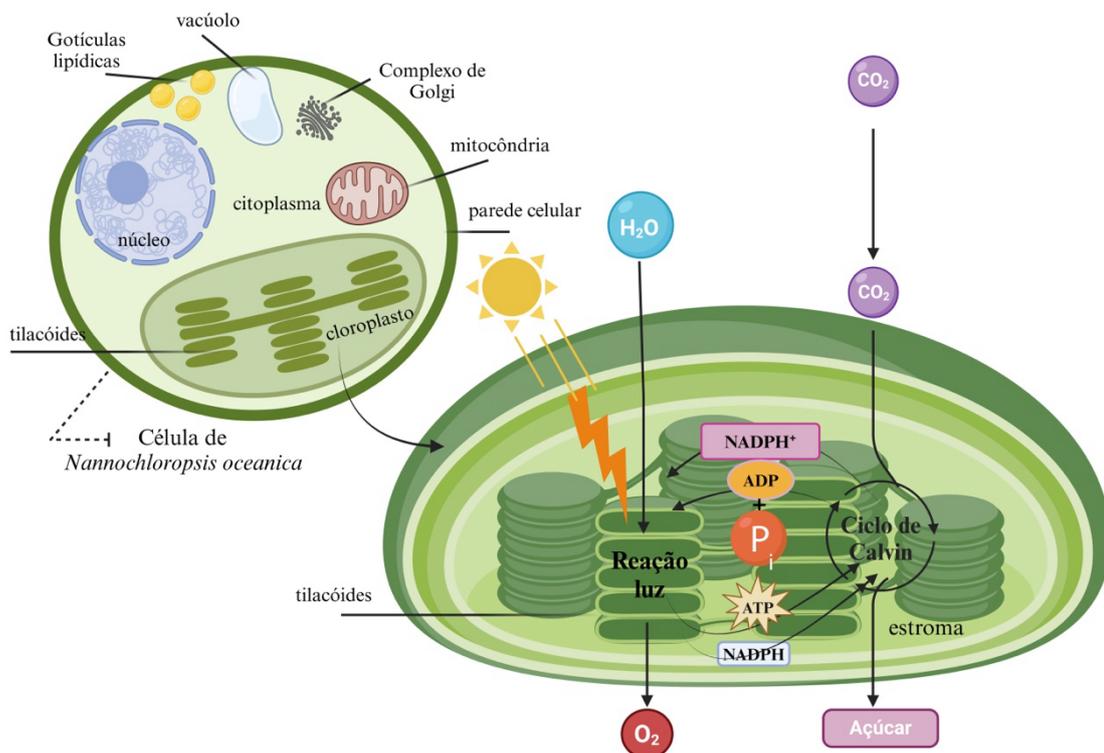


Figura 1: Visão geral da fotossíntese. O cloroplasto é revestido por duas membranas, contendo os tilacóides suspensos no estroma. As reações dependentes de luz ocorrem no interior do tilacóide, com a absorção de luz e água e a produção de oxigênio, ATP e NADPH. No estroma, ocorrem as reações independentes da luz, onde o dióxido de carbono é fixado, empregando ATP e NADPH, com a produção de glicose. Fonte: Adaptado de EVERT, R. F.; EICHHORN, S. (2014).

Na membrana dos tilacóides, encontram-se os complexos fotossintéticos (fotossistemas II e I), compostos por enzimas transportadoras de elétrons e catalizadoras

de reações da fotossíntese (Figura 2). As reações químicas que compõem a fotossíntese são categorizadas de acordo com a sua dependência da luz. Temos, assim, a fase fotoquímica (dependente da luz) e a fase bioquímica (independente da luz), cada uma ocorrendo em uma porção distinta do cloroplasto (Figura 1). Nos tilacóides, o fluxo de elétrons, desencadeado nos centros de reação dos fotossistemas pela excitação dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) pela energia luminosa, alimenta os seguintes processos da fase fotoquímica (Figura 2; MOREIRA, 2013):

- Oxidação de duas moléculas de água, resultando na formação de uma molécula de oxigênio (O_2), quatro prótons ($4H^+$) e quatro elétrons ($4e^-$);
- Transporte ativo de prótons (H^+) do estroma para o interior do tilacóide, onde, juntamente com os prótons produzidos pela oxidação da água, cria-se um gradiente de prótons;
- Geração de moléculas durante a fotofosforilação acíclica, com a formação de ATP pela enzima ATP sintase e de NADPH pela redução do $NADP^+$ pela enzima NADP redutase.

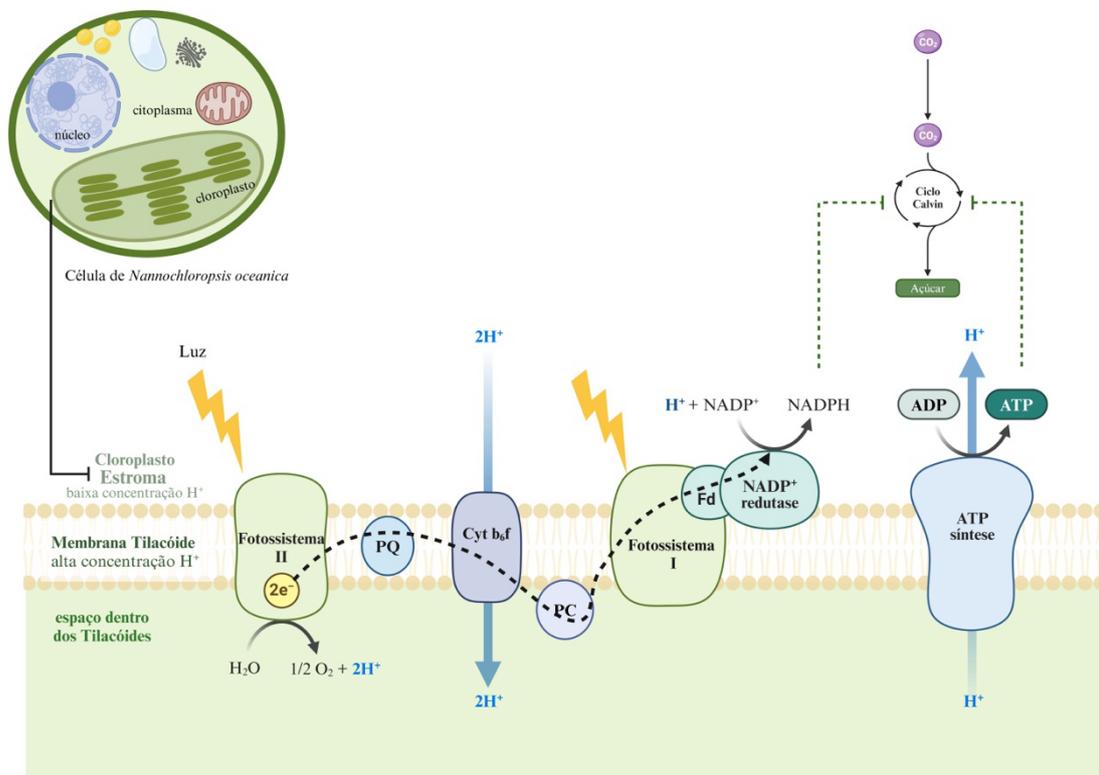


Figura 2: Visão geral da fase fotoquímica. A energia luminosa atinge o fotossistema II, com a fotólise da água, gerando oxigênio, prótons e elétrons. Os elétrons seguem pela cadeia transportadora de elétrons, permitindo o transporte ativo de prótons para o interior do tilacóide. No fotossistema I, o elétron recebe mais energia, resultando na formação de NADPH. O gradiente de prótons resulta na formação de ATP. Fonte: Adaptado de EVERT, R. F.; EICHHORN, S. (2014).

No estroma, ocorre a fase bioquímica da fotossíntese (ciclo de Calvin-Benson-Bassham), onde a glicose é sintetizada a partir de dióxido de carbono, utilizando a energia do ATP e do NADPH produzidos na fase fotoquímica (Figura 3). A fase bioquímica inclui três etapas distintas. A primeira é a fixação do dióxido de carbono pela carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), catalisada pela enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO). A segunda etapa envolve a redução do carbono, onde o composto gerado na fase anterior é reduzido para formar o primeiro açúcar da fotossíntese, o gliceraldeído-3-fosfato (PGAL). A última etapa é a regeneração da RuBP, necessária para

reiniciar o ciclo (JABLONSKY *et al.*, 2011; MOREIRA, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014).

Durante a carboxilação, três moléculas de RuBP (moléculas de cinco carbonos) se unem a três moléculas de dióxido de carbono, gerando três moléculas de um composto intermediário instável de seis carbonos, que é rapidamente quebrado em seis moléculas de um composto com três carbonos, o 3-fosfoglicerato (PGA). Na etapa de redução do carbono, este composto é fosforilado pela enzima 3-fosfoglicerato quinase, usando fósforo proveniente do ATP, resultando em 1,3-bifosfoglicerato. Este composto, por sua vez, é reduzido pela ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, recebendo um hidrogênio do NADPH para formar gliceraldeído-3-fosfato (G3P). Das seis moléculas de G3P formadas na etapa de redução, apenas uma é destinada à geração de glicose. As demais seguem no ciclo, em direção à regeneração da RuBP. Elas são convertidas em três moléculas de ribulose-5-fosfato (RuP) e fosforiladas, utilizando ATP, para formar ribulose-1,5-bifosfato (MOREIRA, 2013; EVERT; EICHHORN, 2014).

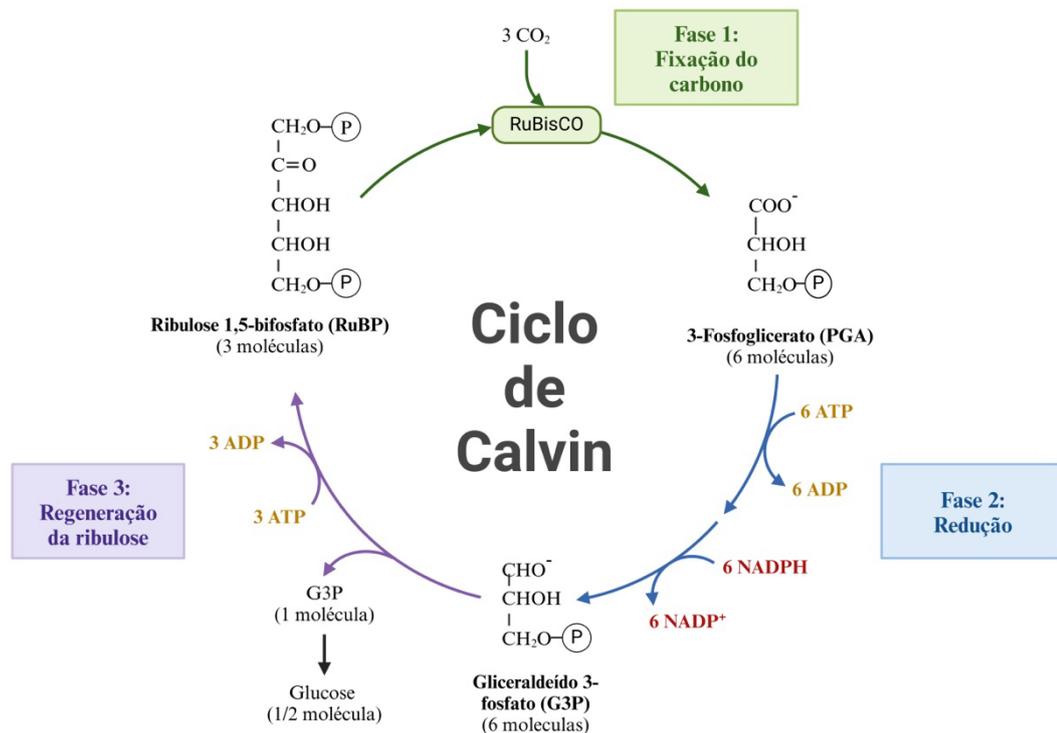


Figura 3: Visão geral da fase bioquímica. Na fase de fixação, três carbonos são fixados pela RuBisCO, formando 6 moléculas de 3-fosfoglicerato, que são fosforiladas em 6 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato. Na fase de redução, as 6 moléculas de 1,3-bifosfoglicerato são reduzidas em 6 moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, sendo que uma molécula é empregada para a produção de glicose. Na fase de regeneração, as 5 moléculas restantes de gliceraldeído 3-fosfato são fosforiladas em 3 moléculas de ribulose-1,5-bifosfato. Fonte: Adaptado de EVERT, R. F.; EICHHORN, S. (2014).

1.3. Limitações da fotossíntese

Apesar das microalgas possuírem uma eficiência fotossintética (~8–10 %) superior à das plantas (~0,1–2%), esta eficiência ainda é baixa, sendo que os principais fatores limitantes são a intensidade da luz, a temperatura e a concentração de dióxido de carbono (HU *et al.*, 2023). Em relação ao dióxido de carbono, a sua concentração na água do mar é considerada baixa (~0,58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), devido à baixa pressão parcial deste gás na atmosfera (~0,04 %) pois, de acordo com a Lei de Henry, a solubilidade de um gás em um líquido é diretamente proporcional à sua pressão parcial na atmosfera (BOYD, 2015).

Em comparação, a pressão parcial do oxigênio na atmosfera é de ~21 %, cerca de 500× superior à do dióxido de carbono, apresentando uma concentração de ~7,603 mg·L⁻¹ na água salgada (BOYD, 2015). Conseqüentemente, isso acarreta a maior disponibilidade de oxigênio dissolvido, em relação ao dióxido de carbono. Durante a fase bioquímica da fotossíntese, quando o oxigênio está em concentrações mais elevadas, a afinidade da RuBisCO pelo dióxido de carbono é reduzida e a fixação do oxigênio é favorecida, processo conhecido como fotorrespiração (Figura 4; HU *et al.*, 2023).

Na fotorrespiração, ao invés da produção de duas moléculas de 3-fosfoglicerato para cada dióxido de carbono fixado, há a produção de apenas uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de 2-fosfoglicolato quando o oxigênio é fixado, sendo esta uma molécula inibidora da fotossíntese. Para compensar esta perda, o 2-fosfoglicolato passa por uma série de reações, no cloroplasto, no peroxissoma e na mitocôndria, com consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, retornando ao ciclo de Calvin–Benson–Bassham como 3-fosfoglicerato (HU *et al.*, 2023).

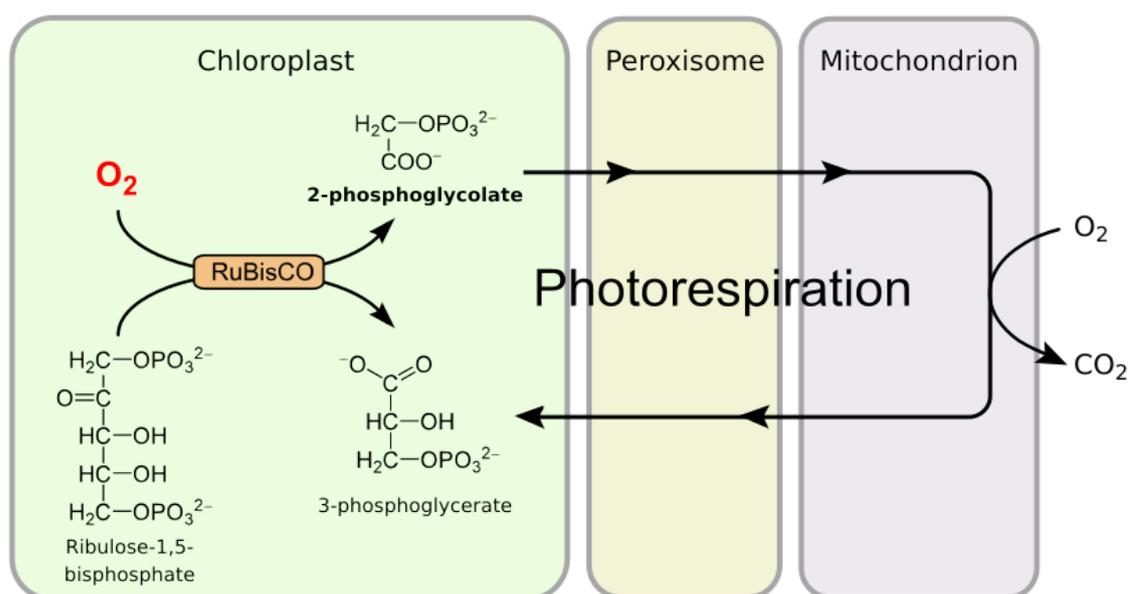
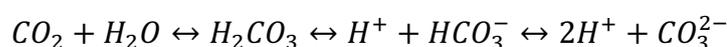


Figura 4: Visão geral da fotorrespiração. Na fase de fixação, um oxigênio é fixado pela RuBisCO, formando uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de 2-fosfoglicolato, esta passa por reações no cloroplasto, peroxissoma e mitocôndria para gerar uma molécula de 3-fosfoglicerato, com consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono. Fonte: EVERT, R. F.; EICHHORN, S. (2014).

Além da sua baixa pressão parcial, quando o dióxido de carbono se dissolve, ele interage com a água para produzir três formas diferentes de carbono inorgânico, de acordo com a reação abaixo (BOYD, 2015):



O dióxido de carbono reage com a água para produzir ácido carbônico (H_2CO_3), que então se dissocia em íons bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogênio (H^+). Os íons bicarbonato, por sua vez, também se dissociam, em íons carbonato (CO_3^{2-}) e hidrogênio. A forma prevalente de carbono é dependente do pH (Figura 5). Assim, o dióxido de carbono prevalece em pH ácido, se esgotando em pH acima de 8,3, enquanto o íon bicarbonato é a forma prevalente entre pH 6,4 e 10,3 e, acima disto, prevalece o íon carbonato (BOYD, 2015). Desta forma, tendo em vista que o pH da água do mar é 8,2 observa-se que a concentração de dióxido de carbono disponível para a fotossíntese é muito baixa, sendo que o bicarbonato é a principal forma disponível, superior a 90 % (SALBITANI *et al.*, 2021).

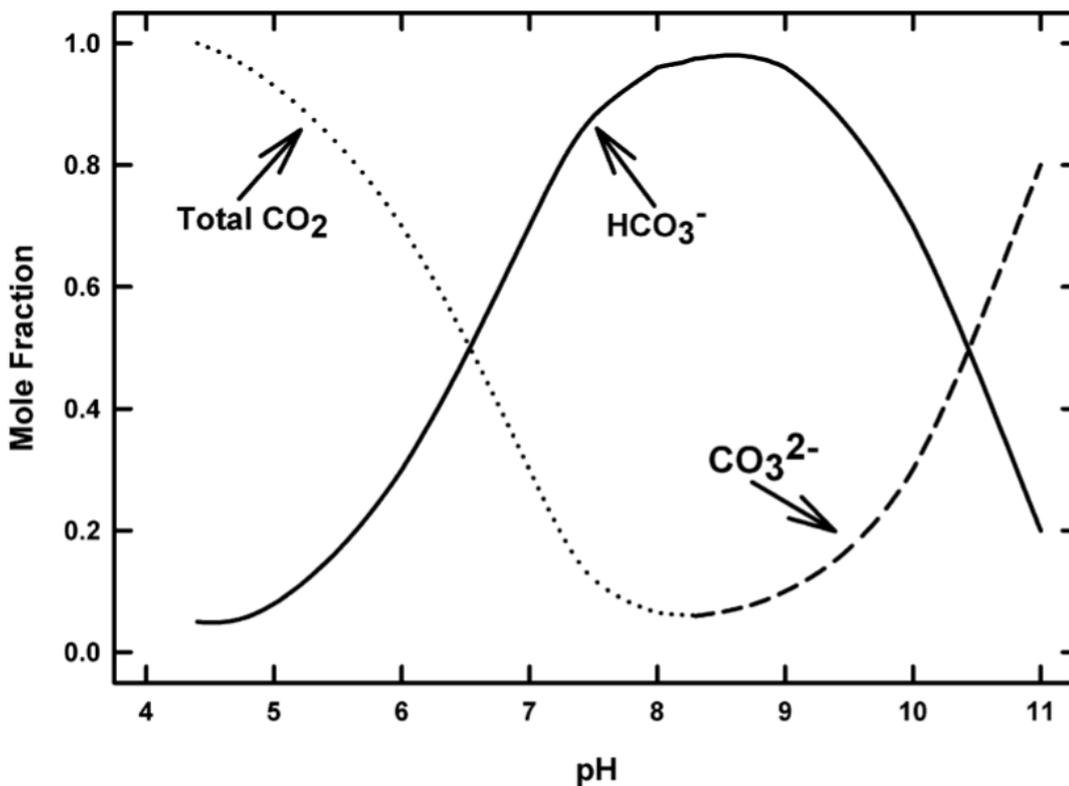


Figura 5: Efeitos do pH nas proporções relativas de carbono inorgânico (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) total. A fração molar de um componente é sua fração decimal de todos os mols presentes. Fonte: BOYD (2015).

1.4. Uso de bicarbonato como fonte de carbono inorgânico

As microalgas, devido à baixa disponibilidade de dióxido de carbono na água do mar, desenvolveram mecanismos para concentrar esse gás ao redor da RuBisCO, aumentando assim a eficiência da fotossíntese (HUERTAS *et al.*, 2000). Um desses mecanismos é o acúmulo intracelular de bicarbonato por transporte ativo, seguido pela sua conversão em dióxido de carbono pela anidrase carbônica, o que eleva a concentração de CO_2 no local da fixação (RAVEN; GOBLER; HANSEN, 2020; Figura 6). Esse processo favorece a reação de carboxilação e reduz a fotorrespiração, otimizando a fotossíntese.

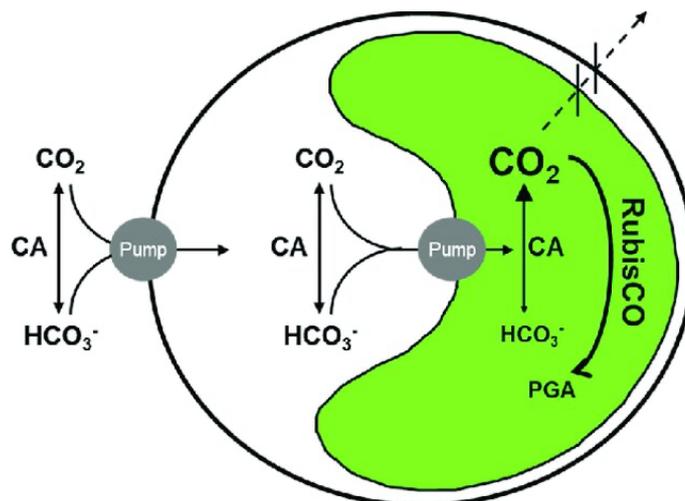


Figura 6: Visão geral do mecanismo de concentração de carbono. O bicarbonato é transportado ativamente para o plasmalema ou cloroplasto, e a enzima anidrase carbônica (CA) converte em dióxido de carbono, aumentando sua concentração intracelular. Fonte: RAVEN; GOBLER; HANSEN (2020).

A partir dos anos 80, o bicarbonato começa, então, a ser estudado como uma fonte alternativa de carbono inorgânico para o cultivo de diversas espécies de microalgas (NIMER; IGLESIAS-RODRIGUEZ; MERRETT, 1997; NUNEZ; QUIGG, 2016; SUPURAN, 2023), contrapondo o uso da principal fonte de carbono inorgânico, tradicionalmente, aplicada em pesquisas de otimização de cultivos de microalgas, o dióxido de carbono, cuja suplementação se provou cara (~35–50% dos custos totais) e ineficiente, devido à perda de grande parte do gás para a atmosfera (SALBITANI *et al.*, 2021).

No entanto, apesar das mais de quatro décadas de esforços de pesquisa em que o bicarbonato vem se provando uma opção de carbono inorgânico mais econômica e eficaz, com boa solubilidade em água ($90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e consequente fácil utilização nos cultivos (SALBITANI *et al.*, 2021), o volume de trabalhos investigando sua aplicação em cultivos de microalgas do gênero *Nannochloropsis* é ínfimo.

1.5. A importância de *Nannochloropsis oceanica*

Nannochloropsis oceanica (Eustigmatophyceae) é uma das cinco espécies do gênero *Nannochloropsis*, conhecida por suas células esféricas pequenas (2-4 μm) e por habitar ambientes marinhos (ANDERSEN *et al.*, 1998; Figura 7). Esta microalga destaca-se por sua alta taxa de crescimento e tolerância a diversas condições ambientais, como variações de temperatura e salinidade. Além disso, pode acumular mais de 50% do seu peso seco na forma de lipídios (CERRI *et al.*, 2021; LJUBIC *et al.*, 2020; MEEHAN *et al.*, 2021), o que a torna uma potencial fonte de matéria-prima para biodiesel (YIN *et al.*, 2020). *N. oceanica* também produz carotenoides como astaxantina, cantaxantina e zeaxantina, com aplicações nutracêuticas e antioxidantes (BOROWITZKA, 2013; CHUA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; YIN *et al.*, 2024).

Estudos sobre o uso de bicarbonato como fonte de carbono no cultivo de *Nannochloropsis* têm demonstrado resultados promissores. MUNOZ; MERRETT (1989) observaram que o bicarbonato é a fonte preferida para *Nannochloropsis oculata*, destacando o transporte ativo de bicarbonato e a conversão enzimática a CO_2 . Outros estudos, como os de HUERTAS *et al.* (2000), confirmaram a importância do bicarbonato para *Nannochloropsis gaditana*, que utiliza este composto através de um sistema de captação eficiente, embora sem a presença de anidrase carbônica extracelular. WHITE *et al.* (2013), assim como, NUNEZ; QUIGG (2016) relataram que a adição de bicarbonato aumenta a abundância celular e as concentrações de pigmentos e lipídios em *Nannochloropsis salina*, com predomínio de ácidos graxos poli-insaturados. Em *Nannochloropsis oculata*, SALBITANI *et al.* (2021) observaram efeitos positivos na biomassa e conteúdo de pigmentos. YUAN *et al.* (2019) demonstraram que a adição de

bicarbonato melhora significativamente as características fisiológicas e a produção de biomassa em *Nannochloropsis oceanica*.

Esses estudos estabelecem claramente o papel do bicarbonato como fonte de carbono inorgânico no cultivo do gênero *Nannochloropsis*. No entanto, é crucial determinar a concentração ideal e o momento apropriado para sua adição, a fim de maximizar a eficiência fotossintética e o rendimento do cultivo na produção de biomassa da microalga.

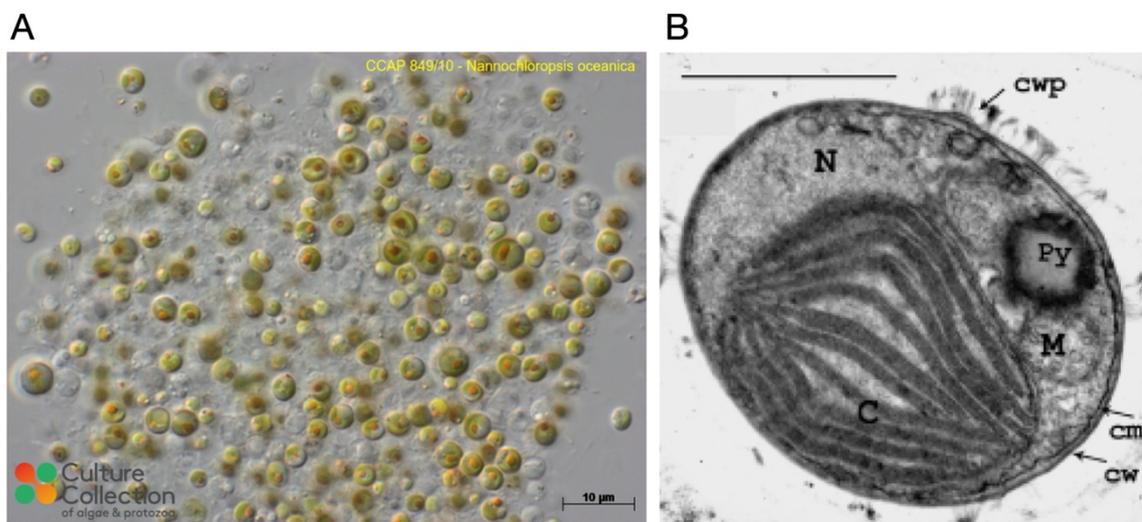


Figura 7: (A) Células de *Nannochloropsis oceanica*. Fonte: <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-849-10>. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de *Nannochloropsis*. C = cloroplasto, M = mitocôndria, N = núcleo, PY = pirenóides, cm = membrana celular, cw = parede celular e cwp = papila da parede celular. A barra de escala é de 1 μm. Fonte: ZHANG *et al.* (2019)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) no cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* sobre o seu crescimento e composição,

considerando diferentes momentos de inserção do bicarbonato e a necessidade de uma aclimatação prévia da microalga à suplementação deste composto inorgânico.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a suplementação de bicarbonato de sódio promove o crescimento de *Nannochloropsis oceanica* em diferentes concentrações, tipos de inóculo (aclimatado ou não ao NaHCO₃ adicional) e momentos de inserção;
- Avaliar a produção de lipídeos em diferentes combinações de concentração de bicarbonato, tipo de inóculo e momento de inserção do bicarbonato;
- Avaliar o rendimento de clorofila *a*;
- Avaliar o consumo dos nutrientes nitrato e fosfato pelos cultivos;
- Avaliar a influência das variáveis físico-químicas (temperatura, pH e irradiância) no crescimento e produção lipídeos nos cultivos de *N. oceanica*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de *Nannochloropsis oceanica*

A cepa da microalga *Nannochloropsis oceanica* (SUDA; ATSUMI; MIYASHITA, 2002), foi obtida da coleção de cepas do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura (LEMAQUI) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil. As culturas da microalga foram mantidas no meio f/2 (GUILLARD, 1975), cuja composição está descrita na Tabela 1. A microalga foi cultivada em água do mar com salinidade de 28, previamente filtrada, através de um filtro de areia e outro de polipropileno de 1,0 µm, seguida de autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.

N. oceanica foi cultivada em modo semicontínuo, com as culturas mantidas na fase de crescimento exponencial. A cultura inicial foi cultivada fotoautotroficamente em frascos Erlenmeyer de 125 mL por 30 dias, utilizando o mesmo meio de cultura, mantido em incubadora (EL222/3 Eletrolab), irradiância de 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, pH 8, temperatura a 23°C e fotoperíodo (12:12). O frasco Erlenmeyer foi agitado manualmente, pelo menos, três vezes por semana.

Após esse período, a cultura inicial foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL e, posteriormente, para um Erlenmeyer de 4 L. Todas as culturas a partir de 500 mL foram mantidas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com pH entre 7 e 8, e sob homogeneização constante com ar atmosférico. O monitoramento qualitativo e quantitativo das culturas, incluindo a concentração celular, viabilidade e eventuais contaminações por bactérias ou protozoários, foi realizado periodicamente utilizando um hemocítômetro e um microscópio óptico.

Tabela 1: Composição final do meio f/2 segundo GUILLARD (1975).

Soluções/Componentes	Solução estoque ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dH ₂ O)	Quantidade Usada	Concentração final no meio (<i>M</i>)
Solução 1		1 mL	
NaNO ₃	75		$8,82 \times 10^{-4}$
Solução 2		1 mL	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5		$3,62 \times 10^{-5}$
Solução 3 (Ferro e Metais traços)		1 mL	
FeCl ₃ .6 H ₂ O	3,15	-	$1,17 \times 10^{-5}$
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	4,36	-	$1,17 \times 10^{-5}$
MnCl ₂ .4 H ₂ O	180	1 mL	$9,10 \times 10^{-7}$
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	22	1 mL	$7,65 \times 10^{-8}$
CoCl ₂ .6 H ₂ O	10	1 mL	$4,20 \times 10^{-8}$
CuSO ₄ .5 H ₂ O	9,8	1 mL	$3,93 \times 10^{-8}$
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	6,3	1 mL	$2,60 \times 10^{-8}$
Solução 4 (Vitaminas)		0,5 mL	

Tiamina (B ₁)	-	200 mg	$2,96 \times 10^{-7}$
Biotina (B ₇)	1	1 mL	$2,05 \times 10^{-9}$
Cianocobalamina (B ₁₂)	1	1 mL	$3,69 \times 10^{-10}$

3.2. Delineamento experimental

O estudo foi conduzido em escala laboratorial utilizando um delineamento inteiramente casualizado, em regime de batelada, e consistiu em três experimentos distintos, cada um com duração de 13 dias (Figura 8). As variações entre os experimentos estavam no momento de inserção do bicarbonato de sódio (NaHCO₃) no meio de cultura e na aclimação do inóculo ao bicarbonato. Assim, teve-se:

- Experimento 1: em que o bicarbonato de sódio foi adicionado no início do cultivo, durante a fase de latência, e cujo inóculo de microalgas não passou por aclimação ao bicarbonato;
- Experimento 2: em que o bicarbonato de sódio foi incluído no sexto dia de cultivo, correspondendo à fase exponencial de crescimento da microalga, com inóculo igualmente não aclimatado ao bicarbonato;
- Experimento 3: em que o bicarbonato de sódio foi adicionado no início do cultivo, porém, o inóculo foi previamente aclimatado à suplementação por um período de 15 dias.

Cada experimento contou com quatro tratamentos diferentes, realizados em triplicata, com concentrações de bicarbonato de sódio no meio de cultura de 0, 1, 2 e 4 g·L⁻¹ (equivalente a 0, 12, 24 e 48 mmol, respectivamente). A solução de bicarbonato (50 g·L⁻¹ de NaHCO₃) foi adicionada aos cultivos na quantidade necessária para atingir as concentrações desejadas, utilizando a fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ (onde C_1 e V_1 são a concentração e o volume iniciais da solução, e C_2 e V_2 são a concentração e o volume

finais no meio de cultura). Isso resultou na adição de volumes de 0, 20, 40 e 80 mL da solução de bicarbonato, respectivamente. Para manter o volume total constante entre os cultivos, foi adicionada água deionizada proporcionalmente nos tratamentos de 0, 1 e 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Nos três experimentos, as unidades experimentais (UE) foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo água marinha com salinidade de 28, previamente autoclavada e enriquecida com o meio f/2. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 90 rpm em um agitador orbital de 25 posições (MarqLabor), à temperatura de 20°C, sob iluminação artificial com fotoperíodo de 16:8 (claro:escuro). A irradiância era variável entre os diferentes pontos do agitador, portanto, sua influência sobre os cultivos precisou ser verificada (tópico 3.3). As microalgas foram inoculadas nas unidades experimentais a uma densidade óptica inicial a 0,3 a 750 nm (DO 750nm), medida através de um espectrofotômetro (UV-Vis SP-220).

3.3. Irradiância

Nos três experimentos a iluminação foi fornecida por uma lâmpada fluorescente posicionada acima do agitador orbital. A irradiância foi medida, para cada uma das 24 posições do agitador a serem ocupadas por unidades experimentais, utilizando medidor de luz (LI-250A, LI-COR Biosciences). Os valores variavam de 90 a 126 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e, por isto, optou-se por reposicionar as UE diariamente, de modo aleatório. As novas distribuições foram registradas e avaliadas estatisticamente para determinar a influência da irradiância sobre cada unidade ao longo dos experimentos. Os resultados foram apresentados na forma de radiação fotossinteticamente ativa (PAR).

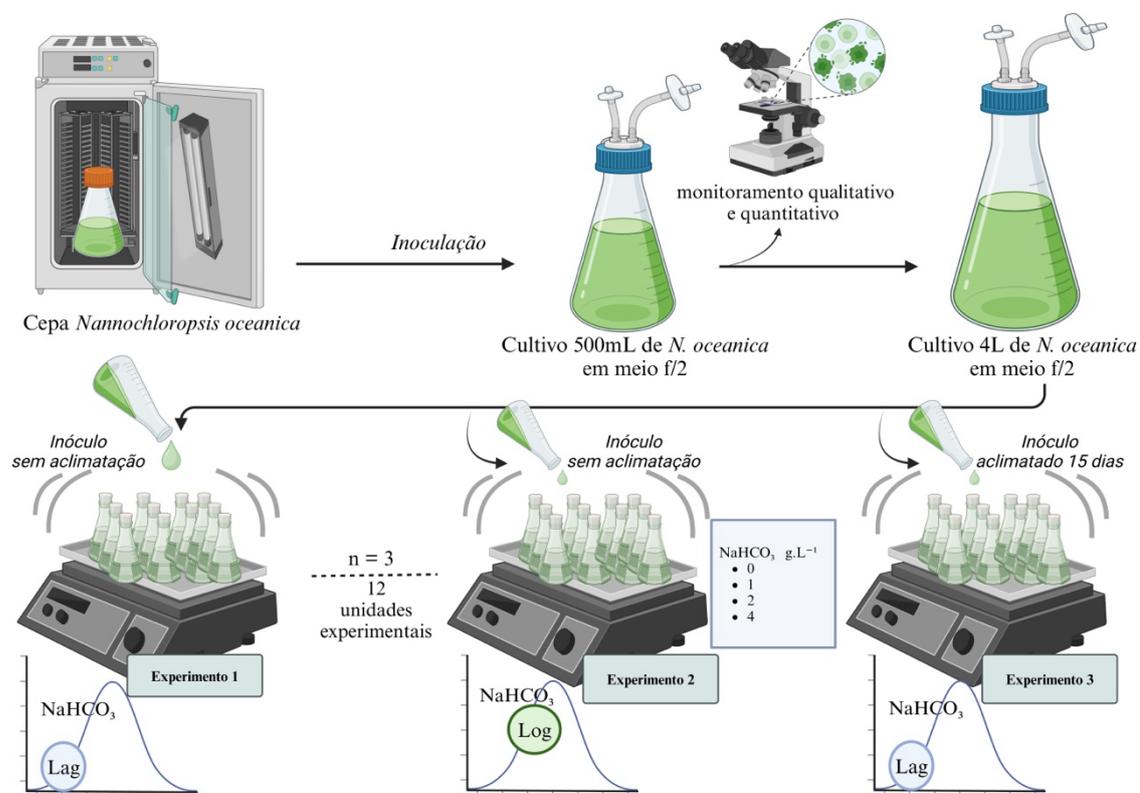


Figura 8: Desenho experimental. Fonte: Autoria própria.

3.4. Avaliação do pH, crescimento e produção de biomassa

Para a avaliação do crescimento da microalga nos três experimentos, amostras de 3 mL foram retiradas das culturas a cada 48 horas, após o início do cultivo. A densidade celular foi monitorada regularmente por meio da medição da absorbância da suspensão celular na densidade ótica a 750 nm (DO 750nm), utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (SP-220). Concomitantemente, o pH e a temperatura dos cultivos também foram monitorados a cada dois dias.

A produção de biomassa seca foi determinada através da filtração dos tratamentos no início e ao final dos experimentos. A filtração foi realizada com o auxílio de uma bomba a vácuo, operando a uma pressão inferior a 5 pol Hg, em um sistema de filtração utilizando filtros de fibra de vidro GF-F de 47 mm de diâmetro e 0,7 µm de porosidade.

A biomassa filtrada foi então lavada com uma solução de formato de amônio 0,5 M (3%) para remover os sais do meio de cultura, seguida por uma lavagem com água destilada.

Os filtros utilizados foram previamente secos em estufa a 60°C por, no mínimo, 24 horas, e pesados antes de receberem as amostras. Após a filtração e secagem completa da biomassa a 60°C, os filtros foram novamente pesados. A biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi calculada utilizando a equação:

$$P = \frac{M_2 - M_1}{\text{vol}}$$

onde M_1 corresponde à massa do filtro antes da filtração (mg) e M_2 à massa do filtro com a biomassa seca da microalga (mg). A diferença entre M_2 e M_1 foi dividida pelo volume de cultivo (L) utilizado na filtração, resultando no valor do peso seco da biomassa (P).

3.5. Análise de nitrato e fosfato

A análise de nitrato (N-NO_3^-) e fosfato (PO_4^{3-}) foi realizada no início (dia 1) e no final do cultivo (dia 13) para avaliar o consumo desses nutrientes pelas microalgas. Após a filtração para obtenção de biomassa, 5 mL do sobrenadante de cada unidade experimental foram coletados, armazenados em tubos Falcon e congelados a -20°C até a análise. As concentrações de nitrato e fosfato foram determinadas seguindo a metodologia de AMINOT; CHAUSSEPIED (1983).

3.6. Determinação de clorofilas

Para a determinação da clorofila *a*, foram coletadas amostras de 20 mL e filtradas utilizando filtros de fibra de vidro GF-F, com 47 mm de diâmetro e 0,7 μm de porosidade, em um sistema de filtração com auxílio de uma bomba a vácuo, mantendo a pressão abaixo de 5 pol Hg. Após a filtração, a biomassa retida no filtro foi removida e

acondicionada em frascos de vidro, seguida de uma extração com 10 mL de acetona a 90%. As amostras foram mantidas a 4 °C por 12 horas para garantir a extração completa das clorofilas, com todos os procedimentos realizados sob proteção da luz.

Após o período de extração, os extratos foram transferidos para cubetas de quartzo. O espectrofotômetro (UV-Vis SP-220) foi previamente calibrado com acetona a 90% antes das leituras de absorbância. A turbidez das amostras foi inicialmente medida em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda de 750 nm. Em seguida, a absorbância de cada amostra foi medida nos comprimentos de onda de 664 nm, 647 nm e 630 nm. O valor da absorbância a 750 nm foi subtraído das leituras nos outros comprimentos de onda para corrigir o efeito da turbidez. A concentração de clorofila a foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Cla \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{(11.85 \times E_{664} - 1.54 \times E_{647} - 0.08 \times E_{630}) \times v}{V \times L}$$

onde E é a leitura do espectrofotômetro nos respectivos comprimentos de onda, corrigida pelo branco da cubeta e subtraída do valor a 750 nm (turbidez); v é o volume da alíquota no extrato de acetona (mL); V é volume de amostra filtrada (L) e L é o comprimento óptico da cubeta (cm).

3.7. Quantificação de lipídios

A quantificação de lipídios foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência com o corante Vermelho do Nilo. Os parâmetros utilizados na leitura da fluorescência dos cultivos de microalgas do gênero *Nannochloropsis*, como comprimentos de onda de excitação (480 e 530 nm) e de emissão (570 e 585 nm), tempo de exposição das amostras ao corante (15 minutos) e concentração do Vermelho do Nilo

nas amostras ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram com base em estudos da literatura (BONGIOVANI *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2009; ELSAYED *et al.*, 2017).

Para isso, alíquotas de 1 mL dos cultivos foram coletadas ao final de cada experimento e preservadas por congelamento a -20°C . Cada alíquota foi dividida em duas amostras de 0,5 mL, ressuspendidas em um agitador tipo vórtex (KASVI Basic) e, em seguida, adicionadas ao corante Vermelho do Nilo na concentração de $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sob baixa luminosidade. A mistura foi novamente agitada por um minuto no vórtex, após o que 200 μL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços de cor preta. As placas foram então inseridas em um leitor de microplacas Synergy H1 (Biotek) e deixadas em repouso por 15 minutos antes de passar pela leitura de fluorescência.

3.8. Análise estatística

Para a análise estatística, foram calculados os valores médios e os desvios-padrão para cada variável investigada. A homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados foram verificadas utilizando os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. As variáveis relacionadas à radiação fotossinteticamente ativa (PAR), temperatura, pH e densidade ótica foram analisadas por ANOVA de duas vias ($\alpha = 0,05$). Já as variáveis peso seco, clorofila, nitrato e fosfato foram analisadas por ANOVA de uma via ($\alpha = 0,05$). Ambas as análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. A fluorescência foi analisada por meio do teste não paramétrico de Friedman ($\alpha = 0,05$), seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. As análises foram realizadas no programa Graphpad Prism 10.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e temperatura

Nos Experimentos 1, 2 e 3 não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, nem ao longo dos dias de cultivo, em relação à radiação fotossinteticamente ativa (PAR). No Experimento 1, a média foi de $110,8 \pm 2,8 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; no Experimento 2, a média foi de $110,6 \pm 2,6 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; e no Experimento 3, a média foi de $110,5 \pm 2,5 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 9).

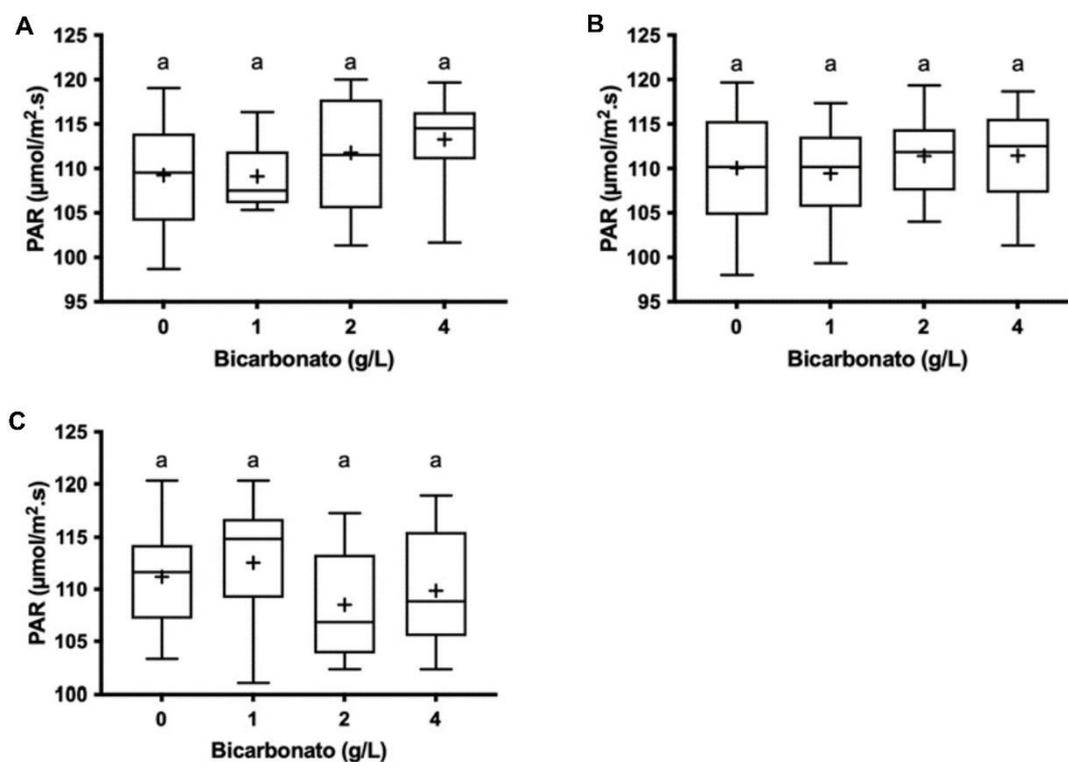


Figura 9: Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR) durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores expressos como média de 3 repetições \pm desvio padrão. Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), conforme ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Quanto à temperatura, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos nos três experimentos ($P > 0,05$), foi observado um pequeno aumento na temperatura ao longo do cultivo. Esse aumento foi devido à oscilação da temperatura na sala de cultivo (Figura 10).

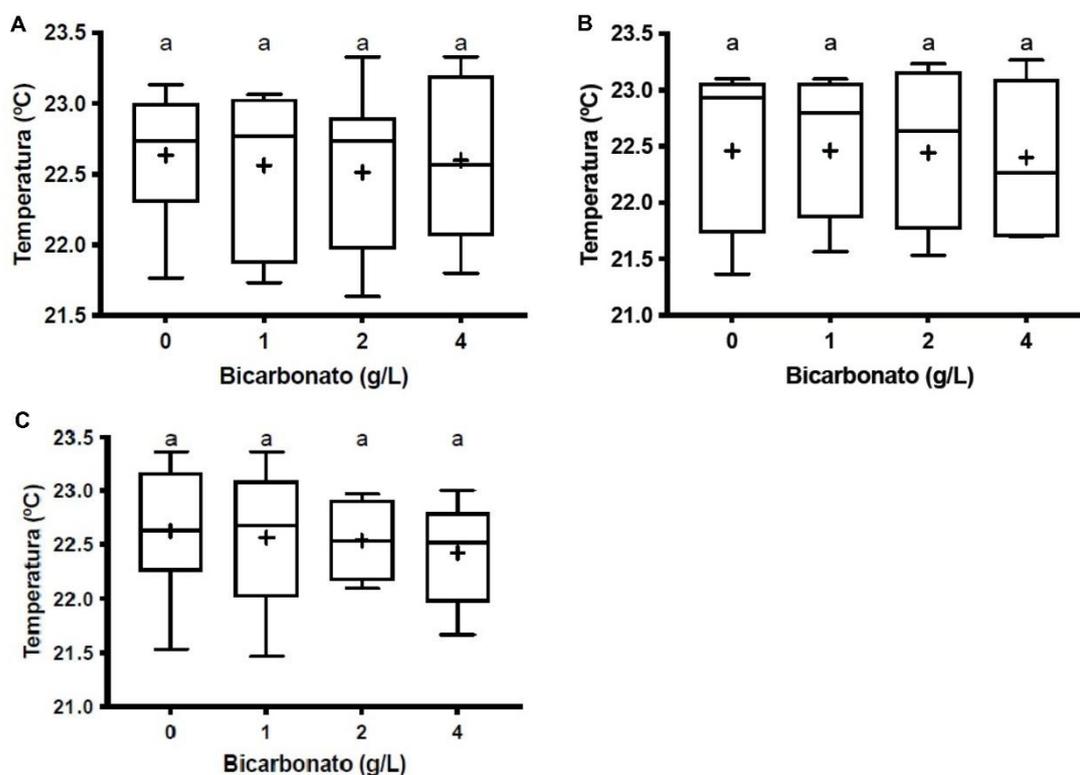


Figura 10: Temperatura durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores expressos como média de 3 repetições \pm desvio padrão. Letras sobrescritas iguais indicam ausência de diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), conforme ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.2. Avaliação do pH, crescimento e produção de biomassa

No início do cultivo, nos Experimentos 1 e 3, observou-se uma diferença significativa no pH entre os tratamentos ($P < 0,05$). No Experimento 2, no entanto, o pH

inicial não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), com um valor médio de $8,83 \pm 0,02$ (Figura 11).

No Experimento 1, o pH aumentou continuamente a partir do terceiro dia, alcançando um valor máximo de $10,55 \pm 0,01$ ao final do experimento, diferindo significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$). O pH máximo dos tratamentos foi de $10,51 \pm 0,04$, com valores superiores a 10 nos dias 3, 5, 7 e 9 para as concentrações de 0, 1, 2 e 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Notou-se que o tratamento com 0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, apesar de apresentar o menor crescimento em densidade ótica, registrou um aumento brusco de pH no terceiro dia. Em contraste, o tratamento com 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ exibiu o maior crescimento em densidade ótica e um aumento gradual do pH.

No Experimento 2, após a adição de bicarbonato, houve uma diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$), com um aumento mais acentuado do pH nas menores concentrações de bicarbonato (0, 1 e 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em comparação à concentração de 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 11c). Entretanto, o pH final foi semelhante entre os tratamentos, com um valor médio de $10,08 \pm 0,22$, apresentando diferença significativa apenas entre os tratamentos 0 e 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0,05$).

No Experimento 3, o pH ao final do cultivo foi mais alto no tratamento com 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 , atingindo $10,46 \pm 0,01$, diferindo significativamente dos outros tratamentos ($P < 0,05$). Similarmente aos experimentos anteriores, o tratamento com 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 demonstrou um aumento gradual do pH, enquanto o tratamento com 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentou um aumento mais brusco (Figura 11e).

O crescimento de *N. oceanica* está apresentado na Figura 11, com base na densidade ótica diária nas diferentes concentrações de bicarbonato de sódio.

No Experimento 1, a partir do quinto dia, o tratamento com concentração de 4 g·L⁻¹ se destacou dos demais, apresentando o maior crescimento, comportamento que se manteve até o final do experimento, com diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos outros tratamentos (Figura 11b). O crescimento do tratamento com 4 g·L⁻¹ estabilizou-se no nono dia, atingindo uma densidade ótica máxima de $1,302 \pm 0,019$ no décimo primeiro dia, e diminuiu ligeiramente para $1,286 \pm 0,108$ ao final do experimento. Os tratamentos com 1 g·L⁻¹ e 2 g·L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$) durante todo o experimento. Em contraste, o tratamento sem adição de bicarbonato apresentou o menor crescimento, estabilizando-se em $0,636 \pm 0,048$ no sétimo dia, e diferenciando-se significativamente dos demais tratamentos a partir do nono dia ($P < 0,05$).

No Experimento 2, o bicarbonato foi adicionado durante a fase exponencial de crescimento, no sétimo dia. Até a adição, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a densidade ótica ($P > 0,05$). Após a adição de bicarbonato, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$) e ao longo do experimento ($P < 0,05$). A densidade ótica seguiu um padrão semelhante ao do Experimento 1, com o tratamento de 4 g·L⁻¹ mostrando o maior crescimento, atingindo uma densidade ótica máxima de $1,249 \pm 0,058$ ao final do experimento (Figura 11d). Os tratamentos com 1 g·L⁻¹ e 2 g·L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas entre si após a adição de bicarbonato ($P > 0,05$), mas se diferenciaram dos demais a partir do nono dia, com um crescimento contínuo e uma densidade ótica máxima de $1,009 \pm 0,081$ ao final do experimento. O tratamento controle (0 g·L⁻¹) não apresentou crescimento significativo após o quinto dia, estabilizando-se em $0,692 \pm 0,022$ até o fim do experimento.

No Experimento 3, a densidade ótica inicial não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Contudo, ao longo do tempo, os tratamentos com 2 e 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram maior crescimento, atingindo uma densidade ótica máxima de $1,049 \pm 0,046$ ao final do experimento, sem diferenças significativas entre eles (Figura 11f). Em contraste, as microalgas submetidas aos tratamentos sem bicarbonato e à menor concentração ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) exibiram baixo crescimento, entrando na fase estacionária no quinto dia de cultivo e permanecendo nessa fase até o final do experimento, com densidades óticas de $0,626 \pm 0,024$ e $0,770 \pm 0,052$, respectivamente.

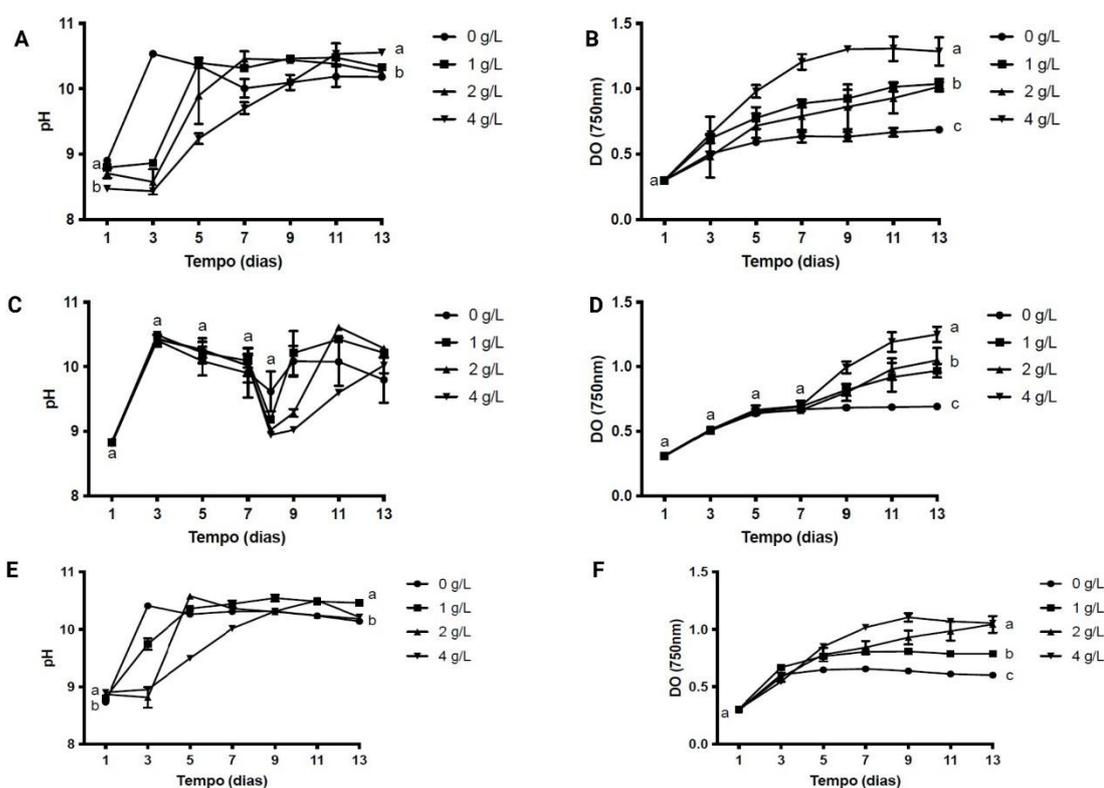


Figura 11: pH e densidade celular através da absorbância na densidade ótica (DO 750nm) durante o cultivo de *N. oceanica* com bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A-B) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (C-D) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (E-F) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

A biomassa seca (expressa em peso seco) foi significativamente diferente entre todos os tratamentos nos três experimentos (Figura 12). No Experimento 1, os tratamentos com 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹ atingiram os maiores valores de biomassa ao final do experimento (1.638 ± 113 mg·L⁻¹), sem diferenças significativas entre eles (P < 0,05). O tratamento com 1 g·L⁻¹ resultou em 1.157 ± 199 mg·L⁻¹, enquanto o tratamento sem bicarbonato (0 g·L⁻¹) apresentou o menor valor de biomassa, com 673 ± 81 mg·L⁻¹ (Figura 12a).

No Experimento 2, o tratamento com 4 g·L⁻¹ atingiu o maior valor de biomassa ao final do experimento, 1.637 ± 115 mg·L⁻¹, seguido pelo tratamento com 2 g·L⁻¹, que alcançou 1.147 ± 115 mg·L⁻¹. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos (P > 0,05). O tratamento sem bicarbonato (0 g·L⁻¹) novamente apresentou o menor valor de biomassa, com 473 ± 91 mg·L⁻¹ (Figura 12b).

No Experimento 3, os tratamentos com 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹ resultaram nas maiores produções de biomassa (1.554 ± 159 mg·L⁻¹), enquanto o tratamento sem bicarbonato (0 g·L⁻¹) apresentou a menor produção, com 357 ± 8 mg·L⁻¹ (Figura 12c).

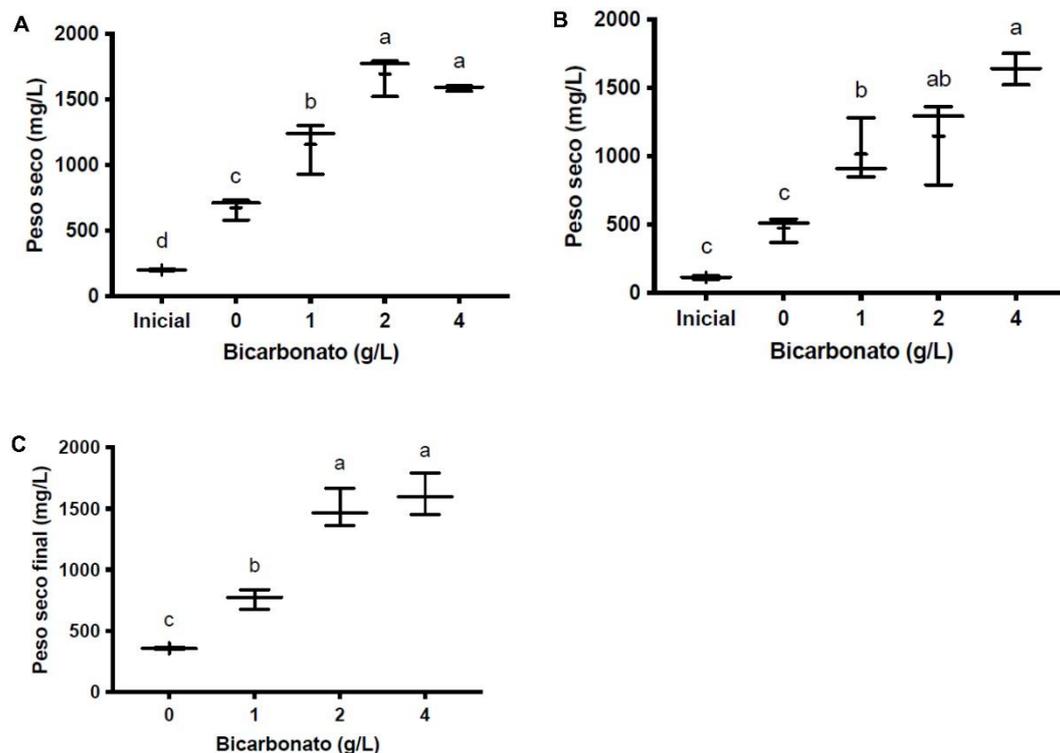


Figura 12: Peso seco da biomassa de *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.3. Análise de nitrato e fosfato

No Experimento 1, as concentrações iniciais e finais de nitrato foram de $3,833 \pm 0,153 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,217 \pm 0,178 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, indicando um consumo significativo do nitrato (Figura 13a). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Em relação ao fosfato, a concentração inicial foi de $0,547 \pm 0,042 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, e foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Os tratamentos 0 e $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram uma concentração final de $0,022 \pm 0,013 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, significativamente diferente do tratamento com $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que

teve o menor consumo ($0,140 \pm 0,079 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento com $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ não apresentou diferença significativa em relação aos outros tratamentos (Figura 13b).

No Experimento 2, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o nitrato ($P > 0,05$), mas observou-se uma redução significativa ao longo do tempo ($P < 0,05$). O comportamento do consumo de fosfato foi semelhante ao do nitrato, sem diferenças significativas entre os tratamentos em relação às diferentes concentrações de bicarbonato ($P > 0,05$), mas houve um declínio nas concentrações de fosfato ao longo dos dias de cultivo (Figura 13d).

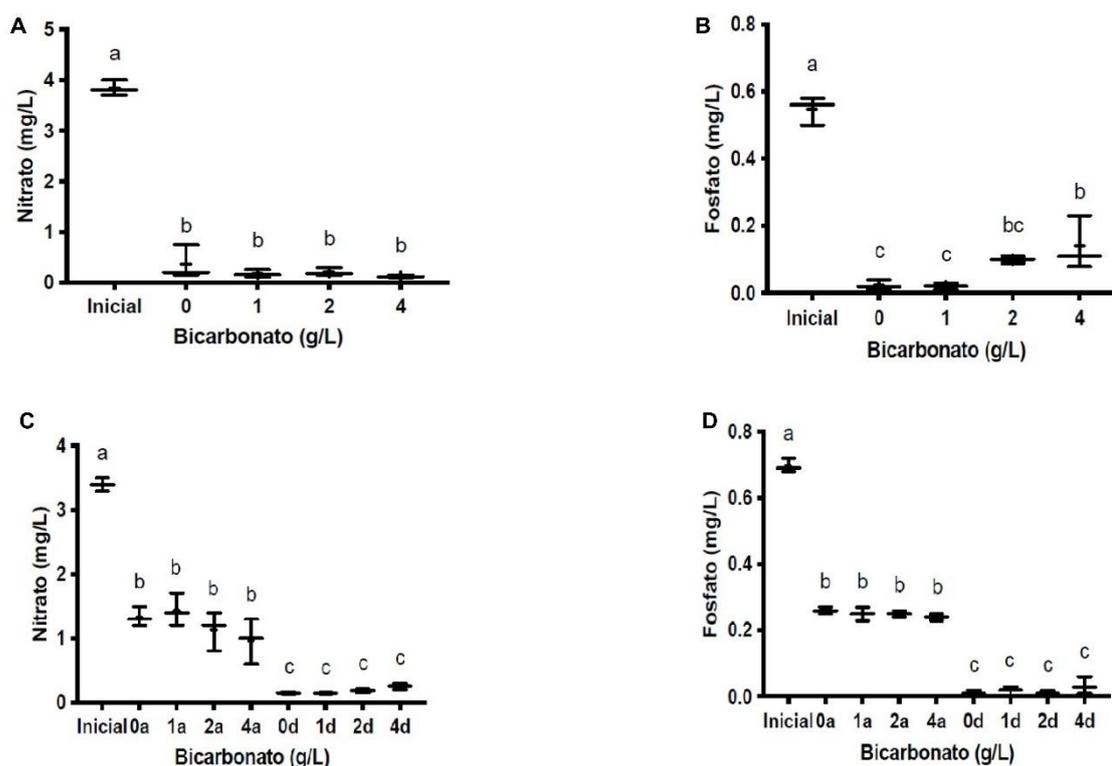


Figura 13: Efeito da adição de bicarbonato de sódio no consumo de nitrato e fosfato durante o cultivo de *N. oceanica*. (A e B) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com inóculo não aclimatado. (C e D) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Os gráficos do experimento 2 trazem: o valor

médio inicial do nutriente no cultivo; os valores médios de cada tratamento, ao 7º dia de cultivo, imediatamente antes da suplementação (sinalizados por 0a, 1a, 2a, 4a); e os valores médios de cada tratamento ao final do cultivo (sinalizados por 0d, 1d, 2d, 4d). Os números no eixo das abscissas (0, 1, 2 e 4) representam os tratamentos (0, 1, 2, 4 g·L⁻¹, respectivamente) e as letras representam as coletas feitas antes (a) e depois (d) da adição bicarbonato.

No Experimento 3, as concentrações iniciais de nitrato não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, ao final do experimento, o tratamento sem adição de bicarbonato (0 g·L⁻¹) apresentou a maior concentração de nitrato ($0,733 \pm 0,115$ mg·L⁻¹), significativamente diferente do tratamento com 2 g·L⁻¹, que teve a menor concentração ($0,200 \pm 0,100$ mg·L⁻¹) (Figura 14). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos com 1 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹ ($P > 0,05$).

As concentrações iniciais de fosfato também não diferiram significativamente ($P > 0,1772$). Ao final, apenas os tratamentos sem bicarbonato ($0,273 \pm 0,061$ mg·L⁻¹) e com 4 g·L⁻¹ ($0,160 \pm 0,010$ mg·L⁻¹) mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si (Figura 14).

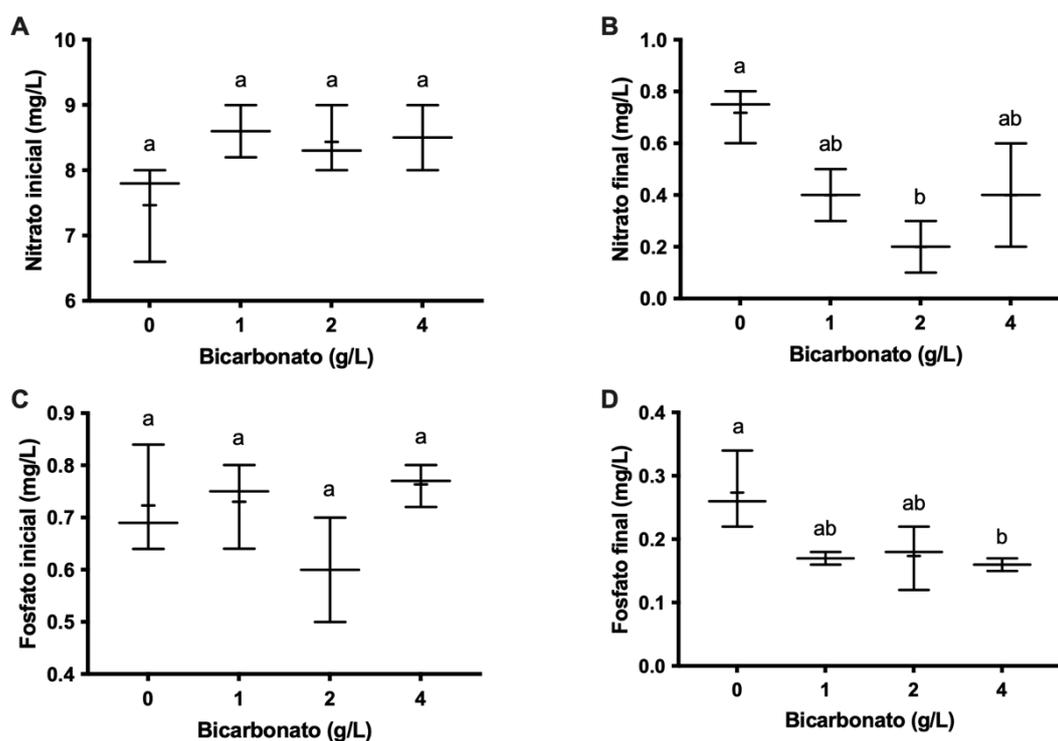


Figura 14: Efeito da adição de bicarbonato no consumo dos nutrientes nitrato e fosfato no cultivo de *N. oceanica* no Experimento 3. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Diferente dos demais testes, o experimento 3 conta com 4 valores médios iniciais para os nutrientes, um por tratamento (visto que eram distintos entre si também em função da aclimação dos inóculos ao bicarbonato). Assim, para melhor compreensão, valores iniciais e finais dos nutrientes estão representados em gráficos distintos.

4.4. Determinação de clorofilas

No Experimento 1, a adição de bicarbonato não resultou em diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$), com uma produção média de clorofila a de $1,177 \pm 0,314 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 15a).

No Experimento 2, foram observadas diferenças na produção de clorofila a entre os tratamentos. Os tratamentos sem bicarbonato ($0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e com $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresentaram as maiores produções, com uma média de $1,317 \pm 0,394 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sem diferenças estatísticas significativas entre eles ($P > 0,05$). O tratamento com $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ produziu $0,798 \pm 0,192$

mg·L⁻¹ de clorofila a, sendo estatisticamente semelhante ao tratamento com 2 g·L⁻¹ (Figura 15b).

No Experimento 3, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$), com uma produção média de clorofila a de $1,841 \pm 0,54$ mg·L⁻¹ (Figura 15c).

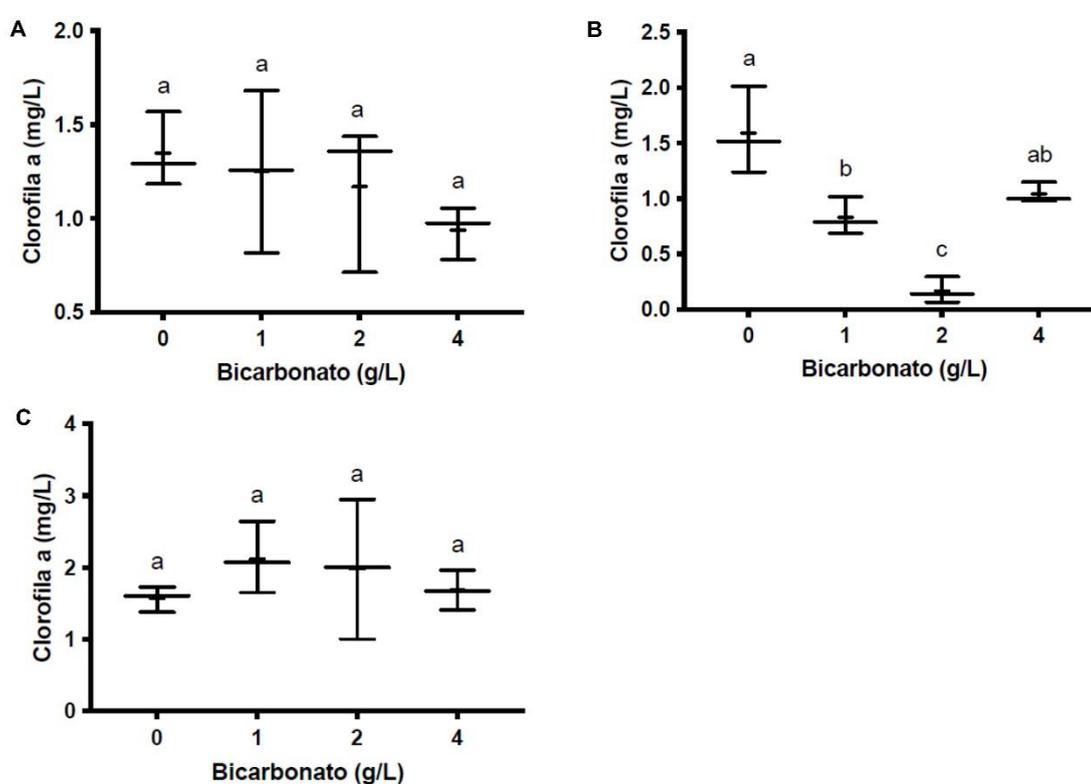


Figura 15: Clorofila a na biomassa de *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4.5. Quantificação de lipídios

No Experimento 1, os tratamentos com 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹ apresentaram as maiores médias de fluorescência (1.914 ± 312 ua·mL⁻¹), sem diferença significativa entre eles (P > 0,05). Os tratamentos com 0 g·L⁻¹ e 1 g·L⁻¹ apresentaram médias inferiores (792 ± 168 ua·mL⁻¹) (Figura 16).

No Experimento 2, os tratamentos com 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹ novamente exibiram as maiores médias de fluorescência (1.538 ± 261 ua·mL⁻¹), sem diferença significativa entre eles (P > 0,05). Os tratamentos com 0 g·L⁻¹ e 1 g·L⁻¹ continuaram a apresentar médias inferiores (814 ± 175 ua·mL⁻¹).

No Experimento 3, o tratamento com 4 g·L⁻¹ resultou na maior fluorescência (9.413 ± 1.052 ua·mL⁻¹), seguido pelo tratamento com 2 g·L⁻¹ (4.947 ± 1.357 ua·mL⁻¹), ambos diferindo significativamente entre si (P < 0,05). Os tratamentos com 0 g·L⁻¹ e 1 g·L⁻¹ apresentaram as menores médias (1.249 ± 264 ua·mL⁻¹), sem diferença significativa entre eles (P > 0,05).

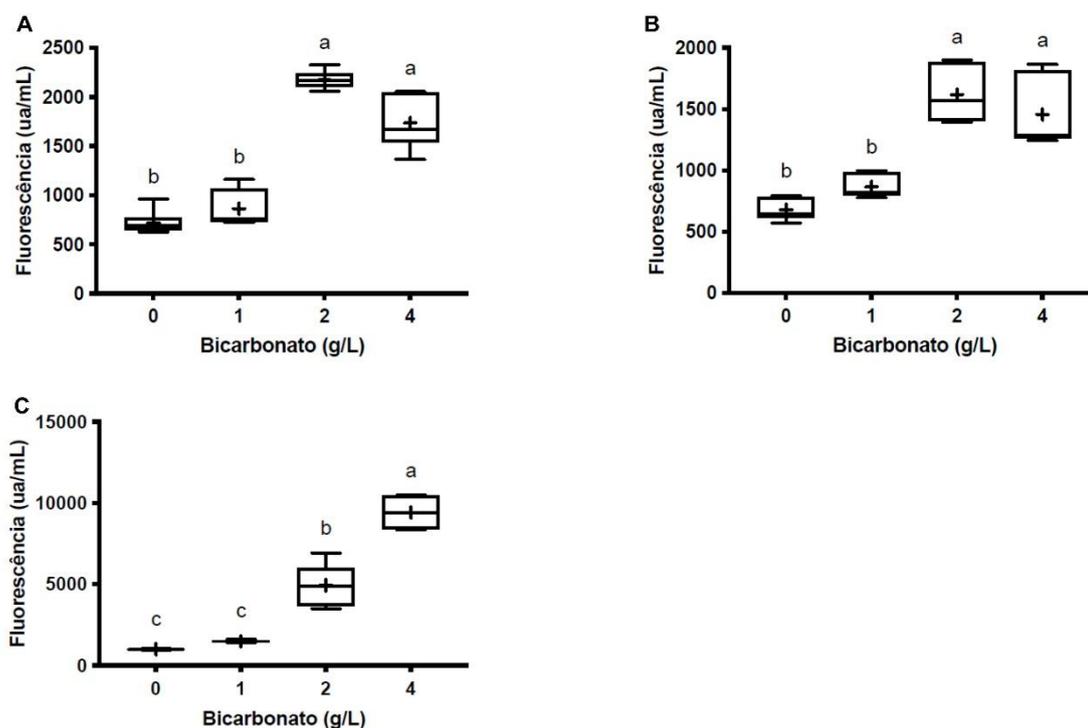


Figura 16: Produção de lipídios em *N. oceanica* cultivada em bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânico. (A) Experimento 1: bicarbonato de sódio adicionado no início do cultivo, com um inóculo não aclimatado. (B) Experimento 2: adição no sexto dia, durante a fase exponencial, com inóculo não aclimatado. (C) Experimento 3: bicarbonato adicionado no início, com inóculo previamente aclimatado. Valores com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito no crescimento

Pesquisas que se propuseram a investigar o efeito do bicarbonato como fonte carbono inorgânico suplementar em cultivos de microalgas do gênero *Nannochloropsis* apontaram benefícios em parâmetros de crescimento e composição bioquímica (WHITE *et al.*, 2013; NUNEZ; QUIGG, 2016; PEDERSEN *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2019, ABUGRARA *et al.*, 2020; SALBITANI *et al.*, 2021). No entanto, a concentração de NaHCO_3 apropriada, demonstrou ser particular a cada espécie e até dependente da cepa

(NUNEZ; QUIGG, 2016), o que reforça a necessidade de ampliar e aprofundar as investigações quanto à esta estratégia de cultivo.

No caso deste estudo, verificou-se a influência do NaHCO_3 no crescimento e no conteúdo de lipídios e clorofila *a* de *Nannochloropsis oceanica*, a partir do início da fase de latência, tanto para cultivos com inóculo aclimatado quanto não aclimatado (Experimentos 3 e 1, respectivamente), e a partir do 7º dia de cultivo (fase de crescimento exponencial) para cultivos com inóculo não aclimatado (Experimento 2). Como principal resposta ao crescimento, todos os tratamentos com adição do bicarbonato, nos três testes, foram superiores ao controle (sem suplementação) em relação à densidade ótica dos cultivos, e o tratamento de maior concentração ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou 48 mM) foi o que resultou nas maiores densidades em todos os casos. A maior densidade ótica ($0,66 \pm 0,02$) também é observada na mais alta concentração de NaHCO_3 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aplicada por NUNEZ; QUIGG (2016) em cultivos *Nannochloropsis salina*, na primeira fase de seu experimento. O mesmo ocorre em SALBITANI *et al.* (2021) para *Nannochloropsis oculata* à 60 mM ($\sim 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e YUAN *et al.* (2019), para uma cepa de *N. oceanica*, à $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (embora esta concentração seja inferior às máximas empregadas nos trabalhos supracitados, inclusive este). Já WHITE *et al.* (2013), ao testar *N. salina*, obtiveram maior contagem de células em $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 , enquanto a maior concentração que utilizaram ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) resultou em uma contagem inferior à do controle.

NUNEZ; QUIGG (2016) e YUAN *et al.* (2019) também registraram um padrão de adensamento diretamente proporcional à concentração de NaHCO_3 no meio. Algo similar à essa tendência foi observado aqui: apesar de haver tratamentos estatisticamente iguais em todos os testes, o crescimento acentuou-se em direção a maiores concentrações de NaHCO_3 .

WHITE *et al.* (2013) ainda notaram que a *N. salina* sob a mais alta concentração de bicarbonato expressou longos períodos (cerca de 2 dias) de fase de latência (fase *lag*). Em contraponto, esta pesquisa verificou a supressão da fase *lag* em todos os tratamentos, inclusive o controle, nos três experimentos, o que supomos estar relacionado ao uso de inóculos em fase exponencial para o preparo dos cultivos experimentais.

Quanto ao peso seco, apesar das equivalências entre alguns tratamentos, a tendência de aumento em direção às maiores concentrações de bicarbonato foi verificada em todos os testes, reforçando que o bicarbonato, realmente, proporciona aumento da biomassa de *N. oceanica*. Contudo, em todos os experimentos, os maiores resultados verificados foram dos tratamentos 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹, que não apresentam distinção estatística entre si em nenhum teste. Isto corrobora com a densidade ótica do Experimento 3, que não tem diferenças significativas entre esses dois tratamentos, mas contrasta com a densidade ótica dos Experimentos 1 e 2, onde o tratamento 4 g·L⁻¹ se sobressai a todos os outros. É possível que isto seja consequência de uma variação mais evidente na composição celular dos organismos de um tratamento em relação aos de outro, resultando em peso secos equivalentes para os tratamentos 2 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹.

Em seu estudo sobre a composição celular de *Nannochloropsis sp.* sob diferentes irradiâncias em cultivos semicontínuos, FÁBREGAS *et. al* (2004) relatam ter obtido no tratamento à 80 μmol.m⁻².s⁻¹ o dobro do peso seco celular (pg·célula⁻¹) do tratamento à 220 μmol.m⁻².s⁻¹, porém os valores não foram informados. Isso se refletiu na produtividade, ao ponto de os dois tratamentos apresentarem valores relativamente próximos (285.06 ± 0.43 mg·L⁻¹.dia⁻¹ e 376.00 ± 0.38 mg·L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente), mesmo tendo densidades celulares distintas (41,45 ± 1,07×10⁶ células·mL⁻¹ e 116,71 ± 0,56×10⁶ cells·mL⁻¹, respectivamente). Assim, também aqui seria possível que o peso

celular no tratamento $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fosse superior ao do tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, tornando os pesos secos equivalentes, ainda que a densidade ótica à $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ tenha sido significativamente maior. No entanto, isto só poderá ser comprovado através de novas análises quantitativas para a composição bioquímica das células em cada tratamento e da conclusão da contagem celular.

5.2. Efeito no pH

O comportamento do pH foi condizente tanto com a adição do bicarbonato, quanto com o próprio crescimento dos cultivos. O aumento do pH em cultivos de microalgas é uma consequência natural da fixação do carbono inorgânico no processo de fotossíntese (WHITE *et al.* 2013) e ocorreu de maneira muito característica nos diferentes tratamentos. O tratamento com maior suplementação ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) demonstrou, em todos os ensaios, uma evolução gradual do pH a partir da inserção do bicarbonato, o que sugere um aumento da alcalinidade à níveis capazes de acentuar, consideravelmente, o tamponamento do meio e, assim, conter variações bruscas no pH, observadas nos outros tratamentos.

Ao atingir pH superior à 10,3, a espécie carbônica prevalente nos cultivos passaria a ser o carbonato (BOYD, 2015), que, diferente do bicarbonato, não é de fácil utilização na fotossíntese, se tornando um fator limitante a ela e ao crescimento da biomassa (CHEN; DURBIN, 1994). Assim, o lento aumento do pH no tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ parece ter sido o fator preponderante para permitir densidades óticas mais elevadas na maior parte do período de cultivo em todos os testes, uma vez que garantiu maior tempo de permanência da alga em meio, predominante, rico em bicarbonato (pH alcalino até 10,3, conforme BOYD, 2015).

Todos os cultivos não suplementados (controle de todos os testes e todas as unidades do teste 2 até o dia 7) sofreram elevações acentuadas de pH rapidamente, atingindo picos próximos à 10,5, ou até maiores, a partir do dia 3, o que foi seguido de redução no crescimento. No Experimento 2 isto é tão evidente que os cultivos entram em fase estacionária no dia 5, voltando a crescer apenas nos tratamentos suplementados, logo após a adição do bicarbonato.

5.3. Efeito no consumo de nutrientes

O envolvimento do bicarbonato na absorção ativa de nutrientes, acumulação de lipídios e carboidratos nas microalgas ainda não está claro (PANCHA *et al.*, 2015). WHITE *et al.* (2013) perceberam que a adição de carbono inorgânico pode ter impulsionado o aumento da demanda metabólica por nitrogênio em *N. salina*, não, necessariamente, resultando em melhor crescimento das culturas, mas, possivelmente, contribuindo com o aumento da síntese de lipídios e pigmentos. Isto contrasta com o consumo de nitrogênio nos Experimentos 1 e 2 (inóculos não aclimatados e suplementação nos dias 1 e 7, respectivamente) por *Nannochloropsis oceanica* neste trabalho, já que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Sendo assim, nestes testes, a adição de bicarbonato não demonstrou influenciar a captação de nitrogênio por esta cepa de *N. oceanica*, nem em consequência de algum mecanismo de absorção e utilização do bicarbonato, nem pelos elevados valores de pH registrados nos cultivos e suas variações entre tratamentos e ao longo do tempo.

No Experimento 3 (inóculo aclimatado com suplementação no dia 1), mesmo o consumo de nitrogênio do tratamento 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sendo superior ao do controle, isto não pareceu representar um aumento na demanda por nitrogênio em razão de um maior

crescimento do cultivo, já que a densidade ótica para este tratamento é equivalente à do tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P = 0,9767$), que, assim como o tratamento $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, não apresentou variações significativas para o consumo de nitrato em relação aos demais tratamentos. Outro indício de que o consumo de nitrato do tratamento $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ não tem relação com o crescimento, é o fato de que, mesmo que os tratamentos $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (estatisticamente equivalentes) tenham apresentado a densidade ótica máxima do Experimento 3, esta foi inferior às máximas dos Experimentos 1 e 2, onde não foram observadas variações no consumo do nitrato. Em outras palavras, nenhum resultado corrobora com a ideia de maior demanda por nitrogênio para ganho de biomassa no tratamento $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ do Experimento 3, sendo o maior consumo uma possível resposta adaptativa ao estresse alcalino, em busca de direcionar os recursos do meio para produção de pigmentos e/ou armazenamento energético.

Quanto ao fosfato, o conteúdo remanescente aponta diferenças de consumo nos três experimentos que parecem ser consequências da alcalinidade nos cultivos. No Experimento 1, apesar de uma concentração final baixa, o consumo na maior concentração de bicarbonato (tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi significativamente inferior ao dos tratamentos 0 e $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que eram estatisticamente iguais entre si. É possível que, pelo fraco tamponamento nas mais baixas concentrações de bicarbonato, o cultivo do tratamento controle do teste 1 tenha requerido uma quantidade ligeiramente maior de nutriente desde os primeiros dias de cultivo para sustentar tanto a fotossíntese, quanto a adaptação ao estresse alcalino, ao qual tinha começado a ser submetida. Enquanto isso, para o experimento 3, também suplementado no primeiro dia, o controle é que teve consumo inferior ao do tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aparentemente, por conta do baixo ganho de biomassa em decorrência do estresse. Percebe-se que após o pico de pH ao 3º dia, o

cultivo segue praticamente estagnado, não atingindo sequer 0,7 de D.O. Sendo assim, não havia algas o suficiente para captar tanto fosfato quanto o tratamento $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sem contar na possibilidade da sua eficiência fotossintética também ter sido comprometida pelo estresse alcalino.

No Experimento 2, assim como para o nitrato, apenas o tempo de cultivo influenciou o consumo do fosfato. As diferentes adições de bicarbonato não alteraram a utilização do nutriente pela microalga, que beirou o esgotamento do nutriente. Isto é justificável, já que a maior parte da captação do recurso ocorreu durante os dias sem suplementação, onde os cultivos eram idênticos. O consumo continuou ocorrendo entre o 7º e o 13º dia de experimento, porém, só pode ser convertido em ganho de biomassa nos tratamentos suplementados.

As respostas do Experimento 2 apontam a divergência entre os resultados desta pesquisa e os de WHITE *et al.* (2013). Eles perceberem que o fosfato foi esgotado em todas as culturas, ao contrário do nitrato, e então o entenderam como o nutriente limitante, cuja depleção interrompeu o crescimento de *N. salina*. Aqui, constatamos que o crescimento de *N. oceanica* chegou a ser interrompido bem antes do completo esgotamento do nutriente (ao 5º dia do teste 2, na etapa sem suplementação), estando, portanto, a limitação do crescimento mais vinculada ao pH nesta pesquisa.

5.4. Efeito na clorofila *a*

Nos Experimentos 1 e 3, com adição de bicarbonato logo no primeiro dia de cultivo, a clorofila *a* não variou entre os tratamentos. Contudo, o Experimento 3, com aclimatação prévia, alcançou uma produção média de clorofila *a* superior à do Experimento 1 (sem aclimatação), mesmo apresentando crescimento inferior (densidade

ótica máxima de $1,302 \pm 0,019$ e $1,049 \pm 0,046$ para os testes 1 e 3, respectivamente). Isto pode sugerir que a adaptação, reduziu a influência do estresse alcalino sobre os cloroplastos, diminuindo o efeito deletério no pigmento.

WHITE *et al.* (2013) encontraram uma relação similar para *N. salina* entre os tratamentos de seu teste sem depleção de nutrientes, onde o tratamento com bicarbonato à $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (maior suplementação), apesar dos maiores níveis de pigmentos totais ($36,7 \pm 3,5 \text{ fg}\cdot\text{célula}^{-1}$, sendo $24,5 \pm 2,5 \text{ fg}\cdot\text{célula}^{-1}$ de clorofila *a*), tinha a menor taxa fotossintética ($0,52 \pm 0,00$ em comparação com $0,54 \pm 0,00$ e $0,59 \pm 0,01 F_v/F_m$ para os tratamentos 0 e $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) e crescimento reduzido ($1,04 \pm 0,03 \times 10^6 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$) em comparação com o tratamentos $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,22 \pm 0,04 \times 10^6 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$) e $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,07 \pm 0,02 \times 10^6 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$), o que lhes levou a cogitar uma dissociação entre o conteúdo de pigmento celular e a eficiência fotossintética à essa concentração de bicarbonato.

Uma outra hipótese para a compreensão dos resultados de clorofila *a* seria a provável limitação da técnica de extração utilizada, uma vez que esta metodologia depende da ação eficiente do solvente sobre as células retidas na filtração e que essa eficiência poderia ser comprometida por diversos fatores, incluindo: as condições de armazenamento das microalgas antes da análise, o solvente escolhido, a duração da extração, o número de etapas da análise, a formação de produtos de degradação pela exposição excessiva à luz, oxigênio, altas temperaturas e condições ácidas ou básicas, o uso (ou não) de uma técnica de ruptura celular e o estágio de crescimento do cultivo (HOSIKIAN *et al.*, 2010).

5.5. Efeito na produção lipídica

Neste trabalho, a fluorescência lipídica média registrada para *N. oceanica* acentuou-se com o aumento da suplementação do bicarbonato, embora os tratamentos de maior concentração (2 e 4 g·L⁻¹) não apresentem diferenças significativas entre si nos Experimentos 1 e 2. Contudo, por ora, os dados não nos permitem afirmar que isto, de fato, represente um aumento da lipogênese em *N. oceanica* ao invés de apenas ser consequência do aumento de biomassa. De todo modo, o aumento de lipídios pela adição do bicarbonato parece ser uma resposta comum de microalgas do gênero *Nannochloropsis*, sendo observada para *N. oceanica* (com fluorescência relativa máxima de ~5 ua·L⁻¹ nos tratamentos 1 e 2 g·L⁻¹ de NaHCO₃ em comparação com os ~2 ua·L⁻¹ no controle) por YUAN *et al.* (2019), e para *N. salina* em NUNEZ; QUIGG (2016), onde foi registrada uma diferença de dez vezes entre o controle e o tratamento com maior concentração de NaHCO₃ (5,0 g·L⁻¹) ao final da fase lipídica (13.414 ± 549 e 130.996 ± 8455 ua·DO⁻¹, respectivamente).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que a adição de bicarbonato favoreceu o crescimento desta microalga e sua produção de lipídios. Os tratamentos, 2 e 4 g·L⁻¹, apresentaram os melhores resultados de crescimento em todos os experimentos, contudo, o confronto dos dados de densidade ótica, peso seco e consumo de nutrientes fornece uma leitura inconclusiva sobre qual seria o mais destacado entre eles. Deste modo, torna-se mais coerente apontar o tratamento 2 g·L⁻¹ como o mais interessante para ganho de biomassa, visando melhor relação custo-benefício. O crescimento superior nas maiores

concentrações de bicarbonato empregadas também evidencia a boa tolerância de *N. oceanica* à suplementação dessa fonte de carbono inorgânico.

Sobre as estratégias de cultivo testadas, levando em conta a prevalência dos tratamentos com suplementação sobre os controles de cada teste, considera-se que as três foram efetivas para o crescimento e produção de lipídeos de *Nannochloropsis oceanica*. Não foi avaliado se havia diferença estatística entre elas, porém o comportamento da densidade ótica e das fluorescências lipídicas do experimento 3, em comparação com os demais experimentos, sugere que a inclusão de uma aclimatação pode não ter sido tão interessante para o rendimento de biomassa, mas pode ser a melhor estratégia para a produção de lipídeos.

Quanto às melhores concentrações para acumulação dos lipídeos, novamente, os tratamentos 2 e 4 g·L⁻¹ geraram os melhores resultados, sendo equivalentes entre si nos testes 1 e 2 e distinguindo-se apenas no teste 3 (no qual prevaleceu o tratamento 4 g·L⁻¹). Em outras palavras, 2 g·L⁻¹ de bicarbonato é a suplementação mais adequada para promover a produção de lipídeos em cultivos não aclimatados de *N. oceanica*, mas 4 g·L⁻¹ gera um rendimento, consideravelmente, maior em cultivos aclimatados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Assim como outros trabalhos que se propuseram a compreender a resposta de microalgas do gênero *Nannochloropsis* à suplementação do bicarbonato de sódio, esta pesquisa conseguiu evidências da melhora no crescimento e produção de lipídeos de *N. oceanica*, mas não reuniu as informações necessárias para esclarecer o mecanismo, ou os mecanismos, que levaram estes resultados. Seria necessário, incluir análises que sinalizassem o início e a evolução do estresse nas algas para determinar com precisão os

gatilhos para a lipídogenese e para um rendimento de biomassa tão superior ao controle. Como exemplo, o monitoramento da eficiência fotossintética, da presença de espécies reativas de oxigênio, e até mesmo da enzima anidrase carbônica nas células seriam inclusões interessantes.

Adicionar à pesquisa a contagem celular e análises mais profundas sobre a composição das algas, como a avaliação do conteúdo de proteínas, carboidratos, carotenoides e a caracterização do perfil de lipídico, acrescentaria precisão e consistência aos resultados e ajudaria a direcionar a técnica de produção empregada para aplicações específicas. E mesmo análises aqui contempladas poderiam ser mais bem aproveitadas se aplicadas ao longo de todo o período de cultivo (por exemplo, as análises de peso seco, clorofila *a* e nutrientes), embora tenha sido necessário executá-las como foram, considerando as limitações de um experimento em escala laboratorial (sobretudo o volume dos cultivos).

Assim, o desafio de novas investigações como esta será alcançar a robustez necessária para, finalmente, elucidar a estratégia que confere às *Nannochloropsis* sua destacada eficiência de produção sob adição do bicarbonato, o que exigirá não apenas mais análises e o monitoramento de algumas variáveis em todo o cultivo, mas também a ampliação da escala de produção para verificar se os resultados observados em laboratório se mantêm em condições de produção industrial/comercial.

8. REFERÊNCIAS

ABUGRARA, A. M. *et al.* Effect of Various Bicarbonate Supplements on Biodiesel Production and Valuable Biochemical Components of the Marine Eustigmatophyceae *Nannochloropsis oculata* (Droop). **Egyptian Journal of Botany**,

Cairo, v. 60, n. 3, p. 785-796, 2020. DOI 10.21608/EJBO.2020.27849.1492. Disponível em: https://ejbo.journals.ekb.eg/article_102374.html. Acesso em: 11 ago. 2024.

AMINOT, A.; CHAUSSEPIED, M. **Manuel des analyses chimiques en milieu marin**. Paris: Centre national pour l'exploitation des océans, 1983. 395 p.

ANDERSEN, R. A. *et al.* Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. **Protist**, Boothbay Harbor, v. 149, n. 1, p. 61–74, 1998. DOI 10.1016/S1434-4610(98)70010-0. Disponível em: <https://www.science-direct.com/science/article/abs/pii/S1434461098700100>. Acesso em: 19 jul. 2024.

ANTO, S. *et al.* Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. **Chemosphere**, [s.l.], v. 242, p. 125079, 2020. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.125079. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519323185>. Acesso em: 15 jul. 2024.

BAHI, A. *et al.* Microalgae with immunomodulatory effects on fish. **Reviews in Aquaculture**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 1522–1539, 2023. DOI 10.1111/raq.12792. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12792>. Acesso em: 15 jul. 2024.

BARBOSA, M. *et al.* The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. **Applied Phycology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 99-120, 2023. DOI 10.1080/26388081.2023.2222318. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/26388081.2023.2222318>. Acesso em: 14 jul. 2024.

BONGIOVANI, N. *et al.* Biorefinery Approach from *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978: Neutral Lipid and Carotenoid Co-Production Under Nitrate or Phosphate Deprivation. **BioEnergy research**, Saltillo, v. 13, p. 518-529, 2020. DOI 10.1007/s12155-019-10045-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-019-10045-2#citeas>. Acesso em: 6 ago. 2024.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of applied phycology**, [s.l.], v. 25, p. 743-756, 2013. DOI 10.1007/s10811-013-9983-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-9983-9>. Acesso em: 19 jul. 2024.

BOYD, C. E. Water Quality: An Introduction. 2. ed. Springer International Publishing, 2015.

CERRI, R. *et al.* Chemical composition and apparent digestibility of a panel of dried microalgae and cyanobacteria biomasses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s.l.], v. 544, p. 737075, 2021. DOI 10.1016/j.aquaculture.2021.737075. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848621007389>. Acesso em: 19 jul. 2024.

CHEN, W. *et al.* A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of microbiological methods**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 41-47, 2009. DOI 10.1016/j.mimet.2009.01.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701209000037>. Acesso em: 6 ago. 2024.

CHEN, Y. C.; DURBIN, E.G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology-Progress Series**, [s.l.], v. 109, p. 83-94, 1994. Disponível em: <https://www.int-res.com/articles/meps/109/m109p083.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2024.

CHUA, E. T. *et al.* Cold and dark treatments induce omega-3 fatty acid and carotenoid production in *Nannochloropsis oceanica*. **Algal Research**, [s.l.], v. 51, p. 102059, 2020. DOI 10.1016/j.algal.2020.102059. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926420305300>. Acesso em: 19 jul. 2024.

DE LUCA, M. *et al.* Lipids from Microalgae for Cosmetic Applications. **Cosmetics**, Basel, v. 8, n. 2, p. 52, 2021. DOI 10.3390/cosmetics8020052. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/2/52>. Acesso em: 15 jul. 2024.

ELSAYED, K. N. M. *et al.* Imaging the accumulated intracellular microalgal lipids as a response to temperature stress. **3 Biotech**, [s.l.], v. 7, p. 1-8, 2017. DOI 10.1007/s13205-017-0677-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0677-x#citeas>. Acesso em: 6 ago. 2024.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven Biologia vegetal**. Tradução: Ana Cláudia M. Vieira *et al.* 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 2720 p.

FÁBREGAS, J. *et al.* The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 31-35, 2004. DOI 10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed#citeas>. Acesso em: 12 ago. 2024.

GOHARA-BEIRIGO, A. K. *et al.* Microalgae trends toward functional staple food incorporation: Sustainable alternative for human health improvement. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 125, p. 185-199, 2022. DOI 10.1016/j.tifs.2022.04.030. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224422001601>. Acesso em: 15 jul. 2024.

GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *In*: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (eds). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Boston: Springer, 1975. *E-book*. parte 1, p. 29–60. DOI 10.1007/978-1-4615-8714-9_3. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8714-9_3#citeas. Acesso em: 29 jul. 2024.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 214–228, 2024. DOI 10.1111/jpy.13431. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpy.13431>. Acesso em: 14 jul. 2024.

HERNÁNDEZ, H. *et al.* Innovative and Healthier Dairy Products through the Addition of Microalgae: A Review. **Foods**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 755, 2022. DOI 10.3390/foods11050755. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/5/755>. Acesso em: 15 jul. 2024.

HOSIKIAN, A. *et al.* Extração de clorofila de microalgas: uma revisão sobre aspectos de engenharia de processos. **Revista internacional de engenharia química**, [s.l.], v. 2010, n. 1, pág. 391632, 2010. DOI 10.1155/2010/391632. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2010/391632>. Acesso em: 03 set. 2024.

HU, J. *et al.* Emerging technologies for advancing microalgal photosynthesis and metabolism toward sustainable production. **Frontiers in Marine Science**, Lausanne, v. 10, p. 1260709, 2023. DOI 10.3389/fmars.2023.1260709. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/marine-science/articles/10.3389/fmars.2023.1260709/full>. Acesso em: 26 jul. 2024.

HUERTAS, I. E. *et al.* Light-dependent bicarbonate uptake and CO₂ efflux in the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Planta**, Heidelberg, v. 211, p. 43-49, 2000. DOI 10.1007/s004250000254. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004250000254#citeas>. Acesso em: 15 ago. 2024.

IBRAHIM, T. N. B. T. *et al.* Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 372, p. 128661, 2023. DOI 10.1016/j.biortech.2023.128661.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852423000871>. Acesso em: 14 jul. 2024.

JABLONSKY, J.; BAUWE, H.; WOLKENHAUER, O. Modeling the Calvin-Benson cycle. **BMC Systems Biology**, [s.l.], v. 5, p. 1-13, 2011. DOI 10.1186/1752-0509-5-185. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1752-0509-5-185>. Acesso em: 26 jul. 2024.

KALRA, R.; GAUR, S.; GOEL, M. Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 40, p. 101794, 2021. DOI 10.1016/j.jwpe.2020.101794. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714420306711>. Acesso em: 15 jul. 2024.

KHAVARI, F. *et al.* Microalgae: therapeutic potentials and applications. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 4757-4765, 2021. DOI 10.1007/s11033-021-06422-w. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/f3cf85bac51311f3c3daa51a6ec581ea/1?pq-origsite=gscholar&cbl=54080>. Acesso em: 14 jul. 2024.

KUSMAYADI, A. *et al.* Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. **Chemosphere**, [s.l.], v. 271, p. 129800, 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.129800. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521002691>. Acesso em: 15 jul. 2024.

LIU, M. *et al.* Functional characterization of carotenogenic genes provides implications into carotenoid biosynthesis and engineering in the marine alga *Nannochloropsis oceanica*. **Algal Research**, [s.l.], v. 67, p. 102853, 2022. DOI 10.1016/

j.algal.2022.102853. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926422002247>. Acesso em: 19 jul. 2024.

LJUBIC, A. *et al.* Microalgae *Nannochloropsis oceanica* as a future new natural source of vitamin D3. **Food chemistry**, [s.l.], v. 320, p. 126627, 2020. DOI 10.1016/j.foodchem.2020.126627. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620304891>. Acesso em: 19 jul. 2024.

MACHADO, B. *et al.* The potential of algae as a source of cellulose and its derivatives for biomedical applications. **Cellulose**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 3353-3376, 2024. DOI 10.1007/s10570-024-05816-w. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-024-05816-w#citeas>. Acesso em: 15 jul. 2024.

MEEHAN, D. J. *et al.* Effects of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Tetraselmis* sp. supplementation levels on in vitro rumen fermentation. **Algal Research**, [s.l.], v. 56, p. 102284, 2021. DOI 10.1016/j.algal.2021.102284. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192642100103X>. Acesso em: 19 jul. 2024.

MISHRA, V. *et al.* Integrating microalgae into textile wastewater treatment processes: Advancements and opportunities. **Journal of Water Process Engineering**, [s.l.], v. 55, p. 104128, 2023. DOI 10.1016/j.jwpe.2023.104128. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214714423006487>. Acesso em: 15 jul. 2024.

MORAIS JUNIOR, W. G. *et al.* Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. **Aquaculture**, [s.l.], v. 528, p. 735562, 2020. DOI 10.1016/j.aquaculture.2020.735562. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848620302246>. Acesso em: 14 jul. 2024.

MOREIRA, C. Fotossíntese. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 1, n. 1, 2013. DOI 10.24927/rce2013.005. Disponível em: <https://rce.casadasciencias.org/rceapp/art/2013/005/>. Acesso em: 26 jul. 2024.

MOROCHO-JÁCOME, A. L. *et al.* (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 104, p. 9513-9522, 2020. DOI 10.1007/s00253-020-10936-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10936-x>. Acesso em: 14 jul. 2024.

MUELLER, J. *et al.* Microalgae as functional feed for Atlantic salmon: effects on growth, health, immunity, muscle fatty acid and pigment deposition. **Frontiers in Marine Science**, [s.l.], v. 10, p. 1273614, 2023. DOI 10.3389/fmars.2023.1273614. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/marine-science/articles/10.3389/fmars.2023.1273614/full>. Acesso em: 15 jul. 2024.

MUNOZ, J.; MERRETT, M. J. Inorganic-carbon transport in some marine eukaryotic microalgae. **Planta**, Heidelberg, v. 178, p. 450-455, 1989. DOI 10.1007/BF00963814. DOI 10.1007/BF00963814. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00963814>. Acesso em: 22 jul. 2024.

MUTANDA, T. *et al.* Biotechnological Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products. **Frontiers in Energy Research**, [s.l.], v. 8, p. 1–21, 2020. DOI 10.3389/fenrg.2020.598803. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/energy-research/articles/10.3389/fenrg.2020.598803/full>. Acesso em: 14 jul. 2024.

NETHRAVATHY, M. U. *et al.* Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, [s.l.], v. 18, n.

6, p. 1882-1897, 2019. DOI 10.1111/1541-4337.12500. Disponível em: <https://ift.online.library.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12500>. Acesso em: 14 jul. 2024.

NIMER, N. A.; IGLESIAS-RODRIGUEZ, M. D.; MERRETT, M. J. Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 625-631, 1997. DOI 10.1111/j.0022-3646.1997.00625.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0022-3646.1997.00625.x>. Acesso em: 15 ago. 2024.

NUNEZ, M.; QUIGG, A. Changes in growth and composition of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis salina* in response to changing sodium bicarbonate concentrations. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, p. 2123-2138, 2016. DOI 10.1007/s10811-015-0746-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-015-0746-7#citeas>. Acesso em: 15 ago. 2024.

PANCHA, I. *et al.* Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 193, p. 315-323, 2015. DOI 10.1016/j.biortech.2015.06.107. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415008986>. Acesso em: 13 ago. 2024.

PEDERSEN, T. C. *et al.* Assessment of *Nannochloropsis gaditana* growth and lipid accumulation with increased inorganic carbon delivery. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 30, p. 2155-2166, 2018. DOI 10.1007/s10811-018-1470-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-018-1470-x#citeas>. Acesso em: 11 ago. 2024.

RAVEN, J. A.; GOBLER, C. J.; HANSEN, P. J. Dynamic CO₂ and pH levels in coastal, estuarine, and inland waters: Theoretical and observed effects on harmful algal blooms. **Harmful algae**, [s.l.], v. 91, p. 101594, 2020. DOI 10.1016/j.hal.2019.03.012.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988319300381>.

Acesso em: 26 jul. 2024.

SALBITANI, G. *et al.* Enhancement of pigments production by *Nannochloropsis oculata* cells in response to bicarbonate supply. **Sustainability**, Basel, v. 13, n. 21, p. 11904, 2021. DOI 10.3390/su132111904. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/21/11904>. Acesso em: 15 ago. 2024.

SIMONIC, M.; ZEMLJIC, F. Production of bioplastic material from algal biomass. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 79-84, 2021. DOI 10.2298/CICEQ191024026S. Disponível em: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93722000026S>. Acesso em: 15 jul. 2024.

SUDA, S.; ATSUMI, M.; MIYASHITA, H. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). **Phycologia**, [s.l.], v. 41, n. 3, p. 273-279, 2002. DOI 10.2216/i0031-8884-41-3-273.1. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2216/i0031-8884-41-3-273.1>. Acesso em: 29 jul. 2024.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase versatility: from pH regulation to CO₂ sensing and metabolism. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s.l.], v. 10, p. 1326633, 2023. DOI 10.3389/fmolb.2023.1326633. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2023.1326633/full>. Acesso em: 15 ago. 2024.

TORRES-TIJI, Y.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Microalgae as a future food source. **Biotechnology advances**, [s.l.], v. 41, p. 107536, 2020. DOI 10.1016/j.biotechadv.2020.107536. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975020300331>. Acesso em: 15 jul. 2024.

WHITE, D. A. *et al.* The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **Journal of applied phycology**, [s.l.], v. 25, p. 153-165, 2013. DOI 10.1007/s10811-012-9849-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-012-9849-6>. Acesso em: 22 jul. 2024.

YIN, R. *et al.* Valorization of *Nannochloropsis oceanica* for integrated co-production of violaxanthin cycle carotenoids. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 399, p. 130597, 2024. DOI 10.1016/j.biortech.2024.130597. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852424003006>. Acesso em: 19 jul. 2024.

YIN, Z. *et al.* A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 301, p. 122804, 2020. DOI 10.1016/j.biortech.2020.122804. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852420300730>. Acesso em: 19 jul. 2024.

YUAN, W. *et al.* Sequential treatment with bicarbonate and low-temperature to potentiate both biomass and lipid productivity in *Nannochloropsis oceanica*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 94, n. 10, p. 3413-3419, 2019. DOI 10.1002/jctb.6155. Disponível em: <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.6155>. Acesso em: 22 jul. 2024.

ZHANG, R. *et al.* (2019). Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioprocess and biosystems engineering**, [s.l.], v. 42, p. 173-186, 2019. DOI 10.1007/s00449-018-2038-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-018-2038-5>. Acesso em: 22 jul. 2024.

ZHUANG, D. *et al.* Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. **Chemosphere**, [s.l.], v. 291, p. 132932, 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.132932. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132932>. Acesso em: 14 jul. 2024.