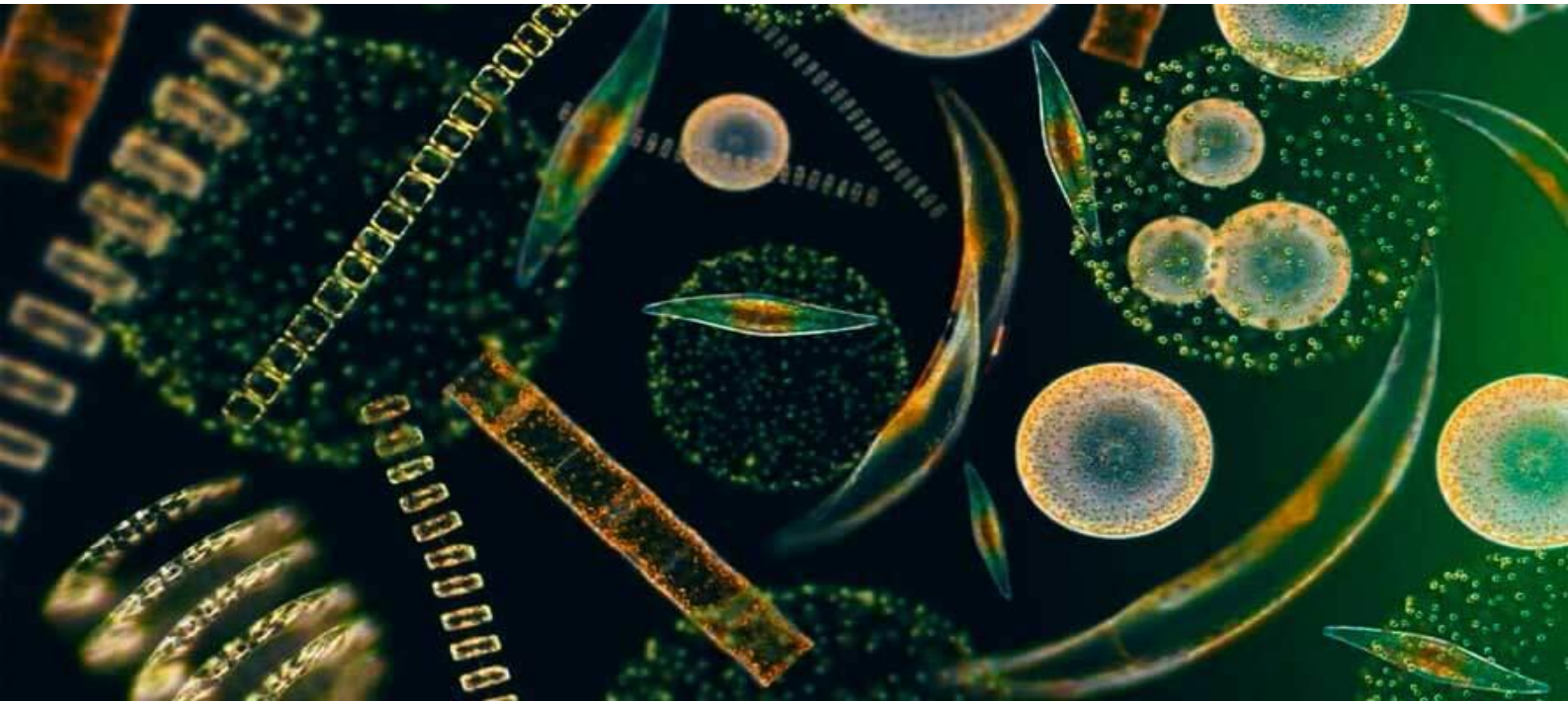




Estudo do efeito de parâmetros ambientais na acumulação de compostos de valor acrescentado na *Chlorella zofingiensis*

ANDRÉ FILIPE DA SILVA PEDROSA

Novembro de 2021



Estudo do efeito de parâmetros ambientais na acumulação de compostos de valor acrescentado na *Chlorella zoofingiensis*

Setembro 2021

AUTOR

André Filipe da Silva Pedrosa

ORIENTAÇÃO

Doutora Nídia de Sá Caetano

**Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Biorrecursos**

Agradecimentos

Com o concluir de uma fase tão importante e bonita da minha vida não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me acompanharam nesta jornada de cinco anos.

Quero começar por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Nídia de Sá Caetano, por ter acreditado em mim desde o início. Tornou-se um pilar fundamental nesta dissertação, por todo o carinho, tempo investido e por ter acreditado e levado a que tudo isto fosse possível.

A todos os engenheiros, auxiliares e colegas do Laboratório de Tecnologia, em particular, a técnica Lurdes Correia, ao Mickael Vilar e ao Diogo Silva pela ajuda e apoio que me foi dado ao longo de todo o trabalho experimental.

Gostaria de agradecer também ao Doutor Wilson Júnior e à Mestre Priscila Corrêa pela partilha de conhecimentos e ensinamentos.

Aos meus amigos, pela forma como me apoiaram ao longo de todo este período, em especial à Inês Casal pelo amor, por nunca me ter deixado desistir, por nunca deixar de acreditar que eu era capaz e pela imensa ajuda que sempre ofereceu ao longo destes cinco anos.

Gostava de agradecer à Ângela Costa, ao Daniel Ricardo e à Rita Alonso por terem sido um pilar de motivação, apoio e amor o que tornou a minha vida académica em algo excecional.

Gostava ainda de agradecer à Ana Soares e à Mariana Babo por terem sido um apoio incondicional, um pilar de ajuda e superação e fundamentalmente por todo o amor depositado em mim.

O maior agradecimento é para a minha família, por terem acreditado em mim todos os dias e me mostrarem sempre o lado positivo das coisas quanto tudo pareceu mais difícil. Em particular, à minha mãe e ao meu pai, por todo o carinho, ajuda, esforço e dedicação ao longo destes 23 anos da minha existência e, por fazerem de mim, a pessoa que sou hoje.

Muito obrigado a todos!

A Prof.^a Nídia de Sá Caetano, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado pela Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2020 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC);

- Projeto POCI-01-0247-FEDER-033784, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC).



Resumo

Atualmente é fundamental encontrar novos cenários e soluções mais sustentáveis, ideias mais limpas e inovadoras, de forma a privilegiar o que é natural, suprindo assim as nossas necessidades como espécie humana, permitindo obter produtos de alto valor comercial com o menor impacto possível para o meio ambiente. Para satisfazer algumas destas necessidades, surgem as microalgas, seres que através das suas características surgem como um bom potencial de investimento e uma boa forma de “limpar” os ecossistemas.

A *Chlorella zofingiensis* é uma microalga que tem uma taxa de crescimento rápida e uniforme, tornando assim possível o encurtamento da duração de cada ensaio. O estudo realizado teve como objetivo otimizar a produção de astaxantina através da alteração dos parâmetros ambientais no cultivo da *Chlorella zofingiensis* em meio BBM. Os parâmetros estudados incluíram o fotoperíodo (8 ou 12 ou 16 horas), o *stress* nutritivo (0 dias ou 10 dias ou 20 dias) e a suplementação de luz laranja (0 ou 12 ou 24 horas).

As culturas realizadas que apresentaram maiores concentrações de carotenoides foram as submetidas a um fotoperíodo de 16 horas de iluminação, com suplementação de luz laranja e efeito de *stress* nutritivo ao longo de todo o ensaio. A concentração de carotenoides totais, CAR, mais elevada que foi obtida foi de $11,97 \pm 0,06$ mg/L e a de astaxantina foi de $9,97 \pm 0,04$ mg/L (obtida no ensaio 16F20N24L). A astaxantina representa 83,21% dos carotenoides totais, ficando a sobrar cerca de 16,79% para os restantes, como por exemplo, a luteína.

Uma vez identificadas as condições que permitiram obter a máxima concentração de carotenoides totais em escala de bancada, procedeu-se ao *scale-up* para cultivo em fotobiorreatores de 15 L.

O ensaio de *scale-up* veio demonstrar que o escalamento realizado originou os resultados esperados, visto que o crescimento celular e a produção de carotenoides tiveram comportamento idêntico ao observado no ensaio à escala de bancada em que foram alcançados os melhores resultados (16F20N24L). A concentração de biomassa obtida no ensaio escalado ao fim de 20 dias de cultivo foi de 5,80 g/L e a concentração de carotenoides foi de 10,34 mg/L, dos quais cerca de 82% correspondem a astaxantina (8,47 mg/L).

Assim, conclui-se que o cultivo de *Chlorella zofingiensis* em meio sem nutrientes com fotoperíodo 16L:8D (horas de luz: horas no escuro), com suplementação de luz laranja permite otimizar a acumulação de pigmentos acessórios que podem vir a ser distribuídos industrialmente.

Palavras-chave: Pigmentos, *stress* nutricional, *Chlorella zofingiensis*, astaxantina

Abstract

Currently, it is essential to find new scenarios and more sustainable solutions, cleaner and innovative ideas that favour what is natural, thus meeting our needs as a human species, in order to obtain products of high commercial value with the least impact on the environment. To fulfil these needs, microalgae arise. These microscopic beings through their characteristics appear as a good potential investment while being a good way to clean up ecosystems.

Chlorella zofingiensis is a microalga that has a rapid and uniform growth rate, thus making it possible to shorten the period of each experimental run. This study aimed to optimize the production of astaxanthin by changing the environmental parameters applied in *Chlorella zofingiensis* cultivation using BBM medium. Thus, the parameters studied included photoperiod, nutritional stress and orange light supplementation.

The cultures produced under these conditions that showed higher concentration of carotenoids were subjected to a 16 hour photoperiod, orange light supplementation and nutritional stress effect throughout the experiment. The highest concentration of total carotenoids obtained was $11,97 \pm 0,06$ mg/L and that of astaxanthin was $9,97 \pm 0,04$ mg/L (16F20N24L). This represents 83,21% of the total carotenoids, leaving about 16,79% for the remaining, such as lutein.

Once the conditions that promoted the maximum concentration of total carotenoids were obtained on a bench scale, the cultivation was scaled-up to 15 L photobioreactors.

The scale-up assay showed that the expected results were achieved, since cell growth and carotenoid production had the similar behaviour as in the bench scale assay that yielded the best results (16F20N24L). The biomass concentration was 5.80 g/L and the carotenoid concentration was 10,34 mg/L, where about 82% is astaxanthin (8,47 mg/L).

Thus, it is concluded that the cultivation of *Chlorella zofingiensis* in nutrient-free medium with 16L:8D photoperiod (hours of light: hours in the dark), with supplementation of orange light allows to optimize the accumulation of accessory pigments that may be industrially distributed.

Keywords: Pigments, nutritional stress, *Chlorella zofingiensis*, astaxanthin

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento do trabalho.....	1
1.2	Objetivos do trabalho	2
1.3	Organização da Dissertação	2
2.	Estado de Arte	3
2.1	Microalgas.....	3
2.1.1	Filos de microalgas.....	3
2.1.2	Crescimento de microalgas	6
2.2	Composição nutricional e estrutural das microalgas	7
2.2.1	Carotenoides e carotenogénese	8
2.2.2	Astaxantina.....	9
2.2.3	Luteína.....	11
2.3	Ácidos gordos.....	11
2.3.1	Ácido γ -linolénico.....	11
2.3.2	Ácido eicosa-pentaenóico.....	11
2.3.3	Ácido docosahexaenóico.....	11
2.4	Vantagens da utilização industrial das microalgas.....	12
2.5	Aplicações das microalgas e dos compostos de valor acrescentado	12
2.6	<i>Chlorella zofingensis</i>	13
3.	Materiais e métodos	15
3.1	Planeamento experimental e codificação dos ensaios	15
3.2	Cultivo das microalgas	16
3.2.1	Estirpe selecionada.....	16
3.2.2	Preparação dos fotobiorreatores de 250 mL.....	16
3.3	Monitorização das culturas.....	17
3.3.1	Determinação da concentração de biomassa	17
3.3.2	Observação da existência de contaminações.....	17
3.4	Determinação do teor de açúcares.....	17
3.5	Determinação da concentração de pigmentos	18
3.5.1	Quantificação das clorofilas	18
3.5.2	Quantificação das carotenoides totais	18
3.5.3	Quantificação de astaxantina.....	18
4.	Resultados e discussão	21

4.1	Concentração de biomassa	21
4.2	Produção e acumulação de açúcares	24
4.3	Produção e acumulação de pigmentos.....	26
4.3.1	Clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e clorofila <i>c</i>	26
4.3.2	Carotenoides.....	28
4.4	<i>Scale-up</i>	30
5.	Conclusões e sugestões para estudos futuros	33
	Referências bibliográficas.....	35
	Anexos	39
	Anexo A- Meio de cultura	39
	Anexo B – Curva de calibração para o crescimento celular	40
	Anexo C- Curvas de calibração para a determinação de astaxantina	41

Índice de figuras

Figura 2.1 - Exemplo de <i>Cyanophyta</i> (<i>Anabaena</i>) (Promdaen et al., 2014).....	4
Figura 2.2- Exemplo de <i>Chlorophyta</i> (<i>Scenedesmus</i>) (Promdaen et al., 2014).	4
Figura 2.3- Exemplo de <i>Euglenophyta</i> (Promdaen et al., 2014).....	5
Figura 2.4- Exemplo de <i>Rhodophyta</i> (Popper et al., 2011).....	5
Figura 2.5- Exemplo de <i>Chromophyta</i> (Lewin, 1994)	6
Figura 2.6 - Crescimento de microalgas em sistema <i>batch</i> (Barsanti & Gualtieri, 2014)...	7
Figura 2.7- Exemplo de plastídio (cloroplasto) (Zhang et al., 2017).....	8
Figura 2.8- Ciclo de carotenogénese (Liu et al., 2014).....	9
Figura 2.9 - Molécula de astaxantina livre (Liu et al., 2014).....	10
Figura 2.10 - <i>Chlorella zofingiensis</i> (A- Situação normal; B- Situação de <i>stress</i>) (Del Campo et al., 2004).....	13
Figura 3.1- Fotobiorreatores de 250 mL.....	16
Figura 3.2- Fotobiorreator de 15 L.....	17
Figura 4.1 - Curvas de crescimento na primeira ronda de ensaios.....	21
Figura 4.4 –Concentração de biomassa seca (g/L) de <i>Chlorella zofingiensis</i> obtida ao final dos 20 dias.....	23
Figura 4.5 - Concentração de açúcares totais na biomassa de <i>Chlorella zofingiensis</i> (mg/mg biomassa seca).....	25
Figura 4.6 - Concentração de clorofila <i>a</i>	26
Figura 4.7 - Concentração de clorofila <i>b</i>	27
Figura 4.8 - Concentração de clorofila <i>c</i>	27
Figura 4.9 - Concentração de carotenoides totais	28
Figura 4.10 - Concentração de astaxantina	29
Figura 4.11 - Curva de crescimento da <i>Chlorella zofingiensis</i> no ensaio de <i>scale-up</i>	30
Figura 4.12 – Evolução da concentração de carotenoides ao longo do ensaio de <i>scale-up</i>	31

Índice de Tabelas

Tabela 3.1- Condições de crescimento e codificação dos ensaios	15
--	----

1. Introdução

1.1 Enquadramento do trabalho

O desenvolvimento sustentável e a necessidade de implementar uma economia circular levaram a comunidade científica, empresas e classes políticas, a investir no desenvolvimento de produtos naturais, que consigam igualar e, se possível, substituir os produtos sintéticos. Estes bioprodutos devem ter custo de produção menor ou igual ao dos seus congêneres sintéticos e originar impactos ambientais menores e menos nocivos. Para a produção de alguns destes compostos recorre-se às microalgas, uma vez que estas possuem um crescimento rápido e necessitam apenas de nutrientes, luz solar e CO₂ para se desenvolverem.

Existem alguns compostos produzidos pelas microalgas de extrema importância, como por exemplo a astaxantina, os lípidos e os antioxidantes.

A astaxantina é um carotenoide de elevado valor comercial com interesse em diversos setores de atividade, desde a cosmética, farmacêutica, nutracêutica, até à indústria alimentar ou à aquicultura (Ip & Chen, 2005). Apresenta vantagens significativas em comparação com os compostos análogos de síntese química. Pode ser encontrada em diversas microalgas, como por exemplo *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* e *Dunaliella salina*, sendo acumulada em maiores quantidades quando estas são submetidas a condições de *stress* (Ip & Chen, 2005).

Os lípidos (ou óleos) são produzidos para fins alimentares ou energéticos por diversas plantas terrestres. Contudo, a produção destes óleos pelas microalgas manifesta diversos benefícios, sendo que não competem na cadeia alimentar, nem necessitam de solo arável fértil ou de água tratada.

Os antioxidantes são moléculas capazes de inibir a oxidação de outras moléculas e apresentam propriedades antimicrobianas. As microalgas produzem alguns antioxidantes sendo ainda necessário realizar estudos científicos para avaliar a sua potencial aplicabilidade.

As microalgas são agentes promotores de um desenvolvimento tecnológico sustentável e da implementação da economia circular (Perez-Garcia et al., 2011).

Para cada espécie de microalga existe uma taxa de crescimento específica, variando os requisitos nutricionais, os requisitos de iluminação e a capacidade de produzir e acumular compostos de alto valor, o que se traduz em diferentes resultados, de acordo com a espécie. Para que o crescimento das microalgas seja eficiente é necessário ter em consideração quatro aspetos:

1. Taxa de crescimento: é avaliada com base na densidade celular à taxa máxima de crescimento específico e tolerância às variáveis ambientais (temperatura, pH, salinidade, etc.);
2. Produção de metabolitos: é estimada com base na concentração que a espécie produz do metabolito de interesse, calculando-se assim o rendimento de produção;
3. Robustez: determina-se pela alta consistência da cultura, alta estabilidade genética e baixa suscetibilidade a predadores externos, bem como fatores abióticos, ou seja, é necessário que a espécie sobreviva a alterações ambientais;
4. Manipulação genética: a espécie utilizada deve ser de fácil manipulação genética (Williams & Laurens, 2010).

No presente trabalho vai ser utilizada a microalga *Chlorella zofingiensis*, sendo que cumpre todos critérios acima descritos. Contudo, para a elaboração deste trabalho apenas são relevantes os três primeiros requisitos. Esta espécie é excelente para produção de compostos de alto valor (astaxantina), possui alta taxa de crescimento específico, é muito tolerante a alterações ambientais e é geneticamente estável (Rastogi et al., 2017).

1.2 Objetivos do trabalho

O trabalho realizado tem como objetivos estudar e otimizar os parâmetros ambientais, que potenciam a acumulação de compostos de valor acrescentado (nomeadamente astaxantina) na *Chlorella zofingiensis*.

1.3 Organização da Dissertação

Esta Dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos.

No capítulo 1, faz-se uma breve introdução à temática do trabalho, refere-se sucintamente os objetivos do mesmo e expõe-se a organização da Dissertação.

No capítulo 2, apresenta-se o estado da arte referente aos compostos de interesse produzidos pela espécie em estudo, bem como os estudos realizados acerca dessa mesma espécie.

O capítulo 3 aborda a área experimental do trabalho, onde se apresentam os materiais e métodos referentes à caracterização e determinação dos compostos de valor acrescentado e ao crescimento das microalgas.

No capítulo 4 são demonstrados aos resultados obtidos e elabora-se a discussão dos mesmos.

No capítulo 5 concluiu-se acerca do trabalho realizado e dos resultados obtidos, apresentando-se ainda sugestões para trabalhos futuros.

Adicionalmente, segue-se uma seção onde se encontram listadas as referências bibliográficas, que suportam a escrita da dissertação. Por último, inclui-se uma seção onde se expõem os anexos, que contemplam os métodos detalhados e as tabelas de resultados necessários para a elaboração do presente trabalho.

2. Estado de Arte

2.1 Microalgas

As microalgas são seres microscópicos unicelulares, e podem ser referidas como um todo pela alga microscópica *Stricto Sensu*, onde se incluem as espécies mais comuns, assim como as bactérias fotossintéticas (cianobactérias) (Perez-Garcia et al., 2011; Pritchard, 1995).

As microalgas podem ser encontradas por todo o planeta, sobretudo em águas doces, salobras ou mesmo salgadas (Mata et al., 2010; Perez-Garcia et al., 2011).

Atualmente, o interesse pelas microalgas tem crescido devido ao seu elevado potencial para a produção de biomassa, recorrendo à utilização eficiente da luz solar (Pritchard, 1995).

Embora as microalgas sejam extremamente promissoras para a obtenção de compostos de alto valor acrescentado, os custos associados a esse processo tornam-no frequentemente pouco viável (Chhandama et al., 2021; Perez-Garcia et al., 2011).

As microalgas apresentam diversas características que as tornam promissoras como matéria-prima para a produção de compostos de alto valor, tais como (Perez-Garcia et al., 2011; Williams & Laurens, 2010):

- Elevada eficiência fotossintética (maior produtividade por área, comparativamente a outros seres fotossintéticos);
- Elevada remoção de dióxido de carbono por área de cultura ocupada;
- Elevada capacidade de síntese e acumulação de compostos de interesse (lípidos, betacarotenos, etc.);
- Ciclo de vida curto, o que indica um crescimento rápido da biomassa;
- Produtividade não sazonal, o que possibilita que a produção seja anual;
- Manuseamento simples;
- Capacidade de maior produção específica por unidade de área, com a utilização de fotobiorreatores (Satpati & Pal, 2018).

2.1.1 Filos de microalgas

As microalgas podem ser estruturadas em 5 filos, onde se destacam principalmente pela coloração e pela natureza de substâncias de reserva que apresentam. Os filos designam-se por: *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta* e *Chromophyta* (Matsunaga et al., 2005).

O grupo *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria* (exemplo: *Synechococcus* sp., *Anabaena* sp.) (Figura 2.1) caracteriza-se pela sua cor azul-esverdeada ou tonalidade roxa. As células das microalgas pertencentes a este filo possuem uma organização procariótica, não apresentam um núcleo organizado, sem plastos e os pigmentos (clorofila e ficocianina) apresentam-se em lamelas fotossintéticas na periferia do citoplasma, atribuindo às células uma cor homogénea (Matsunaga et al., 2005).



Figura 2.1 - Exemplo de *Cyanophyta* (*Anabaena*) (Promdaen et al., 2014).

O filo *Chlorophyta* (exemplo: *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp.) (Figura 2.2) é distinguido pela sua cor verde, devido à presença da clorofila *a* e *b*. As microalgas deste grupo apresentam os seus plastos verdes, o que lhes atribui esta coloração, sendo a principal substância de reserva o amido intraplastidial (Ma et al., 2020).



Figura 2.2- Exemplo de *Chlorophyta* (*Scenedesmus*) (Promdaen et al., 2014).

O filo *Euglenophyta* (exemplo: *Distigma* sp., *Euglena* sp., *Phacus* sp.) (Figura 2.3) tem a mesma coloração que o filo descrito anteriormente. Contudo, a substância de reserva deste grupo é o paramido (substância semelhante ao amido) (De Jesus Raposo et al., 2013).

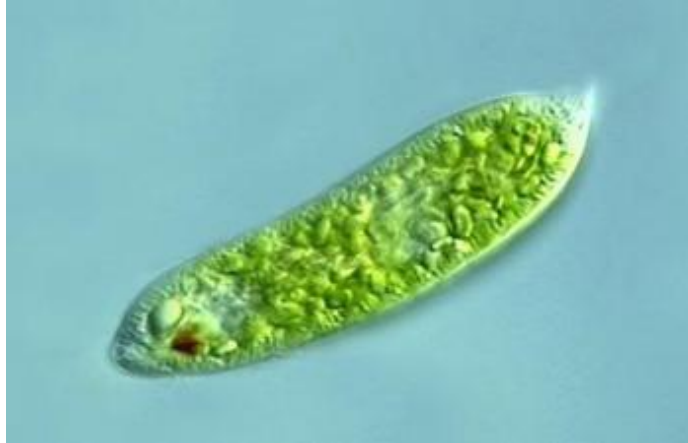


Figura 2.3- Exemplo de *Euglenophyta* (Promdaen et al., 2014).

O filo *Rhodophyta* (exemplo: *Ptilothamnion* sp., *Porphyridium* sp.) (Figura 2.4), ao contrário dos grupos mencionados anteriormente, apresenta plastos de cor roxa e vermelha, podendo, por vezes, apresentar uma tonalidade azul ou verde-azeitona, devido a presença do seu pigmento ficoeritrina. As microalgas pertencentes a este grupo são, predominantemente, marinhas e apresentam como principal substância de reserva o amido florídeo (Ma et al., 2020; Matsunaga et al., 2005).

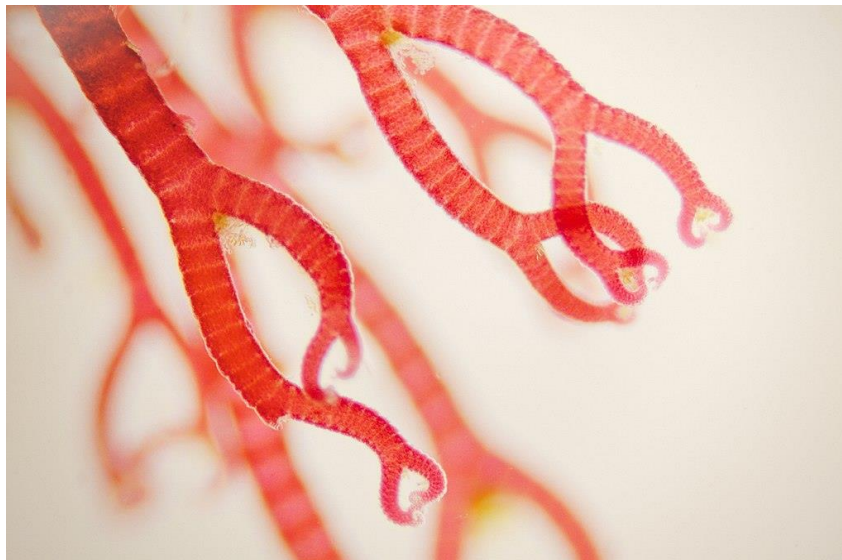


Figura 2.4- Exemplo de *Rhodophyta* (Popper et al., 2011).

Por fim, o grupo *Chromophyta* (exemplo: *Phaeophyceae* sp., *Tetrachrysis* sp., *Cryptomonas* sp.) (Figura 2.5) é representado por algas acastanhadas, dourada e amarelo-esverdeado, devendo-se as suas colorações dos plastos à fucoxantina e à clorofila. A principal substância de reserva são os lípidos (Lewin, 1994; Matsunaga et al., 2005).



Figura 2.5- Exemplo de *Chromophyta* (Lewin, 1994) .

2.1.2 Crescimento de microalgas

O crescimento das diferentes microalgas é influenciado diretamente por diversos fatores, podendo estes ser abióticos e bióticos. Os fatores abióticos distinguem-se em: fotoperíodo, temperatura, nutrientes, oxigênio, dióxido de carbono, pH, salinidade e produtos químicos. Os fatores bióticos são a existência de predadores naturais, microrganismos patogênicos (bactérias, fungos e vírus) e a competição entre espécies (Makareviciene & Sendzikiene, 2020; Mata et al., 2010).

Quando o crescimento é feito de modo artificial, ou seja, as microalgas se desenvolvem em fotobiorreatores, todos os fatores mencionados anteriormente são controlados de forma a potenciar o crescimento ou a produção do(s) composto(s) de valor acrescentado (Makareviciene & Sendzikiene, 2020).

O modo de produção em descontínuo (*batch*) é o método mais utilizado para o cultivo de microalgas. Este método consiste na introdução de uma quantidade de meio de cultura e o respetivo inóculo de microalgas num reator (Richmond, 2013). Como não ocorrem entradas ou saídas de matéria, os nutrientes começam a esgotar-se, com o decorrer do tempo (Barsanti & Gualtieri, 2014). Para algumas espécies é necessário que haja agitação, de modo a garantir uma troca eficaz de nutrientes e gases na interface célula-água. É, normalmente, introduzido um caudal de arejamento, para potenciar esta troca eficaz (Dickinson et al., 2017; Richmond, 2013).

Até se atingir a escassez de nutrientes, as microalgas multiplicam-se e a sua densidade aumenta exponencialmente. Quando estamos perante a carência de nutrientes limitantes ou a acumulação de substâncias inibitórias, as microalgas abrandam a sua velocidade de crescimento, atingindo, assim, a fase estacionária. Tal não acontece caso se forneçam mais nutrientes ao sistema, voltando as microalgas a consumir substrato e a multiplicar-se (Dickinson et al., 2017; Doran, 2013).

O cultivo em *batch* é o mais utilizado a nível industrial, devido à sua simplicidade de utilização. A população de microalgas, neste tipo de método, apresenta um crescimento padrão de acordo com uma curva sigmoide (Figura 2.6) (Barsanti & Gualtieri, 2014).

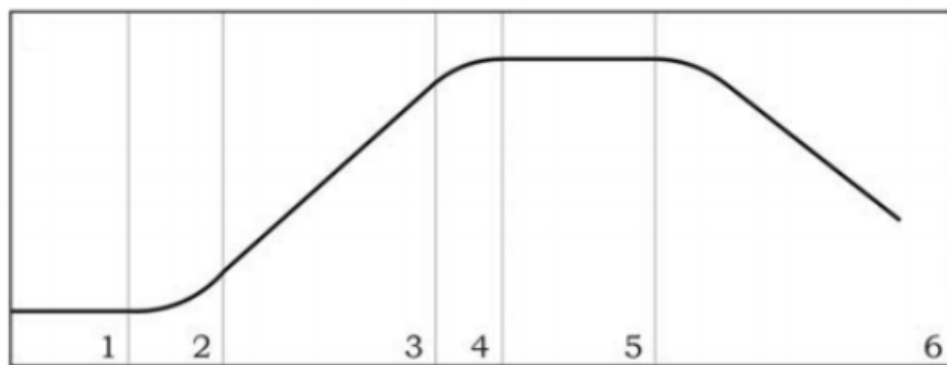


Figura 2.6 - Crescimento de microalgas em sistema *batch* (Barsanti & Gualtieri, 2014).

As várias fases de crescimento da população de microalgas diferenciam-se em:

1. Fase *Lag* – trata-se da fase de adaptação às condições do meio de cultivo por parte das microalgas. A taxa de crescimento nesta fase é nula ou mesmo negativa (Barsanti & Gualtieri, 2014);
2. Fase de *Aceleração* – fase intermédia entre as fases *lag* e *log*, em que as microalgas estão completamente adaptadas às condições impostas (Barsanti & Gualtieri, 2014);
3. Fase *Exponencial* ou *Log* – corresponde à fase na qual as microalgas se multiplicam, alcançando a velocidade máxima de crescimento. Nesta fase, a duplicação da biomassa ocorre em 24 horas. A taxa de crescimento é exponencial (Dickinson et al., 2017; Mata et al., 2010);
4. Fase de *Desaceleração* – atinge-se quando existe o declínio da velocidade de crescimento celular, podendo estar na sua causa a diminuição da luminosidade (provocada pela elevada concentração de microalgas que impedem a passagem de luz), escassez de nutrientes, alteração do pH, acumulação de compostos tóxicos, entre outros fatores físico-químicos, que se tornam limitantes para a proliferação das microalgas (Barsanti & Gualtieri, 2014);
5. Fase *Estacionária* – estamos perante esta fase quando a velocidade de crescimento celular é igual à velocidade de morte celular (Dickinson et al., 2017; Richmond, 2013);
6. Fase de *Morte* – esta fase é caracterizada pela acumulação de compostos tóxicos e pela escassez de nutrientes no meio de cultura, sendo impossível o crescimento. No entanto, a velocidade de morte celular aumenta drasticamente (Barsanti & Gualtieri, 2014).

2.2 Composição nutricional e estrutural das microalgas

Na composição nutricional das microalgas estão presentes lípidos, hidratos de carbono, proteínas, pigmentos e nutrientes vestigiais, incluindo vitaminas e antioxidantes. Dependendo da espécie de microalgas, bem como das estirpes e condições de crescimento, ou do fornecimento de luz solar, temperatura, concentração de dióxido de carbono, etc., as composições nutricionais podem variar. Através das condições de cultivo proporcionadas, consegue-se, também, alterar a composição nutricional dentro da espécie, podendo assim variar cada um destes constituintes entre 15 a 50% de massa em peso seco (Wu et al., 2006).

As microalgas apresentam uma capacidade acrescida de se ajustarem ou alterarem a sua estrutura interna, a sua composição fisiológica e bioquímica, demonstrando um poder de sintetização amplo de uma variedade de compostos, tendo em atenção as condições ambientais ou de cultivo, como é o caso da concentração de nutrientes (Renaud et al., 2002; Sayegh & Montagnes, 2011).

2.2.1 Carotenoides e carotenogénese

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela tonalidade amarela, laranja e vermelha nas plantas, algas, bactérias, fungos e alguns animais, e encontram-se, geralmente, dentro do plastídio (Figura 2.7). Estes são de origem isoprenóide, derivados de uma estrutura de cadeia de polieno de 40 átomos de carbono com grupos cíclicos. Nos organismos foto-autotróficos são pigmentos acessórios essenciais (Guedes et al., 2011; Zhang et al., 2017).



Figura 2.7- Exemplo de plastídio (cloroplasto) (Zhang et al., 2017).

Os carotenoides são habitualmente organizados em carotenoides primários e secundários. Os carotenoides primários, como a luteína, desempenham um papel importante na transferência de energia durante a fotossíntese (Guedes et al., 2011). Os carotenoides secundários, como a astaxantina, são utilizados quando a microalga se encontra em situações de *stress*. O *stress* leva a uma acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e radicais livres, que são eliminados por estes carotenoides secundários, fenómeno denominado por Carotenogénese. Isto demonstra que, para além de transferirem energia, os carotenoides também desempenham um papel protetor (Schüler et al., 2017; Zhang et al., 2017).

É possível induzir a Carotenogénese privando a microalga de nutrientes, aumentando a intensidade luminosa ou suplementando com luz laranja ou, ainda, aumentando a salinidade da cultura ou aumentando a temperatura (Zhang et al., 2017).

Na Figura 2.8 apresenta-se um esquema do ciclo da Carotenogénese.

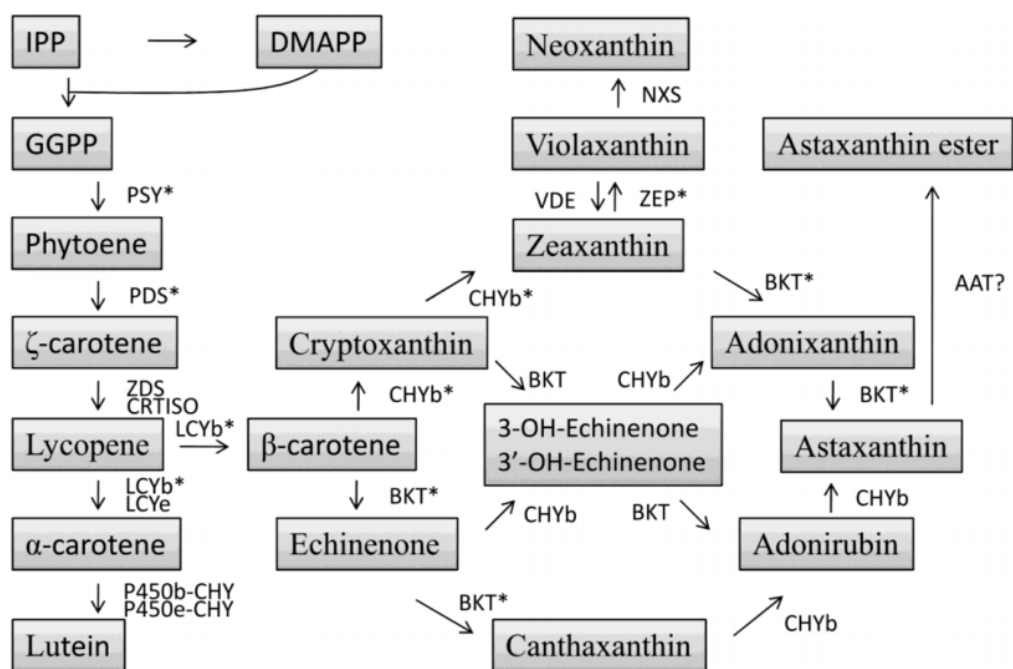


Figura 2.8- Ciclo de carotenogênese (Liu et al., 2014).

Em seres eucarióticos, o isopentildifosfato (IPP) é o primeiro intermediário na via biossintética dos carotenoides, sendo este composto derivado de 3 moléculas de acetil-CoA via mevalonato ou condensado a partir do piruvato e fosfato de gliceraldeído. A *Chlorella zofingiensis* é capaz de sintetizar o IPP, através da segunda via descrita anteriormente (Guedes et al., 2011; Novoveská et al., 2019).

A adição de 3 moléculas de IPP à molécula dimetilalil-difosfato (DMAPP) resulta na formação do C20 pirofosfato de geranylgeranyl (GGPP). De seguida, 2 moléculas de GGPP condensam e formam fitoeno, dando origem ao término da primeira etapa de carotenogênese.

Caso a microalga se encontre nas condições normais, o fitoeno é submetido a ação enzimática para originar o licopeno, e este é ciclizado em α -caroteno que, por fim, será convertido em luteína (Novoveská et al., 2019).

Caso a microalga se encontre em condições de *stress*, o licopeno vai ser ciclizado em β -caroteno, servindo como precursor direto na biossíntese de astaxantina, por meio de um conjunto de etapas de hidroxilação e cetolação. Existem várias rotas que podem ser seguidas. No caso da *Chlorella zofingiensis*, o β -caroteno é convertido em cantaxantina por cetolação em duas etapas catalisadas através de uma enzima, seguido por uma hidroxilação, também em duas fases catalisadas enzimaticamente (Liu et al., 2014).

2.2.2 Astaxantina

A astaxantina, carotenoide que pertence à classe das xantofilas, tem vindo a despertar um elevado interesse, devido à sua capacidade antioxidante e ao possível papel na redução de risco de certas doenças. Este pigmento pode ser encontrado em várias espécies de microalgas, bem como em salmão e crustáceos. Atualmente, a produção de astaxantina é realizada de forma sintética e, cada vez mais, torna-se necessário obter fontes naturais para a produção de astaxantina (Seabra & Pedrosa, 2010).

2.2.2.1 Estrutura química da astaxantina

Os carotenoides podem ser divididos em dois grandes grupos (carotenos e xantofilas), baseando-se nos elementos químicos que cada molécula contém. Os carotenos são carotenoides que contêm carbono, hidrogênio e oxigênio, assim como as xantofilas. A grande diferença entre os dois grupos está na maneira como o oxigênio é apresentado. Nas xantofilas, o oxigênio está presente como grupos hidroxilos, grupos carbonilo ou como uma combinação dos ambos, como é o caso da astaxantina (Seabra & Pedrosa, 2010).

A astaxantina (Figura 2.9) é um derivado do β -caroteno, que sofreu uma hidroxilação e uma cetolação em ambos os anéis aromáticos. Estas reações foram catalisadas por enzimas, denominadas por *β -caroteno hidroxilase* e *β -caroteno cetolase*, respetivamente (Popper et al., 2011).

O sistema de ligações duplas presentes nos carotenoides confere-lhes uma estrutura diferenciada, propriedades químicas únicas e absorção de luz (Seabra & Pedrosa, 2010).

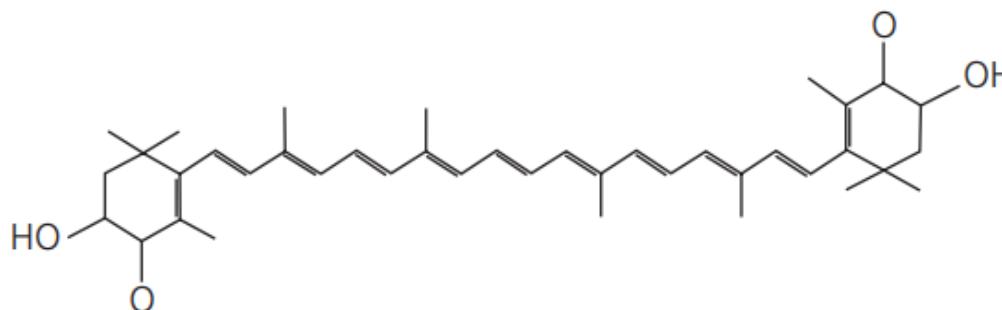


Figura 2.9 - Molécula de astaxantina livre (Liu et al., 2014).

2.2.2.2 Fontes de astaxantina

No meio aquático é possível encontrar a astaxantina em vários seres vivos, quer sejam microscópicos quer macroscópicos (salmão). Devido à existência da cadeia alimentar bem estratificada, este pigmento pode estar presente residualmente em todos os seres vivos marinhos (Popper et al., 2011).

Na natureza, algumas espécies de microalgas conseguem produzir este composto quando submetidas a uma situação de *stress* (Arabbi, 2001).

Em meio industrial é possível utilizar espécies de microalgas para produzir massivamente este composto, desde que as espécies sejam submetidas a stress ou suplementadas com luz laranja (Seabra & Pedrosa, 2010).

2.2.2.3 Poder antioxidante

Para os seres vivos, os carotenoides servem, fundamentalmente, como precursores da vitamina A. O grupo das xantofilas não tem a estrutura, nem os requisitos necessários para serem precursores da vitamina A. Por outro lado, as xantofilas comportam-se como excelentes antioxidantes, capturando os singletos de oxigênio, espécies reativas de oxigênio, e os radicais livres, derivados de processos metabólicos celulares ou poluentes ambientais. Para ser um antioxidante eficaz, é necessário que seja capaz de eliminar os radicais livres, ou seja, torná-los inofensivos (Popper et al., 2011; Seabra & Pedrosa, 2010).

Os carotenoides costumam estar localizados nas membranas celulares, onde estes constituem uma parte integrante das estruturas complexas da membrana. Podem ser incorporados em sistemas como lipossomas e na bicamada fosfolipídica em concentrações bem definidas (Popper et al., 2011).

A astaxantina consegue reduzir a peroxidação lipídica em 40%, preservando a estrutura da membrana (Seabra & Pedrosa, 2010).

2.2.3 Luteína

A luteína é um carotenoide com pigmentação amarela, essencial ao bom funcionamento do organismo, mas o ser humano não o consegue sintetizar, sendo necessário consumi-lo. A luteína contribui para a saúde visual, proteção do ADN, previne o envelhecimento precoce da pele e contribui para a proteção dos olhos e da pele contra os radicais livres, raios UV e luz azul. Assim, é extremamente importante realizar uma dieta equilibrada e rica em alimentos com esta substância (Popper et al., 2011; Zhang et al., 2017).

2.3 Ácidos gordos

As algas são capazes de produzir diversos tipos de lípidos, que funcionam como compostos estruturais em membranas, fonte de energia, metabolitos e produtos de armazenamento. Os lípidos são, basicamente, compostos de glicerol, açúcares ou bases de ácidos gordos. Consoante o número de ligações duplas presentes nas cadeias dos ácidos gordos, as microalgas podem apresentar 50-65% de ácidos gordos insaturados (Mata et al., 2010).

Atualmente, os ácidos gordos descritos seguidamente são produzidos industrialmente a partir de óleos de peixes. A utilização de microalgas para a produção destes ácidos pode ser uma mais valia, pela forma sustentável, viável e rápida em que ocorre (Borowitzka, 2013; Feng et al., 2012).

2.3.1 Ácido γ -linolénico

O ácido γ -linolénico (ALA), da família dos ómega-3, é um ácido gordo essencial que o organismo humano não consegue sintetizar e, por este motivo, torna-se necessário o seu consumo. Este ácido gordo encontra-se alojado nas membranas celulares. O ALA está relacionado com a diminuição do risco de se desenvolver doença cardiovascular (Borowitzka, 2013; Wongsawat, 2017) (Wongsawat, 2017).

2.3.2 Ácido eicosa-pentaenóico

O ácido eicosa-pentaenóico (EPA), da família dos ómega-3, é um ácido gordo essencial, que auxilia o controlo da inflamação causada pelo excesso de ómega-6. Este ácido gordo consegue manter os níveis de triglicérideos saudáveis e previne doenças cardiovasculares. O consumo deste ácido gordo é extremamente importante na fase inicial da vida (Naidoo et al., 2013).

2.3.3 Ácido docosahexaenóico

O ácido docosahexaenóico (DHA), da família dos ómega-3, é um ácido gordo extremamente importante para o bom funcionamento cerebral, visto que 60% da massa cerebral é composta por gordura e, cerca de 20% desta gordura é DHA. O aumento do consumo de DHA melhora a capacidade cognitiva e aumenta a resiliência dos neurónios (Borowitzka, 2013) (Naidoo et al., 2013).

2.4 Vantagens da utilização industrial das microalgas

Industrialmente, as microalgas têm vindo a conquistar um elevado interesse na sua utilização, uma vez que acarretam grandes vantagens e são uma via muito mais promissora em relação a outras utilizadas.

A nível industrial, as principais vantagens na utilização de microalgas são (Goswami et al., 2015):

1. Elevada velocidade de crescimento:
 - O número de microalgas duplica em poucas horas e tem grande produtividade nos compostos de alto valor acrescentado (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Guedes et al., 2011);
2. Elevados rendimentos na produção de biocombustíveis:
 - Uma vez que as microalgas são fundamentalmente constituídas por óleos e hidratos de carbono, a produção de biocombustíveis torna-se altamente rentável;
3. Consumo de dióxido de carbono:
 - As microalgas são plantas, logo utilizam o dióxido de carbono na fotossíntese;
4. Não é necessário solo arável para crescerem;
5. Purificação de efluentes:
 - Os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas podem ser extraídos de águas residuais, contribuindo deste modo para a redução de custos e o tratamento simultâneo de efluentes;
6. Produção de energia;
7. Produção de compostos base de alto interesse industrial usados como matérias-primas de origem renovável na produção de plásticos, químicos, lubrificantes, entre outros (Gomez-Zavaglia et al., 2019);
8. A biomassa pode ser usada com alimentação animal;
9. Geração de empregos.

2.5 Aplicações das microalgas e dos compostos de valor acrescentado

As microalgas apresentam inúmeras aplicações, destacando-se, por exemplo (Goswami et al., 2015):

1. Biocombustíveis:
 - Devido ao crescimento rápido da biomassa e à grande concentração de óleos e/ou de hidratos de carbono, as microalgas são uma boa alternativa como matéria-prima para a produção de biocombustíveis;
2. Cosméticos:
 - As microalgas possuem propriedades naturais anti-celulíticas e anti-idade, uma vez que conseguem aumentar a elasticidade e a estimulação da purificação da pele (Osório et al., 2020);
3. Fertilizantes;
4. Compostos farmacêuticos e nutracêuticos (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Osório et al., 2020).

2.6 *Chlorella zofingiensis*

A família *Chlorella* (spp.) tem vindo a ser comercialmente aplicada para a alimentação humana, animal e para a obtenção de compostos de valor acrescentado. Assistiu-se a um aumento do potencial de utilização de *Chlorella* para a produção de biodiesel (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Wu et al., 2006).

A *Chlorella zofingiensis* tem uma tonalidade verde, sendo assim associada ao género *Chlorella*. Este tipo de microalga apresenta células imóveis e unicelulares de forma esférica, em que o seu tamanho pode variar entre os 2 e 15 µm de diâmetro. Devido à formação de esporos, este tipo de microalga reproduz-se assexuadamente, produzindo células filhas a partir de células parentais imóveis. A fase de reprodução assexuada é, geralmente, composta por três etapas: crescimento, amadurecimento e divisão (Wu et al., 2006).

A *Chlorella zofingiensis* contém clorofila *a* e *b*, o que lhe confere a capacidade de fotossíntese, e carotenoides primários e secundários. Esta microalga consegue sintetizar e acumular compostos primários, como é o caso da luteína (Ip & Chen, 2005). Para que a microalga produza e acumule carotenoides secundários, é necessário que se encontre sob situação de stress, ou é essencial a suplementação de luz laranja, para que se estimule a carotenogénese (Figura 2.10). Por exemplo, quando a *Chlorella zofingiensis* é cultivada em meio sem azoto e com altas intensidades de luz, produz carotenoides secundários, dos quais cerca de 70% é astaxantina (Osório et al., 2020; Zhu et al., 2014).

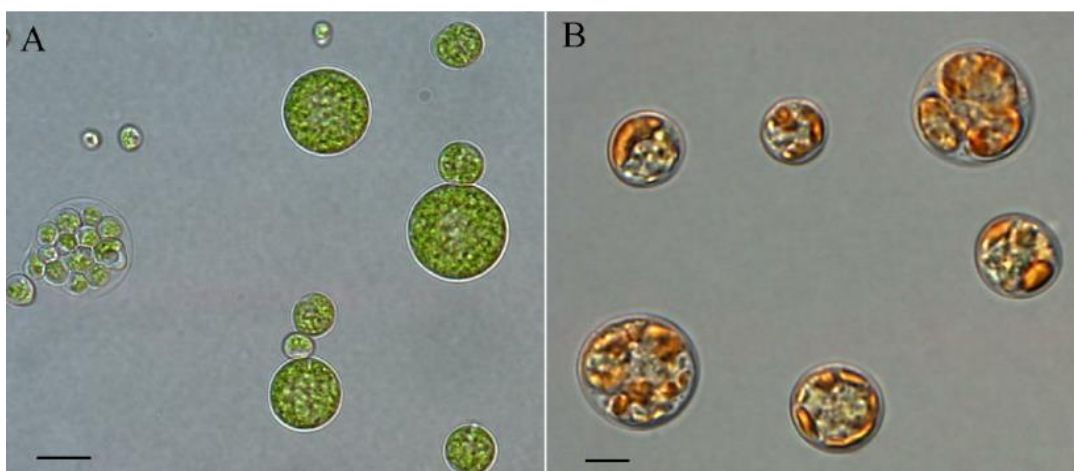


Figura 2.10 - *Chlorella zofingiensis* (A- Situação normal; B- Situação de stress) (Del Campo et al., 2004).

Foram realizados diversos estudos científicos relacionados com o potencial da *Chlorella zofingiensis* para a acumulação de compostos de alto valor, como a astaxantina e luteína. Quando se realiza um cultivo fotoautotrófico, a microalga em estudo acumula uma quantidade significativa de carotenoides valiosos, nomeadamente a astaxantina e luteína, sendo possível obter cerca 15.0 mg/L de astaxantina e cerca de 20.0 mg/L de luteína (Del Campo et al., 2004; Osório et al., 2020).

O cultivo de microalgas recorrendo a utilização da luz solar natural é um método eficaz para reduzir o custo de produção de biodiesel à base de microalgas, o que faz com que seja possível obter cerca de 58,4 mg/L por dia de lípidos (Feng et al., 2012).

Também foram realizados estudos científicos acerca da capacidade de utilização dos resíduos das indústrias de refinação de açúcar, por parte da *Chlorella zofingiensis*. Nestes estudos

os resultados foram bastante promissores, uma vez que se conseguiu obter 0.71 g/L por dia de astaxantina, utilizando os resíduos do melão como fonte principal de carbono (Liu et al., 2012).

A *Chlorella zofingiensis* é uma espécie ótima para se produzir astaxantina, dado que a produção deste composto é dependente das condições abióticas a que se submete a microalga e esta adapta-se a diferentes ambientes. A produtividade pode ser aumentada devido a dois fatores: ou se submete a microalga a condições de *stress* (escassez de substrato, variação de pH, salinidade, etc.) ou se sujeita a microalga a luz laranja, de forma constante. A segunda opção faz com que a espécie potencie o ciclo de Carotenogénese e, assim, aumenta-se a produção de astaxantina (Liu et al., 2014) .

Atualmente, a astaxantina é produzida por via sintética, o que não é o mais desejado ambientalmente. Assim, torna-se importante a otimização da produção da astaxantina através de uma via biológica e sustentável (Liu et al., 2014; Osório et al., 2020).

Todos os estudos que envolvem esta espécie de microalga têm o propósito de potenciar a produção de lípidos e carotenoides de alto valor, sendo pertinente aprimorar a técnica para maximizar a produção destes compostos.

Assim, torna-se evidente a pertinência do estudo do efeito dos fatores ambientais no cultivo da *Chlorella zofingiensis*.

3. Materiais e métodos

Neste capítulo encontra-se descrito o procedimento experimental utilizado no decorrer deste estudo. Neste capítulo estão contemplados o plano experimental e condições impostas às culturas de microalgas, assim como, a montagem dos fotobiorreatores e métodos de extração e quantificação que foram realizados durante os ensaios.

3.1 Planeamento experimental e codificação dos ensaios

Para que fosse possível estimar o número de ensaios a desenvolver, de forma a otimizar e estudar a sinergia entre fatores ambientais, foi realizado um planeamento experimental 2^3 , onde foi avaliada a influência do fotoperíodo (8, 16 ou 24 h), *stress* nutritivo (falta de azoto ou excesso de ferro) e período de suplementação de luz laranja (0, 12 ou 24 h) na acumulação de carotenoides, e em particular de astaxantina.

As amostras foram codificadas quanto ao fotoperíodo, presença de nutrientes e período de suplementação de luz laranja. Por exemplo, um ensaio que tenha sido submetido a um fotoperíodo de 16 horas de luz, onde o meio de cultura esteja com a concentração de azoto reduzida 10 vezes (*stress* nutritivo ao longo dos 20 dias) e com suplementação de luz laranja durante 24 horas é codificado da seguinte forma: 16F20N24L.

Na Tabela 3.1 apresentam-se as condições de cultivo bem como a correspondente codificação. A temperatura foi controlada a 18 ± 1 °C e a iluminação foi mantida constante com uma intensidade luminosa de 5549 LUX (sem a presença de LEDs) ou 7329 LUX (com a presença dos LEDs).

Tabela 3.1- Condições de crescimento e codificação dos ensaios

Ensaio	Fotoperíodo (horas)	<i>Stress</i> nutritivo (dias)	Suplementação de Luz laranja (horas)	Codificação
1	8	20	0	8F20N0L
2	16	20	0	16F20N0L
3	8	20	24	8F20N24L
4	16	20	24	16F20N24L
5	8	0	0	8F0N0L
6	16	0	0	16F0N0L
7	8	0	24	8F0N24L
8	16	0	24	16F0N24L
9	12	10	12	12F10N12L ^A
10	12	10	12	12F10N12L ^B
Controlo A	24	0	0	CA
Controlo B	24	0	0	CB
Controlo C	24	0	0	CC

Nota: Os ensaios 9 e 10 diferem na concentração de $FeSO_4$ adicionada, pois no ensaio 9 foi adicionado cerca de 2 mL de solução de $FeSO_4$ a 4,98 g/L mais 8 mL de água desionizada e no ensaio foi adicionado 10 mL de solução de $FeSO_4$ a 4,98 g/L. O controle A foi utilizado para controlar os ensaios 1,2,5 e 6. O controle B foi utilizado para controlar os ensaios 3,4,7 e 8. O controle C foi utilizado para controlar os ensaios 9 e 10. Cada ensaio teve 3 réplicas para assim se conseguir garantir que os valores obtidos são confiáveis.

3.2 Cultivo das microalgas

3.2.1 Estirpe selecionada

A microalga cultivada neste estudo foi a *Chlorella zofingiensis* SAG 4.80, proveniente da Universidade Gottinger, na Alemanha. O inóculo foi realizado através da adição de 1 L de microalgas ($C=7,3$ g/L) a 5 L de meio Bold Basal Medium (Anexo A). O inóculo foi mantido a uma temperatura estável de 18 ± 1 °C e com uma intensidade luminosa (lâmpada fluorescente Osram 3200 K) controlada de 5549 LUX.

3.2.2 Preparação dos fotobiorreatores de 250 mL

Foram autoclavados todos os tubos de Kjeldahl, tubos de vidro, tubos de silicone, rolhas de algodão hidrofílico e o meio de cultura (Anexo A). Nos tubos de Kjeldahl adicionou-se cerca de 10 mL de solução de microalgas e 190 mL de meio de cultura, colocaram-se os tubos de vidro (ligados a filtros de 20 micrómetros esterilizados) e, por fim, rolhou-se o sistema e ligaram-se as bombas de ar. Os fotobiorreatores, após serem submetidos às etapas mencionadas, podem ser vistos na Figura 3.1.

Posteriormente, foi realizado um *scale-up* para um reator de 20 L, onde a adição de microalgas e meio de cultura se manteve na mesma proporção dos ensaios de 250 mL. Neste *scale-up* não foi utilizado material esterilizado, devido às suas dimensões, contudo para prevenir contaminações, a água foi tratada previamente com hipoclorito. Finalmente neutralizou-se com tiosulfato de sódio (todos os circuitos de ar submersos e a trabalhar), onde a configuração final do fotobiorreator se encontra representada na Figura 3.2.



Figura 3.1- Fotobiorreatores de 250 mL

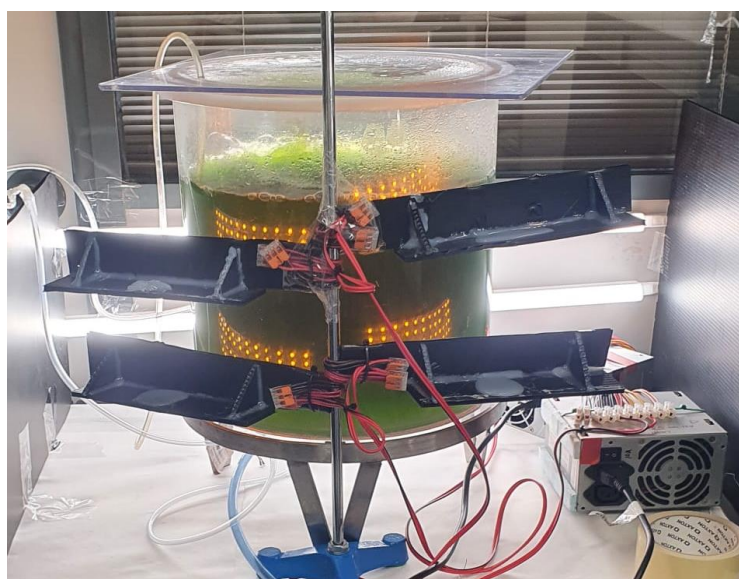


Figura 3.2- Fotobiorreator de 15 L

3.3 Monitorização das culturas

3.3.1 Determinação da concentração de biomassa

Para a determinação da concentração de biomassa, é retirado 1 mL de cultura de microalgas, que é posteriormente diluído, podendo ir desde 0 a 25 vezes. Após esta diluição procede-se a uma leitura espectralométrica, a um comprimento de onda de 750 nm (*Shimadzu UV-1700*). O cálculo da concentração foi realizado através de uma reta de calibração concentração de biomassa seca vs absorvância a 750 nm, presente no Anexo B.

3.3.2 Observação da existência de contaminações

Para avaliar se as culturas tinham algum tipo de contaminação, foram realizadas observações em microscópio ótico (*Leica DME*). Em caso de contaminação o ensaio era descartado.

3.4 Determinação do teor de açúcares

A quantificação dos açúcares presentes na *Chlorella zofingensis* foi feita por HPLC, de acordo com o procedimento seguinte:

- Pesar 10 mg de biomassa liofilizada
- Adicionar 2 mL de ácido sulfúrico diluído a 80%
- Deixar a amostra em água fria por 20 horas (dá-se a hidrólise, no entanto previne-se a combustão total da biomassa)
- Adicionar 8 mL de água desionizada e sonificar as amostras durante 20 min (Borges-Campos et al., 2010)
- Passar o sobrenadante por um filtro hidrofílico de 20 μm
- Ler no HPLC (*Shimadzu LC-40*, com um detetor de índice de refração RID 20-A, com uma coluna de fase reversa *Coregel 87H3SS Transgenomic* e a fase móvel é uma solução de ácido sulfúrico a 5 mmol/L (fluxo de 0,6 mL/min a 45 °C)). A

determinação da concentração dos açúcares foi efetuada a partir da soma das áreas dos picos.

3.5 Determinação da concentração de pigmentos

3.5.1 Quantificação das clorofilas

- Pesar 5 mg de amostra de microalgas liofilizadas;
- Adicionar uma mistura de acetona-água (8 mL, 90% v/v acetona);
- Tapar e marcar no tubo o volume exato da amostra, pois a acetona evapora;
- Agitar o tubo vigorosamente e sonicar por 10 min;
- Deixar a amostra reagir no escuro a 4 °C por 48 horas;
- Após esse tempo, adicionar ao tubo a quantidade evaporada de acetona;
- Centrifugar as amostras a 4000 rpm durante 5 min;
- Ler a absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro *Shimadzu UV-1700*) a 665, 645 e 630 nm.
- Calcular a concentração de clorofilas através das equações:
 - $Ch_a = 11,6 \times OD_{665} - 1,31 \times OD_{645} - 0,14 \times OD_{630}$ (1)
 - $Ch_b = 20,7 \times OD_{645} - 4,34 \times OD_{665} - 4,42 \times OD_{630}$ (2)
 - $Ch_c = 55,0 \times OD_{630} - 4,64 \times OD_{665} - 16,3 \times OD_{645}$ (3)

Onde, Ch_a , Ch_b and Ch_c são as concentrações ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de clorofila *a*, *b* e *c*, respectivamente. OD_{xxx} é a densidade ótica medida no comprimento de onda específico.

Se a densidade ótica medida for superior a 0,8 unidades, a amostra deve ser diluída com o solvente (acetona-água) (Womersley, 1981).

3.5.2 Quantificação das carotenoides totais

- Pesar 5 mg de amostra de microalgas liofilizadas;
- Adicionar uma 1 ml de solução de KOH a 60% w/w
- Sonicar as amostras por 10 min;
- Homogeneizar as amostras e colocar no banho-maria a 40 °C por 40 min;
- Após esse tempo, agitar as amostras e deixar no escuro a 4 °C por 24 horas;
- Após esse tempo, adicionar 1 mL de etil éter até que o extrato orgânico esteja claro;
- Deixar a mistura evaporar por completo ou utilizar nitrogênio para facilitar a evaporação e ressuspender o resíduo em 5 mL de acetona
- Ler a absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro a 444 nm.
- Calcular a concentração total de carotenóides através das equações:
 - $Ct = 4,32 \times OD_{444} - 0,0439$ (4)

Onde, Ct é a concentração de carotenoides ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Whyte, 1987)

3.5.3 Quantificação de astaxantina

- Construção das curvas de calibração (Anexo C)
 - Pesar 5-6 mg de astaxantina padrão em DMSO, para um volume final de 25 mL
 - Pipetar 0,31, 0,625, 1,25, 2,50 e 5,00 mililitros para balões volumétricos de 25 mL e perfazer o volume com DMSO
 - Ler as absorvâncias das soluções diluídas nos seguintes comprimentos de onda: 492, 510, 520, 530, 540 e 550 nm.

- O cálculo da concentração de astaxantina das soluções diluídas é obtido pela equação 5.

$$\blacksquare C_{Ast.} = \frac{ABS \times 10000}{A_{1\text{ cm}}^{1\%}} \quad (5)$$

Onde ABS é o valor da absorvância obtido na leitura espectrofotométrica, $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ é a absortividade molar com o valor de $2220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a concentração de astaxantina é dada em $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

- Extração e quantificação da astaxantina das amostras
 - Pesar 50 mg de biomassa liofilizada e adicionar 2 mL de DMSO
 - Incubar a mistura por 30 min
 - Adicionar 6 mL de acetona e centrifugar as amostras a 4000 rpm por 5 min
 - Recolher o sobrenadante (repetir o processo de extração)
 - Misturar os sobrenadantes e adicionar 10 mL de cloreto de sódio a 200 g/L (para remover traços de acetona) e 10 mL de éter petróleo
 - Separa-se a fase superior e seca-se a mesma por filtração através de sulfato de sódio anidro para um balão de 25 mL e completar com DMSO.
 - Ler as absorvâncias das amostras nos comprimentos de onda referidos anteriormente, o valor da astaxantina é determinado através das retas de calibração (escolher o maior valor obtido nas leituras, mas tem de ser mais baixo ou igual à concentração de carotenoides).

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental, para que seja possível compreender quais os parâmetros que influenciam, e de que modo, o crescimento das microalgas e a acumulação de compostos de alto valor.

4.1 Concentração de biomassa

A concentração da biomassa tornou-se um fator de controlo, não só para perceber se os ensaios estariam a decorrer de acordo com o expectável, mas também para determinar quais os parâmetros ambientais que afetariam positivamente o crescimento das microalgas. O objetivo era o de que as microalgas crescessem de forma rápida e com acumulação de produtos de alto valor, pois assim o rendimento a uma escala industrial seria mais elevado.

Nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam-se as curvas de crescimento correspondentes aos diferentes ensaios. Em cada conjunto de ensaios, procedeu-se a um ensaio de controlo para melhor avaliar a ocorrência de problemas em cada ronda de ensaios.

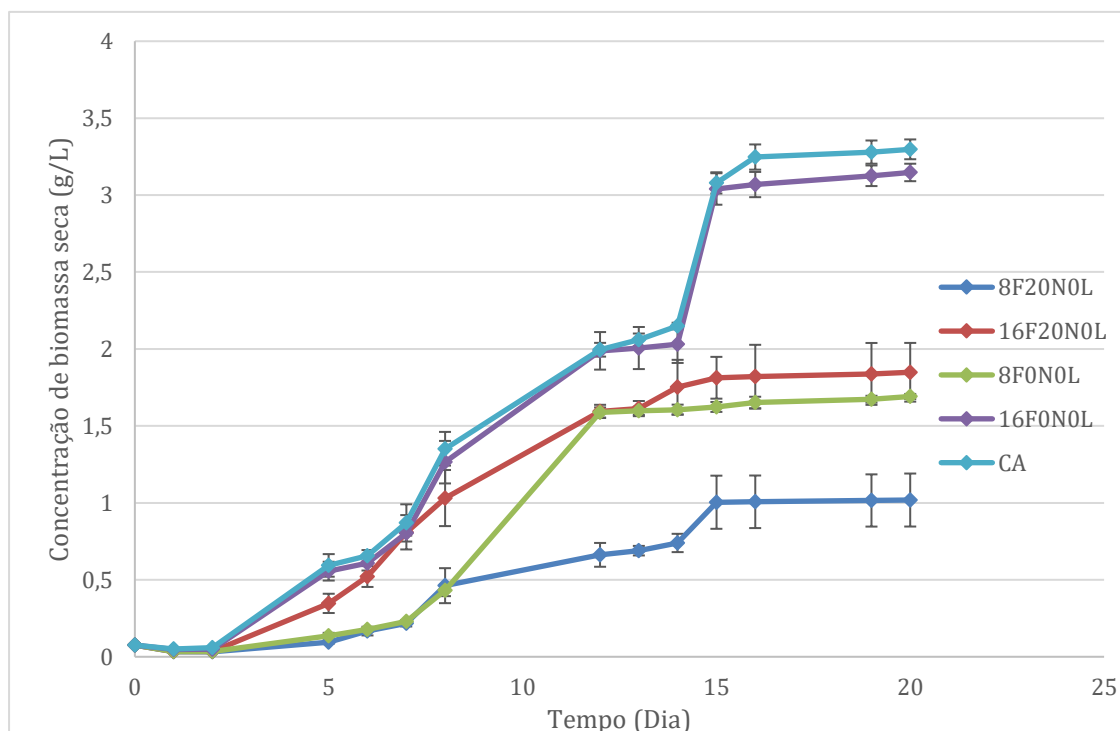


Figura 4.1 - Curvas de crescimento na primeira ronda de ensaios

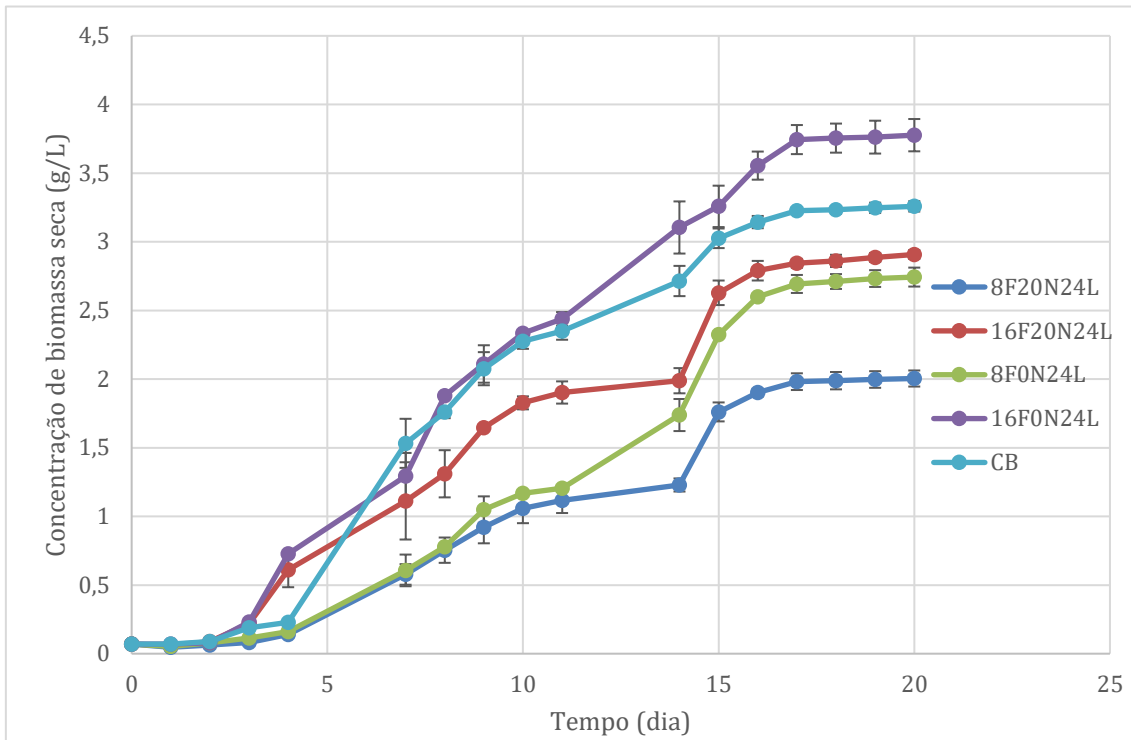


Figura 4.2 - Curvas de crescimento na segunda ronda de ensaios

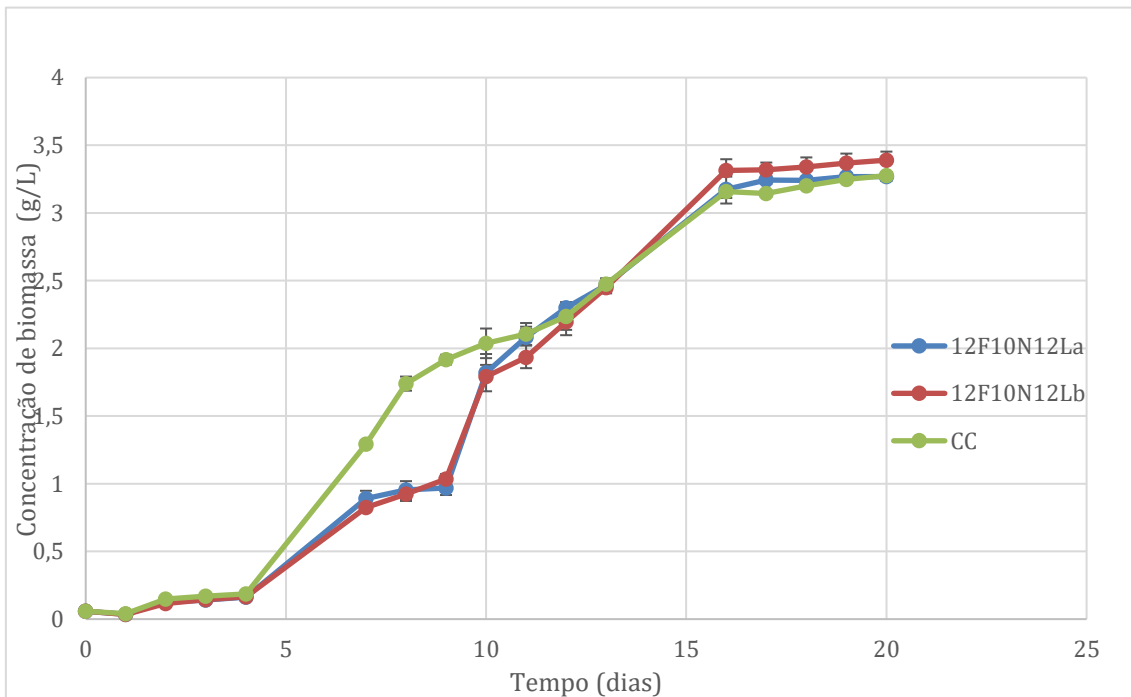


Figura 4.3 - Curvas de crescimento na terceira ronda de ensaios

Nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 é possível observar as diferentes fases das curvas de crescimento da *Chlorella zofingiensis* em diferentes condições de parâmetros ambientais. As diferentes culturas tiveram um período de adaptação ao meio de 2 a 4 dias, este período representa a fase *lag*, onde a taxa de crescimento é muito próxima de zero ou zero, uma vez que as microalgas estão a adaptar-se às condições ambientais impostas, bem como ao reator. A partir dessa altura é

possível notar que o crescimento aumenta de forma exponencial até ao décimo sexto dia, atingindo aqui a sua concentração máxima. Este período é a fase *exponencial*, onde a velocidade de crescimento máxima é atingida e o crescimento celular aumenta exponencialmente. Nesta fase também se dá a acumulação de compostos de alto valor, facto este de elevada relevância, dado que a alteração das condições ambientais pode mudar o mecanismo de produção de energia, levando à acumulação de compostos de alto valor. Uma mudança a nível nutricional ou luminoso pode levar ao mecanismo primordial de produção de energia que é a fotossíntese, para passar a ser utilizado a carotenogénese e é sobre este princípio que vamos discutir todos os resultados. As alterações dos parâmetros ambientais obrigam as espécies a adaptarem-se para sobreviver e depois toda essa informação irá ser transmitida às gerações futuras, o que leva à produção e acumulação de compostos essenciais através dum método sustentável.

Por fim a última fase apresentada nas figuras é a fase *estacionária*. Nesta fase a taxa de crescimento é igual à taxa de morte, o que demonstra que começa a dar-se a escassez de nutrientes.

Na Figura 4.4 está representado um gráfico de barras que ilustra a concentração de microalgas ao fim de 20 dias.

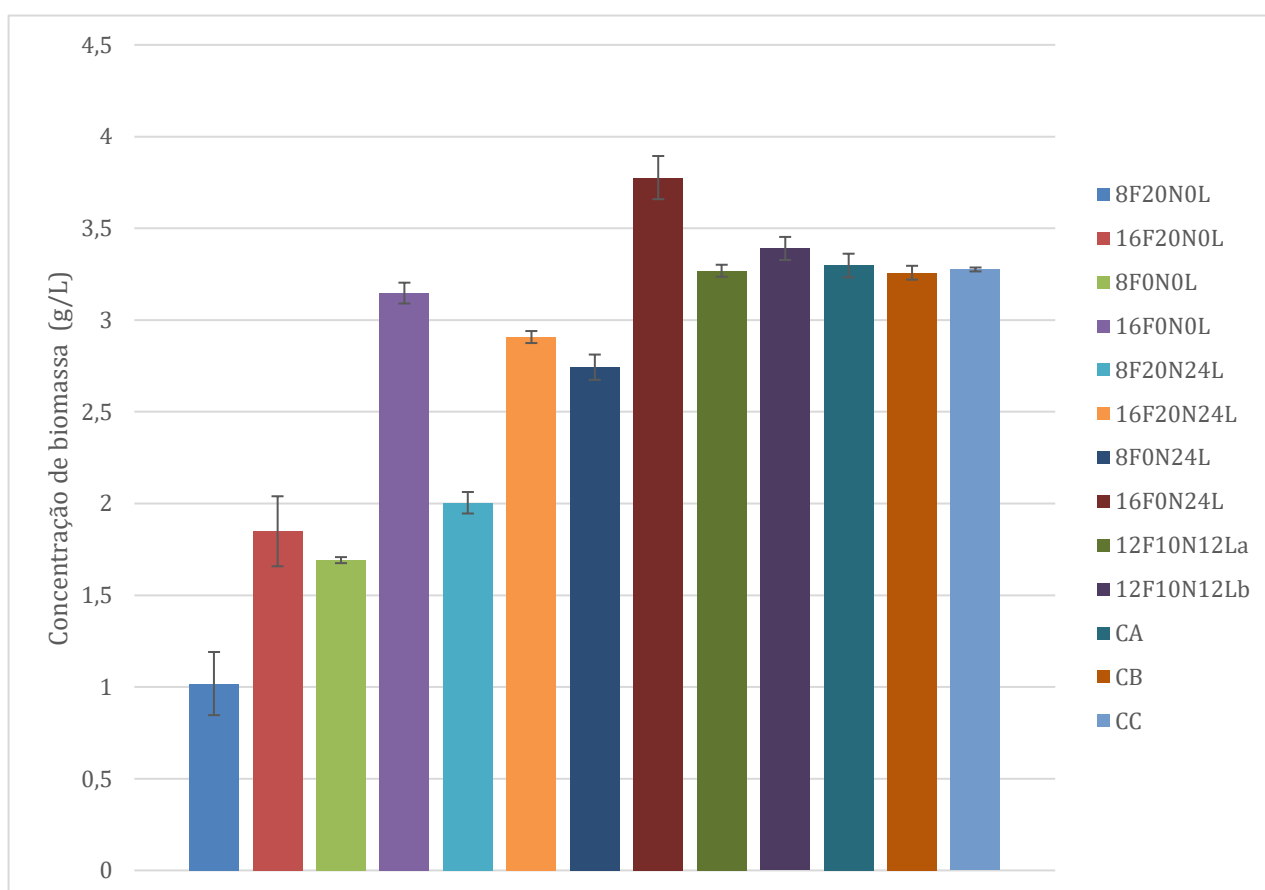


Figura 4.2 –Concentração de biomassa seca (g/L) de *Chlorella zofingiensis* obtida ao final dos 20 dias

É possível observar na Figura 4.4 que a cultura que teve um maior crescimento foi a 16F0N24L, que corresponde à cultura que nunca esteve em *stress* nutricional e teve sempre a maior suplementação com luz laranja, com um máximo de $3,777 \pm 0,1177$ g/L. Isto leva a concluir que uma concentração de nutrientes normal, um período luminoso de 16 horas e uma suplementação de 24 horas de luz laranja pode forçar a microalga a moldar-se a um regime que combina a utilização da fotossíntese e a carotenogénese. Ou seja, nas 16 horas de luminosidade com luz

branca as microalgas utilizariam a fotossíntese como principal mecanismo de produção de energia, já nas 8 horas em que não existia luz artificial branca e só existia luz laranja, as microalgas podem ter recorrido apenas à carotenogénese para continuarem a sua multiplicação.

De realçar também que o controlo imposto a cada ronda CA, CB e CC tiveram todos uma concentração final similar e uma curva de crescimento muito parecida, garantindo que os ensaios foram todos realizados de modo semelhante, sem que existisse quaisquer tipos de inibidores externos ao planeamento experimental, e permitindo assim a comparação de todos os resultados de todos os ensaios, ainda que realizados em períodos distintos.

A cultura que teve uma menor concentração foi a 8F20N0L. Este resultado pode ser explicado pelo facto destas culturas passarem 16 horas por dia sem qualquer tipo de iluminação e com *stress* nutritivo desde o primeiro dia, ou seja, com falta de nutrientes desde do início; isto levou a que a falta de luz e nutrientes inibisse o crescimento.

Os ensaios 12F10N12L^a e 12F10N12L^b variavam em 10 vezes a concentração do inibidor nutritivo implementado para que houvesse 10 dias de *stress* nutritivo, contudo é de salientar que não se notam grandes diferenças no crescimento das culturas de cada um dos ensaios, onde a solução poderia ser o aumento da concentração de agente indutor de *stress*. Desta forma, poder-se-ia observar o que acontece quando se adiciona um agente stressante em concentrações distintas, para que fosse possível a análise do tipo de *stress* que o agente stressante induziu.

4.2 Produção e acumulação de açúcares

Como foi revisto anteriormente no estado de arte, as microalgas são capazes de acumular açúcares com elevado valor comercial e, para tal, foi medida a sua concentração total, desta forma pode-se ter uma ideia geral da acumulação de açúcares em resposta aos parâmetros ambientais que foram impostos, para a potencialização da acumulação de astaxantina.

Na Figura 4.5 apresenta-se a concentração de açúcares totais na biomassa de *Chlorella zofingiensis* obtida nos diferentes ensaios.

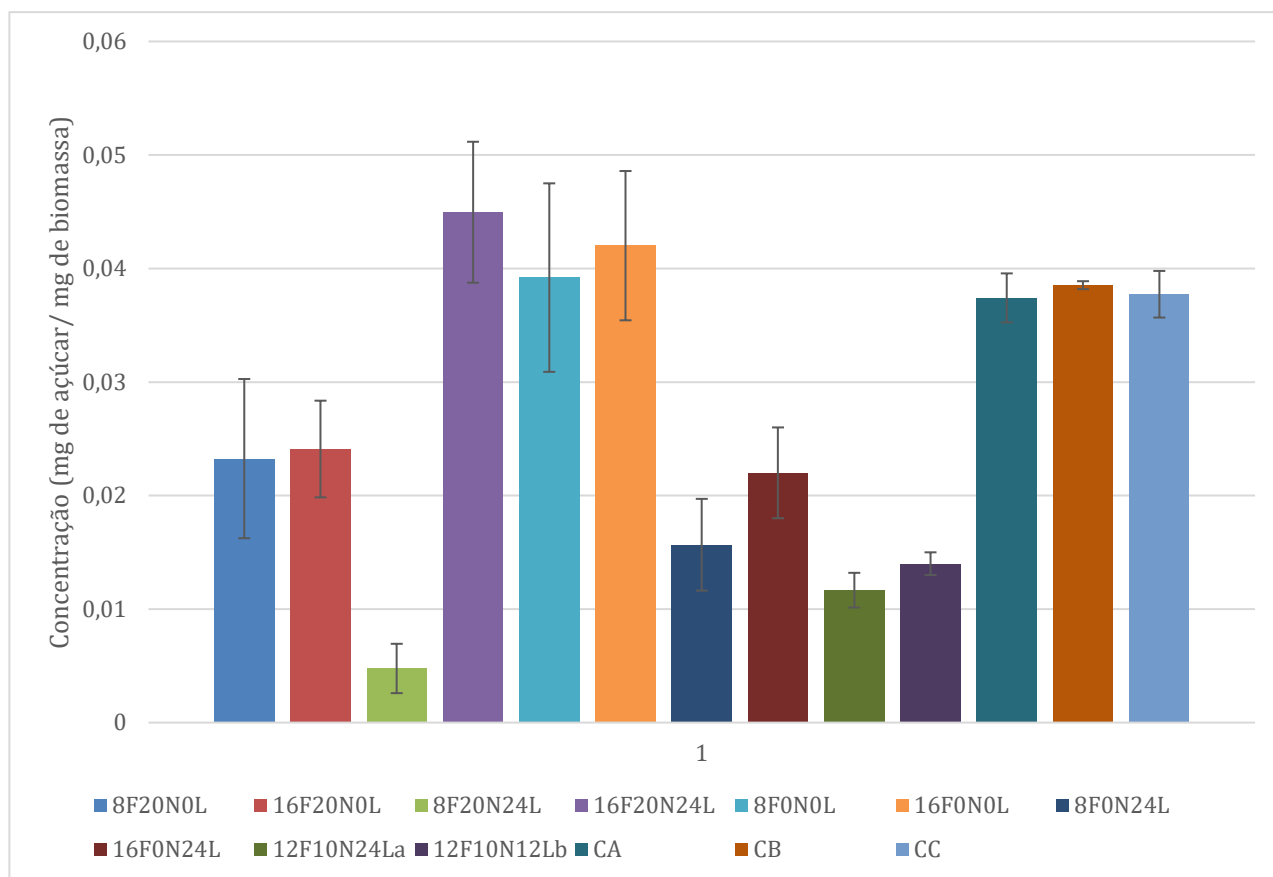


Figura 4.3 - Concentração de açúcares totais na biomassa de *Chlorella zofingiensis* (mg/mg biomassa seca

Na Figura 4.5 é possível observar que o ensaio em que foi obtida maior concentração de açúcares acumulados foi aquele em que a cultura foi submetida a um *stress* nutritivo mais elevado ao longo de 20 dias, 16 horas de luz branca e 24 horas de luz laranja a complementar. Isto pode explicar-se pelo facto de a *Chlorella zofingiensis* conseguir utilizar a fotossíntese e carotenogénese para a produção do seu alimento, levando a que a acumulação de açúcares tenha sido superior numa cultura que sofreu *stress* nutritivo ao longo de todo o ensaio, tendo como consequência uma adaptação da cultura para conseguir sobreviver a estas condições ambientais. Comparando os ensaios que originaram maiores e menores quantidades de açúcares acumulados, é de salientar que o único fator que se altera é o fotoperíodo. O fotoperíodo é necessário para o processo de fotossíntese onde um dos produtos finais deste processo é a glicose. Ou seja, se o meio nutritivo já não tem a concentração de nutrientes necessária, o que por si já leva ao *stress*, uma ausência de luz vai potenciá-lo, e inibe também a formação de glicose através do processo de fotossíntese. Relativamente à acumulação de açúcares, a suplementação de luz laranja não teve qualquer influência, dado que a amostra que apresentou maior e a que teve menor concentração de açúcares estavam ambas expostas ao mesmo período de suplementação de luz laranja.

Na Figura 4.5 também é possível observar que os açúcares totais presentes na biomassa dos controlos são semelhantes, o que reforça o facto de que todo o trabalho experimental ocorreu sem influências externas.

4.3 Produção e acumulação de pigmentos

4.3.1 Clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *c*

A clorofila *a* é o principal pigmento utilizado na fotossíntese, enquanto as clorofilas *b* e *c* são pigmentos acessórios, logo é impossível substituir a clorofila *a* no processo de fotossíntese. As clorofilas *b* e *c* servem para ampliar a faixa de luz que pode ser utilizada no processo de fotossíntese; sendo assim quanto mais elevado o período de exposição à luz, mais elevada a taxa de fotossíntese. Porém quando as células estão sob *stress*, procuram outras vias para conseguirem produzir o seu alimento como a carotenogénese, tendo como consequência a produção de uma grande quantidade de carotenoides, desprezando a produção de pigmentos acessórios como a clorofila *b* e *c*.

Na Figura 4.6 representa-se a concentração de clorofila *a* na biomassa de todos os ensaios realizados ao longo do trabalho

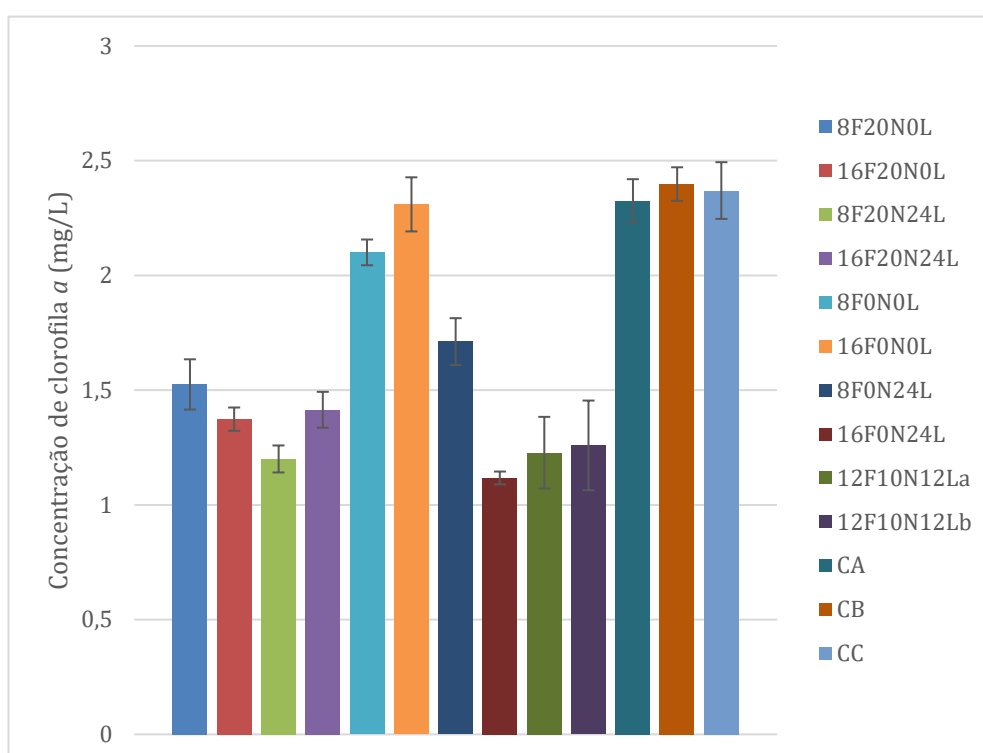


Figura 4.4 - Concentração de clorofila *a*

Na Figura 4.6 é possível observar e perceber que as culturas que mais produziram este composto foram os controlos, o que é expectável pelo facto de os controlos estarem expostos à luz branca 24 horas por dia. A iluminação dos controlos 24 horas por dia resulta numa taxa de fotossíntese superior à dos restantes ensaios.

Ainda assim, nos restantes ensaios é possível observar que a cultura que acumulou mais clorofila *a* foi o grupo que esteve sujeito a 16 horas de exposição de luz branca, não foi exposta à luz laranja e não sofreu *stress* nutritivo (16F0N0L). A cultura que acumulou menor quantidade de clorofila *a* foi a cultura que para além de ter 16 horas de luz branca, também tinha 24 horas de exposição à luz laranja o que levou esta cultura a realizar os dois processos, conduzindo a uma menor acumulação de clorofila *a*.

Nas Figuras 4.7 e 4.8 representam-se as concentrações de clorofila *b* e *c* na biomassa de todos os ensaios realizados.

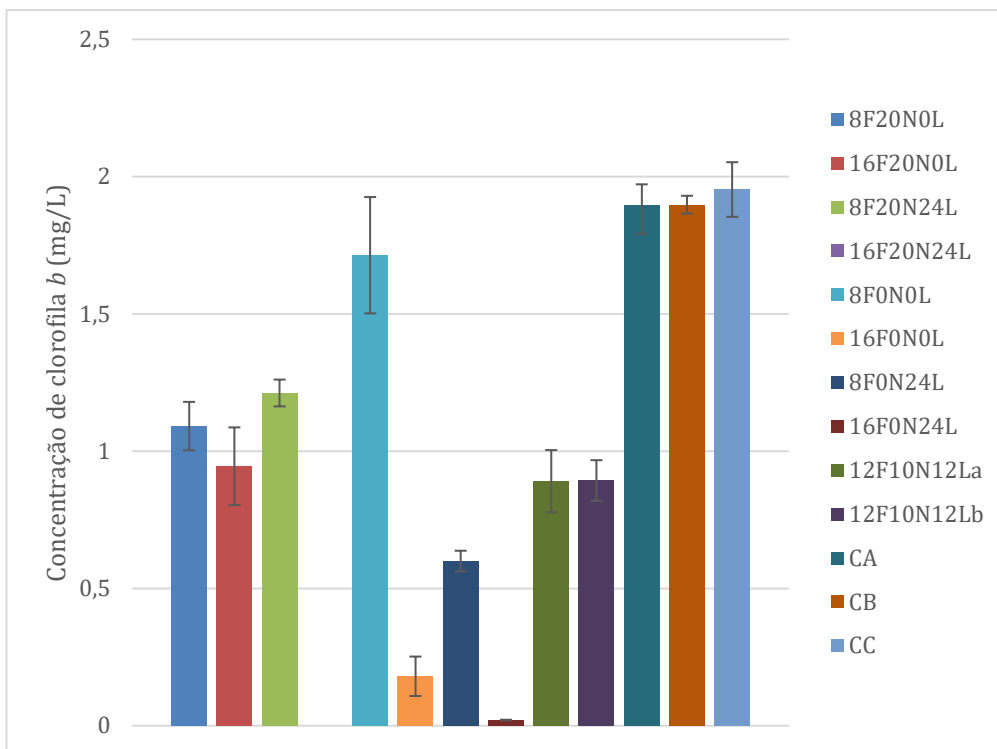


Figura 4.5 - Concentração de clorofila b

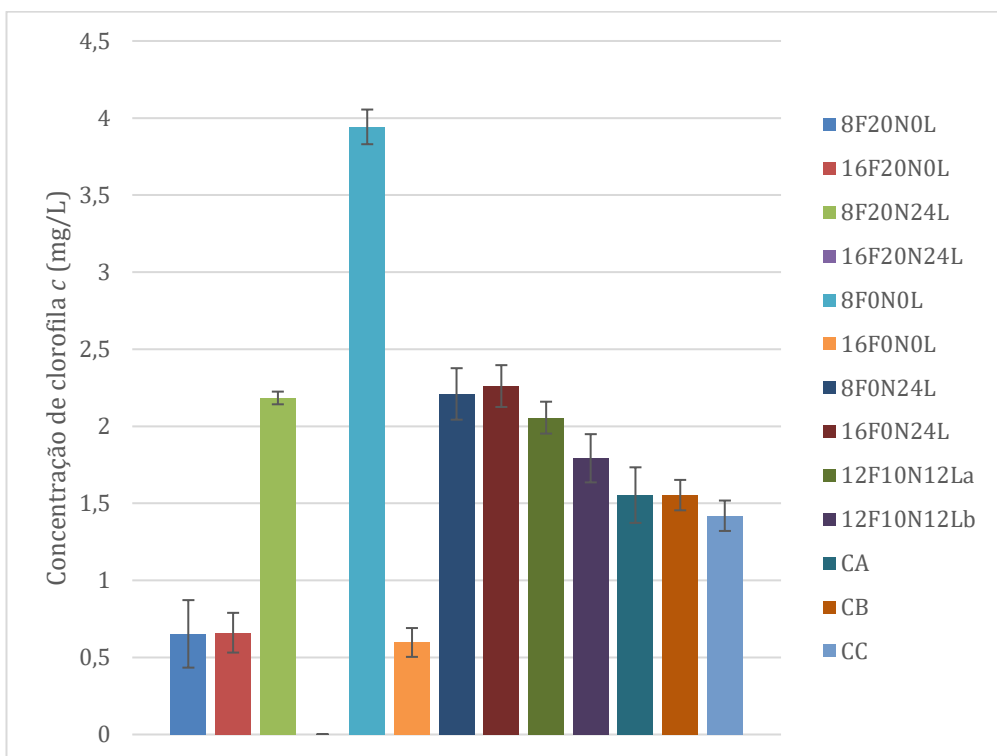


Figura 4.6 - Concentração de clorofila c

Na Figura 4.7 é possível perceber que as culturas que acumularam mais este pigmento acessório foram as que serviram de controlo. Isto pode explicar-se pelo facto de que a taxa de fotossíntese destas culturas ser a maior de todos os ensaios, ou seja, estas culturas só precisavam de recorrer a fotossíntese para conseguirem sobreviver, bastando apenas a clorofila a.

Na Figura 4.8 observa-se que a cultura com maior acumulação de clorofila *c* foi aquela cujo ensaio tinha as seguintes condições: 8 horas de exposição à luz branca por dia, sem *stress* nutritivo e sem exposição à luz laranja (8F0N0L). Portanto, a falta de iluminação para realizar a fotossíntese foi compensada pela maior produção de clorofila *c*.

De realçar também que o ensaio em que as culturas tinham uma exposição à luz branca de 8 horas, sem exposição a luz laranja e com o meio rico em nutrientes a necessidade destas microalgas de realizar fotossíntese foi elevada ao ponto destas acumularem quantidades elevadas de pigmentos acessórios, como aconteceu com a clorofila *b* e *c*. Neste ensaio as microalgas tendem a adaptar-se rapidamente para conseguir sobreviver às condições adversas que lhes são colocadas, levando a considerar que para se obter uma grande acumulação de clorofilas é necessária a diminuição do fotoperíodo. Isto para que as microalgas tenham de reserva uma grande quantidade e variedade de clorofilas, absorvendo assim no curto espaço de tempo em que estão expostas, o máximo de luz.

4.3.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos acessórios que não substituem a clorofila *a*, dado que sem a fotossíntese a microalga morre. No entanto, os carotenoides conseguem absorver luz na região da cor laranja e também realizam um processo similar à fotossíntese que é a carotenogénese. Este processo acessório, pode ser de elevado interesse, podendo ter uma maior taxa que a taxa da fotossíntese, no caso de serem alteradas as condições nutritivas e de luminosidade.

Na Figura 4.9 representa-se a concentração de carotenoides totais na biomassa de todos os ensaios.

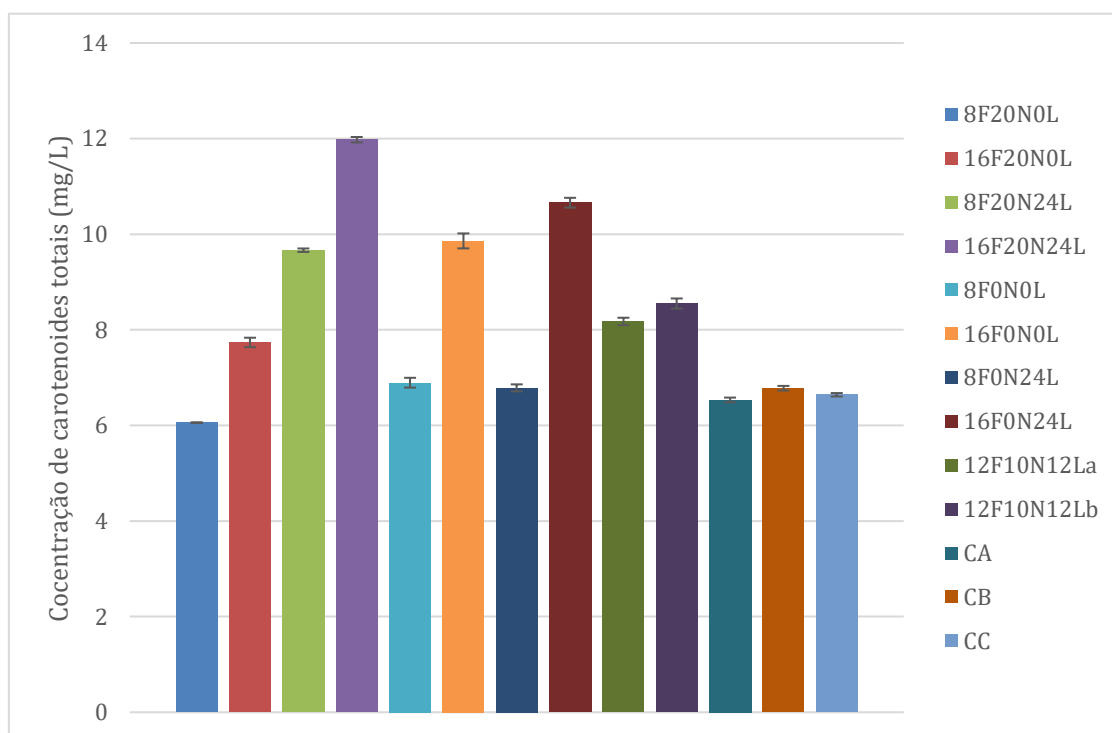


Figura 4.7 - Concentração de carotenoides totais

Na Figura 4.9 é possível observar que a acumulação de carotenoides foi mais elevada nas amostras que tiveram um fotoperíodo de 16 horas, além das 24 horas de suplementação de luz laranja, se bem que a amostra que acumulou mais carotenoides foi a que esteve sob *stress* nutritivo. Isto deve-se ao facto de que a microalga sujeita a *stress* nutritivo desde o início começou a produzir pigmentos acessórios para aumentar a eficiência do processo fotossintético, visto que os pigmentos acessórios absorvem luz noutros comprimentos de onda que a clorofila *a* não consegue.

Também é possível notar que os controlos utilizados para monitorizar todo o trabalho laboratorial estão com valores muito similares, o que indica que aparentemente não existiram condições externas diferentes durante o trabalho experimental.

Nos ensaios 12F10N12L^A e 12F10N12L^B a concentração de sulfato de ferro (II) varia 5 vezes entre estas amostras e nota-se que o ensaio 12F10N12L^B foi o que teve maior acumulação de carotenoides. Isto porque, a concentração deste composto foi de 50 vezes mais que o meio de cultura *standard*, o que levou a que as culturas acumulassem uma maior quantidade de pigmentos acessórios, assegurando e aumentando a eficácia da fotossíntese.

A amostra que acumulou menos carotenoides foi a 8F20N0L. Isto era expectável na medida em que estas culturas foram submetidas ao *stress* nutritivo desde o início, sem suplementação de luz laranja e com um fotoperíodo de 8 horas. Desta forma, a fotossíntese só foi realizada ao longo dessas 8 horas, dificultando a acumulação dos pigmentos acessórios. Também o crescimento da biomassa foi afetado.

Na Figura 4.10 está representada a concentração de astaxantina na biomassa de todos os ensaios.

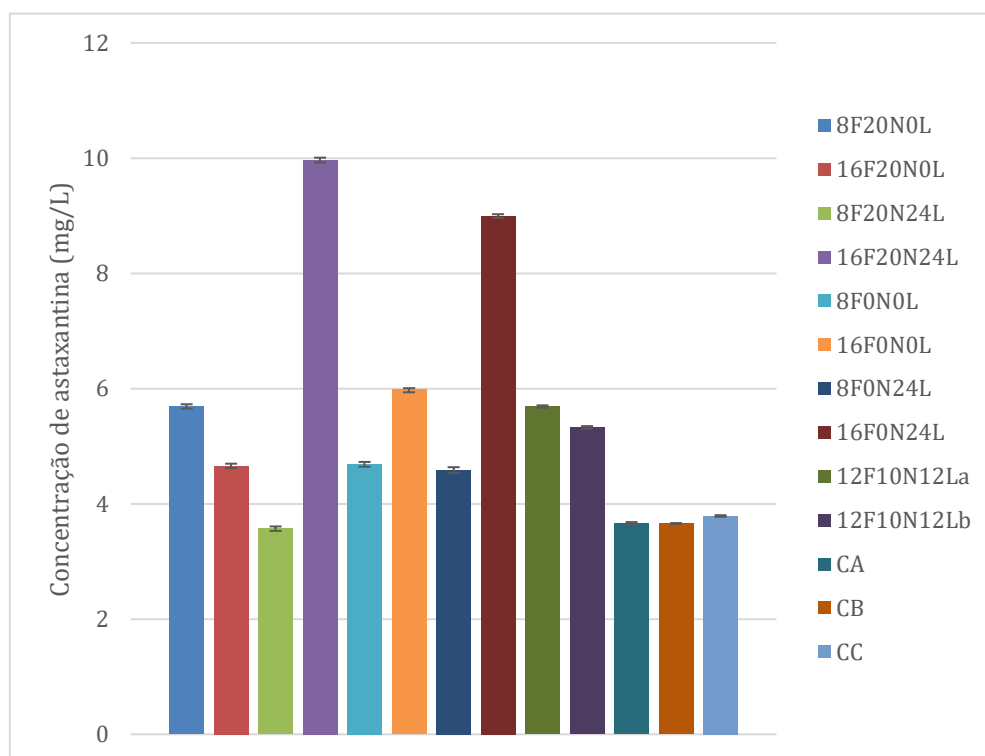


Figura 4.8 - Concentração de astaxantina

Sendo a astaxantina um carotenoide, a Figura 4.10 comprova que os parâmetros ambientais implementados conseguiram potenciar a produção de astaxantina. A cultura que mais acumulou

astaxantina foi a 16F20N24L, isto porque esta cultura tinha um fotoperíodo de 16 horas, com suplementação de luz laranja de 24 horas e *stress* nutritivo desde o início, o que fez com que esta cultura se adaptasse e produzisse muitos carotenoides assegurando o seu alimento.

As condições de *stress* implementadas tinham como objetivo principal otimizar a produção de astaxantina. Com as condições impostas, o valor mais elevado de concentração de astaxantina foi de $9,966 \pm 0,04$ mg/L (16F20N24L), representando assim 83,21% dos carotenoides totais ficando a sobrar cerca de 16,79% que se trata do restante, como por exemplo, a luteína.

Estas variações dos parâmetros ambientais ajudam a compreender a adaptabilidade da espécie estudada às condições adversas. Isto confirma-se, pois, a microalga numa situação de *stress* nutritivo, com fotoperíodo longo e suplementação persistente de luz com comprimentos de onda específicos fez com que a *Chlorella zofingiensis* se adaptasse e começasse a realizar processos semelhantes à fotossíntese (carotenogénese, exemplo) de forma a assegurar o seu processo metabólico.

4.4 Scale-up

Após a identificação de quais eram as condições em que se produzia maior quantidade de astaxantina, foi realizado um *scale-up* para perceber os efeitos dessas condições em culturas de volumes superiores. O volume utilizado para o *scale-up* foi de 15 L, ou seja, deu-se um aumento de 75 vezes em relação aos ensaios de bancada.

Na Figura 4.11 está representada a curva de crescimento do ensaio de *scale-up*, com uma temperatura controlada de 18 ± 1 °C e com uma intensidade luminosa controlada de 7359 LUX

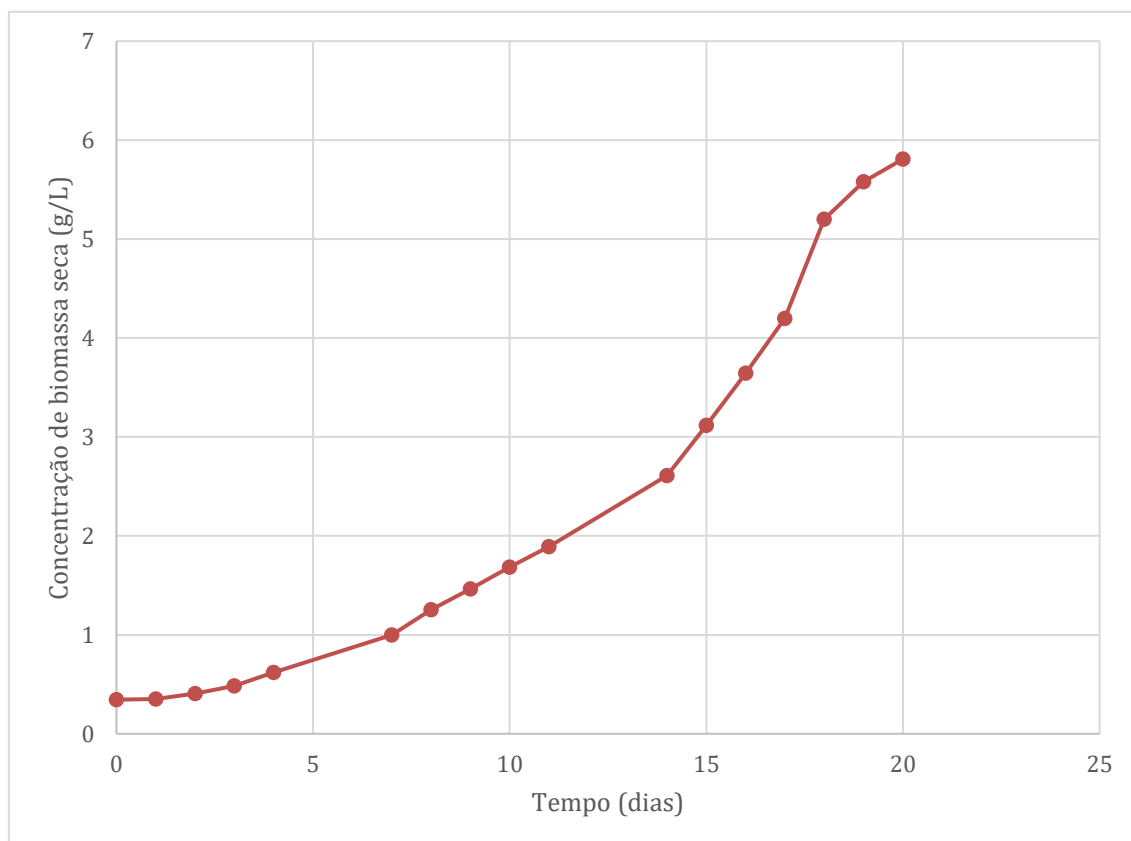


Figura 4.9 - Curva de crescimento da *Chlorella zofingiensis* no ensaio de *scale-up*

Na Figura 4.11 confirma-se que foi atingida a fase exponencial, contudo não se observa a fase *estacionária* como nos ensaios de bancada. Se se tivesse aumentado o período de cultivo no interior do fotobiorreator a fase *estacionária* iria ser atingida e seria possível determinar o tempo até se atingir a fase *estacionária* num fotobiorreator de 15 L. A fase de *adaptação* demorou aproximadamente o mesmo tempo que nos ensaios de bancada.

Na Figura 4.12 está representado o teor de carotenoides que foi traçado ao longo dos 20 dias para se tentar perceber como funciona a produção de carotenoides ao longo do tempo.

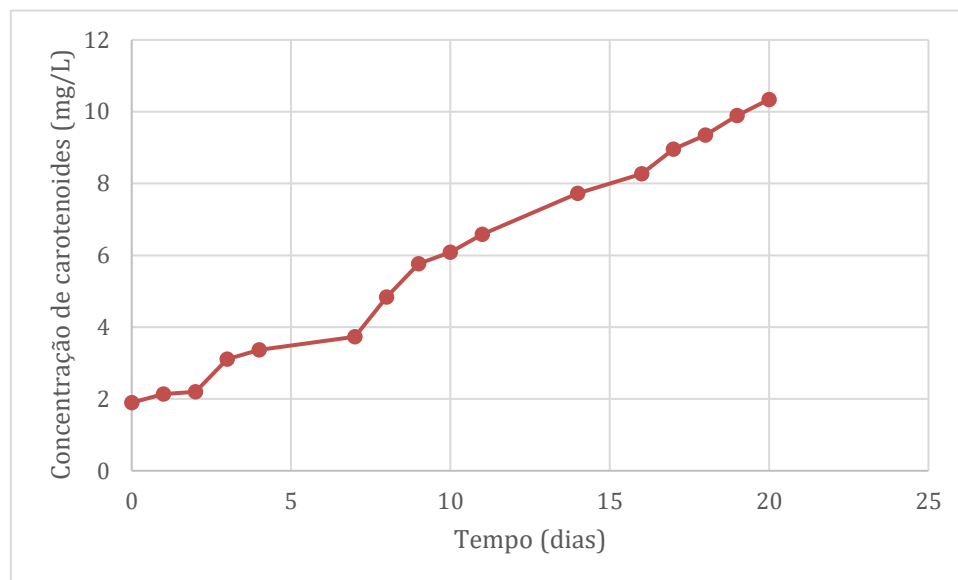


Figura 4.10 – Evolução da concentração de carotenoides ao longo do ensaio de *scale-up*

A Figura 4.12 mostra que ao longo dos 20 dias a produção e acumulação de carotenoides teve um crescimento acentuado, devendo-se ao facto de a cultura ter sido submetida a *stress* nutritivo desde o princípio, o que obrigou as microalgas a realizarem a carotenogénese. A acumulação de carotenoides foi também potenciada pela utilização de luz laranja que serviu de amplificador do processo de carotenogénese.

Poder-se-ia atingir concentrações de carotenoides superiores caso o *scale-up* decorresse por um maior período de tempo até ser atingida a fase estacionária.

Do total de carotenoides cerca de 82% por cento é astaxantina (8.47 mg/L). Isto pode favorecer a continuação de *scale-up* até se atingir a produção industrial destes compostos de alto valor agregado e assim tornar possível a produção destes compostos por uma via verde e sustentável.

Por fim, é de salientar que o crescimento celular e por sua vez a produção de carotenoides do ensaio de *scale-up* teve um comportamento idêntico ao ensaio de bancada 16F20N24L. Quando este valor é comparado com os obtidos anteriormente na literatura é de salientar que as culturas tiveram um crescimento dentro da gama de valores obtidos na literatura (3,0-5,0 g/L) e que a sua acumulação de carotenoides totais e de astaxantina também estão dentro dos valores previstos pela literatura.

5. Conclusões e sugestões para estudos futuros

Neste estudo foi primeiramente realizado um plano experimental que permitiu identificar quais as condições ambientais a implementar nas culturas de *Chlorella zofingiensis* SAG 4.80, proveniente da Universidade Gottinger, na Alemanha. As culturas foram sujeitas a alterações nutritivas, fotoperíodo e suplementação de luz laranja, com o objetivo de produzir compostos de alto valor. Neste estudo os parâmetros ambientais foram aplicados de forma a otimizar a produção de astaxantina.

A temperatura foi controlada a 18 ± 1 °C e a iluminação (lâmpada fluorescente *Osram* 3200 K) foi mantida constante com uma intensidade luminosa de 5549 LUX (sem a presença de LEDs) ou 7329 LUX (com a presença dos LEDs laranja). A combinação dos 3 parâmetros ambientais em análise, permitiu encontrar uma combinação que tornaria a acumulação de carotenoides mais elevada. A combinação que maior quantidade de carotenoides produziu foi uma suplementação de luz laranja durante 24 horas, um fotoperíodo de 16 horas e a falta de azoto no meio de cultura (*stress* nutritivo). Esta combinação fez com que a cultura que estava a crescer se adaptasse de forma a assegurar o seu ciclo metabólico, visto que a cultura neste caso recorreu a pigmentos acessórios e a processos similares à fotossíntese para produzir uma maior quantidade de alimento.

A amostra que apresentou uma maior produção de biomassa foi a amostra 16F0N24L, dado que esta cultura não estava sob o efeito de *stress* nutritivo e tinha um fotoperíodo de 16 horas com suplementação por 24 horas de luz laranja., Isto resultou numa elevada taxa de fotossíntese, originando também uma elevada taxa de multiplicação de células, ou seja, a biomassa aumenta exponencialmente.

A concentração mais elevada de açúcares acumulados na *Chlorella zofingiensis* foi de 0,044 mg de açúcares totais/mg de biomassa seca, sendo esta a amostra de cultura sujeita a um *stress* nutritivo desde o início, com 24 horas de suplementação de luz laranja e com o fotoperíodo de 16 horas. Isto pode ser explicado pelo facto de a *Chlorella zofingiensis* conseguir utilizar a fotossíntese e carotenogénese para a produção do seu alimento, levando a que a acumulação de açúcares tenha sido maior numa cultura que sofreu *stress* nutritivo de nitrogénio ao longo de todo o ensaio, levando assim a uma adaptação da cultura para conseguir sobreviver a estas condições ambientais.

A concentração mais elevada de carotenoides totais foi de $11,97\pm 0,06$ mg/L e a concentração mais alta de astaxantina foi de $9,97\pm 0,04$ mg/L (16F20N24L), representando assim 83.21% dos carotenoides totais ficando a sobrar cerca de 16,79% que são os restantes carotenoides, como por exemplo a luteína.

O ensaio de *scale-up* veio demonstrar que o escalamento realizado correu de acordo com o esperado, visto que o crescimento celular e a produção de carotenoides tiveram um comportamento idêntico aos ensaios de bancada que promoveu os melhores resultados (16F20N24L). No ensaio realizado em fotobiorreator de 15 L, a concentração de biomassa foi de 5,80 g/L e a concentração de carotenoides foi de 10,34 mg/L, cerca de 82% é astaxantina (8.47 mg/L).

Após a realização deste estudo surgem algumas ideias de alterações que podem vir a ser realizadas de forma a ser possível melhorar as condições de *scale-up* bem como estudar outros parâmetros ambientais:

- Aumentar o período de tempo nas culturas no fotobiorreator de 15 L de forma que se atinja a fase estacionária
- Estudar a influência de outros parâmetros ambientais, como por exemplo a temperatura.
- Realizar o estudo com outras espécies de microalgas.
- Realizar o estudo com outros tipos de reatores, como por exemplo *vertical plates*.
- Realizar um *scale-up* idêntico, mas no exterior para perceber quais são os efeitos da variação da temperatura e iluminação ao longo do dia no processo de acumulação de compostos de alto valor.

Referências bibliográficas

- Arabbi, P. R. (2001). Alimentos funcionais-Aspectos gerais Functional foods-General aspects. In *Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr* (Vol. 21).
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Second Edition. Boca Raton.
- Borges-Campos, V., Barbarino, E., & Lourenço, S. de O. (2010). Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. *Ciência Rural*, 40(2), 309–317. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000009>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Chhandama, M. V. L., Satyan, K. B., Changmai, B., Vanlalveni, C., & Rokhum, S. L. (2021). Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100771. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100771>
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., & De Morais, A. M. M. B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. In *Life Sciences* (Vol. 93, Issue 15). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>
- Del Campo, J. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. Á., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 848–854. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1510-5>
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., Sengupta, D., & El-Halwagi, M. M. (2017). A review of biodiesel production from microalgae. In *Clean Technologies and Environmental Policy* (Vol. 19, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1309-6>
- Doran, P. M. (2013). Unit Operations. Bioprocess Engineering Principles. *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*.
- Feng, P., Deng, Z., Fan, L., & Hu, Z. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.007>
- Gomez-Zavaglia, A., Prieto Lage, M. A., Jimenez-Lopez, C., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2019). The potential of seaweeds as a source of functional ingredients of prebiotic and antioxidant value. In *Antioxidants* (Vol. 8, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090406>
- Goswami, G., Bang, V., & Agarwal, S. (2015). Diverse Applications of Algae. *International Journal of Advance Research In Science And Engineering IJARSE*, 4(1), 1102–1109. <http://www.ijarse.com>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. In *Marine Drugs* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/md9040625>
- Ip, P. F., & Chen, F. (2005). Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 40(2). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.039>
- Lewin, R. A. (1994). Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. *Phycologia*. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-33-4-308a.1>
- Liu, J., Huang, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2012). Molasses-based growth and production of oil and

- astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, *107*, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.047>
- Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Liu, Z., Jiang, Y., & Chen, F. (2014). *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential. In *Marine Drugs* (Vol. 12, Issue 6, pp. 3487–3515). <https://doi.org/10.3390/md12063487>
- Ma, R., Wang, B., Chua, E. T., Zhao, X., Lu, K., Ho, S. H., Shi, X., Liu, L., Xie, Y., Lu, Y., & Chen, J. (2020). Comprehensive utilization of marine microalgae for enhanced co-production of multiple compounds. In *Marine Drugs* (Vol. 18, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/md18090467>
- Makareviciene, V., & Sendzikiene, E. (2020). Application of microalgae for the production of biodiesel fuel. In *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818305-2.00022-x>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 1, pp. 217–232). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Miyashita, H., & Yokouchi, H. (2005). Marine microalgae. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/b135784>
- Naidoo, T., Zulu, N., Maharajh, D., & Lalloo, R. (2013). Value-added products from microalgae. In *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*. <https://doi.org/10.1201/b14920>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments content (Chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. *Separations*, *7*(2). <https://doi.org/10.3390/separations7020033>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. In *Water Research* (Vol. 45, Issue 1, pp. 11–36). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B., & Stengel, D. B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: From algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>
- Pritchard, H. N. (1995). Microalgae: Biotechnology and Microbiology. E. W. Becker. *The Quarterly Review of Biology*. <https://doi.org/10.1086/419123>
- Promdaen, S., Wattuya, P., & Sanevas, N. (2014). Automated microalgae image classification. *Procedia Computer Science*. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2014.05.182>
- Rastogi, R. P., Madamwar, D., & Pandey, A. (2017). Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology. In *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*.
- Renaud, S. M., Thinh, L. Van, Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, *211*(1–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)
- Richmond, A. (2013). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>

- Satpati, G. G., & Pal, R. (2018). Microalgae - Biomass to Biodiesel : A Review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 9(4).
- Sayegh, F. A. Q., & Montagnes, D. J. S. (2011). Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology*, 102(3). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.011>
- Schüler, L. M., Schulze, P. S. C., Pereira, H., Barreira, L., León, R., & Varela, J. (2017). Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. In *Algal Research* (Vol. 25). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025>
- Seabra, L. M. J., & Pedrosa, L. F. C. (2010). Astaxanthin: structural and functional aspects. *Revista de Nutrição*, 23(6). <https://doi.org/10.1590/s1415-52732010000600010>
- Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60(3–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90290-0)
- Williams, P. J. L. B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. In *Energy and Environmental Science* (Vol. 3, Issue 5, pp. 554–590). <https://doi.org/10.1039/b924978h>
- Womersley, H. B. S. (1981). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Aquatic Botany*, 10. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(81\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0304-3770(81)90012-7)
- Wongsawat, S. (2017). Predicting factors for quality of life of elderly in the rural area. *International Journal of Arts & Sciences*, 09(04).
- Wu, Z., Deng, P., Wu, X., Cheng, S., Fu, G., & He, F. (2006). Alga compositions in substrate of plot-scale constructed wetland. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 12(2), 207–209.
- Zhang, P., Li, Z., Lu, L., Xiao, Y., Liu, J., Guo, J., & Fang, F. (2017). Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.022>
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>

Anexos

Anexo A- Meio de cultura

O meio usado para os cultivos de *Chlorella zofingiensis* e para a produção de inóculos foi o BBM (Bold Basal Medium), cuja composição se encontra descrita na Tabela A.1

Tabela A. 1 - Solução BBM standard

Reagentes	Concentração mássica final (g/L)	Concentração mássica (g/L)	Volume a pipetar, para o matraz de 1 L
K₂HPO₄	0,075	7,5	10
KH₂PO₄	0,175	17,5	10
MgSO₄.7H₂O	0,075	7,5	10
NaNO₃*	0,25	25	10*
CaCl₂.2H₂O	0,025	2,5	10
NaCl	0,025	2,5	10
EDTA-Na₂ + KOH	0,05 + 0,031	50 + 31	1
FeSO₄.7H₂O + H₂SO₄	0,0050 + 0,0010 mL	4,98 + 1 mL	1
H₃BO₃	0,0114	11,42	1
ZnSO₄.7H₂O	0,001412	1,412	1
MnCl₂.4H₂O	0,000232	0,232	1
CuSO₄.5H₂O	0,000252	0,252	1
Co(NO₃)₂.6H₂O	0,00008	0,08	1
Na₂MoO₄.2H₂O	0,000192	0,192	1
H₂O	-	-	936

*- Reduzir o volume 10 vezes para causar o *stress* nutritivo

Anexo B – Curva de calibração para o crescimento celular

Na Figura B.1 está apresentada a reta de calibração que foi utilizada para monitorizar o crescimento de todos os ensaios.

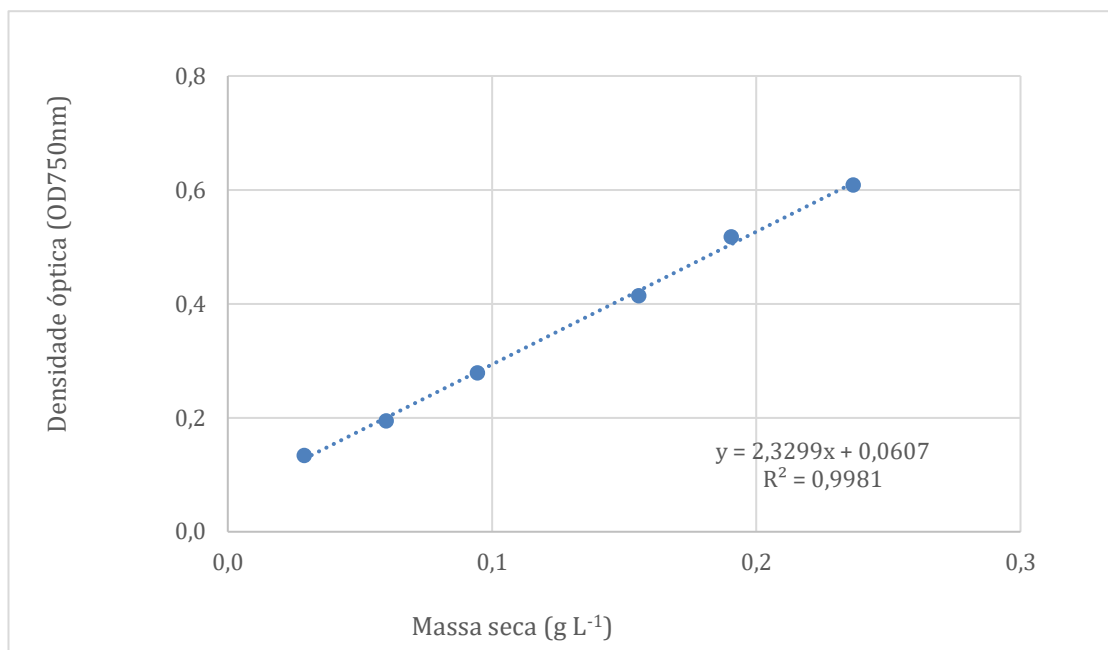


Figura B. 1 - Curva de calibração para crescimento celular

Anexo C- Curvas de calibração para a determinação de astaxantina

Na Figura C.1 estão representadas as curvas de calibração que foram utilizadas para determinar a quantidade de astaxantina.

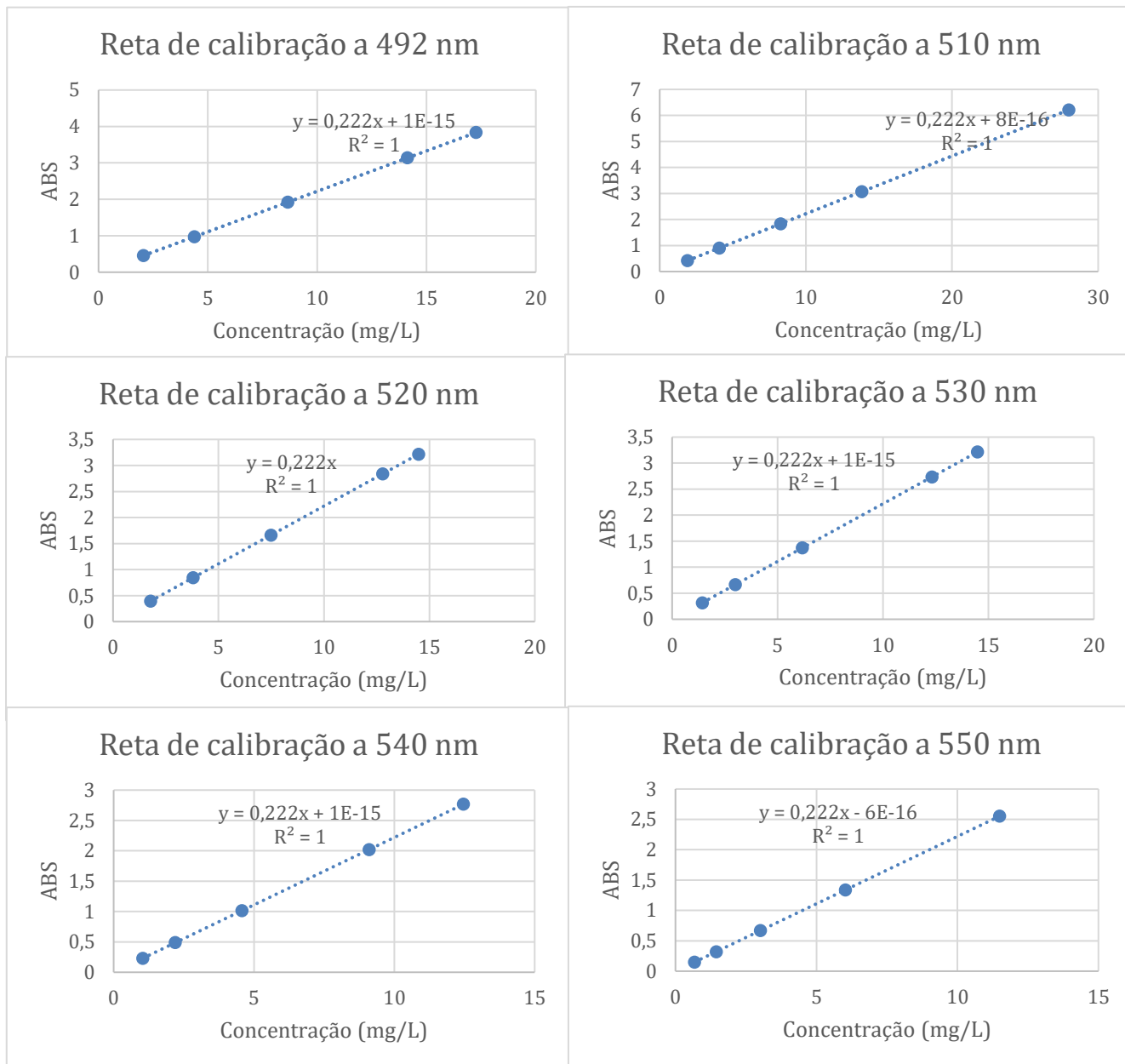


Figura C.1 - Retas de calibração para a astaxantina a diferentes comprimentos de onda