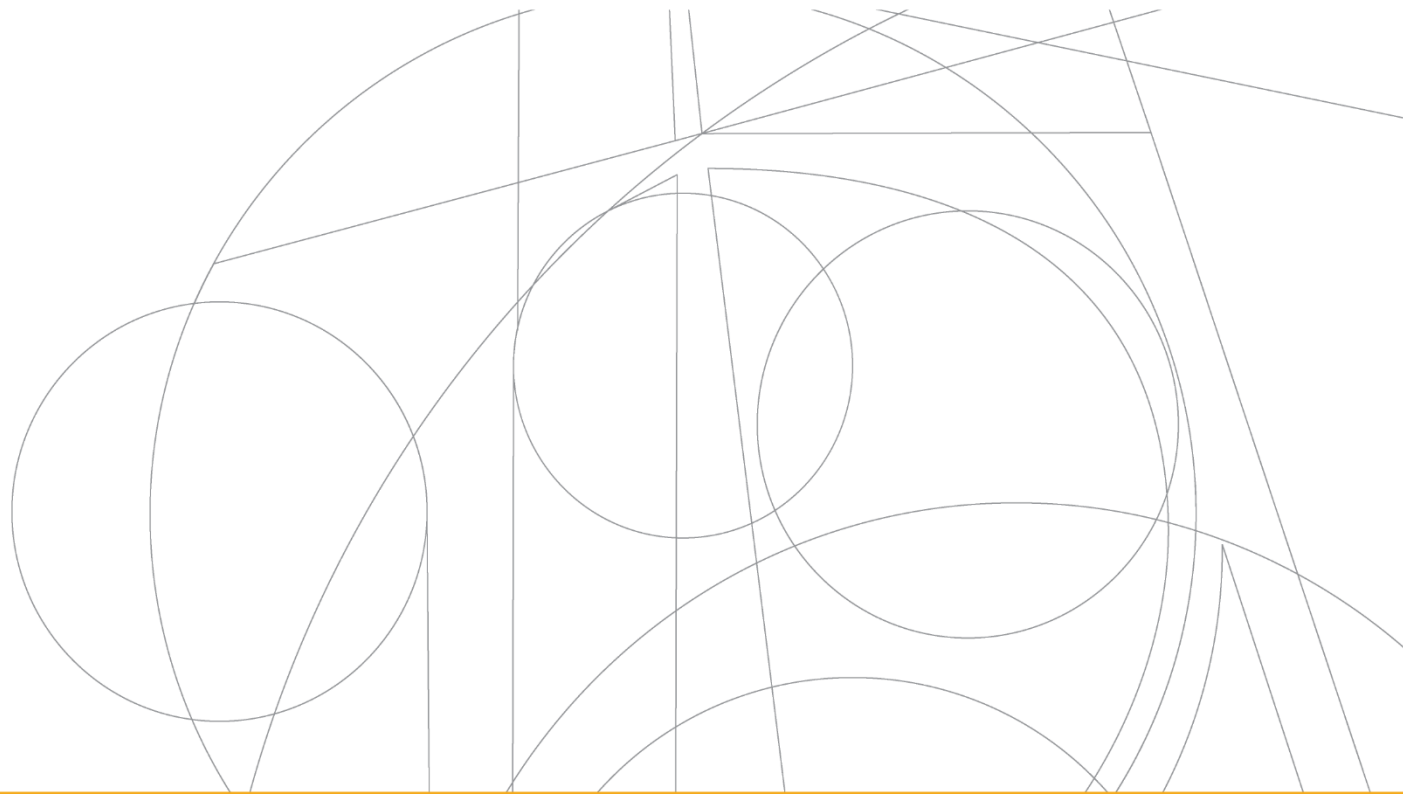
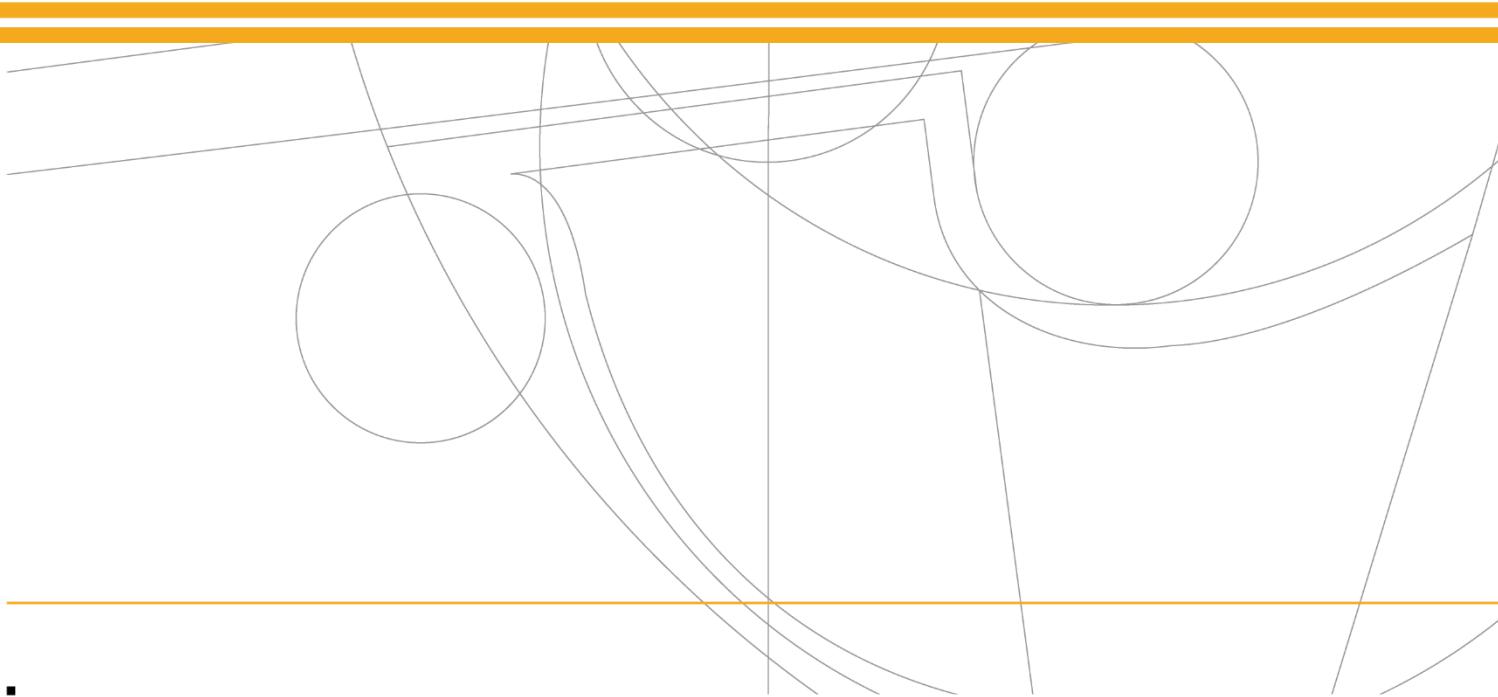
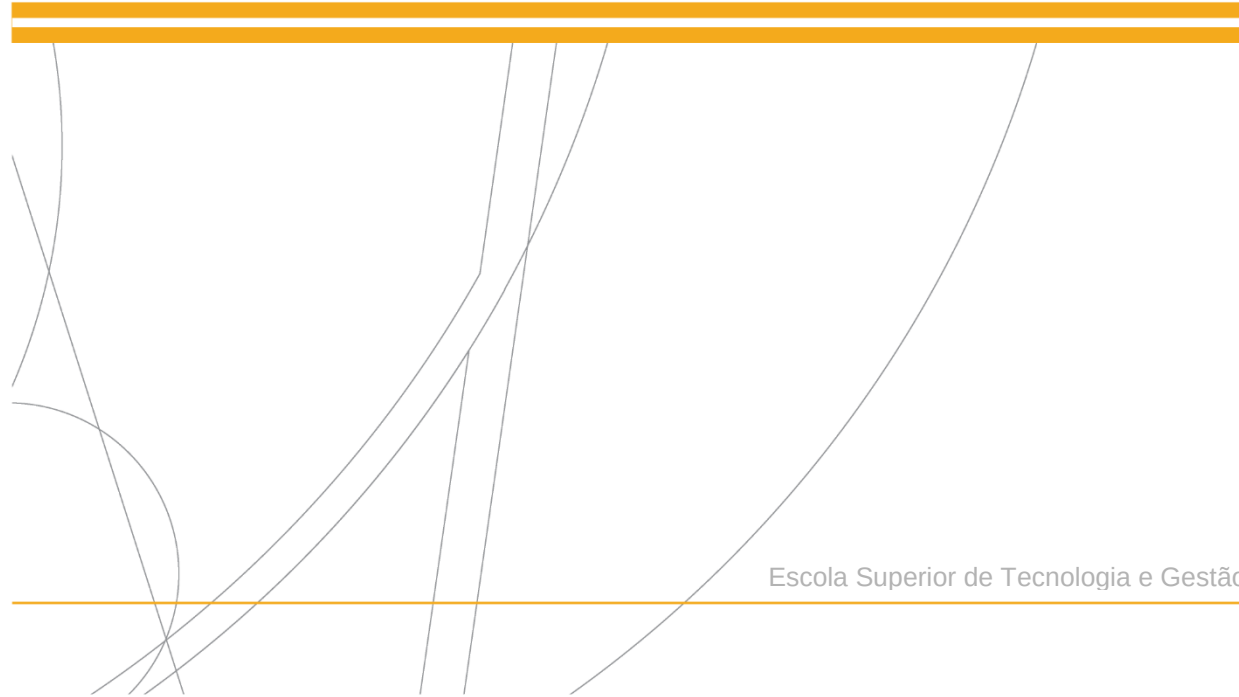




EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE LUZ
LED E MEIOS DE CULTURA NA
CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS EM
MICROALGAS

Beatriz Filipa Tomás Marques

EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE LUZ LED E MEIOS DE CULTURA NA
CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS EM MICROALGAS
Beatriz Filipa Tomás Marques
2024





INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Beatriz Filipa Tomás Marques

EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE LUZ LED E MEIOS DE
CULTURA NA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS EM
MICROALGAS

Mestrado Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria Manuela de Lemos Vaz Velho

Maio de 2024

MEMBROS DO JÚRI

Presidente: Rita Isabel Couto Pinheiro, Prof. Adjunta da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo

Vogal: Alberto José Delgado dos Reis, Investigador Auxiliar do LNEG- Laboratório Nacional de Energia e Geologia, arguente principal

Vogal: Maria Manuela de Lemos Vaz Velho, Prof. Coordenadora da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, orientadora

AGRADECIMENTOS

Estando a terminar mais uma fase importante na minha vida, gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que tornaram possível a realização desta dissertação.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à Professora Manuela Vaz Velho, cuja orientação, paciência e sabedoria foram essenciais para a conclusão desta dissertação. Sua dedicação ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional foi inestimável. Agradeço sinceramente por todas críticas construtivas e pelo encorajamento ao longo deste processo.

Agradeço ao Doutor Pedro Seixas pelo apoio contínuo e por partilhar o seu vasto conhecimento e experiência, inestimáveis no desenvolvimento deste projeto. Gostaria também de agradecer por ter permitido a minha estadia na AQUALGAE, por fornecerem os recursos e o ambiente necessários para a realização desta pesquisa.

Minha profunda gratidão à minha família, especialmente aos meus pais, pelo seu amor incondicional e apoio constante. Agradeço também aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo palavras de encorajamento e compreensão nos momentos mais desafiadores.

Finalizo esta seção com uma reflexão sobre a jornada que foi a realização desta dissertação. Cada desafio superado e cada conquista alcançada só foram possíveis graças ao apoio incondicional e à colaboração de muitos. Meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte desta trajetória.

RESUMO

As microalgas são organismos aquáticos unicelulares que podem ser classificados em dois grupos taxonômicos distintos: procariontes (cianobactérias) e eucariontes, que são subdivididos conforme seus pigmentos fotossintéticos. Esses pigmentos têm despertado grande interesse devido à sua aplicação em alimentos, rações, produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos. A luz, a principal fonte de energia para o crescimento e metabolismo das microalgas, é absorvida por esses pigmentos; no entanto, esses microrganismos fotossintéticos utilizam apenas uma fração do espectro solar. Condições ambientais ou de cultivo desfavoráveis induzem estresse nas células, levando à acumulação de pigmentos.

O principal objetivo deste estudo foi analisar o efeito de LEDs de diferentes intensidades e espectros na produção das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Thalassiosira weissflogii* em escala laboratorial. Avaliou-se o impacto da intensidade luminosa e da composição da luz nas diferentes fases de desenvolvimento de *H. pluvialis*, além do efeito da intensidade luminosa e da adição de cloreto de sódio no meio de cultura sobre o teor de astaxantina acumulado. Para *T. weissflogii*, foi investigado o efeito da intensidade luminosa, da composição do meio de cultura e de diferentes fotoperíodos nas várias fases de desenvolvimento da microalga e a acumulação de fucoxantina.

Foram utilizadas lâmpadas LEDs de luz branca com intensidades luminosas entre 114 e 117 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (V-TAC) e entre 427 e 617 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (NS12), e de luz vermelha, com 408 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AP673L). As intensidades luminosas das diferentes lâmpadas LEDs, que variam conforme a distância entre as lâmpadas e os fotobiorreatores, foram medidas com um luxímetro. A intensidade da luz (lx) foi então convertida em densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD).

O crescimento da biomassa de *H. pluvialis* sob intensidade luminosa de 617 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi significativamente mais pronunciado do que com lâmpadas de menor intensidade, resultando em maiores valores de concentração celular e de biomassa. O espectro de luz vermelha, demonstrou ser altamente benéfico para o crescimento de *H. pluvialis*, resultando em maior produção de biomassa e concentração celular ao longo do tempo.

Não ocorreu acumulação de astaxantina com intensidades luminosas de $179 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo necessárias intensidades luminosas elevadas para a sua acumulação. A indução de *stress* para a produção de astaxantina através da adição de NaCl foi rápida, porém resultou em morte celular. O maior teor de astaxantina obtido foi com intensidades luminosas de $617 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e meio sem NaCl, alcançando $9,83 \text{ mg g}^{-1}$ de astaxantina.

O crescimento da biomassa de *T. weissflogii* com intensidades luminosas de $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi significativamente mais evidente, apresentando maior estabilidade do que com lâmpadas de maior intensidade. Entre os três meios de cultura estudados (NB, GM e GM10), o meio mais estável e consistente nas diferentes fases estudadas foi o meio GM10, suplementado com 10% de Fe. Sob um fotoperíodo de 22 h luz / 2 h escuro, este meio demonstrou um aumento na densidade e concentração celulares em comparação ao fotoperíodo de 12 h / 12 h. *T. weissflogii* cultivada em meio GM10 apresentou maior teor de fucoxantina na fase exponencial, enquanto no estado estacionário o meio NB mostrou melhores resultados.

Em conclusão, a intensidade luminosa emerge como um fator físico-químico crucial que molda o desenvolvimento das microalgas. A capacidade de um fotobiorreator suportar elevadas intensidades luminosas é determinante para o sucesso do cultivo. Assim, a otimização das condições de cultivo, que inclui a escolha adequada do meio de cultura, a intensidade luminosa e o fotoperíodo, revela-se fundamental para maximizar a produtividade e assegurar a viabilidade das microalgas em aplicações de pesquisa e industriais.

PALAVRAS-CHAVE: *Haematococcus pluvialis*; *Thalassiosira weissflogii*; Intensidade luminosa; Pigmentos.

ABSTRACT

Microalgae are unicellular aquatic organisms that can be classified into two distinct taxonomic groups: prokaryotes (cyanobacteria) and eukaryotes, which are subdivided according to their photosynthetic pigments. These pigments have garnered significant interest due to their application in food, feed, pharmaceutical, nutraceutical, and cosmetic products. Light, the main energy source for the growth and metabolism of microalgae, is absorbed by these pigments; however, these photosynthetic microorganisms use only a fraction of the solar spectrum. Unfavorable environmental or cultivation conditions induce stress in the cells, leading to pigment accumulation.

The main objective of this study was to analyze the effect of LEDs with different intensities and spectra on the production of the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Thalassiosira weissflogii* on a laboratory scale. The impact of light intensity and composition on the different developmental stages of *H. pluvialis* was evaluated, along with the effect of light intensity and the addition of sodium chloride to the culture medium on the accumulated astaxanthin content. For *T. weissflogii*, the effect of light intensity, culture medium composition, and different photoperiods on the various developmental stages of the microalgae and the accumulation of fucoxanthin was investigated.

White light LED lamps with light intensities between 114 and 117 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (V-TAC) and between 427 and 617 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (NS12), and red light LEDs with 408 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (AP673L) were used. The light intensities of the different LED lamps, which vary according to the distance between the lamps and the photobioreactors, were measured with a lux meter. The light intensity (lx) was then converted to photosynthetic photon flux density (PPFD).

The biomass growth of *H. pluvialis* under a light intensity of 617 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was significantly more pronounced than with lower intensity lamps, resulting in higher cell and biomass concentrations. The red light spectrum proved to be highly beneficial for the growth of *H. pluvialis*, resulting in greater biomass production and cell concentration over time.

No accumulation of astaxanthin occurred at light intensities of 179 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with high light intensities being necessary for its accumulation. The induction of stress

for astaxanthin production through the addition of NaCl was rapid but resulted in cell death. The highest astaxanthin content obtained was with light intensities of $617 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a medium without NaCl, reaching 9.83 mg g^{-1} of astaxanthin.

The biomass growth of *T. weissflogii* at light intensities of $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was significantly more evident, showing greater stability than with higher intensity lamps. Among the three culture media studied (NB, GM, and GM10), the most stable and consistent medium in the different phases studied was the GM10 medium, supplemented with 10% Fe. Under a photoperiod of 22 h light / 2 h dark, this medium showed an increase in cell density and concentration compared to the 12 h / 12 h photoperiod. *T. weissflogii* cultured in GM10 medium showed a higher fucoxanthin content in the exponential phase, while in the stationary phase, the NB medium showed better results.

In conclusion, light intensity emerges as a crucial physicochemical factor shaping the development of microalgae. The ability of a photobioreactor to support high light intensities is determinant for the success of the cultivation. Thus, optimizing cultivation conditions, including the appropriate choice of culture medium, light intensity, and photoperiod, is essential to maximize productivity and ensure the viability of microalgae in research and industrial applications.

KEYWORDS: *Haematococcus pluvialis*; *Thalassiosira weissflogii*; Light intensity; Pigments.

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ANOVA - Análise da variância

ALA - Ácido α -linolénico

BHA- mistura de 2 isômeros, o 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol

BHT - di-terc-butil metil fenol ou hidroxitolueno butilado

CO₂ - Dióxido de carbono

DHA - Ácido docosahexaenóico

EFSA - European Food Safety Authority

EPA - Ácido eicosapentaenoico

EPS – Exopolissacarídeos

FAO - Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

GM-FWS – GoldMedium Fresh Water Species

GRAS - Generally recognized as safe (FDA) - Geralmente reconhecido como seguro

LED – Light-emitting diode - díodo emissor de luz

lx – intensidade luminosa

ODS - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ONU)

ONU - Organização das Nações Unidas

NaCl – Cloreto de sódio

QPS - Qualified presumption of safety (EFSA) - presunção qualificada de segurança

SCO- Single Cell Oil- óleo unicelular

t – tempo

UE - União Europeia

UV - Radiação ultravioleta

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objetivos	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. Microalgas	2
2.1.1. Características gerais.....	2
2.1.2. Fatores que afetam o crescimento das microalgas	3
2.1.3. Pigmentos produzidos pelas microalgas	5
2.2. Sistemas de cultivo de Microalgas	8
2.3. Aplicações das Microalgas	12
2.4. Microalgas e Indústria Alimentar	17
2.5. As microalgas alvo de estudo	23
2.5.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	23
2.5.2. <i>Thalassiosira weissflogii</i>.....	27
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Produção de microalgas	30
3.1.1. As culturas de microalgas estudadas.....	30
3.1.2. Produção de <i>H. pluvialis</i> em escala laboratorial.....	30
3.1.3. Produção de astaxantina pela microalga <i>H. pluvialis</i>.....	33
3.1.4. Produção de <i>T. weissflogii</i> em escala laboratorial	34
3.2. Metodologias analíticas	37
3.2.1. Determinação da concentração celular	37
3.2.2. Determinação da concentração de biomassa	37
3.2.3. Determinação da Astaxantina, Fucoxantina e Clorofila a e c	38
3.3. Análise estatística	38
4. Resultados e discussão.....	39
4.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	39
4.1.1. Influência da intensidade luminosa de espectro branco	39
4.1.2. Influência da intensidade luminosa do espectro vermelho	42

4.1.3. O efeito da intensidade luminosa na indução de <i>stress</i> na produção de <i>H. pluvialis</i>	45
4.1.4. O efeito da adição de NaCl na indução de <i>stress</i> na produção de <i>H. pluvialis</i>	48
4.2. <i>Thalassiosira weissflogii</i>	52
4.2.1. Influência da intensidade luminosa de espectro branco.....	52
4.2.2. Influência do meio de cultura no crescimento	55
4.2.3. Influência do aumento fotoperíodo no crescimento em diferentes meios	59
5. Conclusões	61
6. Referências bibliográficas.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.2.1 – Curva de crescimento. Fonte: figura adaptada de Lee et al., 2015.	4
Figura 2.5.1.1 - <i>Haematococcus pluvialis</i> em observação microscópica com ampliação 100x, A) macrozoóides e B) quistos. (Fonte própria).	23
Figura 2.5.1.2 - Fases de enquistamento de <i>Haematococcus pluvialis</i> (Fonte própria).	24
Figura 2.5.2.1 - <i>Thalassiosira weissflogii</i> em observação microscópica com ampliação 400x. (Fonte própria).	27
Figura 3.1.1.1 - Culturas de microalgas em meio líquido. (A) Cultura de <i>H. pluvialis</i> e (B) Cultura de <i>T. weissflogii</i> (Fonte própria).	30
Figura 4.1.1.1. - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga <i>H. pluvialis</i> , cultivada sobre diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).	39
Figura 4.1.1.2 - Diferentes fases do estudo da <i>H. pluvialis</i> com diferentes intensidades luminosas com lâmpadas LEDs de espectro branco, V-TAC (nível superior) e NS12 (nível inferior). (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).	40
Figura 4.1.2.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga <i>H. pluvialis</i> , cultivada sobre diferentes espectros luminosos, AP673L espectro vermelho e NS12 espectro branco. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).	42
Figura 4.1.2.2. - Diferentes fases do estudo da <i>H. pluvialis</i> com os LEDs, AP673L de espectro vermelho (nível superior) e NS12 de espectro branco (nível inferior). (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da estacionária (Fonte própria).	43
Figura 4.1.3.1 – Concentração celular (A), teor de astaxantina (B), produtividade astaxantina (C) e teor de clorofila a (D) da microalga <i>H. pluvialis</i> em diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).	45
Figura 4.1.3.2 - Amostras do final da fase de <i>stress</i> (t_7) com diferentes intensidades luminosas, V-TAC (os 4 primeiros frascos) e NS12 (os 4 últimos frascos), na acumulação de astaxantina (Fonte própria).	46
Figura 4.1.3.3 - Coloração dos pigmentos de <i>H. pluvialis</i> ao longo do tempo, com diferentes intensidades luminosas, filtros provenientes da determinação da concentração celular (Fonte própria).	47
Figura 4.1.4.1 – Concentração celular (A), teor de astaxantina (B), produtividade astaxantina (C) e teor de clorofila a (D) da microalga <i>H. pluvialis</i> em meio com e sem NaCl. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).	48

Figura 4.1.4.2 - Amostras do final da fase de <i>stress</i> (t_7) com e sem presença de NaCl, MG-FWS + NaCl (os 4 primeiros frascos) e MG-FWS (os 4 últimos frascos), na acumulação de astaxantina (Fonte própria).	50
Figura 4.1.4.3 - Coloração dos pigmentos de <i>H. pluvialis</i> ao longo do tempo, com e sem presença de NaCl, filtros provenientes da determinação da concentração celular (Fonte própria).	50
Figura 4.2.1.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga <i>T. weissflogii</i> , cultivada sobre diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).	52
Figura 4.2.1.2 - Diferentes fases do estudo da <i>T. weissflogii</i> com diferentes intensidades luminosas com lâmpadas LEDs de espectro branco, V-TAC (nível superior) e NS12 (nível inferior). (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).	54
Figura 4.2.2.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga <i>T. weissflogii</i> , cultivada diferentes meios. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, $p < 0,05$).	55
Figura 4.2.2.2 - Diferentes fases do estudo da <i>T. weissflogii</i> com diferentes meios (GM, GM10 e NB) com lâmpadas LEDs V-TAC. (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).	56
Figura 4.2.2.3 - Concentração celular (A), teor de fucoxantina (B), produtividade fucoxantina (C) e teor de clorofila c (D) da microalga <i>T. weissflogii</i> em diferentes meios (GM10, NB, GM). Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, $p < 0,05$).	57
Figura 4.2.3.1 – Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga <i>T. weissflogii</i> , cultivada sobre um fotoperíodo 22 h luz / 2 h escuro. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, $p < 0,05$).	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1.2.1 - Composição do meio de cultura (GM-FWS).....	31
Tabela 3.1.2.1.1 - Intensidade luminosa das diferentes lâmpadas LEDs consoante a distância do fotobiorreator às lâmpadas LEDs.	31
Tabela 3.1.2.2.1 - Espectro emitido e intensidade luminosa pelas lâmpadas LEDs NS12 e AP673L.....	32
Tabela 3.1.4.2.1 - Composição dos meios de cultura usados na produção de microalgas.	36

1. Introdução

1.1. Enquadramento

O presente projeto de investigação teve lugar na empresa AQUALGAE Sociedade Limitada – Sucursal em Portugal, Parque Empresarial da Praia Norte, Lote B2, 35, 4900-350 Viana do Castelo. A sede da empresa localiza-se na corunha, Espanha. AQUALGAE tem como principal interesse projetos e fabricação de fotobioreatores de alto desempenho para operação em ambientes externos e internos, fornecimento de estirpes e inóculos de microalgas marinhas e de água doce como meios otimizados para as mesmas.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi analisar o efeito de diferentes tipos de luz LED na produção de *Haematococcus pluvialis* e *Thalassiosira weissflogii* à escala laboratorial.

Objetivos específicos:

- i) Estudo dos efeitos da intensidade luminosa e da composição da luz nas diferentes fases de desenvolvimento da microalga *H. pluvialis*.
- ii) Estudo dos efeitos da intensidade luminosa e meios de cultura com adição de cloreto de sódio no teor de astaxantina acumulado pela *H. pluvialis*.
- iii) Estudo dos efeitos da intensidade luminosa e de diferentes fotoperíodos nas diferentes fases de desenvolvimento da microalga *T. weissflogii*.
- iv) Estudo dos efeitos de diferentes composições de meio na produção de *T. weissflogii*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Microalgas

2.1.1. Características gerais

A água, um dos maiores recursos do nosso planeta tem sido investigado e explorado pelo potencial do fitoplâncton, organismos presentes em suspensão nas massas de água nos diferentes ecossistemas aquáticos, na sua maioria microalgas que é adaptado a viver em suspensão em massas de água e fornece cerca de metade da produção primária líquida global em sistemas marinhos e de água doce (Friend et al., 2009).

As algas não partilham um ancestral comum e são consideradas um grupo polifilético, ou seja, não são enquadradas num único *Phylum* (Oliveira & Bragotto, 2022).

As algas podem ser organismos unicelulares ou pluricelulares, de diferentes tamanhos e formas, comumente classificadas em dois grupos: microalgas (microscópicas) e macroalgas (macroscópicas).

Inicialmente, a cor foi utilizada como forma de classificar as algas: verde, castanho e vermelho. Atualmente, a classificação tem por base a fisiologia, a estrutura e a filogenia das células, utilizando técnicas moleculares de forma a entender ligações entre as várias linhagens de algas e de outros organismos (Araújo & Peteiro, 2021; Cai et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022).

As microalgas, que podem formar colónias e filamentos macroscopicamente visíveis, constituem um grupo heterogéneo, de dimensões variando entre 0,2 µm e 1mm (Cai et al., 2021; Caroppo & Pagliara, 2022; Oliveira & Bragotto, 2022). A maioria das microalgas são autotróficas e possuem mecanismo de diferenciação e especialização celular diferente das plantas terrestres (Oliveira & Bragotto, 2022).

As microalgas evoluíram a partir das cianobactérias procarióticas ao longo de 3,5 mil milhões de anos, com uma capacidade de se adaptarem a inúmeros ambientes (Caroppo & Pagliara, 2022; Gauthier et al., 2020). Estes organismos unicelulares fotossintéticos constituem a grande parte do fitoplâncton, são um componente extremamente importante da produtividade, diversidade e funcionamento do ecossistema aquático (Cai et al., 2021; Caroppo & Pagliara, 2022). As microalgas

exibem uma elevada diversidade, estimando-se a existência de 200 000 a 800 000 espécies de microalgas, das quais apenas cerca de 35 000 encontram-se caracterizadas (Gauthier et al., 2020).

A biomassa de microalgas pode ser usada sem fracionamento, como algas em pó, ou pode ser explorada como fonte de um grande número de bioprodutos comercialmente interessantes, para a produção de biocombustíveis e moléculas bioativas: pigmentos, carotenoides, vitaminas, proteínas e compostos fenólicos que podem ser amplamente utilizados para a produção de nutraceuticos, produtos farmacêuticos, aditivos para uso alimentar, na cosmética, ração para animais, biofertilizantes, nos têxteis e em embalagens biológicas (Cai et al., 2021; Merlo et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022; Vella et al., 2019).

As microalgas podem ser divididas em dois grupos taxonómicos distintos, procariontes e eucariontes, os quais são classificadas em grupos secundários de acordo com os seus pigmentos. As cores das microalgas são consequência de pigmentos produzidos no cloroplasto, como as clorofilas e ficobiliproteínas. As microalgas procariotas são representadas pelo tipo cianobactérias (verde-azuladas, exemplo: *Spirulina* spp.), e as eucariotas são as microalgas verdes (Chlorophyceae, exemplo: *Chlorella* spp.) e as diatomáceas (Bacillariophyceae, exemplo: *Nannochloropsis* spp.) (Araújo & Peteiro, 2021; Cai et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022).

2.1.2. Fatores que afetam o crescimento das microalgas

Os microrganismos autotróficos obtêm energia através da absorção de energia luminosa para a redução de CO₂ pela oxidação de substratos, principalmente água, com a libertação de O₂. Organismos fotoautotróficos requerem apenas minerais (íões inorgânicos) e fotoautotróficos obrigatórios são aqueles que não podem crescer na ausência de luz. Organismos heterotróficos obtêm os seus requisitos materiais e energéticos a partir de compostos orgânicos produzidos por outros organismos. Várias espécies de microalgas podem ser cultivadas exclusivamente em substratos orgânicos e isso tornou-se uma opção viável em sistemas convencionais de produção de biorreatores fechados para biomassa e biocompostos, produzidos por certas espécies sob condições específicas de crescimento (Richmond, 2004).

A maioria das microalgas são fotoautotróficos obrigatórios, embora algumas exijam para o crescimento quantidades mínimas de compostos orgânicos, como vitaminas (Richmond, 2004). Os principais fatores que afetam o crescimento das microalgas fotoautotróficas são: O carbono (o primordial macronutriente), a luminosidade, a temperatura, a agitação, o pH, outros macronutrientes, a salientar para além do carbono (CO_2 ou HCO_3^-), Azoto, Fósforo. A salinidade também é fator importante de acordo com o habitat da microalga a cultivar.

Como o de qualquer outro microrganismo o crescimento das microalgas pode ser dividido de forma simples em 4 fases: Fase de latência, Fase exponencial, Fase estacionária e Fase de declínio ou morte, representada na figura seguinte adaptada de Lee et al. (2015).

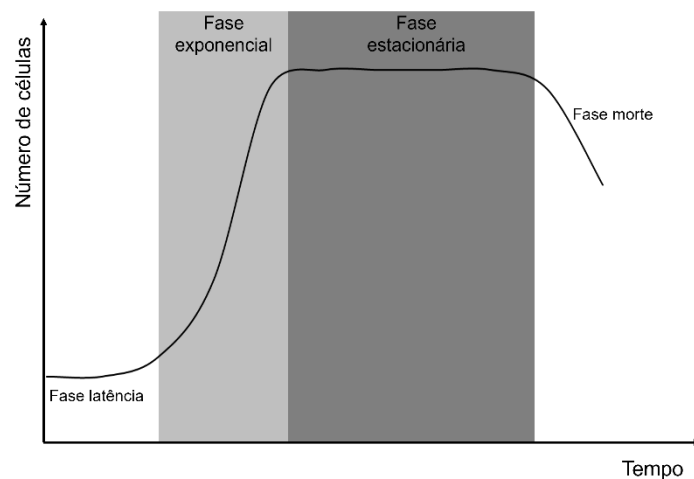


Figura 2.1.2.1 – Curva de crescimento. Fonte: figura adaptada de Lee et al., 2015.

A fase de latência corresponde à fase em que a microalga se adapta às condições do meio ambiente. Após este período de adaptação inicia-se a fase exponencial onde as células multiplicam como uma função exponencial, durante esta fase a intensidade luminosa e os nutrientes não limitam o crescimento. Na fase estacionária, a divisão celular das microalgas diminui porque a luz torna-se limitadora, ou seja, a biomassa acumula-se de forma constante até que os nutrientes ou os inibidores no meio se tornem fatores limitadores e a fase de morte é caracterizada pela perda irreversível da capacidade de divisão celular devido a fatores limitantes (Lee et al., 2015).

Num sistema biológico, o estado estacionário pode ser alcançado quando a taxa de crescimento celular é igual à taxa de morte celular, resultando numa

concentração celular constante ao longo do tempo (Kosman, 2009; Madigan et al., 2017; Shuler et al., 2017). O estado estacionário descreve o crescimento de microalgas com fatores constantes ao longo do tempo (Solimeno & García, 2017).

Num biorreator, o estado estacionário é alcançado quando a densidade da população de microrganismos e a concentração de nutrientes e produtos residuais permanecem constantes. Isto ocorre quando a taxa de entrada de nutrientes e a taxa de remoção de resíduos e células encontram-se equilibradas pelas taxas de crescimento e consumo (Madigan et al., 2017; Shuler et al., 2017).

Foram desenvolvidos modelos de estado estacionário com o objetivo de descrever a fotossíntese de microalgas e cinética de crescimento, que podem ser expressos em termos de crescimento da biomassa ou de absorção de nutrientes sobre a influência de vários fatores como luz, pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (Solimeno & García, 2017). Entender o conceito de estado estacionário é crucial para modelar e analisar sistemas, permitindo prever e controlar o comportamento dos sistemas ao longo do tempo.

Um meio de cultura deve possuir na sua formulação características que garantem, a sobrevivência e o crescimento das espécies a produzir. Não existe um meio de cultura universal para a produção de microalgas. A criação de meios de cultura, baseia-se no ambiente natural da espécie como modelo de composição do meio, uma vez que os requerimentos nutricionais das espécies refletem o tipo de ambiente onde se encontram.

Para otimizar o crescimento das microalgas além das necessidades básicas que condicionam o seu crescimento e a duração das suas fases de crescimento, importa definir qual a finalidade do seu cultivo: manutenção de coleções de culturas, versus crescimento para rendimentos ideais de biomassa, versus indução de *stress* para a síntese de biocompostos valiosos, situações que requerem formulações muito diferentes das de nutrientes no seu cultivo (Richmond, 2004).

2.1.3. Pigmentos produzidos pelas microalgas

Os pigmentos naturais desempenham uma função crucial no processo de fotossíntese, metabolismo e pigmentação das algas. Além disso, eles apresentam benefícios em diversas atividades biológicas, tais como antioxidante,

anticancerígena, anti-inflamatória, antiobesidade, antiangiogénica e neuroprotetora (D'Alessandro & Antoniosi, 2016).

Os pigmentos são classificados principalmente em pigmentos primários e pigmentos secundários, cada um cumprindo funções específicas na absorção de luz e na proteção celular. Os pigmentos primários incluem as clorofilas, que são essenciais para a fotossíntese em microalgas e plantas. As clorofilas são pigmentos verdes, lipossolúveis, com um anel de porfirina, responsáveis por converter energia solar em energia química durante a fotossíntese, através da absorção da luz nas regiões azul e vermelha do espectro luminoso, enquanto refletem luz verde, conferindo a cor característica às plantas. A maioria das microalgas contém clorofila a, mas algumas podem também possuir clorofila b e c. As microalgas geralmente têm uma concentração de clorofila entre 0,5% e 1,0% do peso seco (D'Alessandro & Antoniosi, 2016; Richmond, 2004).

Além das clorofilas, temos a ficoeritrina, um pigmento que absorve luz nas regiões vermelha e laranja do espectro, desempenha um papel crucial em condições de baixa intensidade luminosa, onde pode transferir energia para as clorofilas. Por fim, a ficocianina é outro pigmento primário que absorve luz na região azul do espectro e também contribui significativamente na captura de luz e na transferência de energia para o processo fotossintético (Richmond, 2004).

Os pigmentos secundários incluem carotenoides e ficobilinas, que desempenham papéis cruciais na fotossíntese e na fotoproteção. Os carotenoides, incluindo β -caroteno, luteína, zeaxantina e astaxantina, são substâncias lipossolúveis com diversas cores como castanho, vermelho, laranja a amarelo. Apresentam funções essenciais na fotossíntese: absorção da luz em regiões do espectro visível onde a clorofila não é eficiente, proteção dos sistemas fotossintéticos contra *stress* oxidativo, dissipam o excesso de energia luminosa, atuam como antioxidantes e precursores de vitamina A. O β -caroteno é um pigmento laranja-amarelado, utilizado corante alimentar ou suplemento nutricional, por ser precursor da vitamina A e a astaxantina é um pigmento vermelho, insolúvel em água, que é produzido como um subproduto do β -caroteno em condições de *stress*, acumulada em vesículas lipídicas fora dos cloroplastos (D'Alessandro & Antoniosi, 2016; Richmond, 2004).

As ficobilinas, por outro lado, são pigmentos associados a proteínas que absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda, auxiliando na captação e transferência de energia para a fotossíntese. Solúveis em água, as ficobilinas podem ser isoladas e purificadas com relativa facilidade devido à sua alta proporção na proteína celular total, desempenham um papel secundário na captação de luz durante a fotossíntese. Existem quatro classes de ficobilinas produzidas em algas vermelhas (Rhodophyta e Glaucophytas): aloficocianina (verde-azulada), ficocianina (azul), ficoeritrina (roxa) e ficoeritrocianina (laranja). Devido às suas propriedades de absorção, as ficobilinas têm uma aplicação extensiva na indústria e em laboratórios de imunologia (D'Alessandro & Antoniosi, 2016).

2.2. Sistemas de cultivo de Microalgas

O cultivo de microalgas apresenta uma combinação de benefícios que vai além do potencial de fornecer uma fonte adicional de energia, mantendo ou melhorando a sustentabilidade ambiental. Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser particularmente benéficos numa área urbana, onde existe uma necessidade urgente de satisfazer o aumento da necessidade de materiais e energia, reduzindo ao mesmo tempo a poluição atmosférica (Merlo et al., 2021).

O cultivo comercial de microalgas muito menor que o cultivo de macroalgas marinhas, sendo que o cultivo registado na Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) contribuiu com menos de 0,2% da produção global de algas em 2019. No entanto, o cultivo de microalgas desempenha um papel crucial na aquicultura, como alimento de viveiros ou parte essencial dos ciclos de nutrientes primários que constituem o sistema de produção de aquicultura de peixes e de camarão, entre outras espécies (Cai et al., 2021; FAO, 2020).

A única produção de microalgas registada na FAO, de 1962 a 1993, foi de *Spirulina* no México, com uma produção máxima de 4 375 toneladas em 1989. Em 2010, o cultivo global de microalgas atingiu 93 756 toneladas, sofrendo uma queda para 56 456 toneladas em 2019. Destas 56 456 toneladas de microalgas, 56 208 toneladas são de *Spirulina* cultivada em 10 países e as restantes toneladas correspondentes a *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis* spp. e *Dunaliella salina*, produzida apenas em 4 países (Cai et al., 2021).

Em 2018, a FAO registou o cultivo de 87 000 toneladas de microalgas em 11 países, sendo que a China foi o país com maior produtividade, 86 600 toneladas. Contudo, os dados da FAO subestimam a realidade de escala do cultivo mundial, devido à inexistência de dados dos maiores produtores tais como Austrália, República Checa, França, Islândia, Índia, Israel, Itália, Japão, Malásia, Myanmar e Estados Unidos da América (FAO, 2020). Recentemente, num estudo de Araújo et al., 2021 (Araújo et al., 2021), a UE apresentou 23 países mapeados com 447 produtores de algas, sendo os principais países produtores de microalgas a Alemanha, Espanha e Itália. O cultivo de microalgas tende a ser rigorosamente regulamentado e monitorizado a nível nacional local separadamente da aquicultura (FAO, 2020).

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser instalados no exterior e interior. Ao longo dos últimos 50 anos, foram utilizadas lagoas abertas e fotobiorreatores em instalações exteriores na produção de microalgas em grande escala com fins comerciais (Oliveira & Bragotto, 2022; Vella et al., 2019).

Os sistemas de cultivo de microalgas são: i) em sistemas abertos - tanques com profundidade de 0,2 m a 5 m, equipadas com agitador de pás e misturador. ii) fotobiorreatores tubulares - tubos transparentes de vidro ou plástico com diâmetro aproximado de 0,1 m. iii) fermentadores heterotróficos - biorreatores agitados fechados feitos de aço inoxidável, compostos por sensores, defletores, coletores, inoculadores e válvulas de fornecimento de gás (Oliveira & Bragotto, 2022). Os fotobiorreatores apesar de exigirem custos de capital mais elevados, são considerados mais eficientes que tanques abertos, devido à inexistência de risco de evaporação e contaminação (Vella et al., 2019).

A produção em sistemas abertos requer um fornecimento constante de nutrientes e apresenta desafios como controlar as seguintes variáveis: a temperatura, a possibilidade de contaminações e a penetração limitada de luz. O desenvolvimento de modelos matemáticos, como modelos de previsões climáticas locais, torna o cultivo mais rentável (Oliveira & Bragotto, 2022).

O tipo de sistema de cultivo afeta diretamente a produtividade da biomassa, todavia fatores intrínsecos como a biologia das microalgas, custo de espaço e energia, a irradiância do reator, temperatura e outras condições ambientais, identicamente afeta a produtividade, sendo que, geralmente o *stress* oxidativo é o principal fator na decadência de biomassa (Gauthier et al., 2020; Vella et al., 2019).

As microalgas são na sua grande maioria autotróficas havendo algumas espécies heterotróficas que na ausência de luz necessitam de aplicação de uma fonte de carbono orgânico, através de vias respiratórias e fermentativas combinadas, e outras mixotróficas em que o CO₂ e o carbono orgânico são assimilados conjuntamente, através dos metabolismos respiratório e fotossintético (Oliveira & Bragotto, 2022).

Embora as microalgas possam crescer rapidamente em condições adequadas, a produtividade do cultivo de microalgas em grande escala e em sistemas abertos tende a ser prejudicada por vários fatores técnicos, como contaminação de outras

microalgas, vírus, parasitas e predadores. Ainda pode ocorrer escassez de nutrientes ou dióxido de carbono, insuficiência de luz solar devido a elevada concentração celular, fotoxidação, morte celular devido à acumulação excessiva de oxigénio durante o dia e alteração significativa no pH. Os sistemas de cultivo fechados proporcionam ambientes mais controlados, mas são mais caros para construir e operar (Cai et al., 2021).

Na Ásia, a maior parte da produção de microalgas ocorre em sistemas abertos. Em contrapartida, na Europa 71% da produção assenta em sistema de fotobiorreatores tubulares, sendo que na produção de *Spirulina* o sistema de fermentadores heterotróficos é o mais utilizado (83%). Por outro lado, a *Dunaliella*, é uma microalga muito atrativa devido ser produtora de β -caroteno e possuir a capacidade de crescimento em sistemas abertos e em condições extremas (Oliveira & Bragotto, 2022).

A produção de microalgas abrange, o cultivo e o crescimento de biomassa, sucedido pela colheita e processamento/transformação da matriz recolhida em produto final, existem diferentes condições de cultivo: autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas (Oliveira & Bragotto, 2022).

Os diferentes estádios na produção de microalgas consistem em: i) *upstream*, caracterizado pelo cultivo e aumento de biomassa, ii) *midstream*, a colheita de microalgas, secagem da biomassa, rutura das paredes celulares e, por fim iii) *downstream*, a extração e purificação do produto da biomassa (Oliveira & Bragotto, 2022).

Após a fase exponencial, pode ocorrer uma remoção mecânica das partículas através de filtragem ou por métodos que utilizem a gravidade (sedimentação, floculação e centrifugação). Na colheita a biomassa é agregada até formar uma pasta com concentração de biomassa seca entre 15 e 25 %. A biomassa obtida na produção pode ser seca através dos seguintes métodos: secagem por pulverização, secagem em tambor, liofilização, secagem solar e secagem convectiva (Oliveira & Bragotto, 2022).

Microalgas e cianobactérias podem ser vendidas tanto como biomassa bruta (seca) ou processadas para fins industriais para a obtenção de compostos específicos. Quando apenas um composto específico é pretendido, é necessário

processamento posterior de extração e, possivelmente, de purificação (Pagels et al., 2021).

Muitas metodologias de extração foram desenvolvidas e otimizadas nos últimos anos. Em geral, a extração pode ser realizada usando dois tipos distintos de metodologias: (i) não mecânicas, como química, térmica e enzimática; e (ii) mecânicas, como sistemas pressurizados, ultrassons, micro-ondas, campos elétricos e extração supercrítica (Pagels et al., 2021).

As microalgas crescem exponencialmente quando cultivadas em condições otimizadas, no entanto a produção pode ser afetada por diferentes problemas técnicos, tais como, condições ambientais, pH, *stress* por UV e disponibilidade de nutrientes (Oliveira & Bragotto, 2022). A indução de *stress* salino e/ou a falta de nutrientes são dois métodos mais utilizados para induzir a produção de determinados metabolitos valiosos para vários setores industriais (Gauthier et al., 2020).

A manipulação das condições ambientais durante o cultivo, permite influenciar a produção e a acumulação destes bioprodutos. Uma perturbação nas condições ambientais pode induzir *stress* oxidativo, promovendo produção de metabolitos secundários defensivos com potencial antioxidante de forma a compensar o desequilíbrio (Gauthier et al., 2020). A otimização do cultivo de microalgas depende da aplicação de mudanças específicas nas condições de cultivo que forçam a produção excessiva de metabolitos secundários quando desejável (Oliveira & Bragotto, 2022).

Na atualidade, o cultivo em larga escala tem como finalidade a sua aplicação em rações para aquicultura, como de fontes de β -caroteno, astaxantina, suplementos nutricionais, ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaheptaenoico (DHA). São utilizadas principalmente as seguintes espécies: *Chlorella*, *Spirulina*, *Nannochloropsis* spp., *Isochrysis galbana*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis* spp., *Phaeodactylum tricornutum* (Vella et al., 2019).

2.3. Aplicações das Microalgas

As microalgas exibem diversas aplicações promissoras, como por exemplo, na agricultura, no ambiente, na indústria farmacêutica e cosmética e na indústria alimentar.

A biomassa de microalgas pode ser usada sem fracionamento, como algas em pó, ou pode ser explorada como fonte de um grande número de bioprodutos comercialmente interessantes, para a produção de biocombustíveis e moléculas bioativas: pigmentos, carotenoides, vitaminas, proteínas e compostos fenólicos que podem ser amplamente utilizados para a produção de nutraceuticos, produtos farmacêuticos, aditivos para uso alimentar, na cosmética, ração para animais, biofertilizantes, nos têxteis e em embalagens biológicas (Cai et al., 2021; Merlo et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022; Vella et al., 2019).

Embora estas aplicações possam não ser ainda totalmente comercializáveis, os mercados, para muitas delas, encontram-se a crescer e a expandir rapidamente:

a) Agricultura

Estima-se que o crescimento populacional obrigue a um aumento de 60 % da produção agrícola em 30 anos. Portanto, manter as elevadas produtividades e mitigar os impactos ambientais é o desafio da atualidade (Alvarez et al., 2021).

As microalgas em ambiente agrícola de produção vegetal melhoram a fertilidade do solo, contribuindo assim para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo benéficas para a reciclagem de nutrientes. Algumas microalgas conseguem produzir substâncias bioativas como fito-hormonas ou até exopolissacarídeos (EPS), que melhoram a estrutura e composição do solo. As cianobactérias são consideradas biofertilizantes devido à sua capacidade de fixar o azoto atmosférico e solubilizar o fósforo imobilizado (Alvarez et al., 2021).

Na produção animal, as microalgas têm sido incorporadas na ração de animais, tais como peixes, animais domésticos e animais que integram a cadeia alimentar humana. As microalgas afetam positivamente a fisiologia dos animais, devido ao seu perfil rico em vitaminas naturais, minerais e ácidos gordos essenciais, melhorando a resposta imunológica e da fertilidade, o controlo de peso e a aparência dos animais (Spolaore et al., 2006). Relativamente à aquicultura, as

microalgas exercem um papel importante na alimentação direta ou indireta dos peixes, por exemplo para cultivo de zooplâncton, alimento de larvas de peixes, moluscos, crustáceos e de outros animais aquáticos. As microalgas também representam um papel importante na manutenção da qualidade da água nos tanques, permitindo a criação de ambientes idênticos e naturais para as espécies (Cai et al., 2021). A microalga *H. pluvialis* é utilizada como “corante” na aquicultura, pelo facto de estimular a cor dos camarões e do salmão, devido à produção de astaxantina (Araújo et al., 2021; Gangl et al., 2015).

b) Ambiente

As algas contribuem significativamente para a produção primária global ao mesmo tempo que desempenham um papel importante na absorção de nutrientes dissolvidos no ambiente circundante e, potencialmente, no sequestro de carbono (Araújo et al., 2021).

As microalgas podem desempenhar um papel de remediação de águas residuais, uma vez que apresentam a capacidade de remover o azoto e o fósforo inorgânicos. Inclusive, as microalgas conseguem remover metais pesados e alguns compostos tóxicos, permitindo assim reduzir a contaminação secundária da água (Cai et al., 2021; Merlo et al., 2021). O tratamento de águas residuais com base em microalgas não requer grande consumo de energia e apresenta vasta aplicação devido à capacidade de as microalgas crescerem sob diferentes condições ambientais e, ainda à possibilidade de recuperarem e transformar nutrientes de águas residuais em compostos bioativos altamente valiosos (Caroppo & Pagliara, 2022). Contudo, o equacionar de grandes volumes de água a ser tratadas pode ultrapassar a capacidade das microalgas, sendo que os sistemas abertos, como os tanques e lagoas, são considerados como o método mais viável de cultivo de microalgas em águas residuais (Caroppo & Pagliara, 2022).

Apesar de as microalgas apresentarem resistência a substâncias tóxicas, sendo úteis na biorremediação das águas, as microalgas mais sensíveis também são ferramentas para bioensaios e biomonitorização de poluentes ambientais. Os bioensaios com microalgas permitem avaliar a toxicidade de poluentes como metais pesados e pesticidas (Loy & Chu, 2012).

A produção de biocombustíveis com base em microalgas é uma resposta à demanda de uma fonte de energia verde. O biocombustível é produzido a partir da fração lipídica. O óleo proveniente de microalgas contém 14 a 20 carbonos, sendo que os lípidos obtidos são triacilgliceróis, carotenoides e ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (Gangl et al., 2015; Gauthier et al., 2020). O teor de óleo das microalgas pode variar de 16 a 68% do seu peso seco e o seu rendimento pode atingir até 136 900 L ha⁻¹, sendo que outras culturas vegetais apresentam rendimentos por volta dos 5 950 a 172 000 L ha⁻¹ [30]. Um outro método de produção de biocombustíveis, que não tem como base os triacilgliceróis, é o uso de microalgas produtoras de hidrogénio (Gangl et al., 2015).

Contudo, a utilização de biocombustíveis provenientes de microalgas promove alguma discórdia entre autores. A sustentabilidade do processo pode ser limitada pelo ciclo de vida e a viabilidade económica e energética que é considerada demasiado cara em comparação a outras fontes de energia (Merlo et al., 2021). A principal vantagem dos biocombustíveis produzidos por microalgas é a inexistência de competição com as terras aráveis, produção de alimentos, forragens, entre outros bens essenciais (Gangl et al., 2015; Loy & Chu, 2012; Merlo et al., 2021; Vella et al., 2019).

As microalgas apresentam, ainda, um papel relevante na redução dos gases de efeito de estufa, sendo que apresentam vantagens devido à sua alta taxa de fixação de carbono, superior à de outras plantas terrestres. A taxa de fixação de CO₂ das microalgas varia entre 0,143 a 14,5 g L⁻¹ dia⁻¹ (Cai et al., 2021; Vella et al., 2019).

c) Indústria Farmacêutica e Cosmética

As atuais tendências de consumidores aumentam a demanda de produtos de origem natural, em detrimento de alternativas sintéticas, como suplementos alimentares ou nutraceuticos. Os produtos de interesse na área da saúde são os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa com mais de 20 carbonos e também outras moléculas bioativas importantes e naturais, como os carotenoides, pigmentos e enzimas produzidas em situação de *stress* e que exibem propriedades antioxidantes (Gauthier et al., 2020).

Algumas microalgas, como *Chlorella* spp., *Spirulina*, *Dunaliella* sp., *H. pluvialis*, produzem compostos bioativos com características benéficas para a saúde, com

atividades biológicas, como atividade antifúngica, antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante e de imunomodulação. Assim, atualmente, uma vasta variedade de produtos farmacêuticos e de cosmética incorporam microalgas ou subprodutos das mesmas (Araújo & Peteiro, 2021)

Os carotenoides são produtos relevantes, extraídos de microalgas, e o primeiro a ser comercializado foi o β -caroteno, que atua como pró-vitamina A. A astaxantina, proveniente da microalga *H. pluvialis*, é um carotenoide bem posicionado no mercado nutracêutico, usado principalmente como suplemento alimentar devido as suas propriedades antioxidantes (10 vezes maior que outros carotenoides) e atividades de proteção celular. A astaxantina ostentou capacidade de prevenir infecção bacteriana, insuficiência vascular e cancro Clique ou toque aqui para introduzir texto.(Gangl et al., 2015; Loy & Chu, 2012).

Os ácidos gordos são componentes naturais, utilizados em suplementos alimentares. O ômega-3 provém essencialmente da produção de óleo de peixe, mas a sua exploração depende de combustíveis fósseis e de ecossistemas aquáticos que se encontram esgotados pela alta demanda. Por outro lado, a produção de óleo proveniente de microalgas é bastante sustentável e ostenta baixo impacto ambiental comparado, por exemplo, com o óleo de linhaça (Oliveira & Bragotto, 2022). Diversas microalgas marinhas são ricas em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, como DHA, EPA e ácido α -linolénico (ALA), sendo que EPA e ALA apresentam propriedades antioxidantes superiores aos óleos provenientes de peixes (Gangl et al., 2015). O DHA é um ácido importante para o desenvolvimento adequado do cérebro e do sistema ocular em bebés e ainda proporciona melhor saúde a nível cardiovascular em adultos (Loy & Chu, 2012).

A *Spirulina* é uma fonte abundante de ficocianina, sendo que os seus derivados manifestam propriedades fluorescentes, empregadas na rotulagem de anticorpos com imunofluorescência em citometria de fluxo (Gangl et al., 2015). A ficocianina também demonstra propriedades promotoras de saúde, como atividades antioxidantes, sendo o seu potencial antioxidante 16 vezes mais eficiente que o trolox (análogo da vitamina E) e 20 vezes mais eficaz que a vitamina C, avaliado com base no efeito protetor dos eritrócitos contra a lise induzida por radicais livres (Loy & Chu, 2012).

Algumas cianobactérias produzem substâncias tóxicas tais como hepatotoxinas e neurotoxinas. Contudo, investigações sobre as cianobactérias demonstraram potencial antiviral de próxima geração, antibacteriano e anticancerígeno, sendo que diversos medicamentos já atingiram ensaios clínicos de fase II e III (Gangl et al., 2015).

As microalgas *Arthrospira* e *Chlorella* são as principais microalgas utilizadas em produtos de cosmética. Os extratos de microalgas são encontrados em produtos para o rosto e corpo, por exemplo: em cremes antienvelhecimento, em produtos de regeneração, em cremes hidratantes e em *peeling* suaves, sendo também possível encontrar microalgas em produtos de proteção solar e cuidado capilar. Um extrato rico em proteínas de *Arthrospira* pode reparar sinais de envelhecimento da pele, hidratando profundamente e evitando a formação de estrias, e um extrato de *Chlorella* pode estimular a síntese de colagénio na pele, regenerar tecidos e reduzir as rugas (Spolaore et al., 2006).

2.4. Microalgas e Indústria Alimentar

Fornecer comida em quantidade adequada para a população é um dos grandes desafios enfrentados atualmente em todo o mundo. A fome é um problema que afeta 1 a cada 9 pessoas no mundo, podendo provocar a morte devido à falta de ingestão adequada de calorias e proteínas, caracterizada por desnutrição proteico-energética. Este problema piora com o aumento da população mundial, previsto atingir os 9,7 mil milhões de pessoas até 2050, estimativas atuais sugerindo que não haverá água ou terras aráveis suficientes para satisfazer esta procura (Matos, 2017; Torres-Tiji et al., 2020).

A resolução da Organização das Nações Unidas (ONU) intitulada “Transformar o nosso mundo: Agenda 2030 de Desenvolvimento Sustentável”, constituiu os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que visam reduzir a fome em todo o mundo, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover uma agricultura sustentável entre outros. O crescimento da população mundial ao longo das últimas décadas e a sua tendência crescente levará ao aumento da demanda alimentar e, como consequência, ao aumento da subnutrição, tornando desafiante este compromisso da ONU (Merlo et al., 2021).

As microalgas compreendem um conjunto extremamente diversificado de microrganismos capazes de acumular macromoléculas como proteínas, hidratos de carbono e lípidos através do uso eficiente de energia solar, CO₂ e nutrientes. Aliás, as microalgas são consideradas candidatas perfeitas para nutracêuticos ou alimentos funcionais devido à sua capacidade de sintetizar produtos valiosos, como carotenoides, ácidos gordos de cadeia longa, açúcares, aminoácidos essenciais e não essenciais, enzimas, vitaminas e minerais necessários à nutrição humana (Matos, 2017).

As microalgas como alimento parece ser algo recente, mas na verdade as microalgas são antigas aliadas na nutrição humana. O uso mais antigo conhecido de algas como fonte de alimento provém do Chile, onde existem registos arqueológicos que demonstram o consumo de algas datado há 14 000 anos (Vaz et al., 2016). A ONU na conferência alimentar de 1974, considerou a *Spirulina* como um dos melhores alimentos para o futuro da alimentação mundial. Reconheceu a contribuição para o combate à fome e à desnutrição e o

fornecimento de alimentos com alta qualidade. Com o reconhecimento da ONU, vários países começaram a investigar os benefícios das microalgas na alimentação (Merlo et al., 2021).

A Food & Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprovou espécies de microalgas alimentares como Geralmente, Reconhecidas como Seguras (GRAS), incluindo *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella protothecoides*, *Dunaliella bardawil*, *Haematococcus pluvialis*, *Prototheca moriformis*, *Schizochytrium* sp., e *Ulkenia* sp. (Oliveira & Bragotto, 2022).

Na UE, existem várias categorias de regulamentos para alimentos para consumidores e para animais, aplicadas ao uso de microalgas. As microalgas aprovadas para fins alimentares são avaliadas de acordo com o diploma relativo a novos alimentos, Regulamento (UE) n.º 2015/2283, sob alçada da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). A classificação de novos alimentos é definida pela seguinte citação: alimentos que “não foram utilizados de forma significativa para consumo humano antes de 15 de maio de 1997”. Esta legislação fornece uma avaliação de segurança de alimentos ou ingredientes alimentares (Oliveira & Bragotto, 2022; Turck et al., 2020).

Esta legislação prevê uma avaliação da segurança dos alimentos ou ingredientes alimentares atribuindo o estatuto QPS (EFSA). *Chlorella* sp. (*C. pyrenoidosa*, *C. vulgaris* e *C. luteoviridis*) e *Arthrospira* sp. foram comercializados e consumidas como ingredientes alimentares antes de 1997, e assim não estando sujeitas a esta classificação (Oliveira & Bragotto, 2022; Turck et al., 2020).

O Regulamento (UE) n.º 2015/2283 permite garantir que os novos alimentos e ingredientes alimentares sejam submetidos a uma avaliação de segurança através de um procedimento unificado para proteger a saúde pública. A lista de novos alimentos inclui *Haematococcus pluvialis*, *Odontella aurita*, *Schizochytrium* sp., *Tetraselmis chui*, *Ulkenia* sp. (Araújo & Peteiro, 2021; Oliveira & Bragotto, 2022; Turck et al., 2020).

Na Ásia Oriental, as algas marinhas tornaram-se alimentos amplamente e frequentemente consumidos, enquanto noutras zonas do mundo as algas são consumidas apenas como alimento tradicional por algumas comunidades costeiras ou utilizadas para diversos fins, como dietéticos, nutricionais, ambientais (produto

de baixa pegada ecológica) e sociais (veganismo, etc.) (Araújo et al., 2021; Cai et al., 2021).

Em 2004, a FDA confirmou que os alimentos contendo compostos EPA e DHA, reduzem o risco de doença cardíaca coronária. Assim, microalgas são cultivadas com objetivo de produção de DHA como aditivo alimentar (Vaz et al., 2016). Entre 2015 e 2019, foi descrito que dos, aproximadamente, 13 090 novos produtos alimentares que continham algas ou componentes delas derivados, 79 % e 21% correspondiam, respetivamente, a alimentos e bebidas (Oliveira & Bragotto, 2022).

Nas últimas décadas, a biomassa de microalgas tem sido aplicada como alimento com alegações de saúde, e vários são os benefícios descritos, como por exemplo, melhoria da saúde intestinal e redução dos riscos de doenças crónicas, como a obesidade e a diabetes tipo II (Cai et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022). Os principais produtos à base de microalgas são suplementos alimentares (com por exemplo, astaxantina e cantaxantina de *Haematococcus* e carotenoides de *Dunaliella*), aditivos (polissacarídeos como aditivo em produtos cosméticos), ingredientes (por exemplo, *Spirulina* como corante alimentar azul natural) e óleo unicelular (DHA de *Crypthecodinium*), sendo que o DHA já se encontra presente em fortificações de sumos, leite e outras bebidas, direccionadas para bebés e crianças [3], (Oliveira & Bragotto, 2022).

O cultivo de microalgas como *Spirulina* spp., *Chlorella* spp., *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis* spp. está estabelecido em diversos países, variando a produção desde a pequena escala à escala industrial, com o propósito da obtenção de suplementos nutricionais para humanos e outros usos (FAO, 2020). Microalgas como a *Spirulina* e a *Chlorella* são utilizadas pelo consumidor como suplementos dietéticos, devido ao teor em vitaminas, lípidos, minerais e proteínas que são facilmente absorvidos pelo organismo do ser humano, contribuindo para a manutenção das funções essenciais do organismo (Merlo et al., 2021).

As algas verdes, como por exemplo, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e as cianobactérias como a *Spirulina* são as microalgas de maior relevância biotecnológica, sendo amplamente comercializadas como suplementos nutricionais para humanos e como aditivos para rações de animais (Matos, 2017). As microalgas podem ser incorporadas diretamente em formulações para larvas e

alimentos de juvenis, principalmente para rotíferos que são utilizados na criação de crustáceos e peixes (Araújo et al., 2021). Contudo, o cultivo de microalgas tende a ser regulamentado e monitorizado a nível nacional e local separadamente do da aquicultura (Cai et al., 2021).

A FDA e Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) restringiram o uso de corantes sintéticos em alimentos devido à existência de um aumento de reações alérgicas e possibilidade de originar cancro (Vaz et al., 2016). Os principais pigmentos naturais produzidos por microalgas são clorofilas (verde), carotenoides (amarelo/laranja/vermelho), antocianina (vermelho/azul) e betanina (vermelho) (Oliveira & Bragotto, 2022). A astaxantina extraída de *H. pluvialis*, uma microalga verde, é utilizada como intensificador de pigmentação na indústria da criação de salmão (Cai et al., 2021). A FDA aprovou a ficocianina obtida da *Spirulina* como corante alimentar azul e a UE autorizou o uso de β -caroteno derivado de *D. salina* como aditivo alimentar (Gangl et al., 2015; Oliveira & Bragotto, 2022).

Um produto alimentar precisa de ser projetado para toda a cadeia produtiva até ser adquirido e usado pelo consumidor. Deste modo, têm sido desenvolvidos diversos estudos com microalgas para melhorar processos e produtos alimentares: i) Uma barra de chocolate que apresentou estabilidade oxidativa e baixos valores de peróxidos após fortificação com microalga liofilizada e encapsulada *Scenedesmus obliquus*; ii) Um iogurte que com incorporação de *Spirulina* (0,25 %) que melhorou as condições de retenção de água e teve menor interação com o soro de leite durante 28 dias de armazenamento e; iii) Um leite achocolatado com *Spirulina*-LEB-18 que melhorou a taxa de sedimentação, aumentou a solubilidade e diminuiu a higroscopicidade do produto (<10 %) (Oliveira & Bragotto, 2022).

A biomassa de microalgas afeta até aspetos reológicos, como a viscosidade de novos produtos alimentares, conseguindo estruturas estáveis e com resistência à cozedura. Os avanços na derivatização da biomassa de microalgas delineiam novos alimentos e ingredientes usados em formulações de bebidas, pães e massas. No pão, parâmetros de textura como a dureza e mastigabilidade não foram alterados com adição de microalgas (*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus almeriensis* e *Nannochloropsis gaditana*). Contudo, observou-se uma mudança de cor na crosta e do miolo para tons verdes/amarelados, devido a capacidade de corante natural das microalgas, podendo ser usado como aditivo

alimentar (Oliveira & Bragotto, 2022). Pães sem glúten, produzidos com farinha de arroz e adição de *Streptomyces platensis*, 2 a 5%, apresentam maior teor de proteína e biscoitos com 1 % de biomassa de *S. platensis* adicionada na formulação apresentam 70% melhor digestibilidade e uma maior aceitação pelos consumidores (Vaz et al., 2016).

As microalgas são excelentes fontes de vários compostos, contendo alto teor de proteína, proteínas bio acessíveis e baixo teor de fibra (Oliveira & Bragotto, 2022). As microalgas são fonte de quase todas as vitaminas importantes para ser humano, como vitamina E, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, inositol. A cianófito *Spirulina* é rica em vitamina B12 e pró-vitamina A (β -caroteno) (Vaz et al., 2016).

O uso potencial de microalgas na produção de hidratos de carbono comerciais (monossacarídeos, dissacarídeos e polialcoois) inclui as espécies *Chorella*, *Nannochloropsis gaditana*, *Pyrocistis lunula* e *Arthrospira platensis* (Oliveira & Bragotto, 2022). No entanto, as microalgas ainda não podem ser consideradas como uma alternativa aos vegetais ou produtos animais como fonte de proteína para o mercado de rações pois a quantidade produzida é ainda insuficiente (Araújo et al., 2021).

A alimentação está correlacionada com a saúde dos seres vivos. Um ser humano com altos níveis de *stress* oxidativo pode contrair doenças crônicas e degenerativas. Uma dieta rica em antioxidantes reduz a prevalência destas doenças. Muitos dos antioxidantes sintéticos convencionais como BHA (2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol) e BHT (hidroxitolueno butilado) apresentam efeitos cancerígenos, e estas implicações originaram a busca de alternativas para produção de antioxidantes mais seguros e naturais (Gauthier et al., 2020).

Determinadas algas produzem óleo comestível, normalmente comercializado como óleo unicelular (SCO). Este óleo apresenta valor económico pois muitas algas acumulam quantidades consideráveis de ácidos gordos de cadeia longa na forma de triacilgliceróis, como ómega-3, ácido α -lipóico (ALA), EPA, DHA, entre outros. Os ácidos têm sido associados a efeitos benéficos na saúde humana, como mitigação da hipertensão, efeitos anti-inflamatórios na degeneração muscular, na artrite reumatoide e na osteoporose (Araújo et al., 2021; Cai et al., 2021; Matos, 2017).

A microalga *Schizochytrium* sp., é rica em óleo que contém DHA obtido após decomposição enzimática e as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* são usadas na produção de ômega-3 (Oliveira & Bragotto, 2022). O painel da EFSA considera que não há preocupação relativamente à toxicidade deste novo alimento, que é seguro para utilização em suplementos dietéticos com o nível máximo de ingestão de 1 g de DHA por dia para adultos, excluindo grávidas e lactantes (Turck et al., 2020).

Existem fatores que restringem a utilização de microalgas na alimentação humana como: (i) sabor ou cor desagradáveis; (ii) potenciais contaminações por metais pesados e/ou microcistinas produzidos por cianobactérias sob cultivo descontrolado; (iii) potenciais efeitos secundários causados pela ingestão de microalgas (por exemplo, alergias); e (iv) preços relativamente elevados de produtos de qualidade.

Apesar da importância de todos os derivados obtidos de microalgas, surge uma lacuna sobre a incidência de substâncias químicas indesejáveis presentes nos seus produtos. O consumo de algas marinhas e microalgas selvagens e microalgas cultivadas também pode contribuir para a exposição de a certos perigos para a segurança alimentar (por exemplo, contaminações com metais pesados ou microcistinas) ou incorrer em riscos para a saúde devido à ingestão excessiva de certos elementos, como iodo, provenientes das características intrínsecas da biomassa e componentes presentes nos estádios de cultivo e das condições de processamento (Cai et al., 2021; Oliveira & Bragotto, 2022).

2.5. As microalgas alvo de estudo

2.5.1. *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis, Flotow 1844 é uma microalga unicelular de água doce pertence à classe Chlorophyceae, ordem Chlamydomonadales e família Haematococcaceae. Clique ou toque aqui para introduzir texto. (M.D. Guiry in Guiry & Guiry, 2019) (figura 2.5.1.1.). *Haematococcus* foi descrito pela primeira vez por J. Von Flotow em 1844 e mais tarde em 1899 por Tracy Elliot Hazen que apresentou extensivamente a sua biologia e o ciclo de vida (Kim et al., 2015; Nur et al., 2021; Shah et al., 2016). *H. pluvialis* apresenta uma distribuição global em diversificados habitats aquáticos, geralmente em regiões temperadas, encontra-se facilmente em lagoas naturais e artificiais e em piscinas artificiais e pluviais. Contudo, esta microalga apresenta capacidade de sobrevivência sob condições de luz extrema, variações de temperatura e em meios que contenham cloreto de sódio (NaCl), condições estas que seriam deletérias para outras espécies. Esta capacidade de sobrevivência deve-se à capacidade de se enquistarem. Atualmente, *H. pluvialis* é reconhecida como a fonte mais natural, abundante e promissora para a produção comercial de astaxantina (Nur et al., 2021; Shah et al., 2016).

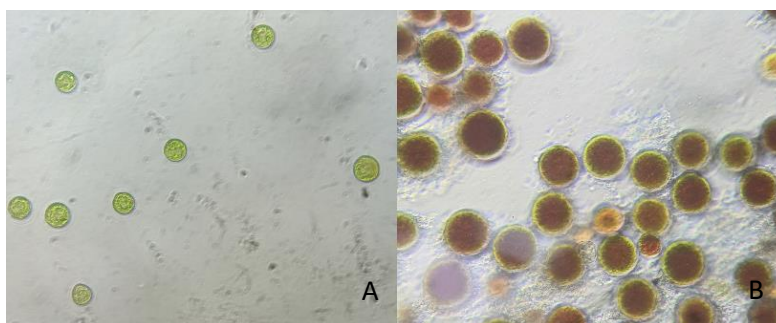


Figura 2.5.1.1 - *Haematococcus pluvialis* em observação microscópica com ampliação 100x, A) macrozoóides e B) quistos. (Fonte própria).

O ciclo de vida de *H. pluvialis* pode ser influenciado por situação de *stress*, modificando a sua estrutura celular, sendo que o seu ciclo consiste em quatro tipos de morfologia celulares distinguíveis: macrozoóides (zoósporos), microzoóides, palmela e quistos (aplanósporos), figura 2.5.1.2 (Kobayashi et al., 1997; Nur et al., 2021; Shah et al., 2016).

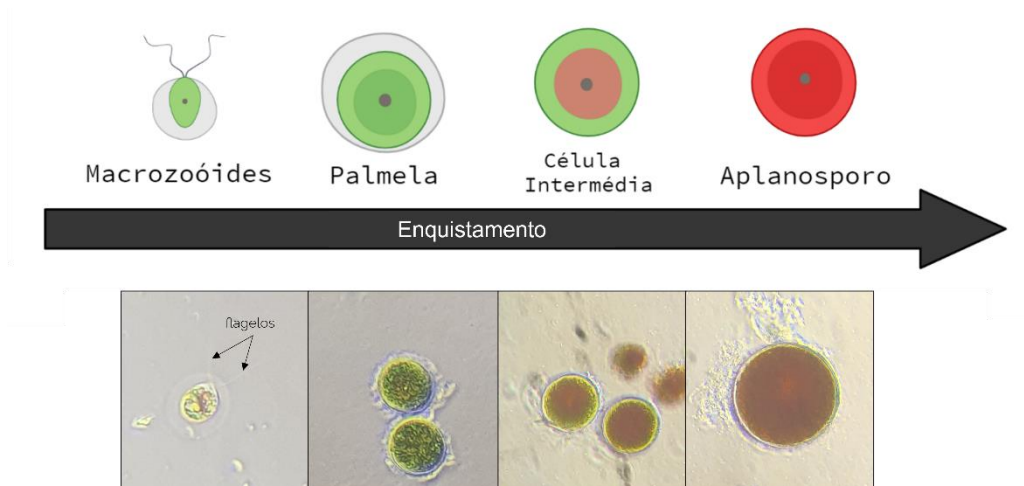


Figura 2.5.1.2 - Fases de enquistamento de *Haematococcus pluvialis* (Fonte própria).

Na fase vegetativa, podem-se encontrar macrozoóides, microzoóides e palmela. Quando as células se encontram em fase macrozoóides, apresentam forma esférica, elipsoidal ou ovoide com dois flagelos de igual comprimento e um cloroplasto com numerosos pirenoides dispersos. As células macrozoóides apresentam tamanho entre 8 e 30 μm com uma matriz extracelular gelatinosa distinta (Shah et al., 2016).

Durante o crescimento vegetativo, as células flageladas de crescimento rápido predominam, podendo-se reproduzir assexuadamente, originando 2 a 32 novas células (Nur et al., 2021). O crescimento vegetativo pode ser influenciado pela composição do meio, cinética de crescimento, condições de luz e *stress* ambiental. As células vegetativas contêm altos níveis de clorofila e proteína, mas baixos teores de carotenoides, sendo que, na fase de enquistamento, ocorre a degradação da clorofila e das proteínas e um aumento importante de carotenoides (Kobayashi et al., 1997).

Condições ambientais ou de cultivo desfavoráveis provocam indução de *stress* nas células. Os macrozoóides perdem os flagelos, tornam-se imóveis, aumentam de tamanho e adquirem uma forma mais oval. Desenvolvem uma estrutura amorfa de múltiplas camadas na região interna da matriz celular, à medida que se tornam células palmelas. Nesta fase a astaxantina começa a acumular-se, iniciando o processo de enquistamento, no qual ocorre a mudança de cor nas células para laranja-esverdeadas, esta cor pode ser observada em 7 a 10 dias após indução de *stress*. Com indução de *stress* contínuo, como a privação de nutrientes, a alta

irradiação de luz e a salinidade no meio, é induzida cessação da divisão celular em fase palmela, transformando-se em aplanósporos assexuados (Nur et al., 2021; Shah et al., 2016).

Os quistos (aplanósporos) são designados como fase enquistada, na qual ocorre acumulação de astaxantina, a célula torna-se vermelha e imóvel geralmente em 11 a 14 dias após a indução de *stress*. Neste estágio, as células contêm duas estruturas distintas: uma bainha trilaminar espessa e rígida e, uma parede celular secundária resistente à acetólise, por privação de nutrientes ou à alta exposição à luz (Nur et al., 2021; Shah et al., 2016). A maturação das células enquistadas é acompanhada por um aumento de biossíntese de carotenoides e da degradação das proteínas (Kobayashi et al., 1997). Quando *H. pluvialis* se encontra na fase de aplanósporo adquire a capacidade de resistir a condições ambientais extremas (Shah et al., 2016).

Uma vez que as condições ambientais retornam ao ideal, os aplanósporos vermelhos transforma-se em zoósporos flagelados, de forma a iniciar um novo ciclo de crescimento retomando ao estado de macrozoóides. Em alguns casos, a gametogénese pode ocorrer em aplanósporos, podendo produzir até 64 microzoóides, estes são menores (< 10 µm) em comparação aos macrozoóides (Shah et al., 2016).

A microalga *Haematococcus* é conhecida como uma fonte de produção natural de astaxantina sendo mais rentável que outras microalgas capazes de produzir este carotenoide [2]. No estágio maduro dos aplanósporos, a astaxantina acumula-se densamente em gotículas lipídicas no citoplasma perinuclear, resultando na cor vermelha brilhante das células (Nur et al., 2021; Shah et al., 2016).

A astaxantina é um carotenoide vermelho (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) derivado do β -caroteno, que no organismo humano não se converte em vitamina A. É um pigmento importante para indústria que é usado na aquicultura, de forma a obter a tonalidade característica na carne de alguns peixes, a tonalidade vermelha-rosada. Apresenta ainda importância no fator nutricional das larvas de peixe e existem diversas aplicações farmacêuticas devido a ser um imunomodulador, contém propriedades anticancerígenas e atividade antioxidante é maior que a atividade da vitamina E, do β -caroteno e α -tocoferol, sendo 100 vezes superior à

sua atividade antioxidante (Domínguez et al., 2019; Kobayashi et al., 1997; Sathasivam et al., 2019).

A estrutura química da astaxantina contém um hidroxilo e um grupo cetona em cada uma de suas extremidades moleculares, embora todos os carotenoides apresentem propriedades antioxidantes, que derivam das ligações duplas conjugadas. Contudo, a astaxantina apresenta maiores atividades antioxidantes que os restantes carotenoides, provavelmente devido aos seus grupos hidroxila e cetona, que podem ser facilmente oxidados e, também, contém grupos lipofílicos na estrutura, permitindo facilmente atravessar a membrana celular sem afetar a integridade estrutural (Li et al., 2020). Permite, assim exercer funções protetoras nas microalgas contra os danos de luz UV e a fotoxidação, eliminando os radicais livres (Sathasivam et al., 2019).

A produção de astaxantina está correlacionada com dois principais fatores: deficiências nutricionais (falta de azoto) e altas intensidades de luz (Domínguez et al., 2019). Contudo, temperaturas elevadas, diferentes espectros de luz, pH, concentração de NaCl e hormonas vegetais podem induzir *stress* e causar a acumulação do pigmento (Domínguez et al., 2019; Nur et al., 2021; Shah et al., 2016). Um outro fator causador de *stress* a considerar é o fotoperíodo, luz e escuro, porque para a divisão celular é crucial na realização de processos bioquímicos, incluindo a síntese de antioxidantes, sendo que a falta do período de escuro pode ser um fator de *stress* para *H. pluvialis* (Domínguez et al., 2019).

Embora a astaxantina seja acumulada principalmente como um metabolito secundário, uma vez que a divisão celular tenha cessado. Contudo, existe alguma acumulação de astaxantina durante a divisão celular enquanto as células apresentam flagelos (Domínguez et al., 2019). As características mencionadas fazem da astaxantina um dos carotenoides mais valiosos da saúde humana e nutrição animal, já que no mercado mundial atual de aquicultura a astaxantina tem um valor aproximado de 200 milhões de dólares (Li et al., 2020; Sathasivam et al., 2019).

2.5.2. *Thalassiosira weissflogii*

Thalassiosira weissflogii (Grunow) G.A.Fryxell & Hasle 1977, é uma microalga unicelular diatomácea planctônica marinha que pertence à classe Coscinodiscophyceae, ordem Thalassiosirales e família Thalassiosiraceae (figura 2.5.2.1) (M.D. Guiry in Guiry & Guiry, 2021). Pode ser encontrada em ambientes marinhos, mas também em águas doce e salobras, podendo crescer em ambientes com elevados teores de salinidade (Borges et al., 2011).

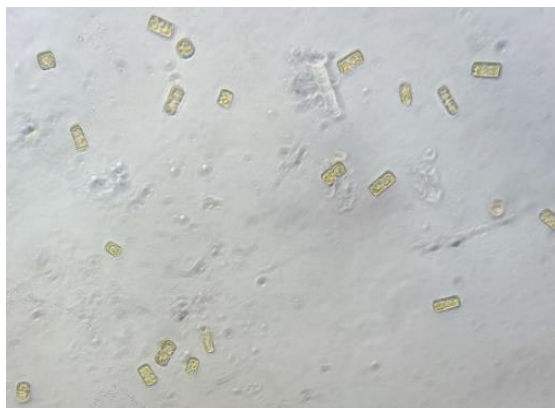


Figura 2.5.2.1 - *Thalassiosira weissflogii* em observação microscópica com ampliação 400x. (Fonte própria).

A estrutura celular de *T. weissflogii* é composta por uma parede celular dura e porosa, composta por sílica, a frústula, retangular em plano valvar e, o seu eixo perivalvar (equivalente à altura da célula) é mais curto que o seu diâmetro (18 a 22 μm) (Tihamér & Kovács, 1984). Portanto, apresenta uma forma cilíndrica curta e o seu tamanho pode variar entre os 4 a 32 μm de diâmetro (Borges et al., 2011). A frústula é formada por duas tecas independentes que se encaixam. Cada teca é formada por uma valva e um ou mais cíngulos. As valvas possuem uma face valvar e, disposto perpendicularmente sobre a mesma, um manto (Vieira, 2011). É visível um anel de “espinhos” entre a face valvar e o manto. Na fase valvar, as aréolas (esporos formados por projeções de sílica) são poligonais e as costas orientadas radialmente (eixos secundariamente formados) sendo pouco perceptíveis em micrografias, são, contudo, visíveis na superfície externa da valva (Tihamér & Kovács, 1984). Défice nutricional de azoto, níquel e sílica pode resultar num crescimento limitado e em produção de lípidos (Etesami et al., 2022).

O ciclo de vida das diatomáceas é composto por duas fases: fase de crescimento e fase de reprodução. A indução e a duração de cada fase podem ser influenciadas

por fatores externos, tais como uma variação na intensidade da luz, temperatura ou duração do fotoperíodo. A fase dominante é caracterizada pela formação de frústula, fase diploide. Tanto o crescimento como a reprodução de diatomáceas requerem adaptações para contornar as limitações impostas pela estrutura silicosa da frústula. A reprodução pode ser por meios assexuados ou sexuado. A fase assexuada envolve a divisão celular, cada novo indivíduo recebe uma valva, originando descendentes de tamanhos diferentes, tendendo uma diminuição de tamanhos nas gerações sucessivas (Vieira, 2011).

Esta diatomácea é utilizada na alimentação de larvas de camarão, copépodes e artêmias e como fonte de alimento para o estágio pós-larval de amêijoas, mexilhões e vieiras. A *T. weissflogii* é considerada melhor que outras microalgas comerciais, como *Chaetoceros* e *Tetraselmis*, devido ao seu grande tamanho, permitindo a continuação da sua utilização em estádios larvais mais avançados (Borges et al., 2011; Etesami et al., 2022).

O crescimento de *T. weissflogii* é influenciado pela concentração iônica, salinidade e qualidade da água (Borges et al., 2011). É uma microalga capaz de responder a diferentes estímulos nutricionais e à injeção de CO₂, através da modulação do conteúdo de biomassa e distribuição de componentes bioquímicos dentro da célula (Vella et al., 2019).

A fucoxantina é um carotenoide importante presente nas algas marinhas de cor castanha e em microalgas diatomáceas (Khaw et al., 2021; Xia et al., 2013). As atuais fontes comerciais de fucoxantina são macroalgas, como *Saccharina japonica*, *Undaria pinnatifida* e *Sargassum fusiforme*. As microalgas diatomáceas, contudo, apresentam maior concentração de fucoxantina, maior taxa de crescimento, menor custo de extração e duração de cultivo mais curta do que as macroalgas (Foo et al., 2015; Wang et al., 2021). No entanto, as microalgas são ainda pouco exploradas, como o caso da *T. weissflogii*, como produtores alternativos de fucoxantina.

As bioatividades da fucoxantina são atribuídas à sua estrutura molecular única com uma ligação aleno, um grupo acetil e um carbonilo conjugada com um 5,6-monoepóxido (Khaw et al., 2021; Kim et al., 2012). A fucoxantina é o principal mecanismo complexo de colheita de luz nas diatomáceas, devido aos complexos

de proteína-clorofila a que encontram correlacionados com a absorção de luz das algas. Esta atividade é responsável por mais de 10% da produção total estimada de carotenoides na natureza (Foo et al., 2015; Khaw et al., 2021).

Além dos papéis fundamentais da fucoxantina na fotossíntese e na fotoproteção, esta possui um amplo espectro de bioatividade, sendo um eliminador eficaz de radicais livres, que pode regular positivamente a expressão de enzimas antioxidantes (Foo et al., 2015; Wang et al., 2021). Outras bioatividades que este carotenoide apresenta são anti-inflamatórias, antiobesidade, antidiabética, anticancerígeno, antiangiogénica e anti-hipertensiva (Kim et al., 2012; Wang et al., 2021; Xia et al., 2013). Devido aos seus múltiplos benefícios para a saúde, estima-se que o mercado mundial de fucoxantina aumente de 88 milhões de dólares (valores de 2019) para mais de 100 milhões de dólares nos próximos anos (Khaw et al., 2021). O uso de fucoxantina é permitido em diversos países, nomeadamente na União Europeia (UE), tendo estatuto QPS para ser usada como nutracêutico ou mesmo como aditivo em rações nas indústrias avícola e aquícola (Kim et al., 2012; Xia et al., 2013).

As microalgas diatomáceas apresentam potencial no desenvolvimento de processos sustentáveis de base biológica. Isso deve-se principalmente as suas altas taxas de multiplicação, a plasticidade da alocação do carbono nos componentes celulares, a resiliência significativa às mudanças ambientais e altas taxas de sedimentação que poderiam reduzir consideravelmente os custos de determinados processos (Vella et al., 2019).

3. Materiais e Métodos

3.1. Produção de microalgas

Os ensaios tiveram lugar nas instalações da AQUALGAE, sucursal em Viana do Castelo. O sistema de cultivo de microalgas utilizado compreendeu uma série de fotobiorreatores com sistemas de arejamento e injeção de CO₂, dispostos em prateleiras, cada prateleira estando equipada com 4 lâmpadas LEDs.

3.1.1. As culturas de microalgas estudadas

As culturas de *Haematococcus pluvialis* (SAG 34-1a) e de *Thalassiosira weissflogii* (SAG 2135) foram obtidas da coleção de cultura de algas da Universidade de Göttingen, Alemanha. A partir das culturas em coleção iniciou-se o processo de produção de microalgas em escala laboratorial (figura 3.1.1.1).

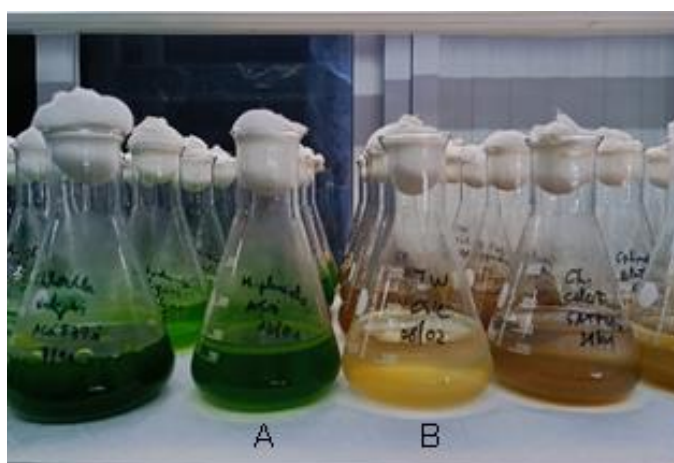


Figura 3.1.1.1 - Culturas de microalgas em meio líquido. (A) Cultura de *H. pluvialis* e (B) Cultura de *T. weissflogii* (Fonte própria).

3.1.2. Produção de *H. pluvialis* em escala laboratorial

A microalga *H. pluvialis* foi cultivada num fotobiorreator de 2 L, com 2 das 4 lâmpadas LEDs ativas e colocadas a 16 cm de distância dos fotobiorreatores. Recebendo constante fluxo de ar, de forma a garantir que todas as microalgas recebem a mesma intensidade luminosa e que não se depositam no fundo do fotobiorreator. Os fotobiorreatores foram submetidos a um fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro a temperatura ambiente, 20 ± 2 °C regulada por equipamento de ar condicionado.

Na produção de *H. pluvialis* foi utilizado como substrato a água doce desionizada estéril enriquecida com o meio de cultura GM-FWS (tabela 3.1.2.1), com o pH mantido entre 7,3 e 7,6 através de pulsos de CO₂, 10 seg. a cada 12 min, apenas durante o período de luz, com o objetivo principal de obter uma concentração ideal para o início de ensaios de 0,25 g L⁻¹.

Tabela 3.1.2.1 - Composição do meio de cultura (GM-FWS).

GM-FWS*
Nitrato de sódio (NaNO ₃)
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)
Oligoelementos e vitaminas

*meio formulado pela empresa Aqualgae

3.1.2.1. Influência da intensidade de luz de espectro branco no crescimento de *H. pluvialis*

A partir do fotobiorreator referido anteriormente, a cultura inicial foi separada em 8 fotobiorreatores de 1 L com volume total de 900 mL, e igual concentração. Foram utilizadas lâmpadas LEDs de diferentes intensidades no espectro branco, V-TAC e NS12. Na tabela 3.1.2.1.1 encontram-se descritas as diferentes intensidades de luz (lx) consoante a tipologia das lâmpadas LEDs e a distância destas aos fotobiorreatores, determinadas através de luxímetro (LM37), e a lx foi depois convertida em densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD).

Tabela 3.1.2.1.1 - Intensidade luminosa das diferentes lâmpadas LEDs consoante a distância do fotobiorreator às lâmpadas LEDs.

Lâmpadas LEDs	PPFD			
	16 cm		5 cm	
	2 lâmpadas LEDs	4 lâmpadas LEDs	2 lâmpadas LEDs	4 lâmpadas LEDs
V-TAC (VT-1577, 50Hz, 22W)	67 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	114 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	179 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
NS12 (L35 NS12, 50/60Hz, 35 W)	198 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	427 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	414 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	617 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Na fase exponencial, correspondendo ao período entre o dia 0 e o dia 6, o ensaio arrancou com 2 das 4 lâmpadas LEDs posicionadas a 16 cm (dia 0), de forma a salvaguardar a microalga do *stress* inicial. No 2º dia, movimentaram-se os fotobiorreatores para 5 cm de distância das lâmpadas LEDs, aumentando assim a intensidade luminosa. Determinou-se a concentração celular ao longo do tempo, (ponto 3.2.1) e no 6º dia determinou-se a concentração da biomassa (ponto 3.2.2), o ponto máximo de crescimento.

No 6º dia, após a recolha da amostra iniciou-se o estudo do estado estacionário com 4 lâmpadas LEDs ligadas numa distância de 16 cm, concluído ao 10º dia. A implementação do estado estacionário foi realizada através de renovações diárias de 25 % do volume do fotobiorreator com o mesmo meio de cultura, durante a primeira hora de luz do fotoperíodo. Determinou-se a concentração celular ao longo do tempo, sendo que no 10º dia determinou-se a concentração da biomassa, o ponto de estabilização.

3.1.2.2. Influência dos espectros de luz branco e vermelho no crescimento de *H. pluvialis*

Para comparação da eficiência das lâmpadas LEDs AP673L de espectro vermelho com as lâmpadas LEDs NS12 utilizados anteriormente, ambas com a mesma intensidade luminosa. O espectro de luz emitido e a intensidade luminosa pelas lâmpadas LEDs utilizadas, encontram-se descritos na tabela 3.1.2.2.1.

Tabela 3.1.2.2.1 - Espectro emitido e intensidade luminosa pelas lâmpadas LEDs NS12 e AP673L.

Lâmpadas	PPFD		Espectro emitido										
	16 cm		UV	B	G	R	FR	PAR	CCT	CRI	B:G	B:R	R:FR
	2 lâmpadas LEDs	4 lâmpadas LEDs											
NS12 (L35 NS12, 50/60Hz, 35 W)	198 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	427 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1%	20%	36%	38%	6%	94%	4500	90	0,6	0,57	5,0
AP673L (L35 AP673L, 50/60Hz, 35 W)	166 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	408 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0%	10%	19%	63%	8%	92%	2000	60	1,8	0,16	6,0

UV- radiação ultravioleta; B – azul; G – verde; R - vermelho; FR – vermelho distante; PAR - radiação fotossinteticamente ativa; CCT - temperatura de cor; CRI - índice de renderização de cores; B:G – razão entre azul e verde; B:R – razão entre azul e vermelho; R:FR – razão entre vermelho e borda vermelha.

Como anteriormente, no ponto 3.1.2.1, a fase exponencial decorreu do dia 0 ao dia 6, inicialmente somente com 2 das 4 lâmpadas LEDs ativas numa distância de 16 cm. Como anteriormente, e mencionado no ponto 3.1.2.1, a fase exponencial decorreu do dia 0 ao dia 6, inicialmente somente com 2 das 4 lâmpadas LEDs ativas à distância de 16 cm, e no 2º dia com 4 lâmpadas LEDs ativas e à mesma distância, de forma a aumentar a intensidade luminosa. Determinaram-se a concentração celular (ponto 3.2.1) ao longo do tempo e no 6º dia determinou-se a concentração da biomassa (ponto 3.2.2), o ponto máximo de crescimento.

Após o estudo da fase exponencial iniciou-se o estudo da fase estacionária, do 6º ao 10º dia de ensaio. A implementação do estado estacionário ocorreu através de renovações diárias de 25 % do volume do fotobiorreator com o mesmo meio de cultura, durante a primeira hora de luz do fotoperíodo. Determinaram-se a concentração celular (ponto 3.2.1) ao longo do tempo e a concentração da biomassa no 10º dia (ponto 3.2.2), o ponto de estabilização.

3.1.3. Produção de astaxantina pela microalga *H. pluvialis*

H. pluvialis quando submetida a *stress* ocorre acumulação de pigmento secundário, a astaxantina com o objetivo de proteger as células.

3.1.3.1. Por aumento da intensidade luminosa

Aumentar a intensidade luminosa é uma das formas de provocar *stress* na cultura de *H. pluvialis*, induzir a acumulação de astaxantina.

A partir do estado estacionário do ponto 3.1.2.1, induziu-se a cultura a uma fase de *stress*, com 4 lâmpadas LEDs ativas à distância de 5 cm dos fotobiorreatores, durante sete dias, sem renovações de meio. Determinou-se a concentração da biomassa (ponto 3.2.2) nos dias 0, 3, 5 e 7, sendo que dia 0 corresponde ao dia 10 (ponto de estabilização) mencionado no ponto 3.1.2.1. Nos dias 3, 5 e 7 foram recolhidas amostras para analisar a eficiência da indução de *stress* das lâmpadas LEDs V-TAC e NS12 e, assim, a produção de astaxantina. A produção de astaxantina (ponto 3.2.3) foi determinada num laboratório externo.

3.1.3.2. Por adição de NaCl ao meio de cultura

H. pluvialis é uma microalga de água doce, e, assim, em ambientes com presença de cloreto de sódio (NaCl) a cultura é induzida a *stress*, levando à acumulação de astaxantina.

A partir do estado estacionário do ponto 3.1.2.2, 4 dos 8 fotobiorreatores tiveram adição ao meio de cultura 2 % de NaCl, sendo que todos foram submetidos à ação de 4 lâmpadas LEDs NS12, selecionadas face aos resultados obtidos no ponto 3.1.2.1, à distância de 5 cm sem renovação de meio. Determinou-se a concentração da biomassa nos dias 0, 3, 5 e 7 e nos dias 3 e 7 retiraram-se amostras para análise da astaxantina. A produção de astaxantina (ponto 3.2.3) foi determinada num laboratório externo.

3.1.4. Produção de *T. weissflogii* em escala laboratorial

A microalga *T. weissflogii* foi cultivada num fotobiorreator de 2 L, com 2 das 4 lâmpadas LEDs ativas e à distância de 16 cm dos fotobiorreatores, sob constante fluxo de ar, de forma a garantir que todas as células recebem a mesma intensidade luminosa e que não se depositam no fundo do fotobiorreator. Os fotobiorreatores foram submetidos a um fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro com temperatura ambiente, 20 ± 2 °C regulada por ar condicionado.

Na produção de *T. weissflogii* foi utilizado como meio de cultura água do mar filtrada estéril, com 30 ppm de salinidade e enriquecida com meio GM mais nitratos (4 mM L⁻¹). O pH das culturas foi mantido entre 7,5 e 7,8, através de pulsos de CO₂, 10 seg. a cada 12 min, apenas durante o período de luz.

Com o objetivo principal de obter uma concentração ideal para início de ensaios 0,25 g L⁻¹.

3.1.4.1. Influência das diferentes intensidades de luz de lâmpadas LEDs de espectro branco no crescimento de *T. weissflogii*

A partir do fotobiorreator referido anteriormente, a cultura foi dividida por 6 fotobiorreatores de 1 L com volume total de 900 mL e de igual concentração de cultura. Foram utilizadas lâmpadas LEDs de diferentes intensidades no espectro branco, V-TAC e NS12, num fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro. A partir do fotobiorreator referido anteriormente, a cultura inicial foi separada em 8

fotobiorreatores de 1 L com volume total de 900 mL, e igual concentração. Foram utilizadas lâmpadas LEDs de diferentes intensidades no espectro branco, V-TAC e NS12.

Na tabela 3.1.2.1.1 encontram-se descritas as diferentes intensidades de luz (lx) consoante a tipologia das lâmpadas LEDs e a distância destas aos fotobiorreatores, determinadas através de luxómetro (LM37), sendo a lx depois convertida em densidade de fluxo de fotões fotossintéticos (PPFD). A fase exponencial decorreu do dia 0 ao dia 4, iniciando-se com 2 das 4 lâmpadas LEDs ativas sendo que no 2º dia foram acionadas as restantes lâmpadas LEDs a 16 cm. Determinou-se a concentração celular ao longo do tempo e no dia 4, o ponto máximo de crescimento, determinou-se a concentração da biomassa.

O estado estacionário, do dia 4 ao dia 7, iniciou-se em regime semi-contínuo através de renovações diárias de 25 % do volume do fotobiorreator com o mesmo meio de cultura e salinidade, na primeira hora de luz. Determinou-se a concentração celular (ponto 3.2.1) ao longo do tempo e no dia 7, o ponto de estabilização, determinou-se a concentração da biomassa (ponto 3.2.2).

3.1.4.2. Influência do meio de cultura no crescimento de *T. weissflogii*

A partir do fotobiorreator referido no ponto 3.1.4, a cultura foi separada em 9 fotobiorreatores de 1 L com volume total de 900 mL e igual concentração. Foram testados três meios diferentes: GM, GM10 e NB com uma concentração de 4 mM L⁻¹ de nitratos (tabela 3.1.4.2.1), com as lâmpadas LEDs V-TAC previamente selecionadas face aos resultados do ponto 3.1.4.1, num fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro.

Tabela 3.1.4.2.1 - Composição dos meios de cultura usados na produção de microalgas.

Meios	GM*	GM10*	NB**
Constituintes	Nitrato de sódio (NaNO ₃)	Nitrato de sódio (NaNO ₃)	Azoto (N) 2,800%
	Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	Fósforo (P) 0,310%
	Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ferro (Fe) 0,112%
	Cloreto de cálcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Cloreto de cálcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Zinco (Zn) 0,014%
	Oligoelementos	Oligoelementos	Molibdênio (Mo) 0,010%
	Vitaminas	Vitaminas	Manganês (Mn) 0,006%
	Silicatos	Silicatos	Magnésio (Mg) 0,005%
		Ferro (Fe)	Cobalto (Co) 0,001%
			Cobre (Cu) 0,001%
			Biotina (B ₇) 0,0005%
			Tiamina (B ₁) 0,0035%
			B ₁₂ 0,0003%
			Silicatos

* meio formulado pela empresa Aqualgae. ** meio formulado pela empresa Necton.

A fase exponencial consistiu do dia 0 ao dia 4, e o estado estacionário, do dia 4 ao dia 7, através de regime semi-contínuo através de renovações diárias de 25 % do volume do fotobiorreator com o mesmo meio de cultura e mantendo a salinidade, efetuadas na primeira hora de luz. Determinou-se a concentração celular (ponto 3.2.1) em amostragens diárias e nos dias 4 e 7 determinou-se a concentração da biomassa (ponto 3.2.2). Para determinação da fucoxantina (ponto 3.2.3) retiraram-se amostras nos dias 4 e 7 (análises realizadas em laboratório externo).

3.1.4.3. Influência do fotoperíodo na produção de *T. weissflogii*

O fotoperíodo compreende os períodos em que as culturas têm incidência de luz (fase clara), quando tem lugar a fotossíntese, e o período de escuridão (fase escura).

Foi estudado um fotoperíodo com incidência de luz máxima, 22h luz/2h escuro, e avaliada a sua eficiência na produção de *T. weissflogii* comparando com os resultados obtidos com as concentrações celulares e de biomassa com o fotoperíodo de 12h luz/12h escuro (ponto 3.1.4.2). O estudo iniciou-se com renovações diárias de 25 % do meio, analisando-se apenas o estado estacionário do ciclo da microalga, do dia 0 ao dia 4. Amostragens para determinação da concentração celular foram efetuadas diariamente e para a concentração da biomassa somente no último dia.

3.2. Metodologias analíticas

3.2.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi avaliada por contagem celular microscópica (100x, Motic®) usando uma câmara de contagem (Improved Neubauer, VWR®).

Para a realização das contagens, quando necessário procedeu-se à realização de diluições com água desionizada estéril, de forma que o número de células contadas por campo (1 mm²) ficasse compreendido entre os valores 30 a 300 células (England et al., 1988; Lobban et al., 1988). Na fase exponencial as células de *H. pluvialis* apresentam mobilidade, sendo necessário colocar uma gota de Lugol para promover a fixação celular antes da contagem celular.

A concentração celular foi determinada com base no número de células contabilizadas, segundo a equação seguinte:

$$\text{Concentração celular (células mL}^{-1}\text{)} = L \times D \times 10\,000$$

em que L a média das contagens obtidas nos campos e D a diluição aplicada na amostra.

3.2.2. Determinação da concentração de biomassa

Para a determinação da concentração de biomassa, utiliza-se o método de peso seco. Amostras de 10 mL foram filtradas através de filtro de microfibras de vidro de grau 698 (VWR®, European Cat. No. 516-0345). Previamente os filtros foram secos a 80 °C por 24 h, em triplicados para cada amostra. Na microalga *T. weissflogii* a amostra filtrada foi lavada três vezes com 5 mL água desionizada de forma a eliminar os sais da água do mar e, depois seca novamente a 80 °C durante 24 h antes da pesagem final (C. J. Zhu & Lee, 1997). A concentração de biomassa foi determinada com base na equação seguinte:

$$\text{Concentração de biomassa (g L}^{-1}\text{)} = \frac{(P_a - P_f) \times 1000}{V_f}$$

em que P_a o peso do filtro seco com a amostra filtrada, P_f o peso do filtro seco e V_f o volume da amostra filtrada.

3.2.3. Determinação da Astaxantina, Fucoxantina e Clorofila a e c

As determinações da Astaxantina e clorofila a de *H. pluvialis* e de Fucoxantina e clorofila c de *T. weissflogii* foram efetuados por laboratório externo no Departamento de Biologia Vegetal e Ecologia, da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade do País Basco, Bº Sarriena S/N 48940 Leioa, Espanha. Os resultados chegaram em concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) foram convertidos para mg L^{-1} , o teor foi determinado pela seguinte equação:

$$\text{Teor (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração (mg L}^{-1}\text{)}}{\bar{X}_{\text{peso seco } t_y}}$$

em que t_y o dia em análise.

A produtividade foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Produtividade (mg L}^{-1}\text{dia}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta \text{Concentração (mg L}^{-1}\text{)}}{n^{\circ} \text{ de dias decorridos}}$$

3.3. Análise estatística

Os dados foram calculados com a média de quatro réplicas $\pm$ desvio padrão para a microalga *H. pluvialis* e com média de três réplicas $\pm$ desvio padrão para a microalga *T. weissflogii*. As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do software IBM SPSS Statistics 28.0.0.0. Para ensaios com 2 amostras independentes realizou-se a análise do teste t de student ($P < 0,05$), para ensaios com 3 amostras independentes realizou-se a análise de variância (*one-way* ANOVA) com provas post-hoc de Tukey ($P < 0,05$).

As comparações entre os ensaios foram efetuadas no final da fase exponencial e no final da fase estacionária, através dos valores da concentração celular e da concentração celular.

4. Resultados e discussão

4.1. *Haematococcus pluvialis*

4.1.1. Influência da intensidade luminosa de espectro branco

Foram testadas duas intensidades luminosas de espectro branco das lâmpadas V-TAC e NS12, na fase exponencial 95 e 414 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e no estado estacionário 114 e 427 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente. A produção de *H. pluvialis* foi iniciada com concentração celular idêntica em todos os grupos, e foram observadas diferenças significativas nas concentrações celulares e de biomassa, figura 4.1.1.1.

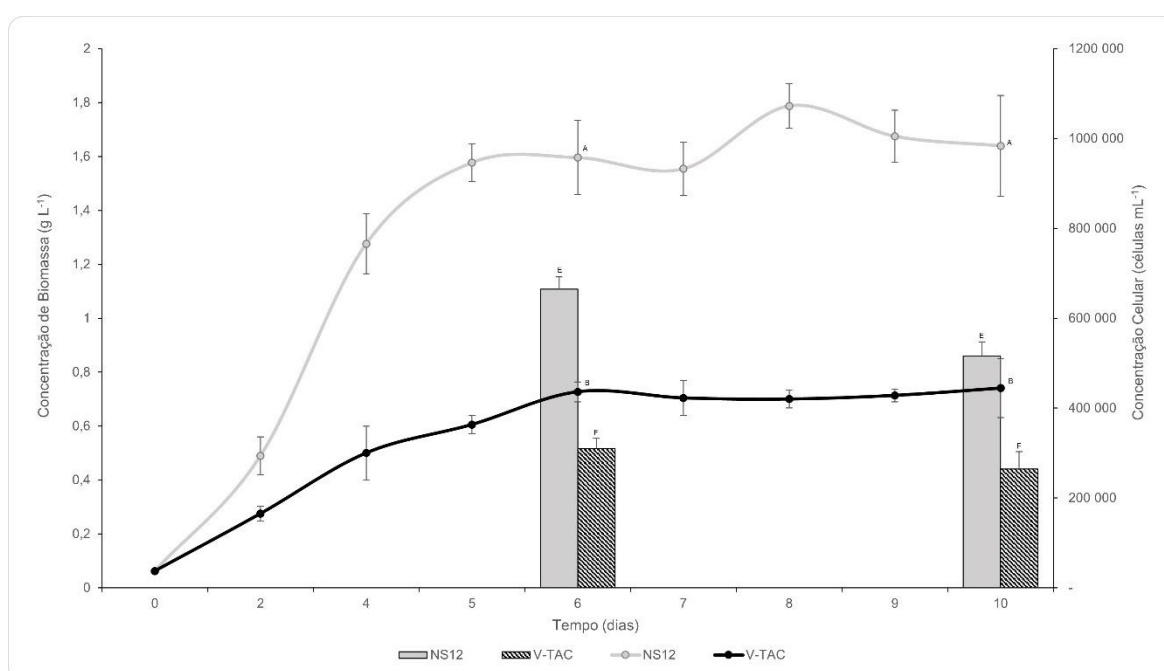


Figura 4.1.1.1. - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga *H. pluvialis*, cultivada sobre diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, p < 0,05).

No final da fase exponencial (t_6), o crescimento mais elevado observado ocorreu com as lâmpadas LEDs NS12, onde a concentração celular atingiu os valores de 957 500 células mL⁻¹, enquanto com as lâmpadas LEDs V-TAC a concentração celular apenas atingiu as 436 250 células mL⁻¹. No 4º dia, as culturas sob lâmpadas NS12 apresentaram mais 55 % da concentração celular que as das V-TAC, e no 6º dia ocorreu um aumento de 20% na concentração celular, demonstrando o potencial das lâmpadas NS12 de induzir a rápida produção de *H. pluvialis*, por comparação com as lâmpadas V-TAC. A concentração de biomassa manteve-se

proporcional à concentração celular, as lâmpadas NS12 induzindo maior concentração de biomassa que as lâmpadas V-TAC, 1,108 g L⁻¹ e 0,518 g L⁻¹ respetivamente.

No estado estacionário, as culturas sob lâmpadas NS12 apresentaram maiores concentrações celulares e de biomassa no fim do estudo do estado estacionário, 983 750 células mL⁻¹ e 0,860 g L⁻¹ respetivamente. Contudo, as lâmpadas V-TAC induziram um estado estacionário muito uniforme, estabilizando-se com uma concentração celular de 444 375 células mL⁻¹ e concentração celular 0,441 g L⁻¹.

O crescimento de *H. pluvialis* também é visível por observação direta da cor da cultura no fotobiorreator de lâmpadas V-TAC, à medida que a concentração celular e concentração de biomassa aumentam a cor da cultura passa de verde-claro transparente para verde-escuro mais opaca (Figura 4.1.1). Também é visualmente notório que os fotobiorreatores na secção C, correspondentes ao t₁₀, com as lâmpadas NS12 apresentam uma cor mais opaca que os das lâmpadas V-TAC, revelando maior concentração celular.

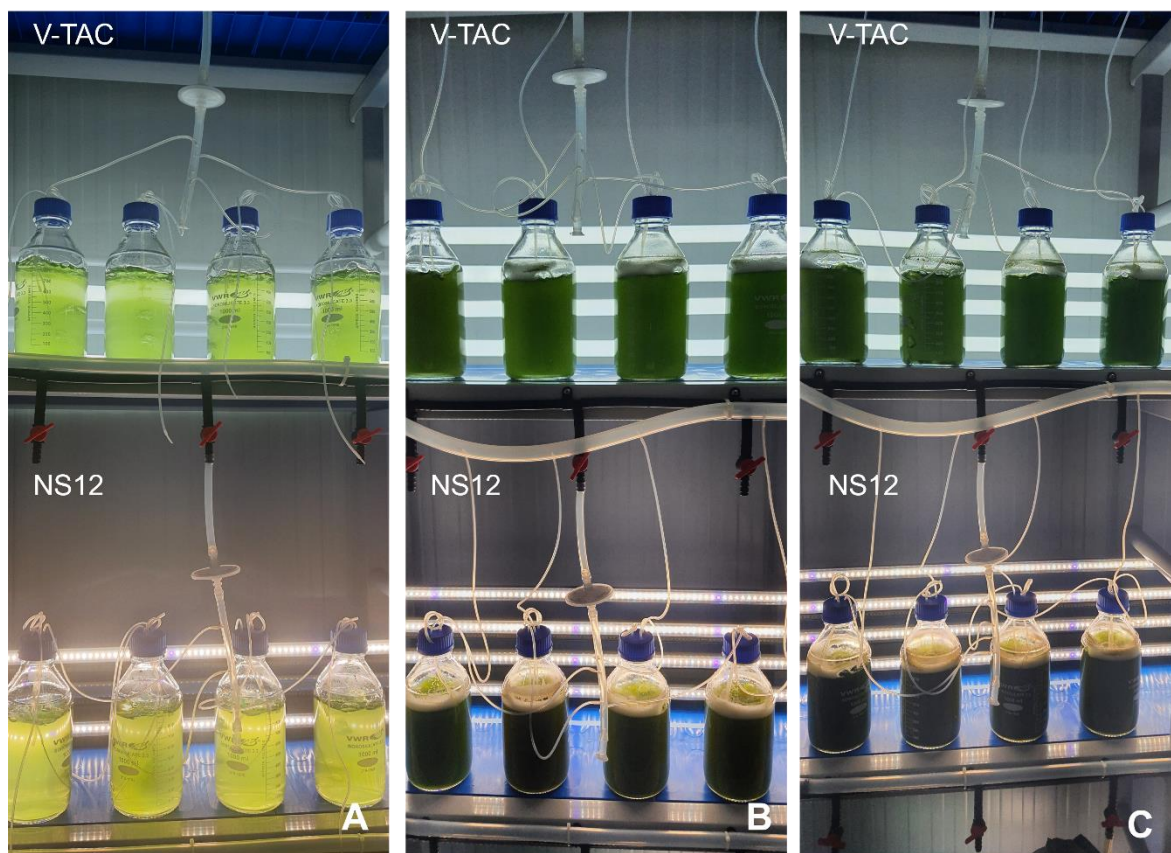


Figura 4.1.1.2 - Diferentes fases do estudo da *H. pluvialis* com diferentes intensidades luminosas com lâmpadas LEDs de espectro branco, V-TAC (nível

superior) e NS12 (nível inferior). (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).

Com referência nos resultados obtidos, a intensidade luminosa influenciou claramente a produção da microalga *H. pluvialis* sendo que, maior a intensidade luminosa maior o seu crescimento. A influência da intensidade luminosa foi notória na fase exponencial, onde as lâmpadas NS12 com 4 vezes maior intensidade luminosa que as lâmpadas V-TAC induziram um crescimento celular 55 % maior.

O estado estacionário é atingido quando a concentração celular permanece estável, ou seja, quando a taxa de entrada de nutrientes e a taxa de remoção de resíduos e células encontram-se equilibradas pelas taxas de crescimento e consumo. Neste estado, as culturas sob as lâmpadas NS12 demonstraram maior instabilidade comparativamente às culturas sob influência das lâmpadas V-TAC. O crescimento de *H. pluvialis* sob intensidade luminosa menor estabiliza mais rápido.

Num estudo de Imamoglu & Dalay (2007) o qual teve como objetivo de avaliar o crescimento de *H. pluvialis* em diferentes meios e diferentes intensidades luminosas, foi atingida a concentração celular de 950 000 células mL⁻¹ em 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 810 000 células mL⁻¹ em 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 680 000 células mL⁻¹ em 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O efeito da intensidade da luz depende do estado nutricional e o valor de saturação de irradiação da espécie. Neste estudo, ao contrário do revelado pelos nossos resultados, as densidades máximas foram observadas quando usadas intensidades luminosas menores. Os autores, mencionam que existe uma interferência entre o estado nutricional e a intensidade luminosa, demonstrando a importância da escolha do meio de cultura no desenvolvimento da microalga.

4.1.2. Influência da intensidade luminosa do espectro vermelho

Este estudo investigou, para a mesma intensidade luminosa ($427 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NS12 e $408 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ AP673L), a influência do espectro luminoso, comparando o crescimento de *H. pluvialis* sob a ação de lâmpadas LEDs AP673L, de espectro vermelho comparativamente às lâmpadas LEDs NS12, de espectro branco. O estudo foi iniciado com densidades celulares idênticas em todos os grupos. Na fase exponencial a concentração celular não difere significativamente, mas a concentração de biomassa apresenta diferenças significativas, no estado estacionário foram observadas diferenças significativas na concentração celular e concentração de biomassa (figura 4.1.2.1).

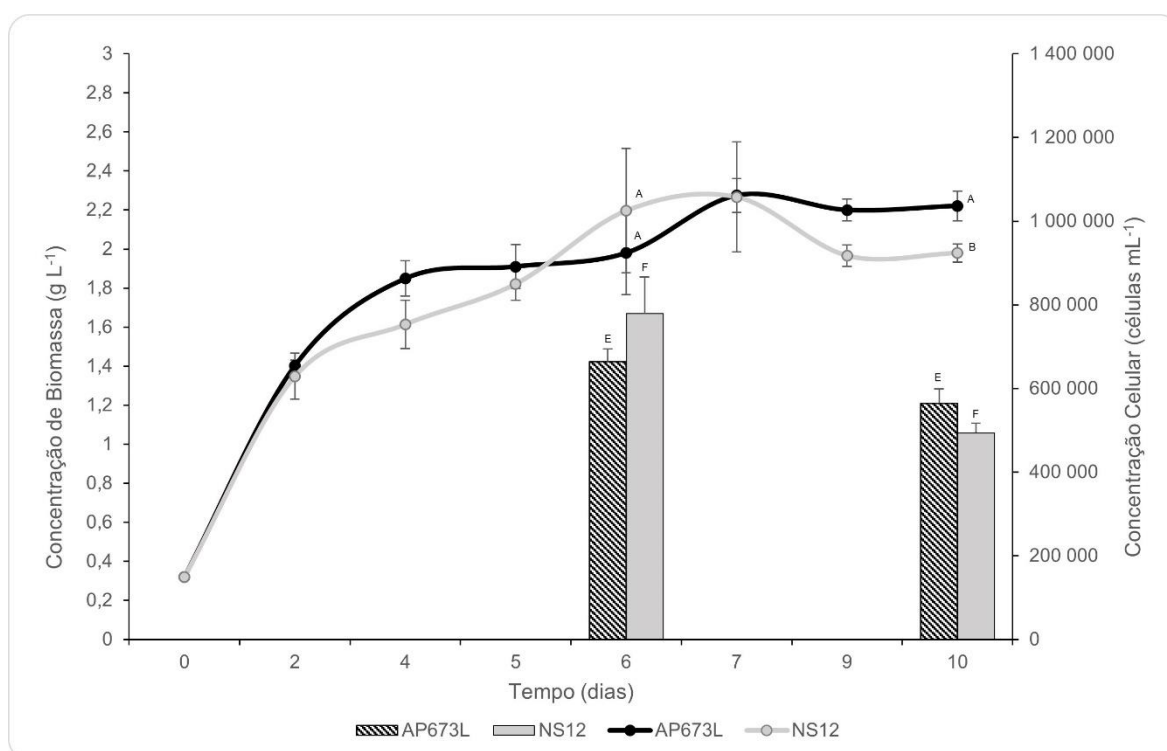


Figura 4.1.2.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga *H. pluvialis*, cultivada sobre diferentes espectros luminosos, AP673L espectro vermelho e NS12 espectro branco. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).

Na fase exponencial, os dois tipos de lâmpadas LEDs induziram crescimentos sem diferenças significativas, embora sob influência das lâmpadas AP673L, de espectro vermelho, o crescimento tenha sido maior e mais estável. A estimulação do crescimento pela luz vermelha deve-se à sua eficiência em promover a fotossíntese, pois a clorofila a, o principal pigmento fotossintético, possui picos de absorção na faixa de luz vermelha. Por isso, a luz vermelha é essencial para uma

fotossíntese eficiente, especialmente nos fotossistemas onde a clorofila a desempenha um papel fundamental.

No final da fase exponencial (t_6) a concentração celular obtida foi 923 750 células mL^{-1} nos AP673L e 1 025 000 células mL^{-1} nos NS12, porém a concentração de biomassa revela diferenças significativas, 1,423 g L^{-1} nos AP673L e 1,669 g L^{-1} nos NS12.

No final do estado estacionário, observam-se diferenças significativas, AP673L concluiu o estudo com uma maior concentração celular, atingindo 1 036 250 células mL^{-1} , enquanto NS12 apresentou uma queda na concentração celular. Ambas as fontes de luz promoveram o início da estabilização no mesmo dia, t_9 .

A figura 4.1.2.2. mostra a instalação de birreatores montada para o estudo. Apesar da luz vermelha dificultar a observação a comparação visual, é visível que em ambas lâmpadas LEDs os fotobiorreatores apresentam uma cor mais escura e mais densa na secção C (t_{10}) demonstrando maior concentração celular obtida no final do ensaio.

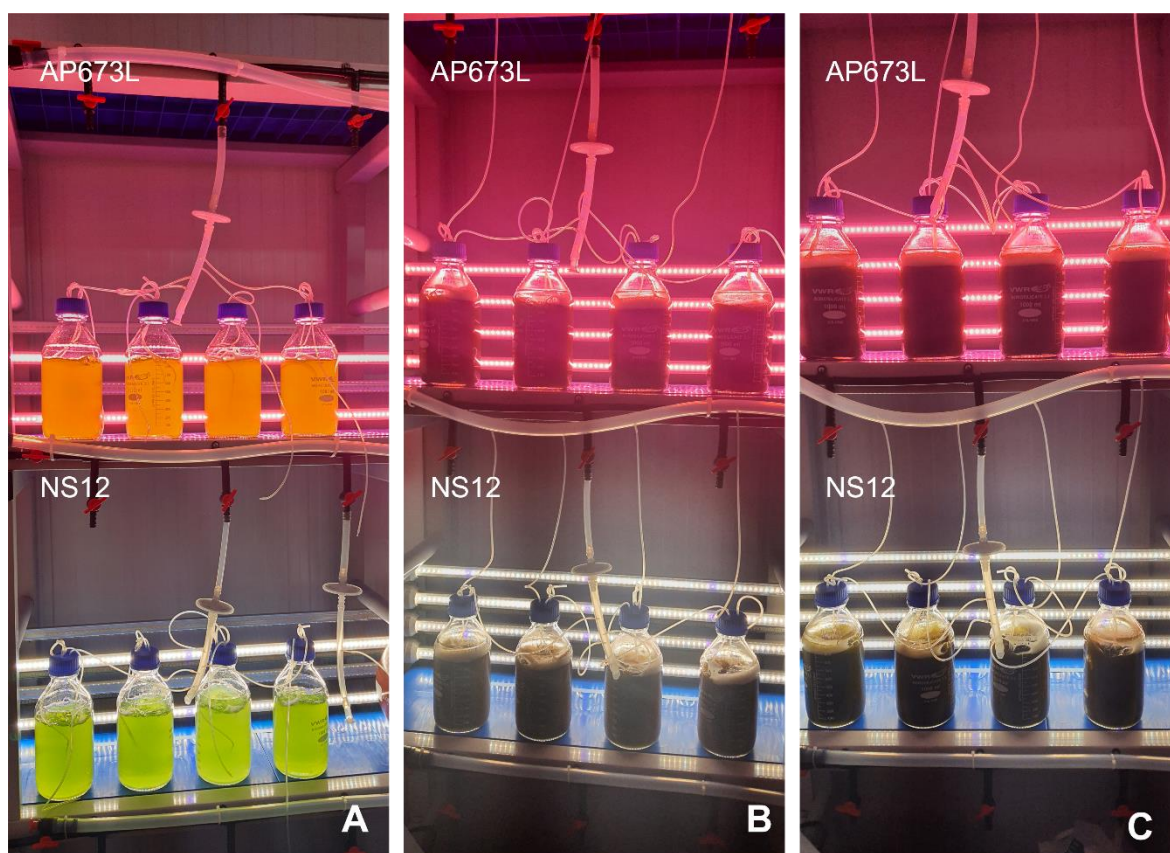


Figura 4.1.2.2. - Diferentes fases do estudo da *H. pluvialis* com os LEDs, AP673L de espectro vermelho (nível superior) e NS12 de espectro branco (nível inferior).

(A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da estacionária (Fonte própria).

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o espectro de luz tem uma influência significativa no crescimento e no peso da microalga *H. pluvialis*. Embora ambos os espectros tenham proporcionado crescimentos semelhantes, a cultura exposta à luz vermelha (AP673L) parece oferecer condições mais favoráveis em comparação com a luz NS12. Isso resultou em uma maior produção de biomassa e concentração celular ao longo do tempo. Além disso, observações microscópicas revelaram que as microalgas sob luz vermelha encontravam em estágio de macrozoóides, por outro lado, as microalgas dos fotobiorreatores sob luz NS12 já demonstravam uma leve acumulação de astaxantina. Estes achados sugerem que a luz vermelha não apenas promove um melhor crescimento da microalga, mas como estimula a “fase verde” da microalga.

No estudo de Gao et al. (2017), foi observado que a luz vermelha é bem absorvida pela microalga *H. pluvialis*, aumentando tanto o tamanho quanto o número de células ao longo do tempo. À medida que a concentração celular aumenta, a entrada de luz nos fotobiorreatores pode ser limitada, mas aumentar a intensidade luminosa pode compensar isso, resultando em maiores concentrações celulares. Esses achados destacam a importância de ajustar a intensidade e o espectro da luz para otimizar o crescimento e a produção de biomassa da microalga.

No estudo de Zhu et al., (2018), comparou-se a eficiência de fotobiorreatores utilizando espectro branco e vermelho, ambos com intensidades iguais de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em um fotoperíodo de 12 horas luz / 12 horas escuro e temperatura de 20°C. Os autores concluíram que não houve diferenças significativas na fase exponencial do crescimento da *H. pluvialis* entre os dois espectros de luz. No entanto, notaram que sob espectro branco, promoveu uma estabilização mais rápida em comparação ao espectro vermelho, apesar deste último apresentar maior concentração celular. Além disso, observaram que o movimento celular foi suprimido mais rapidamente sob espectro branco, o que resultou em diferenças nos valores de biomassa. Os resultados deste estudo são consistentes com os obtidos no seu ensaio, onde ambos os espectros de luz vermelha na fase estacionária promoveram maior concentração celular e de biomassa, enquanto não foram detectadas diferenças significativas entre os espectros nas fases de crescimento estudadas.

4.1.3. O efeito da intensidade luminosa na indução de stress na produção de *H. pluvialis*

Após o ensaio do ponto 4.1.1, iniciou-se a indução de *stress* nos fotobiorreatores. Assim o presente ensaio de sete dias, teve início após o término do anterior, deste modo o t_{10} corresponde ao t_0 deste ensaio. Foram observadas diferenças significativas dos diversos parâmetros avaliados com exceção do teor de clorofila a, figura 4.1.3.1.

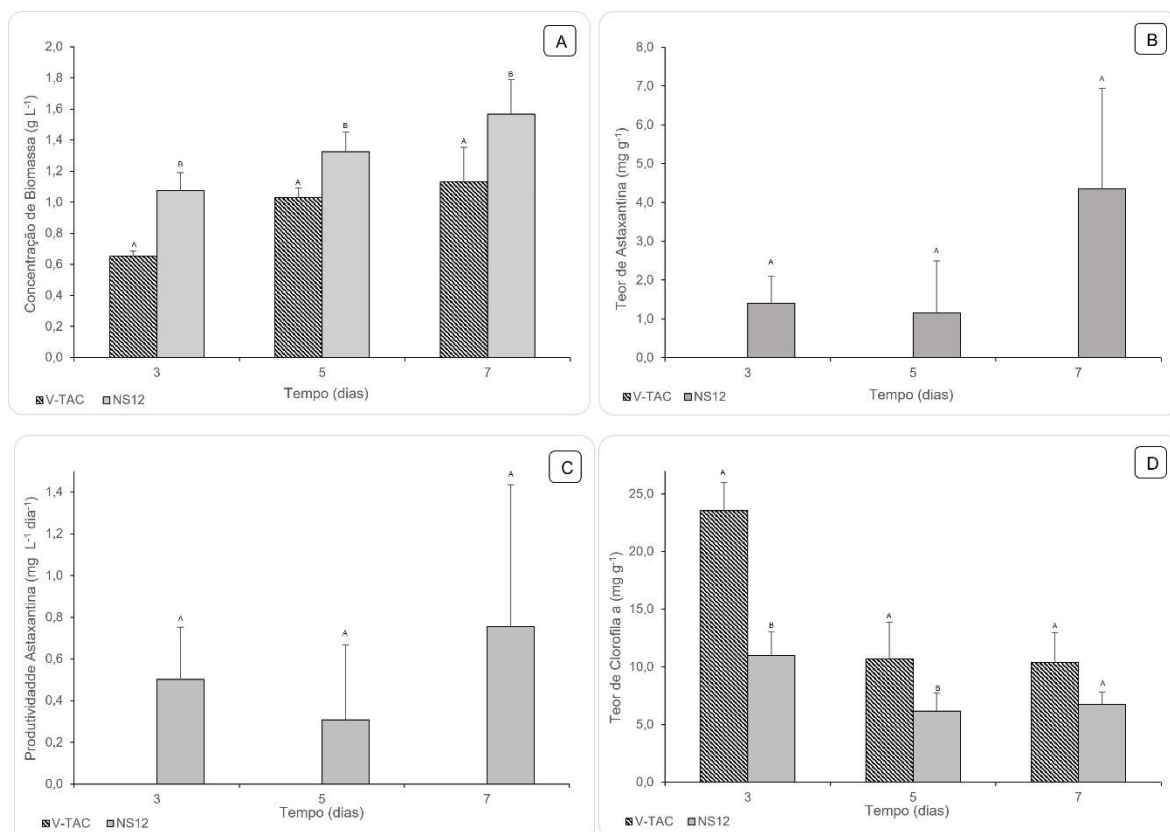


Figura 4.1.3.1 – Concentração celular (A), teor de astaxantina (B), produtividade astaxantina (C) e teor de clorofila a (D) da microalga *H. pluvialis* em diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$)

A intensidade luminosa demonstrou influenciar significativamente a acumulação de astaxantina na microalga *H. pluvialis*. Curiosamente, utilizando lâmpadas LEDs V-TAC, não foi observada acumulação de astaxantina, apesar dos valores consideráveis da concentração de biomassa, anulando a hipótese de morte celular. Sob condições de alta intensidade luminosa, a necessidade de captar luz pela clorofila a diminui, pois a luz é abundante. Portanto, a microalga reduz a produção

de clorofila a para evitar danos por excesso de luz. Simultaneamente, a microalga aumenta a produção de astaxantina para proteger contra espécies reativas de oxigênio e absorver a luz em comprimentos de onda diferentes da clorofila, ajudando na dissipação luminosa. O teor de clorofila a, embora tenha diminuído de $23,7 \text{ mg g}^{-1}$ para $10,4 \text{ mg g}^{-1}$ no final do ensaio nas lâmpadas LED V-TAC, não foi o suficiente para desencadear a acumulação de astaxantina.

A maior intensidade luminosa, NS12 ($617 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foi capaz de induzir o *stress* crucial para a acumulação de astaxantina. No terceiro dia do ensaio, o teor de astaxantina era de $1,41 \text{ mg g}^{-1}$, e ao final do ensaio, esse teor aumentou para $4,36 \text{ mg g}^{-1}$, resultando em uma produtividade no último dia de $0,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

A presença de astaxantina é facilmente detetável a olho nu devido à sua tonalidade vermelha característica, como evidenciado nas figuras 4.1.3.2 e 4.1.3.3, onde é possível observar a coloração avermelhada nas amostras cultivadas sob as lâmpadas NS12, tanto na cultura líquida quanto nos filtros resultantes da filtração.



Figura 4.1.3.2 - Amostras do final da fase de *stress* (t_7) com diferentes intensidades luminosas, V-TAC (os 4 primeiros frascos) e NS12 (os 4 últimos frascos), na acumulação de astaxantina (Fonte própria).



Figura 4.1.3.3 - Coloração dos pigmentos de *H. pluvialis* ao longo do tempo, com diferentes intensidades luminosas, filtros provenientes da determinação da concentração celular (Fonte própria).

No estudo de Zhang et al. (2014), foi concluído que altas intensidades luminosas, especificamente $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, são eficazes para estimular o acúmulo de astaxantina em *H. pluvialis*. No entanto, os pesquisadores alertam que altas intensidades luminosas podem comprometer a eficiência fotossintética das células. Por outro lado, no estudo de Kang et al. (2010), as células de *H. pluvialis* foram cultivadas sob condições fotoautotrófica com lâmpadas fluorescentes brancas a uma intensidade de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 9 dias a 23°C , com ar enriquecido com CO_2 . Este estudo resultou numa elevada produtividade de astaxantina, alcançando $14 \text{ mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$.

Com base nessas referências bibliográficas, pode-se concluir que a alta intensidade luminosa é crucial para alcançar altas produtividades de astaxantina em culturas de *H. pluvialis*. Embora altas intensidades possam afetar a eficiência fotossintética, o *stress* oxidativo induzido pela luz intensa é um fator chave para desencadear a síntese e acumulação de astaxantina, um pigmento antioxidante importante para a alga em resposta ao *stress* ambiental.

Assim, conclui-se que a intensidade luminosa de $179 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não é suficiente para induzir a acumulação de astaxantina nas condições testadas. Esta intensidade não atinge a saturação luminosa necessária para *H. pluvialis*. É importante notar que o valor exato da saturação luminosa para a microalga pode variar dependendo das condições específicas de cultivo e do estado fisiológico das células. Por outro lado, a maior intensidade luminosa (NS12) resulta em uma significativa redução do teor de clorofila a ao longo do tempo, o que está associado ao *stress* luminoso e à produção de astaxantina. Além disso, promove uma acumulação maior de astaxantina ao longo do tempo, especialmente visível ao 7º dia.

Portanto, para maximizar a produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis*, recomenda-se o uso de intensidades luminosas mais altas, como aquelas fornecidas pelas lâmpadas LED NS12.

4.1.4. O efeito da adição de NaCl na indução de *stress* na produção de *H. pluvialis*

A adição de cloreto de sódio no meio de cultura de uma microalga de água doce é uma forma de induzir *stress* e a produção de astaxantina. Este estudo teve início no momento t_{10} do ensaio 4.1.2, que corresponde ao t_0 deste ensaio com lâmpadas LEDs NS12. Foram comparados dois meios de cultura com e sem adição de 2% de NaCl. Foram determinados os seguintes parâmetros: concentração de biomassa, teor de astaxantina, produtividade astaxantina e teor de clorofila a em 4 amostragens durante os 7 dias do ensaio. Os resultados podem ser observados na figura 4.1.4.1.

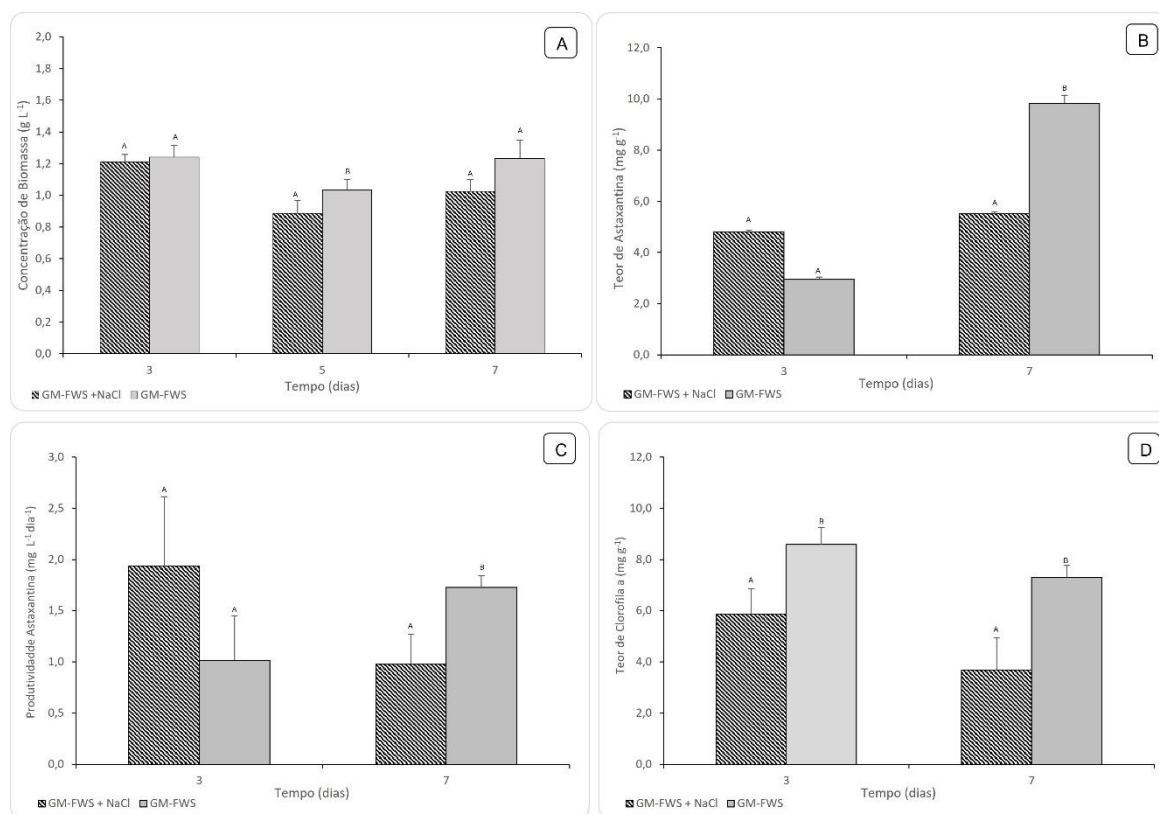


Figura 4.1.4.1 – Concentração celular (A), teor de astaxantina (B), produtividade astaxantina (C) e teor de clorofila a (D) da microalga *H. pluvialis* em meio com e sem NaCl. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).

A adição de NaCl demonstrou influenciar a acumulação de astaxantina na microalga *H. pluvialis*, ao 3º dia. Contudo, não existem diferenças significativas da concentração de biomassa, teor e produtividade de astaxantina.

Com a presença de NaCl no meio, a microalga enfrenta um ambiente de *stress* osmótico. Para mitigar esse *stress*, a célula pode reduzir a síntese de clorofila a,

essencial para a fotossíntese, a fim de conservar energia e recursos. Simultaneamente, ocorre um aumento na produção de astaxantina para proteger as células contra os danos causados por espécies reativas de oxigênio. Essas mudanças - a redução da clorofila a e o aumento da astaxantina - são parte de uma adaptação metabólica da microalga para otimizar sua sobrevivência em condições adversas.

O teor mais elevado de astaxantina na fase inicial foi observado no meio com NaCl, alcançando $4,80 \text{ mg g}^{-1}$, a produtividade de astaxantina atingiu $1,94 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ao 3º dia. No entanto, até o 7º dia, não houve o esperado aumento de produção de astaxantina nos fotobiorreatores com NaCl, a produtividade caiu para $0,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com o teor de astaxantina sendo semelhante ao obtido no 3º dia e o teor de clorofila a também diminuiu. A diminuição simultânea da clorofila a juntamente com a redução na produção de astaxantina nos fotobiorreatores com NaCl pode indicar um estado de *stress* mais severo para a microalga. Concentrações elevadas de NaCl podem provocar um *stress* osmótico excessivo, impactando não apenas a produção de astaxantina, mas também comprometendo a integridade e função dos cloroplastos. Isso pode resultar na diminuição da síntese de clorofila a, essencial para a fotossíntese, devido à incapacidade da microalga de manter suas funções normais sob condições extremas. O *stress* osmótico e as condições adversas podem induzir *stress* oxidativo na microalga, causando danos aos sistemas antioxidantes e afetando a capacidade da célula de sintetizar tanto clorofila a quanto astaxantina. Esses danos foram confirmados ao determinar a concentração de biomassa através de contagens celulares, visualização microscópica, que revelaram células com danos na parede celular.

O meio sem adição de NaCl demonstrou ser a forma mais viável e estável de produzir astaxantina, que neste meio e no final do ensaio atingiu o teor de $9,83 \text{ mg g}^{-1}$ com produtividade de $1,73 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Contudo, para acelerar a produção de astaxantina, seria recomendável testar concentrações de NaCl inferiores a 2%, que foi a concentração utilizada neste estudo.

A presença de astaxantina é facilmente detetável a olho nu, devido à sua tonalidade característica vermelha, nas figuras 4.1.4.2 e 4.1.4.3 é possível observar a tonalidade avermelhada presente nas amostras com tonalidade idênticas entre os ensaios.



Figura 4.1.4.2 - Amostras do final da fase de *stress* (t_7) com e sem presença de NaCl, MG-FWS + NaCl (os 4 primeiros frascos) e MG-FWS (os 4 últimos frascos), na acumulação de astaxantina (Fonte própria).

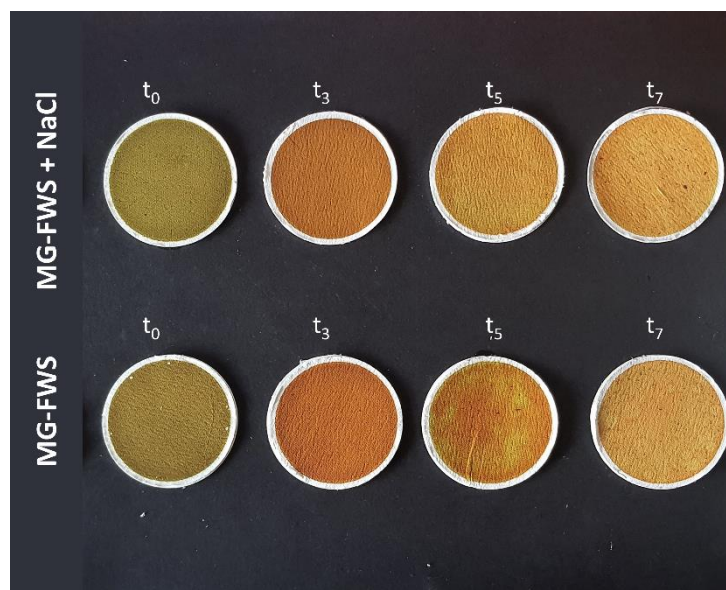


Figura 4.1.4.3 - Coloração dos pigmentos de *H. pluvialis* ao longo do tempo, com e sem presença de NaCl, filtros provenientes da determinação da concentração celular (Fonte própria).

No estudo dos autores Li et al. (2022) foram analisadas três concentrações de NaCl (1, 2 e 4 g L⁻¹ NaCl), intensidade luminosa de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 28 ± 1 °C tendo sido obtidos : com 1 g L⁻¹ NaCl o teor de astaxantina foi de 20,78 mg⁻¹ g⁻¹ com uma concentração celular de 1,37 g L⁻¹; com 2 g L⁻¹ NaCl o teor de astaxantina foi de 25,92 mg⁻¹ g⁻¹ com uma concentração celular de 1,53 g L⁻¹ e com 4 g L⁻¹ NaCl o teor

de astaxantina foi de $17,26 \text{ mg}^{-1} \text{ g}^{-1}$ com uma concentração celular de $0,67 \text{ g L}^{-1}$. Ao contrário do nosso estudo, o mesmo teor de NaCl conduziu ao teor mais elevado de astaxantina observado embora concentrações superiores tenham revelado ser tóxicas para *H. pluvialis*. Comparativamente entre o ensaio de Li et al. e o ensaio realizado obteve-se menor teor de astaxantina, contudo a intensidade luminosa e a temperatura difere entre ensaios e poderá ser o fator dos resultados serem díspares.

Num outro estudo os autores Ding et al. (2019) com uma intensidade luminosa $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a $28 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $0,4 \text{ g L}^{-1}$ NaCl presente no meio de cultura, conseguiram obter $38,75 \text{ mg}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de teor de astaxantina em 7 dias, o que parece revelar que a adição de NaCl em baixas concentrações proporcionam maiores teor de astaxantina.

De acordo com as referências bibliográficas e nos resultados obtidos neste ensaio, a adição de NaCl ao meio induz a acumulação de astaxantina no interior das células de *H. pluvialis*.

4.2. *Thalassiosira weissflogii*

4.2.1. Influência da intensidade luminosa de espectro branco

Foram testadas duas intensidades luminosas de espectro branco das lâmpadas V-TAC e NS12, 114 e 427 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente, ao longo de 10 dias. A produção de *T. weissflogii* foi iniciada com concentração celular idêntica em todos os grupos. Foram observadas diferenças significativas na concentração celular final estacionária e na concentração celular no final das fases exponencial e estacionária, figura 4.2.1.1.

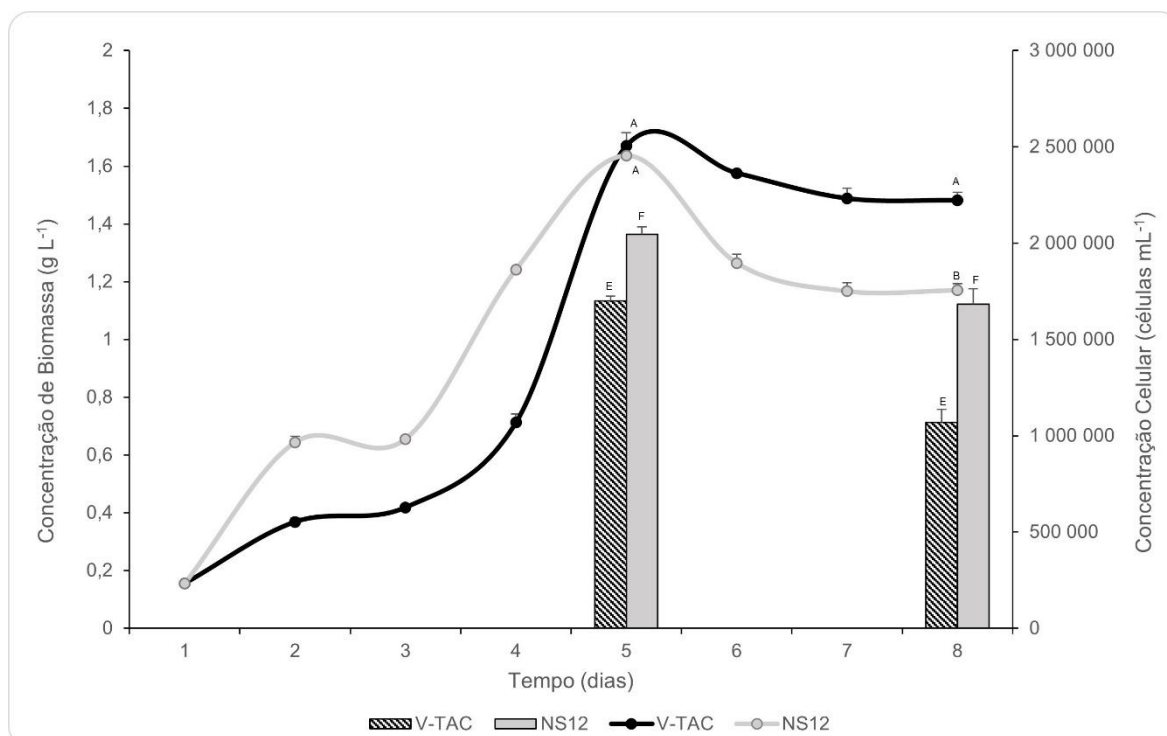


Figura 4.2.1.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga *T. weissflogii*, cultivada sobre diferentes intensidades luminosas. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste t de student, $p < 0,05$).

No final da fase exponencial (t_6), não foram observadas diferenças significativas no crescimento celular, com uma concentração de 2 505 000 células mL^{-1} para os fotobiorreatores com lâmpadas V-TAC e 2 455 000 mL^{-1} para os com lâmpadas NS12. No entanto, foram encontradas diferenças significativas na concentração de biomassa, sendo que os fotobiorreatores com lâmpadas NS12 apresentaram uma maior concentração, alcançando 1,363 g L^{-1} .

Em diatomáceas como *T. weissflogii*, as células-filhas resultantes da divisão celular são geralmente menores que a célula-mãe original. Isso ocorre devido à

distribuição do citoplasma e dos organelos durante o processo de divisão, o que resulta em células-filhas de tamanho reduzido em relação à célula-mãe. Durante a fase exponencial, as microalgas se dividem rapidamente, aumentando tanto a concentração celular quanto a biomassa. No entanto, à medida que a intensidade luminosa começa a influenciar, as células podem continuar a se dividir, mas com uma redução na produção de biomassa por célula.

Em alguns casos, as células mais antigas podem começar a morrer e a decompor-se, libertando nutrientes que são rapidamente utilizados pelas células mais jovens. Isso pode resultar em um aumento na concentração celular, enquanto a biomassa total pode diminuir devido à decomposição das células mortas. Esses fatores combinados podem explicar o aumento na concentração celular enquanto a concentração de biomassa diminui (Fig. 4.2.1.1).

No estado estacionário, em ambas as intensidades luminosas, as culturas estabilizaram no t_8 , mas as lâmpadas LEDs V-TAC induziram melhores resultados quer na concentração celular ($2\,221\,667\text{ células mL}^{-1}$) quer na concentração celular ($0,713\text{ g L}^{-1}$). A redução na biomassa ao mesmo tempo que a concentração celular aumenta, indicando que as células estão a dividir-se, mas com menor peso, sugere um possível efeito da intensidade da luz no processo. Por outro lado, nos fotobiorreatores com lâmpadas NS12, onde a concentração celular diminuiu e a biomassa se manteve igual à fase exponencial, isso pode indicar que a reprodução da microalga diminuiu devido à possível saturação luminosa alcançada.

A produção da *T. weissflogii* é bastante visível a olho nu pela concentração da cor no fotobiorreator, quanto maior a sua concentração celular mais a cor da microalga muda de amarelo para castanho. Na figura 4.1.1.2 é visualmente notório que nos fotobiorreatores na secção B, correspondentes ao t_6 , a cor das culturas é mais escura, o momento de maior concentração celular. No final da fase exponencial (B) e na fase estacionária (C) as culturas nos fotobiorreatores de lâmpadas V-TAC apresentam uma cor castanho mais escuro que as das NS12 o que é demonstrador do maior crescimento da *T. weissflogii* em ambiente de menor intensidade luminosa.

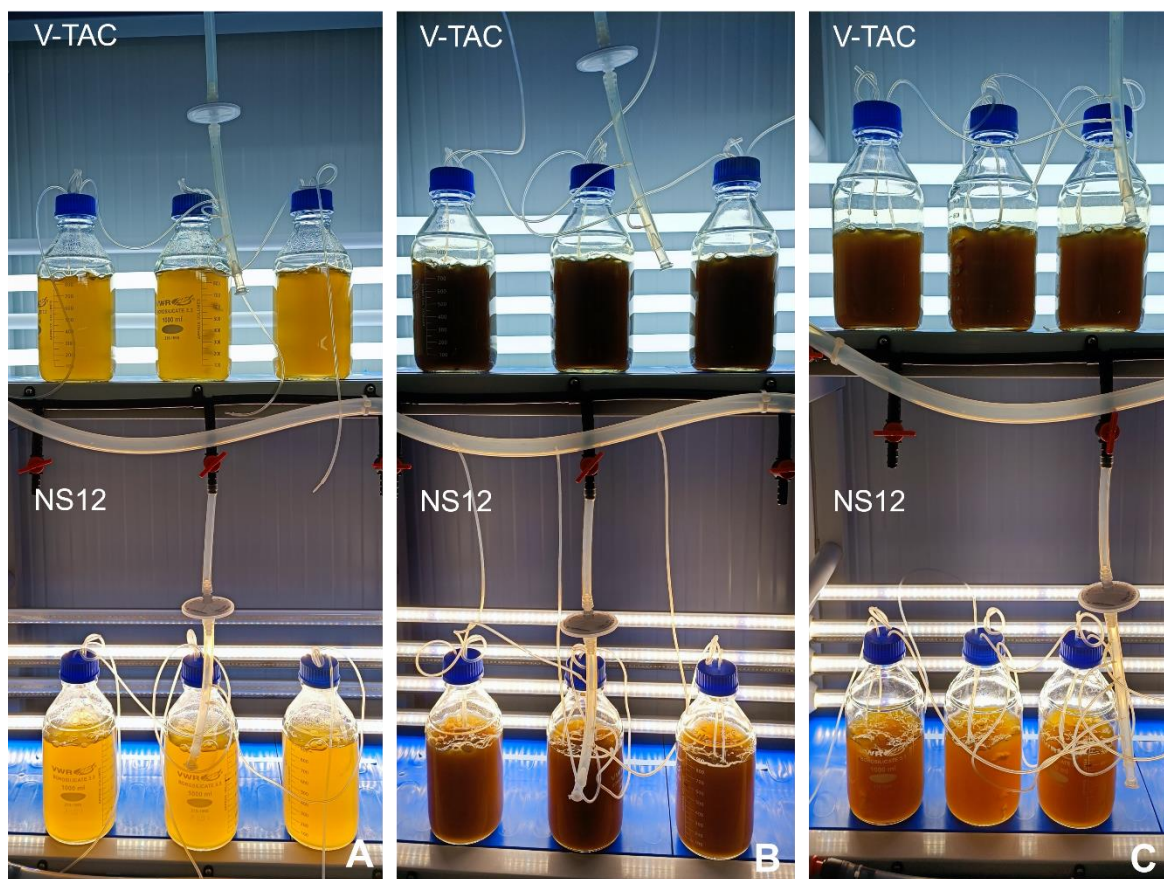


Figura 4.2.1.2 - Diferentes fases do estudo da *T. weissflogii* com diferentes intensidades luminosas com lâmpadas LEDs de espectro branco, V-TAC (nível superior) e NS12 (nível inferior). (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).

Num estudo de García et al. (2012) foi analisado meio com salinidade de 30 ppm com $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Com a salinidade de 30 ppm o valor máximo obtido de concentração celular foi de $420\,000 \text{ células mL}^{-1}$.

Comparando com o estudo atual, embora as condições de salinidade e intensidade luminosa sejam semelhantes às do estudo de García et al. (2012), foram encontradas diferenças significativas na densidade celular. No estudo atual, alcançou-se uma densidade celular de $2.505.000 \text{ células mL}^{-1}$. Isso sugere que, para *T. weissflogii*, uma intensidade luminosa menor pode ser mais favorável, contrastando com as condições de intensidade luminosa mais alta utilizadas anteriormente.

4.2.2. Influência do meio de cultura no crescimento

Sendo que cada espécie de microalga apresenta necessidades únicas, para obter sucesso na produção é imperativo conhecer as exigências nutricionais específicas, para que os nutrientes sejam fornecidos na forma e proporções adequadas. O crescimento de uma espécie de microalga é resultado da interação de fatores biológicos (taxas metabólicas e influência de outros microrganismos presentes) e fatores físico-químicos (luz, temperatura, O₂ e disponibilidade de macro e micronutrientes). Os principais requerimentos nutricionais das microalgas são: fonte de carbono, azoto, fósforo, magnésio, sódio, sulfato, potássio e outros microelementos, para as diatomáceas o silício é imprescindível.

Os meios selecionados para este estudo mostraram ser adequados para o crescimento de *T. weissflogii* e foram selecionados com base em resultados de estudos anteriores realizados pela empresa (dados não disponibilizados). Neste ensaio foram testados três meios diferentes: GM, GM10 e NB com com 4 mM L⁻¹, sobre as lâmpadas LEDs V-TAC, 114 µmol m⁻² s⁻¹, a partir de culturas com concentração celular inicial idêntica, figura 4.2.2.1.

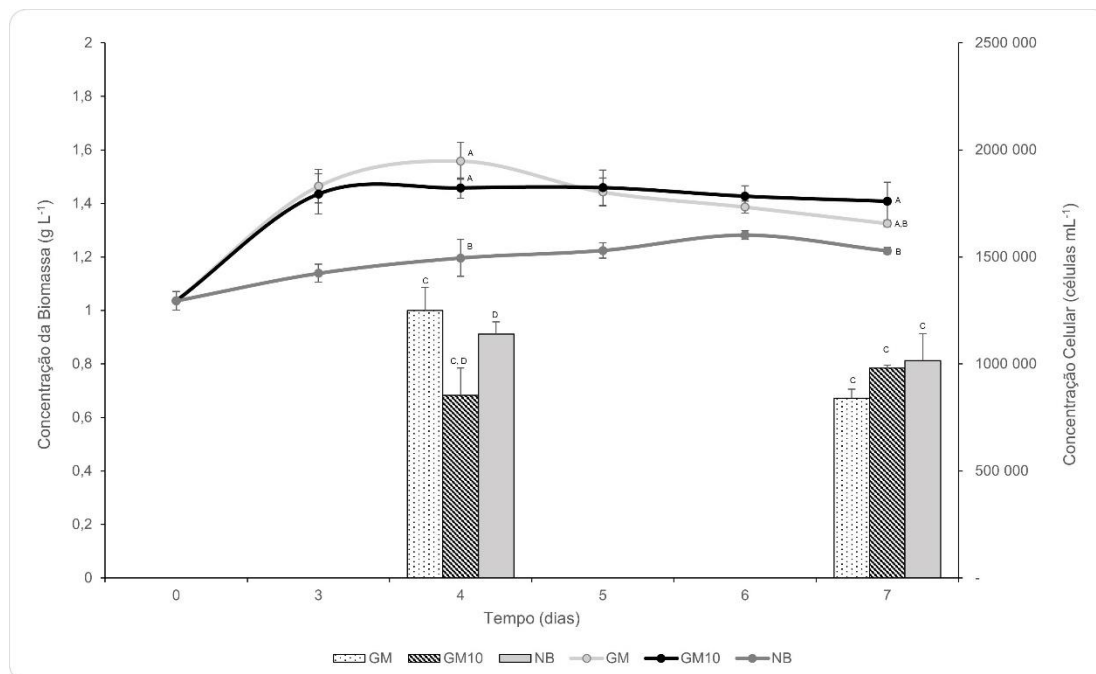


Figura 4.2.2.1 - Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga *T. weissflogii*, cultivada diferentes meios. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, p < 0,05).

No final da fase exponencial (t_4) o meio NB revelou diferenças significativas na concentração celular em relação aos outros meios, com $1\,495\,000\text{ células mL}^{-1}$, enquanto os meios GM e GM10 não apresentaram diferenças entre si, com $1\,948\,333\text{ células mL}^{-1}$ e $1\,821\,667\text{ células mL}^{-1}$, respetivamente. Relativamente à concentração de biomassa foram encontradas diferenças significativas entre os meios GM e NB. No final do estado estacionário (t_7) só foram encontradas diferenças significativas na concentração celular dos meios GM10 e NB que apresentavam, $1\,760\,000\text{ células mL}^{-1}$ e $1\,528\,333\text{ células mL}^{-1}$ respetivamente.

O meio NB foi o meio com pior performance quer em termos dos valores de concentração celular quer na concentração de biomassa. O meio GM10 foi o que proporcionou um crescimento estável e consistente, com maiores concentrações na fase exponencial e no estado estacionário, demonstrando que a adição de ferro ao meio GM (GM10) é um fator positivo na produção de *T. weissflogii*.

Na figura 4.2.2.2 é visível a olho nu o escurecimento da cor dos fotobiorreatores ao longo do tempo do ensaio, e não existem diferenças visíveis entre os meios entre as mesmas fases do ensaio.

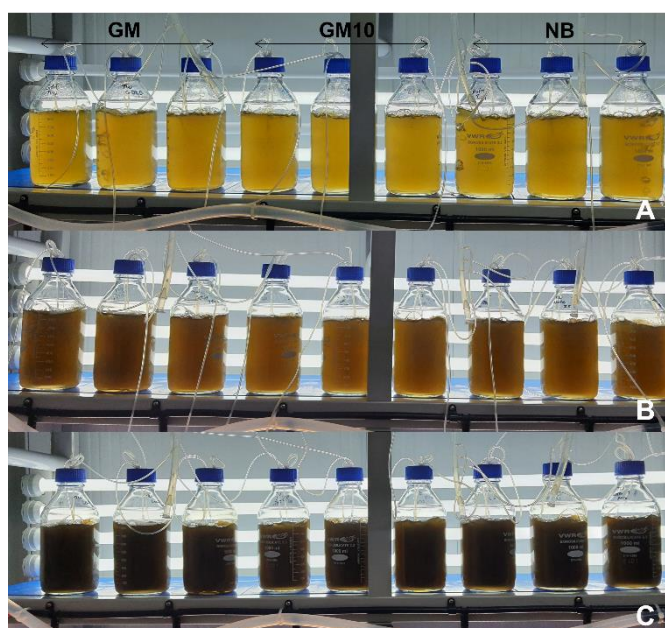


Figura 4.2.2.2 - Diferentes fases do estudo da *T. weissflogii* com diferentes meios (GM, GM10 e NB) com lâmpadas LEDs V-TAC. (A) início do ensaio; (B) final da fase exponencial e (C) final da fase estacionária (Fonte própria).

Num estudo de Harrison & Morel (1986), que teve como objetivo avaliar os efeitos do ferro no crescimento e na fisiologia da *T. weissflogii*, a deficiência de ferro

resultou na redução significativa na taxa de crescimento das células, ocorrendo uma diminuição da concentração de clorofila c por célula, indicando um impacto negativo na capacidade fotossintética. A diatomácea estudada exibiu ainda, adaptações morfológicas e fisiológicas, como a redução do tamanho celular, para poder maximizar a eficiência na captação de ferro.

T. weissflogii produz um carotenoide conhecido como fucoxantina. Neste ensaio, o teor de fucoxantina produzido foi determinado ao dia 4 e dia 7, figura 4.2.2.3.

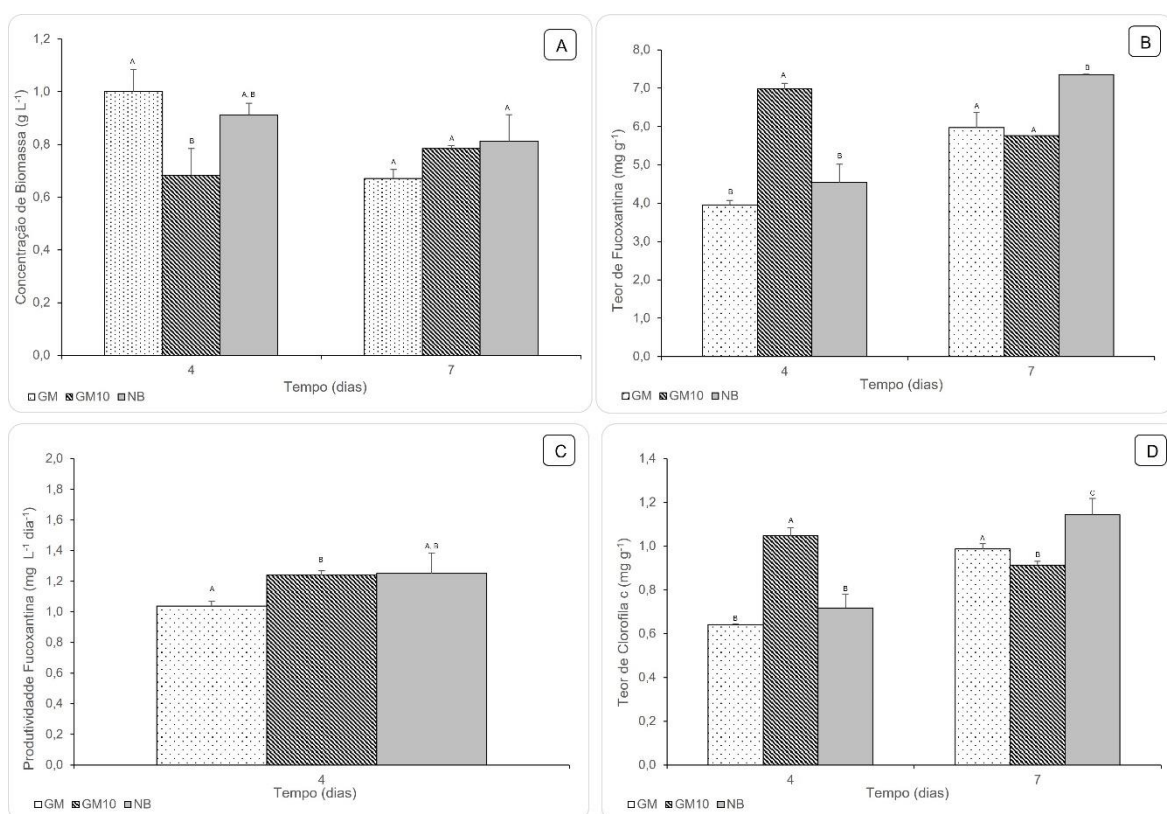


Figura 4.2.2.3 - Concentração celular (A), teor de fucoxantina (B), produtividade fucoxantina (C) e teor de clorofila c (D) da microalga *T. weissflogii* em diferentes meios (GM10, NB, GM). Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, $p < 0,05$).

Os teores de fucoxantina e clorofila c geralmente estão correlacionados em diatomáceas, ambos os pigmentos desempenhando papéis importantes na fotossíntese. A clorofila c é o pigmento principal envolvido na fotossíntese, absorve luz nas faixas de comprimento de onda azul e vermelho, enquanto a fucoxantina absorve principalmente na faixa de comprimentos de onda azul-verde. Isso permite que as algas maximizem a absorção de luz disponível em diferentes profundidades oceânicas.

Na fase exponencial (t_4) o meio GM10 foi o meio que apresentou que conduziu a teor mais elevado de fucoxantina $6,97 \text{ mg g}^{-1}$, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre os meios GM e NB, com $3,96 \text{ mg g}^{-1}$ e $4,54 \text{ mg g}^{-1}$ respetivamente. Contudo, em termos de produtividade não ocorreram diferenças significativas entres os meios GM10 e NB. O teor de clorofila c foi proporcional ao teor de fucoxantina, sendo que o meio suplementado com ferro, GM10, apresentou teor mais elevado, $1,04 \text{ mg g}^{-1}$, e os meios GM e NB não apresentaram diferenças significativas, $0,64 \text{ mg g}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg g}^{-1}$ respetivamente.

No estado estacionário (t_7) os meios GM e GM10 não apresentaram diferenças significativas, mas o maior teor de fucoxantina foi com o meio NB, $7,36 \text{ mg g}^{-1}$, que por sua vez também apresentou maior teor de clorofila c, $1,14 \text{ mg g}^{-1}$.

O meio GM10 demonstrou os melhores resultados na produção de fucoxantina durante a fase exponencial, alcançando menor concentração de biomassa e um maior teor de fucoxantina. Por outro lado, o meio NB, no estado estacionário, superou os valores obtidos pelo meio GM10, apesar de apresentar uma diminuição no teor de fucoxantina nessa fase. Esses resultados sugerem que o meio GM10 pode ser uma opção mais eficiente para a rápida obtenção de fucoxantina, enquanto o meio NB pode ser mais demorado, porém resultando em maiores quantidades totais ao longo do tempo.

Em um estudo conduzido por Uslu et al. (2021), utilizando fotobiorreatores com salinidade de 30 ppm, temperatura de 20°C , intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz para 8 horas de escuro, a concentração máxima de fucoxantina alcançada foi de $4,99 \text{ mg L}^{-1}$. De acordo com essas condições, seria de esperar que a maior concentração de fucoxantina fosse obtida em intensidades luminosas mais baixas. No entanto, no nosso estudo, mesmo com um fotoperíodo mais longo, foi possível alcançar uma concentração ainda maior de fucoxantina, atingindo $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando o meio NB.

4.2.3. Influência do aumento fotoperíodo no crescimento em diferentes meios

O período de luz é responsável pela fotossíntese, que fornece energia necessária para funções vitais das microalgas, como o seu crescimento e reprodução. Este ensaio foi a continuação do ponto 4.2.2, permitindo a comparação do estado estacionário entre o fotoperíodo de 12h / 12 h com o fotoperíodo de 22h / 2h, sob intensidade luminosa de $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4.2.3.1).

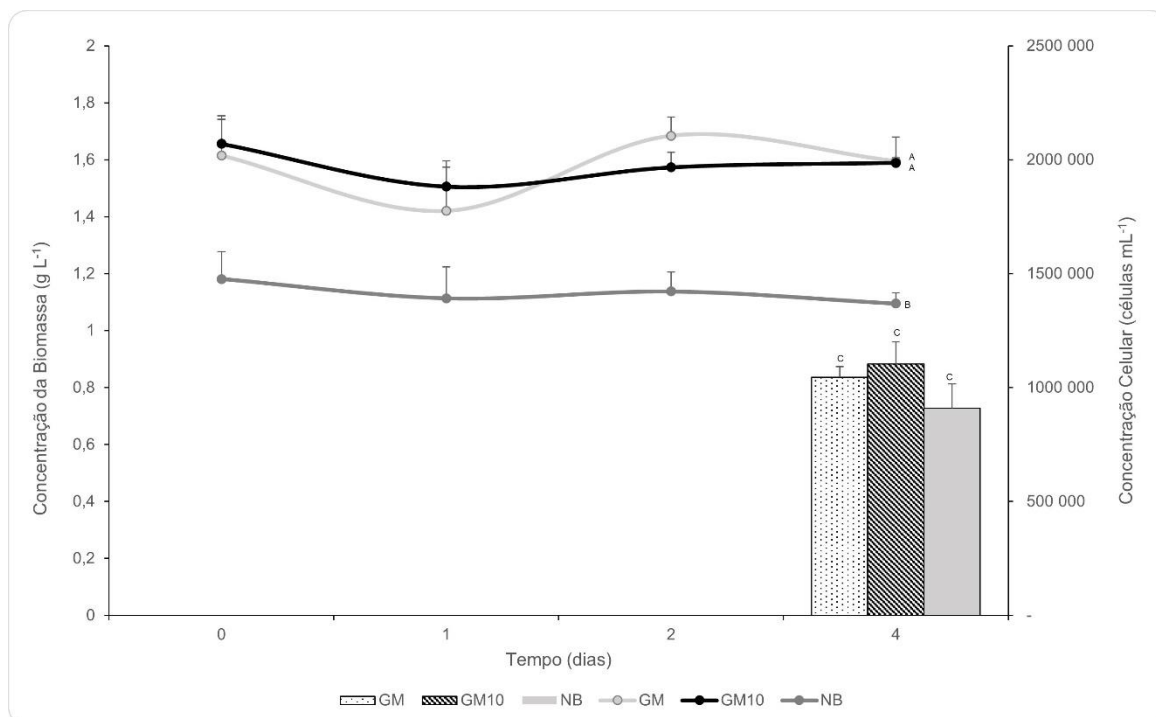


Figura 4.2.3.1 – Concentração de biomassa (colunas) e concentração celular (linhas) da fase exponencial e estabilização do fotobiorreator da microalga *T. weissflogii*, cultivada sobre um fotoperíodo 22 h luz / 2 h escuro. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferenças significativas entre as amostras (teste one-way ANOVA, com correção Turkey, $p < 0,05$).

Num fotoperíodo de 22h luz / 2h escuro, o meio GM e GM10 não apresentaram diferenças significativas na concentração celular, mas o meio NB apresentou diferenças significativas em relação aos outros meios. Em termos da concentração de biomassa não foram detetadas diferenças significativas entre os três meios. O meio GM10 foi, contudo, o que apresentou maior estabilidade no estado estacionário.

O fotobiorreator utilizando o meio GM10, com um fotoperíodo de 22 horas de luz para 2 horas de escuro, revelou um aumento de 10% na concentração celular e de 30% na concentração de biomassa em comparação com o ensaio realizado com

fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de escuro, diferenças consideradas significativas. Com o meio GM, não foram observadas diferenças significativas entre os fotoperíodos, porém houve um aumento de 11% na concentração celular e de 30% na concentração de biomassa. Portanto, ambos os meios GM e GM10, quando submetidos a um fotoperíodo mais longo, resultaram em teores mais elevados dos parâmetros analisados.

A microalga *T. weissflogii* cultivada em meio NB parece beneficiar-se de um fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de escuro, levando a um aumento de 9% em relação ao fotoperíodo de 22 horas de luz / 2 horas de escuro, apresentando diferenças significativas em relação aos outros dois meios.

No estudo de Walter et al. (2015) os autores analisaram dois cenários na produção de *T. weissflogii*: i) um ensaio com uma intensidade de luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ num fotoperíodo de 12 h / 12 h (claro/escuro), ii) um ensaio com uma intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ num fotoperíodo de 2 h / 22 h (claro/escuro). Os melhores resultados em termos de crescimento foram obtidos com a menor intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e mais tempo de luz. Curiosamente, o modelo foi testado à temperatura de 15 °C e salinidade de 32 ppm, pois visava reproduzir as características do mar do Norte.

Os resultados do nosso estudo sugerem que, para uma produção industrial, o fotoperíodo de 22 horas de luz / 2 horas de escuro demonstra maior produtividade. No entanto, é importante considerar que a microalga pode estar sob estresse nesse regime, o que pode eventualmente levar à morte celular. Por outro lado, o fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de escuro representa uma metodologia mais estável para a microalga, caracterizada por menores gastos energéticos e pela manutenção da viabilidade celular.

5. Conclusões

Na produção de microalgas, é fundamental ter um conhecimento profundo sobre a espécie específica, suas necessidades nutricionais e os fatores biológicos e físico-químicos que afetam sua viabilidade em cultivo *in vitro*.

A intensidade luminosa desempenha um papel crucial no desenvolvimento das microalgas, sendo um dos fatores físico-químicos mais determinantes para o crescimento adequado em cultivo. Um exemplo disso é a microalga *H. pluvialis*, que demonstrou uma maior taxa de crescimento quando exposta a intensidades luminosas elevadas. Em um espectro de luz branca, a intensidade de $617 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (utilizando lâmpadas NS12) resultou em um aumento de 55% na taxa de reprodução em comparação com a intensidade de $179 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As lâmpadas LEDs NS12 têm uma intensidade luminosa que é 300% maior do que as lâmpadas LEDs V-TAC.

Num espectro de luz vermelha, a intensidade luminosa $408 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, demonstrou ser altamente benéfica para o crescimento de *H. pluvialis*, resultando em maior produção de biomassa e concentração celular ao longo do tempo. As microalgas expostas a este espectro luminoso predominaram na fase de macrozoóides, indicando uma promoção da fase verde da microalga.

A intensidade luminosa desempenhou um papel crucial na acumulação de astaxantina no estudo realizado. Sob condições de alta intensidade luminosa (NS12, $617 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a produção de astaxantina aumentou significativamente ao longo dos sete dias de ensaio, atingindo $4,36 \text{ mg g}^{-1}$. Em contraste, a intensidade luminosa de $179 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não induziram a acumulação de astaxantina, apesar da alta concentração de biomassa, o que refutou a hipótese de morte celular por excesso de luz.

Além disso, a adição de NaCl ao meio de cultura não resultou em diferenças significativas na concentração de biomassa ou na produtividade de astaxantina globalmente, embora tenha influenciado a acumulação de astaxantina no terceiro dia. O stress osmótico induzido pelo NaCl pode ter desempenhado um papel ao reduzir a produção de clorofila *a* e ao aumentar a produção de astaxantina, possivelmente como um mecanismo de defesa contra danos oxidativos nas células.

No estudo com *T. weissflogii*, foram testadas duas intensidades luminosas: $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $427 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Uma intensidade luminosa maior pode provocar saturação luminosa, resultando em uma diminuição do crescimento das microalgas. Ao contrário de *H. pluvialis*, *T. weissflogii* é mais suscetível a variações na intensidade luminosa.

O estado nutricional desta diatomácea é um fator decisivo, destacando a importância da escolha adequada do meio de cultura para garantir o desenvolvimento esperado da microalga.

O meio GM10 destacou-se por proporcionar os melhores resultados na produção de fucoxantina durante a fase exponencial, enquanto o meio NB mostrou maior produtividade na fase estacionária. O meio GM10 proporcionou um crescimento estável e consistente, demonstrando que a suplementação com 10% de Fe foi benéfica para a produção de *T. weissflogii*. Este meio resultou em uma menor concentração celular, mas com um teor mais elevado de fucoxantina na fase exponencial, atingindo $6,97 \text{ mg g}^{-1}$. No entanto, no estado estacionário, o meio NB superou os valores obtidos com o meio GM10, sugerindo que o GM10 pode ser uma solução rápida para a obtenção de fucoxantina, enquanto o meio NB representa uma abordagem mais demorada, mas igualmente eficaz.

O período de luz é crucial para a fotossíntese, fornecendo a energia necessária para as funções vitais das microalgas, como crescimento e reprodução. No caso de *T. weissflogii*, o cultivo em um meio suplementado com ferro e sob um fotoperíodo de 22 h de luz / 2 h de escuridão resultou em um aumento de 10% na concentração celular e de 30% na concentração de biomassa em comparação com um fotoperíodo de 12 h de luz / 12 h de escuridão. Esses resultados sugerem que, para produção industrial, o fotoperíodo de 22 h / 2 h pode oferecer maior produtividade. No entanto, esse regime coloca a microalga sob maior esforço, podendo eventualmente levar à morte celular. Em contraste, o fotoperíodo de 12 h / 12 h é uma abordagem mais estável, apresentando menos gastos energéticos e mantendo a viabilidade celular a longo prazo.

Em resumo, a otimização das condições de cultivo, incluindo a escolha do meio de cultura, a intensidade luminosa e o fotoperíodo, é fundamental para maximizar a produtividade e a viabilidade das microalgas.

6. Referências bibliográficas

- Alvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M., & Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. Em *Algal Research* (Vol. 54). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102200>
- Araújo, R., Calderón, F. V., López, J. S., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Tasende, M. G., Ghaderiadekani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Monagail, M. Mac, Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., & Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Araújo, R., & Peteiro, C. (2021). *Algae as food and food supplements in Europe*. <https://doi.org/10.2760/049515>
- Borges, L., Morón-Villarreyes, J. A., D'Oca, M. G. M., & Abreu, P. C. (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. *Biomass and Bioenergy*, 35(10), 4449–4454. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2011.09.003>
- Cai, J., Lovatelli, A., J, A.-M., Cornish, L., Dabbadie, L., Desrochers, A., Diffey, S., & Gamarro, E. G. (2021). SEaweeds and Microalgae: An Overview for Unlocking Their Potential in Global Aquaculture Development FAO Fisheries and Aquaculture Circular NFIA/C1229 (En). FAO. <https://doi.org/10.4060/cb5670en>
- Caroppo, C., & Pagliara, P. (2022). Microalgae: A Promising Future. Em *Microorganisms* (Vol. 10, Número 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081488>
- D'Alessandro, E. B., & Antoniosi, N. R. F. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. Em *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 58, pp. 832–841). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
- Ding, W., Cui, J., Zhao, Y., Han, B., Li, T., Zhao, P., Xu, J. W., & Yu, X. (2019). Enhancing *Haematococcus pluvialis* biomass and Γ -aminobutyric acid accumulation by two-step cultivation and salt supplementation. *Bioresource Technology*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121334>
- Domínguez, A., Pereira, S., & Otero, A. (2019). Does *Haematococcus pluvialis* need to sleep? *Algal Research*, 44. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101722>
- England, J. M., Rowan, R. M., & Bins, M. (1988). International committee for standardisation in haematology: selected method for visual platelet counting. *Labmedica*, 4, 25–36.
- Etesami, E., Jorjani, S., & Noroozi, M. (2022). Improvement of *Thalassiosira weissflogii* as high valuable nutritional feed. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 21(1), 15–32. <https://doi.org/10.22092/IJFS.2022.125835>

- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. *FAO*, 32(6), 6–10.
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Foo, S. C., Yusoff, F. M., Ismail, M., Basri, M., Chan, K. W., Khong, N. M. H., & Yau, S. K. (2015). Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Algal Research*, 12, 26–32.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.004>
- Friend, A. D., Geider, R. J., Behrenfeld, M. J., & Still, C. J. (2009). *Chapter 20 Photosynthesis in Global-Scale Models*.
- Gangl, D., Zedler, J. A. Z., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M. R., Riseley, A., Włodarczyk, A., Purton, S., Sakuragi, Y., Howe, C. J., Jensen, P. E., & Robinson, C. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 6975–6990.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv426>
- Gao, X., Wang, X., Li, H., Roje, S., Sablani, S. S., & Chen, S. (2017). Parameterization of a light distribution model for green cell growth of microalgae: *Haematococcus pluvialis* cultured under red LED lights. *Algal Research*, 23, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.018>
- García, N., López-Elías, J. A., Miranda, A., Martínez-Porchas, M., Huerta, N., & García, A. (2012). Efecto de la salinidad en el crecimiento y composición química de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* en tres fases de cultivo. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(2), 435–440. <https://doi.org/10.3856/vol40-issue2-fulltext-18>
- Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. In *Algal Research* (Vol. 52). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Harrison, G. I., & Morel, F. M. M. (1986). Response of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to iron stress. *Limnology and Oceanography*, 31(5), 989–997.
<https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.5.0989>
- Imamoglu, E., & Dalay, M. C. (2007). *Effect of different culture media and light intensities on growth of Haematococcus pluvialis*. <https://www.researchgate.net/publication/284261435>
- Kang, C. D., Han, S. J., Choi, S. P., & Sim, S. J. (2010). Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(1), 133–139.
<https://doi.org/10.1007/s00449-009-0362-5>
- Khaw, Y. S., Yusoff, F. M., Tan, H. T., Mazli, N. A. I. N., Nazarudin, M. F., Shaharuddin, N. A., & Omar, A. R. (2021). The critical studies of fucoxanthin research trends from 1928 to june 2021: A bibliometric review. *Marine Drugs*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/md19110606>
- Kim, Affan, A., Jang, J., Kang, M.-H., Ko, A.-R., Jeon, S.-M., Oh, C., Heo, S.-J., Lee, Y.-H., Ju, S.-J., & Kang, D.-H. (2015). Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (*Haematococcaceae*,

- Chlorophyta) Isolated from Korea. *J. Microbiol. Biotechnol*, 25(2), 238–246.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1410.10032>
- Kim, Kang, S. W., Kwon, O. N., Chung, D., & Pan, C. H. (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(4), 477–483.
<https://doi.org/10.1007/s13765-012-2108-3>
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94–97. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82794-8)
- Kosman, D. J. (2009). Illustrating the steady-state condition and the single-molecule kinetic method with the NMDA receptor. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 37(6), 333–338. <https://doi.org/10.1002/bmb.20327>
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. Em *Algal Research* (Vol. 12, pp. 497–512). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Li, Q., You, J., Qiao, T., Zhong, D. bo, & Yu, X. (2022). Sodium chloride stimulates the biomass and astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* via a two-stage cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126214>
- Li, Wang, X., Duan, C., Yi, S., Gao, Z., Xiao, C., Agathos, S. N., Wang, G., & Li, J. (2020). Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. Em *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>
- Lobban, C., Chapman, D., & Kremer, B. (1988). Experimental phycology: a laboratory manual. *Cambridge University Press*. https://www.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=a2o5AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PP13&dq=experimental+phycology&ots=cLZVlyPQ5y&sig=ldDmjvc3PbnYuAcJKgVctujn_k
- Loy, C. W., & Chu, W.-L. (2012). *Biotechnological applications of microalgae*.
- Lu, X., Liu, B., He, Y., Guo, B., Sun, H., & Chen, F. (2019). Novel insights into mixotrophic cultivation of *Nitzschia laevis* for co-production of fucoxanthin and eicosapentaenoic acid. *Bioresource Technology*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122145>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2017). *Brock Biology of Microorganisms* (15th edition). Pearson.
- Matos, Â. P. (2017). The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. Em *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* (Vol. 94, Número 11, pp. 1333–1350). Springer Verlag.
<https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>

- M.D. Guiry in Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019, Julho 3). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. <https://www.algaebase.org>; searched on 15 May 2024. https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43375
- M.D. Guiry in Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2021, Agosto 5). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. . <https://www.algaebase.org>; searched on 13 May 2024 . https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=32240
- Merlo, S., Durany, X. G., Tonon, A. P., & Rossi, S. (2021). Marine microalgae contribution to sustainable development. Em *Water (Switzerland)* (Vol. 13, Número 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/w13101373>
- Nur, Muizelaar, W., Boelen, P., & Buma, A. G. J. (2019). Environmental and nutrient conditions influence fucoxanthin productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown on palm oil mill effluent. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1563-6>
- Nur, S., Oslan, H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. Bin, Sulaiman, A. Z., Mohamed, M. S., & My, A. B. A. (2021). *biomolecules A Review on Haematococcus pluvialis Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin*. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Oliveira, A. P. F. de, & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157>
- Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Guedes, A. C. (2021). Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria-a review on current methodologies. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/app11115187>
- Richmond, Amos. (2004). *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology* (Amos Richmond, Vol. 577). Blackwell Science Ltd.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. Em *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 26, Número 4, pp. 709–722). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016), 531. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00531/BIBTEX>
- Shuler, M. L., Kargi, F., & DeLisa, M. (2017). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* (3.^a ed.). Prentice Hall.
- Solimeno, A., & García, J. (2017). Microalgae-bacteria models evolution: From microalgae steady-state to integrated microalgae-bacteria wastewater treatment models – A comparative review. Em *Science of the Total Environment* (Vols. 607–608, pp. 1136–1150). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.114>

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Tihamér, K. K., & Kovács, K. J. (1984). *The fine structure of some Thalassiosira species (Bacillariophyceae) in the Danube and the Tisza rivers Porphyry copper and epithermal gold deposits View project Long-term changes in the River Danube phytoplankton in the context of its functional diversity and ecosystem functioning View project*. https://doi.org/10.1127/algol_stud/67/1984/409
- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. Em *Biotechnology Advances* (Vol. 41). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Turck, D., Castenmiller, J., Henauw, S. De, Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Engel, K. H., Frenzel, T., Heinonen, M., ... Knutsen, H. K. (2020). Safety of Schizochytrium sp. oil as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 18(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6242>
- Uslu, L., Isik, O., Hamid, M. A., & Cimen, B. A. (2021). The effect of different salinity levels on biomass productivity of diatom species and accumulation of fucoxanthin. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 5421–5428.
- Vaz, B. S., Moreira, J. B., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. Em *Current Opinion in Food Science* (Vol. 7, pp. 73–77). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.12.006>
- Vella, F. M., Sardo, A., Gallo, C., Landi, S., Fontana, A., & d'Ippolito, G. (2019). Annual outdoor cultivation of the diatom *Thalassiosira weissflogii*: productivity, limits and perspectives. *Algal Research*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101553>
- Vieira, C. E. L. (2011). *Diatomáceas* (I. de Souza Carvalho, Ed.; 3.^a ed.). Interciência. <https://www.researchgate.net/publication/262836546>
- Walter, B., Peters, J., Van Beusekom, J. E. E., & St. John, M. A. (2015). Interactive effects of temperature and light during deep convection: A case study on growth and condition of the diatom *Thalassiosira weissflogii*. Em *ICES Journal of Marine Science* (Vol. 72, Número 6, pp. 2061–2071). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu218>
- Wang, S., Wu, S., Yang, G., Pan, K., Wang, L., & Hu, Z. (2021). A review on the progress, challenges and prospects in commercializing microalgal fucoxanthin. *Biotechnology Advances*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107865>
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., & Zhang, C. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *odontella aurita*. *Marine Drugs*, 11(7), 2667–2681. <https://doi.org/10.3390/md11072667>

- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 158, 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.044>
- Zhu, C. J., & Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189–194. <https://doi.org/10.1023/A:1007914806640/METRICS>
- Zhu, X., Luo, J., Zhou, C., Wang, J., Meng, R., Xu, J., Chen, J., Luo, Q., & Yan, X. (2018). Changes of pigments and lipids composition in *Haematococcus pluvialis* vegetative cell as affected by monochromatic red light compared with white light. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(6), 2257–2267. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7195-0>