



***Chlorella vulgaris:*
Influência da intensidade luminosa e exposição
ao H₂O₂ sobre o crescimento e acumulação de
lípidos e carotenoides.**

André Eduardo Palos Cunha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Rogério Simões

setembro de 2020

Agradecimentos

Este projeto só pode ter sido desenvolvido com a ajuda de várias pessoas às quais tenho de expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao prof. Doutor Rogério Simões por me ter apoiado neste projeto e por tudo que me ensinou, revelando a sua boa disposição, compreensão e disponibilidade sempre que dele precisei.

Às várias pessoas do departamento de Química e da Unidade de Investigação FibEnTech que ajudaram direta e indiretamente neste projeto, em especial aos meus “vizinhos” de laboratório.

Aos meus amigos e, especialmente, à Sofia pelo incentivo e pela paciência em ouvirem falar reiteradamente sobre “microalgas”, bem como por me apoiarem, não só este ano, mas sempre que necessitei.

Por último, mas não menos importante, à minha família. Especialmente aos meus pais e ao meu irmão, por me possibilitarem e incentivarem a seguir esta área e pelo apoio incondicional ao longo da minha vida.

Obrigado a todos.

Resumo

Com origem há cerca de 2.500 milhões de anos, as microalgas podem ser encontradas em quase todo o tipo de ambientes apresentando, deste modo, uma extensa biodiversidade que possibilita a exploração de diferentes metabolitos por elas produzidos.

Atualmente, a exploração destes microrganismos abrange uma vasta área, que vai desde a alimentação humana e animal até à farmacêutica. O seu interesse comercial é evidente, produzindo-se cerca de 11 000 toneladas todos os anos.

Apesar dos avanços alcançados, persiste a necessidade de otimizar o processo como um todo, para melhorar a sua viabilidade económica. Neste contexto, a otimização da extração de produtos de elevado valor acrescentado, como a astaxantina, é uma das vias a seguir.

Este produto é produzido principalmente pela microalga *Haematococcus pluvialis*; atualmente, são produzidas cerca de 300 toneladas por ano e o seu valor pode atingir os 6300€/kg. O presente trabalho visava trabalhar com a *H. pluvialis* e otimizar as suas condições de crescimento e de extração de astaxantina. Durante os meses de novembro e dezembro de 2019 realizaram-se alguns ensaios com esta microalga, que permitiram identificar alguns fatores limitantes do crescimento, nomeadamente fosforo e luz. Com o aparecimento da pandemia não foi possível manter a *H. pluvialis* em condições favoráveis, tendo ocorrido contaminações por outros microrganismos que tornou inviável continuar com esta microalga adquirida na Escócia. Face a isto, o trabalho orientou-se para a *Chlorella vulgaris* na qual se aplicou a mesma estratégia: identificação das limitações ao crescimento; aumento do crescimento suprindo as carências de fosforo e implementando um método que permite fornecer a intensidade luminosa necessária, mesmo com elevadas concentrações de biomassa; aplicação de condições de stress (luz, carência de nutrientes e H₂O₂) e avaliação do impacto na biomassa e nos correspondentes teores de carotenoides e lípidos.

Deste modo, foi realizado uma otimização que envolveu alterações no meio de cultura e, posteriormente, foi analisado e caracterizado o efeito da intensidade luminosa ao longo do tempo de cultura, sendo este um dos fatores limitantes na cultura.

O método proposto permitiu aumentar em 22% a quantidade de lípidos e em 51% a quantidade de carotenos produzidos pelas células, tendo em conta o acréscimo de biomassa obtido pelos métodos de cultura otimizados, quando comparados a um controlo.

Os resultados desta investigação permitem o desenvolvimento de métodos mais eficazes na produção de biomassa, bem como a utilização de um método para a produção de compostos de interesse, apresentando-se o peróxido de hidrogénio como um indutor de stress.

Palavras-chave

Microalga; *Chlorella vulgaris*; *Haematococcus pluvialis*; otimização luminosa; carotenos.

Abstract

Microalgae appeared around 2,500 million years ago. They can be found in almost all types of environments, thus presenting an extensive biodiversity that allows the exploration of different metabolites produced by them.

Currently, the use of these microorganisms covers a wide area, ranging from human and animal food to pharmaceuticals. Being produced around 11,000 tonnes every year.

Despite the advances achieved, there is still a need to optimize the process, to improve its economic viability. In this context, the optimization of the extraction of products with high added value, such as astaxanthin, is one of the ways to be followed.

This product is mainly produced by the microalgae *Haematococcus pluvialis*; currently, about 300 tons are produced per year and their value can reach € 6300 / kg. The present work aimed to work with *H. pluvialis* and to optimize its conditions of growth and astaxanthin extraction. During the months of November and December 2019, some tests were carried out with *H. pluvialis*, which allowed to identify some limiting factors of growth, namely phosphorus and light. With the appearance of the pandemic, it was not possible to maintain *H. pluvialis*: contamination by other microorganisms occurred and it was impossible to continue the study. In view of this, the work was oriented towards *Chlorella vulgaris* in which the same strategy was applied: identification of growth limitations; increased growth, surpassing the phosphorus deficiencies and implementing a method that allows to provide the necessary light intensity, even with high concentrations of biomass; application of stress conditions (light, nutrients starvation and H₂O₂) and assessment of the impact on biomass and the levels of carotenoids and lipids.

In this way, an optimization was carried out that involved changes in the culture medium and, later, the effect of light intensity over the culture time was analyzed and characterized, this being one of the limiting factors in the culture.

The proposed method allowed to increase the amount of lipids by 22% and the amount of carotenes produced by cells by 51%, considering the increase in biomass obtained by the optimized culture methods, when compared to a control.

The results of this investigation allow the development of more effective methods in the production of biomass, as well as the use of a method to produce compounds of interest, presenting hydrogen peroxide as a stress inducer.

Keywords

Microalgae; *Chlorella vulgaris*; *Haematococcus pluvialis*; light optimization; carotenes.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do trabalho	1
1.2. Objetivo do trabalho	3
1.3. Estrutura do trabalho	4
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Microalgas	5
2.2. Produção de Biomassa	6
2.3. Compostos de elevado valor acrescentado	7
2.3.1 Pigmentos	7
2.3.2. Clorofila.....	8
2.3.3. Carotenoides	9
2.3.4. Ficobiliproteínas	10
2.4. Lípidos	11
2.5. Tratamento de efluentes	12
2.6. Condições da cultura.....	13
2.6.1. Luminosidade	14
2.6.2. Nutrientes	15
2.6.3. Carbono	16
2.6.4. Fosforo e azoto	16
2.6.5. Temperatura.....	17
2.6.6. pH	17
2.6.7. Agitação.....	18
2.7. Modos de operação	19
2.7.1. Descontínuo (Batch)	19
2.7.2. Semi-contínuo (Fed-Batch)	20
2.7.3. Contínuo	20
2.8. Tipos de biorreatores	21
2.8.2. Fotobiorreatores fechados.....	22
2.8.3. Fermentadores	23
2.9. Condições de stress	24
2.9.1. Produção lipídica	24
2.9.2. Produção de carotenoides	25
2.10. Recuperação da biomassa.....	26
2.10.1. Filtração	26
2.10.2. Centrifugação	27
2.10.3. Floculação	27
2.10.4. Flotação.....	28
3. Materiais e métodos	29
3.1. Materiais	29
3.1.1. Reagentes.....	29
3.1.2. Microalgas e meio de cultura.....	29
3.1.3. Instalação	30
3.2. Métodos	31
3.2.1. Produção de biomassa algal.....	31
3.2.1.1. Produção de biomassa algal em biorreator (8,6cm de diâmetro).....	32
3.2.1.2. Produção de biomassa algal em biorreator (6 cm de diâmetro).....	32
3.2.1.3. Erlenmeyers 250mL – Ensaios de stress.....	33

3.2.2.	Indução de stress	34
3.2.3.	Controlo do processo.....	34
3.2.3.1.	Biomassa.....	34
3.2.3.2.	Luminosidade.....	35
3.2.3.3.	Caracterização do sistema de LEDs.....	36
3.2.3.4.	Concentração de azoto e fosforo.....	38
3.2.4.	Extração e quantificação dos compostos.....	39
3.2.4.1	Extração de pigmentos	39
3.2.4.2.	Extração de lípidos.....	39
3.2.4.3.	Quantificação dos compostos	40
4.	Resultados e discussão	41
	Resultados e discussão	41
4.1.	Correlação da densidade ótica, concentração mássica e a quantidade de células na <i>H. pluvialis</i>	41
4.2.	Otimização do meio de cultura	42
4.2.1	<i>Haematococcus pluvialis</i>	43
4.2.2.	Contaminações na <i>Haematococcus pluvialis</i>	49
4.2.3.	<i>Chlorella vulgaris</i>	51
4.3.	Otimização da Intensidade Luminosa.....	53
4.3.1.	Intensidade luminosa progressiva vs Intensidade luminosa fixa.....	53
4.3.2.	Ensaio com diferentes intensidades luminosas.....	54
4.4.	Quantificação e identificação de Pigmentos	58
4.5.	Percurso ótico	61
4.6.	Indução de Stress através de H ₂ O ₂	64
5.	Conclusão e perspetivas futuras	69
6.	Referências	70

Lista de Figuras

- Figura 2.1 – Estrutura da clorofila A e B, as mais abundantes;
- Figura 2.2 – Estrutura dos quatro principais carotenoides explorados nas microalgas;
- Figura 2.3 – Relação entre o preço dos produtos e a quantidade de produção;
- Figura 2.4 – Efeito do pH na disponibilidade do dióxido de carbono na água;
- Figura 2.5 – Ilustração de um *raceway*;
- Figura 2.6 – Designs de biorreatores aplicados ao cultivo de microalgas;
- Figura 2.7 – Vantagens e desvantagens dos vários métodos de stress para a produção de lípidos;
- Figura 2.9 - Exemplo de um sistema de centrifugação laboratorial;
- Figura 3.1 - Instalação do equipamento;
- Figura 3.2 – a) Montagem do sistema de LEDs; b) Ensaio do sistema;
- Figura 3.3 - Fotobiorreator cilíndrico de 1 L com 8,6cm de diâmetro durante os ensaios;
- Figura 3.4 - Fotobiorreator cilíndrico de 1 L, com 6 cm de diâmetro durante os ensaios;
- Figura 3.5 – Biorreatores para os ensaios de stress químico;
- Figura 3.6 – a) Ilustração da medição de intensidade luminosa dentro do biorreator; b) Sistema montado;
- Figura 3.7 – Fotografia e esquema do sistema de iluminação por LEDs;
- Figura 3.8 – Caracterização do sistema de LEDs + Lampâdas;
- Figura 3.9 – Kits para medição de nitrato e fosfato;
- Figura 3.10 - Espectrofotômetro para leitura dos kits;
- Figura 3.11 – a) Pellet após extração dos pigmentos; b) Solventes após extração dos pigmentos;
- Figura 3.12 - Sobrenadante recuperado após extração;
- Figura 3.13 – Equipamento de evaporação rotativo;
- Figura 4.1 – Relação entre a biomassa e a densidade ótica na microalga ***Haematococcus pluviialis***;
- Figura 4.2– Quantificação da biomassa da *H.pluviialis* ao longo de um ciclo de cultura;
- Figura 4.3 – Evolução da intensidade luminosa ao longo do tempo dentro do biorreator;
- Figura 4.4 –Relação entre intensidade luminosa e a concentração de biomassa.;
- Figura 4.5 - [Biomassa] ao longo do tempo nos diferentes ensaios.;
- Figura 4.6– Observação de microscópio das condições da cultura de *H.pluviialis*. A e B paramécia no meio de detritos celulares, C – Paramécia no meio de cultura, D – Parasita e a microalga com evidências perceptíveis de stress, E – *H.pluviialis* em fase de replicação, F – *H.pluviialis* na fase móvel;

Figura 4.7 – Representação de uma paramécia.

Figura 4.8– Imagem microscópica das colónias crescidas em agar.

Figura 4.9 – Crescimento da densidade ótica dos 3 ensaios.

Figura 4.10 – Comparação entre a intensidade luminosa no interior do reator a usar o sistema de LEDs e sem o uso do sistema.

Figura 4.11 – Evolução da densidade ótica dos diferentes ensaios.

Figura 4.12– Evolução das concentrações de células para os diferentes ensaios referidos na tabela 4.3.

Figura 4.13 – Representação da resposta das microalgas à exposição inicial de luz. a) Aglomeração presente ao 3^o dia no ensaio de stress; b) Dispersão uniforme da biomassa no ensaio de controlo e progressivo.

Figura 4.14 – Solventes após extração dos pigmentos: a) Ensaio n^o2; b) Ensaio n^o1

Figura 4.15 – Ensaios sobre percurso ótico; Ensaio N^o1- 4 cm de diâmetro* e N^o2 – 6 cm

Figura 4.16 – Evolução da densidade ótica para os ensaios com diferentes diâmetros.

Figura 4.17 – Lixiviação dos ensaios com mais de 5nM de peróxido de hidrogénio.

Figura 4.18 – Relação entre a quantidade de lípidos produzidos dos ensaios com o controlo.

Figura 4.19 – Comparação da produção de biomassa e lípidos entre os ensaios

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Composição das soluções stock de nutrientes;

Tabela 4.1 – Ensaios de otimização *H. pluvialis*;

Tabela 4.2 – Otimização da cultura da microalga *Chlorella vulgaris*;

Tabela 4.3 – Características e resultados dos ensaios com a *C.vulgaris* ao longo de 27 dias;

Tabela 4.4 – Caracterização dos três ensaios ao fim de 23 dias;

Tabela 4.5 – Quantificação dos pigmentos e lípidos do ensaio de controlo e de stress;

Tabela 4.6 – Efeito da concentração de H₂O₂ sobre a resposta da *C. vulgaris*.

Lista de Acrónimos

GRP	Gabinete de Relações Públicas
UBI	Universidade da Beira Interior
H. pluvialis	Haematococcus pluvialis
C. vulgaris	Chlorella vulgaris
CO ₂	Dióxido de carbono
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
TAG	Triglicéridos
LED	Díodo emissor de luz
PPFD	Densidade do fluxo de fotões fotossintéticos $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
ROS	Espécies reativas de oxigénio
GM-FWS	Fresh-Water species GoldenMedium
GM-M	GoldenMedium modificado

1. Introdução

O impacto ambiental do crescimento da população e do uso excessivo de fontes de energia não renováveis são problemas mundiais com que lidamos diariamente.

Ao longo deste trabalho são demonstradas as razões que fazem das microalgas uma das soluções para estes problemas pelas suas características singulares, nomeadamente a capacidade de absorção de nutrientes e fixação de CO₂, associada à capacidade de produzir uma grande variedade de compostos, tornam estas “fábricas-vivas” uma alternativa eficaz para o tratamento de afluentes, produção de energia renovável, bem como fonte de compostos bioativos para as mais diversas áreas.

1.1. Enquadramento do trabalho

O interesse pelas microalgas tem vindo a registar um aumento significativo, devido ao seu elevado potencial como alternativa para a produção de biocombustível e compostos farmacêuticos de uma maneira mais sustentável face aos métodos atuais^{1,2}.

Os problemas ambientais têm tido uma especial atenção nestes últimos anos, após vários estudos comprovarem o aumento da temperatura média global do planeta como consequência da poluição atmosférica, sendo que a libertação de CO₂ e outros gases efeito de estufa, são um dos principais fatores. Estas alterações atmosféricas não afetam só os seres humanos, mas todo o ecossistema da Terra³, tornando urgente e imprescindível encontrar alternativas aos métodos atuais de produção imprescindível.

Segundo a *European Environment Agency*, só na Europa são libertados mais de 400 milhões de toneladas de CO₂ para a atmosfera, o que corresponde a 30% de todo o CO₂ emitido no mundo anualmente⁴. Aproximadamente, 92% destas emissões são provenientes da combustão de combustíveis fósseis, evidenciando as emissões dos sectores energéticos e dos transportes⁴. As matérias primas usadas, nomeadamente, o petróleo e o carvão, são matérias não renováveis que, quando são refinadas e usadas, libertam enormes quantidades de gases de efeito de estufa, cujos perigos associados já são sobejamente conhecidos.

A bio-fixação de dióxido de carbono (CO₂) por organismos fotossintéticos é uma das estratégias que se tem vindo a explorar, no sentido de se conseguir reduzir a concentração deste gás na atmosfera^{5,6}. As microalgas poderão vir a ser a solução para este problema, tendo em conta que entre as espécies que fazem bio-fixação, existem determinadas microalgas que permitem taxas de fixação de CO₂ até 50 vezes superior às das plantas terrestres⁷.

Atualmente, já existem biorrefinarias que, apesar de serem ainda em número reduzido, usam o CO₂ emitido no seu funcionamento para a produção de microalgas⁸, sendo estas posteriormente usadas para combustão, ocorrendo assim uma reciclagem do dióxido de carbono e da biomassa produzida.

No entanto, sabemos que para a produção de microalgas só o dióxido de carbono não é suficiente, sendo também necessários outros nutrientes. Neste sentido, associado ao crescimento da indústria e da população mundial, tem sido investigada a vantagem do uso das microalgas para o tratamento de afluentes, visto que estes apresentam matéria orgânica e, principalmente, inorgânica que as microalgas precisam para o seu crescimento. Atualmente, no tratamento de águas, mais concretamente no tratamento terciário e quaternário, as microalgas já são usadas para absorção da matéria inorgânica, em especial o azoto e o fósforo⁹.

Estas características, nomeadamente a capacidade de fixar CO₂ e usar fontes orgânicas e inorgânicas de nutrientes para o seu crescimento, bem como para a produção de diversos compostos, fazem da microalga, uma “fábrica verde” de compostos e biomassa para as diversas indústrias.

Em paralelo à solução para determinados problemas ambientais, as microalgas também podem dar resposta a problemas sociais e económicos, visto que algumas espécies têm sido catalogadas como um superalimento, nomeadamente, a *Spirulina spp.* e a *Chlorella spp.*, devido ao seu valor nutricional e aos compostos bioativos que estas contêm¹⁰.

Neste momento, os compostos que mais se exploram nas microalgas são os polissacáridos, lípidos, pigmentos, proteínas, vitaminas e antioxidantes¹. Os lípidos e os antioxidantes serão objeto de atenção particular já que a *C. vulgaris* apresenta capacidade de os produzir.

Devido ao seu rápido crescimento e acumulação de compostos, esta microalga tem-se tornado uma das microalgas mais exploradas na área da biotecnologia verde e azul¹¹, sendo a sua produção focada na biomassa e na extração de lípidos.

Apesar das vantagens comprovadas do uso das microalgas para produção de compostos e biomassa, persistem dificuldades associadas ao processo de extração e produção que dificultam o crescimento desta indústria.

Ao longo desta investigação, vão ser analisados os vários fatores que afetam o crescimento das microalgas, bem como a produção dos compostos de interesse, com o objetivo de determinar os fatores limitantes e desenvolver um método para os ultrapassar. Neste âmbito, os diversos ensaios vão ser realizados em fotobiorreatores de 1L que permitirão o controlo dos diferentes fatores, sendo que, em paralelo, realizar-se-á uma monitorização da resposta das microalgas.

Com base em outras investigações¹²⁻¹⁴ já realizadas, a intensidade luminosa que chega às microalgas é um dos fatores limitantes no crescimento da biomassa, sendo este um dos fatores que irá ser caracterizado e investigado ao longo deste projeto.

1.2. Objetivo do trabalho

Como anteriormente referido, as microalgas apresentam uma enorme capacidade para substituir outras fontes de energia e de se tornarem “fábricas” na produção de compostos com elevado valor comercial. No entanto, para viabilizar este processo, persiste a necessidade de otimizar os processos de produção e extração dos compostos. Com o objetivo de ultrapassar algumas das dificuldades associadas à produção de microalgas, vão ser estudados os efeitos de diferentes parâmetros de cultivo, de modo a identificar os parâmetros mais limitantes.

O principal objetivo dos ensaios com a *C. vulgaris* é identificar os fatores limitantes do seu cultivo em fotobiorreatores com luz artificial e desenvolver um método para minimizar essas limitações em conjunto com uma monitorização do efeito do método de cultivo na acumulação dos metabolitos nas microalgas.

Os resultados vão permitir uma melhor compreensão dos parâmetros fundamentais para o crescimento das microalgas e a sua influência na produção e acumulação de compostos.

Com este projeto pretende-se obter informação para desbloquear o potencial económico das microalgas, sabendo da sua capacidade de responder a muitos dos problemas ambientais e económicos, aos quais permanecemos associados nos dias de hoje.

1.3. Estrutura do trabalho

Após serem definidos os objetivos e efetuado uma breve introdução ao potencial das microalgas, segue-se:

Capítulo 2 – Revisão da literatura sobre as diferentes temáticas abordadas;

Capítulo 3 - Materiais e métodos;

Capítulo 4 – Resultados e respetiva discussão;

Capítulo 5 – Conclusões e perspetivas futuras;

Capítulo 6 - Referências Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, desenvolvem-se algumas das principais temáticas para o trabalho, através da revisão bibliográfica.

Este capítulo permite um enquadramento mais completo na cultura de microalgas desde a física dos biorreatores, às aplicações dos produtos nas diversas áreas.

2.1. Microalgas

As microalgas são seres fotossintéticos unicelulares que conseguem viver nos mais diversos sistemas aquáticos, sejam estes de água doce ou salgada. Existem três grandes géneros de algas, nomeadamente as Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas castanhas) e as Chlorophyta (algas verdes), sendo possível encontrá-las praticamente em qualquer parte do planeta¹.

Devido à enorme biodiversidade, as microalgas apresentam-nos com três sistemas de crescimento diferentes. A saber:

- Autotrófico. As microalgas necessitam de compostos inorgânicos e luz para o seu crescimento. Para além da luz fornecer a energia para o seu crescimento também a usa para a degradação dos compostos no meio.

O processo de fotossíntese realizado por estas microalgas poderá ser uma das respostas aos graves problemas ambientais com que nos deparamos, uma vez que o seu metabolismo permite a fixação de CO₂, transformando-o em biomassa¹⁵.

- Heterotrófico. Estas microalgas utilizam matéria orgânica como fonte de energia e de carbono, sendo capazes de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono orgânico. Esta característica é uma das mais importantes, para a sua utilização no tratamento de afluentes^{11,16}.

- Mixotrófico. Como o próprio nome indica, este tipo de microalgas consegue transformar tanto os compostos inorgânicos como os orgânicos em energia. As microalgas mixotróficas pode eliminar um dos maiores problemas do cultivo de microalgas autotróficas, nomeadamente a limitação da luz no sistema e, deste modo, permitir uma maior quantidade de biomassa. No entanto, este tipo de crescimento pode induzir um elevado stress na cultura, em comparação com os restantes sistemas¹⁷.

Atualmente, a exploração destes microrganismos foca-se na produção de compostos para uma elevada diversidade de aplicações justificando a nomeação das microalgas como sendo “mini-fábricas”. Os compostos com maior valor comercial são os polissacáridos,

lípidos, pigmentos, proteínas, vitaminas e outros produtos bioativos, como alguns antioxidantes^{1,10,18}.

Para além da exploração industrial para obtenção dos seus compostos, as microalgas podem ser a solução para alguns problemas ambientais, atendendo ao seu crescimento rápido e à capacidade de absorver nutrientes do meio.

O aumento dos gases efeito de estufa e de afluentes domésticos são dos dois maiores desafios para a sustentabilidade do ambiente. Deste modo, o metabolismo natural das microalgas pode ser explorado e mesmo otimizado, com a finalidade de se tornar uma opção válida no combate a estes problemas ambientais¹⁹. Como já referido, a sua capacidade em fixar CO₂ e de consumir nutrientes no meio, também tem sido explorada, sendo amplamente usadas no tratamento de afluentes, permitindo a redução de nitratos e fosfatos até 96%^{5,20}.

Atualmente, as microalgas utilizadas no tratamento de afluentes têm sido exploradas não só para adubagem ou alimento animal, mas também para extração de compostos, permitindo maximizar o rendimento deste tipo de tratamento²⁰.

2.2. Produção de Biomassa

A biomassa algal é composta em média por: 60% de proteínas, 15% de hidratos de carbono e 15% lípidos²¹. Estas proporções variam muito de microalga para microalga, mas representam os compostos mais explorados devido à elevada capacidade de produção e acumulação.

Anualmente, na Europa, existem mais de 150 empresas de biotecnologia para explorar esta indústria, representando 750M€ em 2015²². Os principais compostos explorados são os pigmentos e os lípidos. Contudo, a exploração de microalgas não possui apenas como objetivo a extração de compostos, mas também a produção de biomassa.

A biomassa apresenta diferentes mercados nos quais as microalgas são comercializadas, em grande maioria, desidratadas. Alguns exemplos deste tipo de produto podem ser encontrados na aquacultura, agricultura e mesmo como fonte de alimento humano.

Devido às suas características específicas, a utilização de microalgas na alimentação humana e animal tem aumentado exponencialmente, sendo a *Chlorella*, a *Spirulina*, a *Dunaliella* e a *Haematococcus* as mais usadas devido à sua riqueza em antioxidantes e ao elevado conteúdo de proteínas e de nutrientes essenciais²³.

Em conjunto com a industrialização da produção de microalgas e a necessidade de acompanhar a procura, tanto ao nível da alimentação como da extração de compostos, ocorrem tentativas de otimizar o próprio mecanismo celular da microalga. Deste modo, a modificação genética, apesar de ainda restrita, já é explorada, sendo que estes

organismos geneticamente modificados apresentam uma maior expressão dos compostos de alto valor comercial, em conjunto com um tempo de crescimento inferior^{24,25}. Este tipo de investigação vai ajudar a aumentar, a nível global, a industrialização das microalgas, contornando os vários problemas associados à sua cultura em larga escala, permitindo responder a alguns dos problemas ambientais e sociais existentes.

2.3. Compostos de elevado valor acrescentado

A extração de compostos produzidos pelas microalgas é um dos setores mais rentáveis nesta área. Proteínas, polissacarídeos, ácidos gordos, pigmentos, enzimas e vitaminas são alguns dos compostos já explorados²³ apresentando diversas aplicações. A área farmacêutica é exemplo disso. É uma área em constante inovação e sempre à procura de novos compostos bioativos que permitam o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos especialmente, agentes terapêuticos de origem biológica²⁶, devido às suas vantagens.

Os compostos explorados nesta área representam os valores comerciais mais elevados, devido à necessidade de produzir agentes bioativos, com grande pureza, para a sua administração no corpo humano. Anti-inflamatórios, antioxidantes, antifúngicos²⁷ e até anticancerígenos²⁸ como é o caso do Cucarin-A, proveniente da *Lyngbya majuscula*²⁹, são vários dos compostos explorados nesta área.

2.3.1 Pigmentos

Os pigmentos são moléculas complexas com capacidade de refletir ou absorver luz com determinados comprimentos de luz, existindo em grande quantidade nos vários tipos de microalgas, como é o caso da clorofila, carotenoides e as ficobiliproteínas, estas últimas menos conhecidas, sem, no entanto, deixarem de ter o seu interesse. Estas encontram-se presentes nas cianobactérias e microalgas vermelhas e, tal como a clorofila, permitem a captação da luz. Uma das suas aplicações é na citometria de fluxo, devido às suas propriedades de fluorescência, tornando-as num dos principais fluoróforos usados na citometria³⁰. São ainda usadas nas áreas de cosmética e na alimentação.

2.3.2. Clorofila

A clorofila é um pigmento verde natural responsável pela absorção de energia proveniente da luz, convertendo-a em energia química através da fotossíntese. É um composto bioativo usado tanto na indústria alimentar, como na cosmética e farmacêutica³¹. Esta molécula tem sido investigada devido às suas propriedades nutricionais, antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias³².

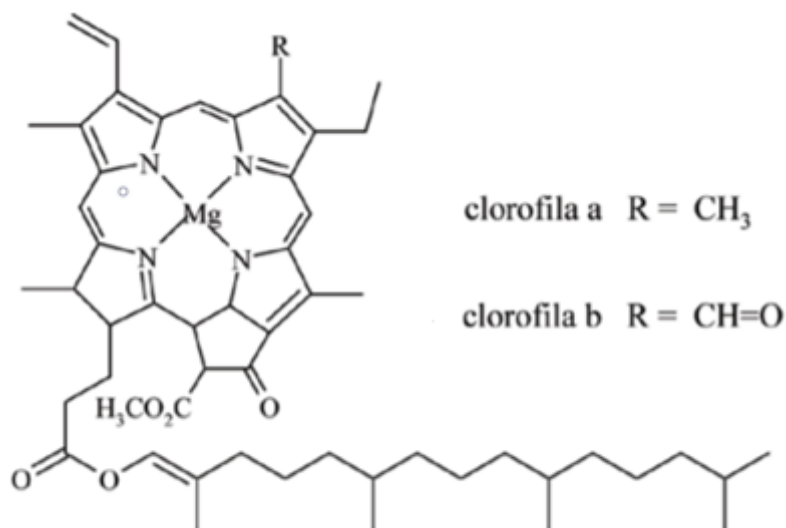


Figura 2.1 – Estrutura da clorofila A e B, as mais abundantes.

Este produto abrange diversos mercados incluindo a sua venda como corante, devido à sua absorção de luz de determinados comprimentos de ondas.

A clorofila também é usada em produtos farmacêuticos, embora de forma menos significativa. Alguns trabalhos científicos demonstram que o uso deste produto permite aumentar a velocidade da cicatrização até 25%, por facilitar a hidratação das células danificadas, promovendo assim o processo de cicatrização³³.

Apesar das diversas vantagens da utilização deste produto, existem algumas dificuldades durante a sua extração, principalmente devido à sua instabilidade. Esta decorre devido à exposição do ião magnésio ao oxigénio sem qualquer tipo de proteção. Deste modo, durante o processo de extração, é necessário realizarem-se procedimentos particulares, tendo em atenção o rigoroso controlo de diversos fatores, nomeadamente a temperatura e a intensidade luminosa, bem como o tempo em que o composto é exposto ao ambiente, sob pena do composto se poder degradar, diminuindo a rentabilidade do processo e inviabilizando o *scale-up* ³⁴.

A preferência de pigmentos naturais tem vindo a aumentar quando comparados aos pigmentos artificiais em virtude de mudanças de legislação baseadas nas diferentes vantagens do seu uso.

2.3.3. Carotenoides

Os carotenoides podem ser extraídos de diferentes fontes. Tanto são extraídos de algumas bactérias, como de fungos e, até mesmo, de algumas espécies de camarão. No entanto, é nas microalgas onde se encontra a melhor relação de w/w (peso de carotenoides por peso de biomassa), sendo considerados um dos principais compostos extraídos destes microrganismos.

Na natureza, existem mais de 600 compostos de carotenoides que podem ser divididos em dois grupos³⁵:

- Xantófilos. Onde se encontram a astaxantina e a luteína, que contêm o grupo funcional hidroxilo;
- Carotenos. Os compostos mais conhecidos deste grupo incluem o β -caroteno e o licopeno, que não contêm nenhum grupo funcional.

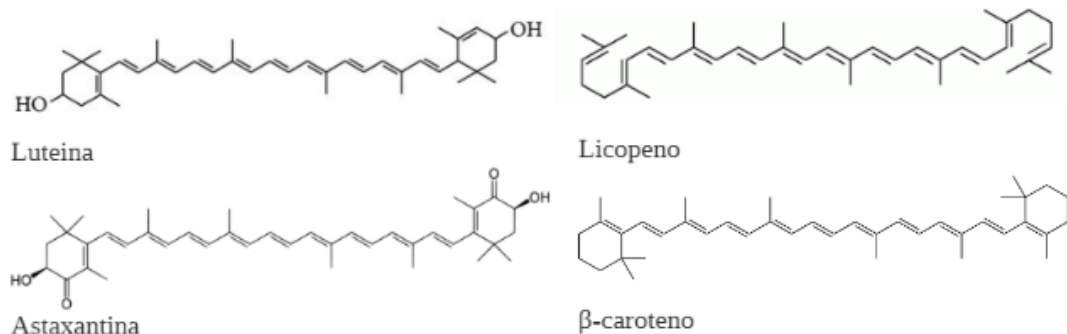


Figura 2.2 – Estrutura dos quatro principais carotenoides explorados nas microalgas.

Devido à consciencialização do consumidor acerca dos benefícios que os carotenoides e os seus derivados³⁶ trazem para a saúde, o mercado mundial deste setor tem vindo a aumentar consideravelmente. De 2017 a 2019 registou-se um aumento de 25%, atingindo o valor de 2 biliões de dólares.

Atualmente, a investigação sobre métodos de otimização da produção de carotenoides e da sua extração também tem vindo a apresentar um crescimento, visando satisfazer o aumento da procura do produto, otimizando o custo do processo de *downstream*, tornando a extração economicamente mais atrativa.

Os carotenoides incluem alguns dos compostos com maior potencial de anti-oxidação existentes na natureza, sendo usados pelas microalgas para defesa, quando sujeitas a ambientes de stress. Com base neste mecanismo de defesa, a indução de stress nas microalgas é dos principais métodos utilizados para induzir a produção e acumulação destes compostos dentro da célula. No entanto, associado a este mecanismo de defesa, algumas microalgas, nomeadamente a *H. pluvialis*, apresentam outros mecanismos de defesa, tal como o endurecimento da parede celular. A nível industrial, este segundo mecanismo aumenta os custos associados ao *downstream* deste composto, pois exige um maior gasto de energia, com o consequente aumento do custo, no processo de lise celular. Apesar do elevado potencial destes produtos, a otimização dos mecanismos celulares e do processo de *downstream* são exigência de mercado.

2.3.4. Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são proteínas solúveis em água que, tal como a clorofila, capturam energia proveniente da luz. Contudo, dos pigmentos produzidos pelas microalgas, são os menos explorados. A sua utilização baseia-se nas suas propriedades de fluorescência, por apresentar melhores resultados em ensaios de alta sensibilidade, quando comparados com outros fluoróforos. A grande solubilidade em água e uma intensidade de luz 10-20x superior aos fluoróforos mais utilizados, colocam estes pigmentos entre os melhores candidatos para técnicas baseadas em fluorescência, nomeadamente a citometria de fluxo e ensaios de fluorescência em microplacas^{30,37}.

Tal como os diferentes pigmentos acima referidos, este tipo de proteína também desempenha funções nas áreas da nutrição humana e farmacêutica, devido às propriedades anti-oxidantes e anti-virais.

Como estes compostos são menos explorados, a procura por mais espécies de microalgas com capacidade de produzir este tipo de proteína em maiores quantidades, eventualmente, permitiria o avanço de algumas técnicas biotecnológicas para a diagnose e prevenção e tratamento de doenças até agora intratáveis³⁰.

2.4. Lípidos

As microalgas têm a capacidade de produzir dois tipos de lípidos, polares e não polares. Os lípidos polares encontram-se maioritariamente nas membranas das microalgas, enquanto que os lípidos não polares (neutros), como por exemplo os triglicéridos (TAG), são armazenados em compartimentos próprios, sendo produzidos em maior quantidade sempre que as microalgas ficam sujeitas a situações de stress³⁹.

O teor de lípidos na biomassa depende da espécie bem como da fase de crescimento e do meio de cultura onde se encontram. Deste modo, é possível manipular as microalgas para produzirem em maior quantidade o produto de interesse, tendo, em alguns casos, atingindo cerca de 70% da sua massa seca, como lípidos, após ensaios de indução de stress.

Dos diversos lípidos que as microalgas conseguem produzir, destaca-se o TAG. A transformação deste composto para biocombustível ocorre através da sua transesterificação³⁸, que pode ser realizado por via química ou enzimática.

Para além da transformação dos TAG em metil ou etil esteres dos ácidos gordos, os lípidos podem sofrer outro tipo de transformação, nomeadamente termoquímica ou bioquímica.

As técnicas termoquímicas baseiam-se na decomposição da matéria orgânica através de combustão, enquanto que as técnicas bioquímicas incluem fermentação alcoólica, digestão anaeróbica e produção biológica de hidrogénio^{38,39}, para obtenção do produto final.

Um dos problemas na produção de biocombustível através de matérias primas renováveis encontra-se na otimização do processo de conversão dos lípidos a biocombustível, pois alguns destes processos apresentam elevados custos, levando ao aumento do preço final do produto.

Apesar dos diversos estudos já efetuados, uma otimização do processo industrial permitiria diminuir os custos associados, facilitando a entrada direta destes produtos na competição com combustíveis provenientes de fontes não renováveis, como é o caso do petróleo.

A exploração das biomoléculas produzidas pelas microalgas não se baseia só nos compostos já referidos, mas em muitos outros que, apesar de uma exploração inferior, apresentam vantagens igualmente importantes. Em conjunto com os produtos mais conhecidos, todos os anos têm aparecido novos compostos com capacidade de competir diretamente com os seus análogos sintéticos, tanto a nível de desempenho, como a nível económico.

A figura 2.3 relaciona os valores dos produtos com as suas aplicações e a quantidade vendida.

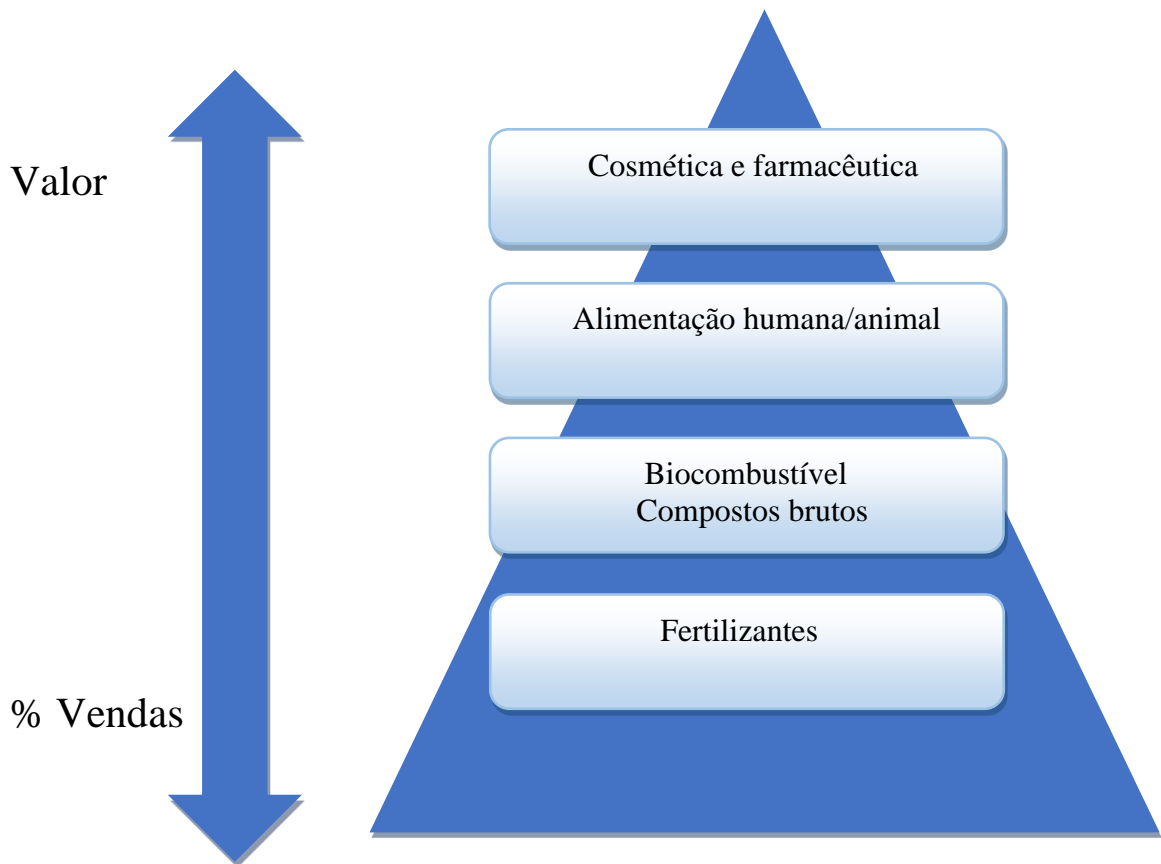


Figura 2.3 – Relação entre o preço dos produtos e a quantidade de produção

2.5. Tratamento de efluentes

Como resultado do elevado crescimento demográfico, compostos orgânicos e inorgânicos libertados para o ambiente têm vindo a crescer. Um aumento considerável de descargas de resíduos domésticos, agropecuários e industriais são a principal causa da poluição das águas. O tratamento destes afluentes surge como uma necessidade urgente para a defesa e melhoria de qualidade do ambiente. As microalgas apresentam potencial para a intervenção no âmbito do tratamento de afluentes, por possuírem capacidades de absorção e na transformação de alguns dos compostos libertados, com a vantagem de conseguir produzir compostos de interesse⁹.

Os cursos de água sofrem descargas de várias fontes, o que afeta a composição dos afluentes, apresentando, genericamente compostos orgânicos e inorgânicos, tanto naturais como produto da ação humana. Os principais compostos orgânicos que se encontram nos afluentes são carboidratos, gorduras, proteínas e aminoácidos. Por outro

lado, grandes quantidades de sódio, cálcio, potássio, fosfato, amônia, metais pesados, entre outros, então presentes nos efluentes⁴⁰ como compostos inorgânicos.

O tratamento de efluentes pode ser dividido em quatro etapas:

- Pré-tratamento: resume-se à remoção de matéria sólida no afluente. Este passo vai facilitar as etapas posteriores, removendo a matéria que pode danificar o material ou reduzir o fluxo dos afluentes nos processos seguintes.

- Tratamento secundário: o foco deste tratamento é reduzir a carga orgânica do afluente diminuindo, conseqüentemente, a carência bioquímica de oxigênio. O uso de bactérias heterotróficas é essencial neste processo, sendo que estas decompõem a matéria orgânica;

- Tratamento terciário: o objetivo deste passo é remover grande parte dos compostos orgânicos, podendo ser removidos quimicamente ou biologicamente, registrando diferentes vantagens, dependendo do afluente a ser tratado.

É neste terceiro tratamento que o potencial das microalgas se insere, visto poderem intervir de forma muito relevante na remoção de compostos orgânicos.

A cultura de microalgas representa uma solução para este problema, devido à capacidade/necessidade do consumo de fosfatos e nitratos, para o seu próprio crescimento. Associado à metabolização destes compostos, as microalgas produzem oxigênio e outros metabolitos durante a fotossíntese que provocam alterações no meio, como é o caso do aumento do pH, originando um efeito de desinfecção⁹.

A biomassa produzida nesta etapa pode e deve ser aproveitada para extração de compostos, otimizando o rendimento de todo o processo. Atualmente, a extração de lípidos de microalgas usadas no tratamento de afluentes é um dos processos explorados, em conjunto com o uso de biomassa, como fonte de energia para biocombustíveis⁴⁰;

- Tratamento quaternário: foca-se na extração de metais pesados e minerais solúveis que não ficaram retidos durante os tratamentos anteriores.

Diversos estudos efetuados sobre a absorção de metais pesados por parte das microalgas, torna-as uma potencial solução para este tratamento. Neste processo, as microalgas funcionam como um meio de concentração dos metais, sendo necessário posterior tratamento da biomassa⁴¹.

2.6. Condições da cultura

A cultura de biomassa com fins comerciais exige uma grande densidade de microalgas dentro do biorreator. Devido a esta elevada densidade, a escassez de alguns dos recursos essenciais para o crescimento, pode ser inevitável. De modo a obter uma biomassa saudável e em grande quantidade, é necessário ter atenção às condições às quais as microalgas são expostas.

As condições ótimas mudam de espécie para espécie e mesmo de biorreator para biorreator, no entanto os principais requisitos são comuns: a luz (tanto a intensidade luminosa como o comprimento de onda)³¹, nutrientes e dióxido de carbono⁴⁰.

Num sistema descontinuo, no final da cultura, a elevada densidade algal dificulta a difusão da luz pelo biorreator, sendo necessário induzir elevadas intensidades nesta fase do processo. No entanto, caso no início da cultura as microalgas sejam sujeitas a estas intensidades, vai ocorrer stress ou mesmo lise celular das células, limitando o seu crescimento normal.

Os sistemas em contínuo, apesar de não terem as limitações acima referidas, é necessário controlar as condições de cultura de igual modo.

2.6.1. Luminosidade

O efeito da luz e a sua interação da mesma com as microalgas representa uma grande parte dos estudos efetuados nesta área. Alguns dos aspetos estudados centram-se na caracterização da luz, nomeadamente o comprimento de onda, intensidade luminosa, ciclos de dia/noite⁴² e noutros casos, nas áreas de superfície dos biorreatores e o percurso ótico da luz dentro do biorreator⁴³. Em especial, nas microalgas autotróficas, este é o parâmetro mais importante a controlar.

A combinação entre nutrientes, CO₂ e luz permite aos cloroplastos produzirem energia essencial para o metabolismo das microalgas e para o seu crescimento. No entanto, é importante controlar não só a intensidade da luz, como também os seus comprimentos de onda.

As microalgas apresentam diferentes rácios de clorofila a, b e c, absorvendo variados comprimentos de onda. Assim, a otimização dos comprimentos de onda emitidos pela fonte de luz a utilizar, pode traduzir-se a uma diminuição nos gastos de energia, evitando os comprimentos de onde de luz que as microalgas não têm a capacidade de absorver. Em situações *indoor* o uso de LEDs pode potenciar o seu rendimento⁴⁴.

Como a luz não afeta apenas o crescimento, mas também os metabolitos que as microalgas produzem, o uso de determinados comprimentos de onda permite aumentar a quantidade de metabolitos produzidos e acumulados pela microalga especialmente os pigmentos e os lípidos⁴⁵.

As luzes azuis, 400-450nm, e as luzes vermelhas, 650-700nm, são as ondas de luz que as microalgas têm maior capacidade de absorção.

2.6.2. Nutrientes

Os nutrientes mais usados, tanto na indústria como na investigação, são vendidos por empresas onde os meios de cultura vêm preparados em quantidades pré-estabelecidas de modo a satisfazer um maior número de espécies. Estes são divididos em macro e micronutrientes, apresentando também, embora em menores quantidades, alguns metais essenciais e vitaminas, como é o caso do magnésio e do ferro⁴⁶.

O controlo dos nutrientes no meio de cultura tem especial importância, pois pode influenciar a produção de certos produtos de interesse. Por exemplo, o rácio entre os fosfatos e os nitratos tanto influencia o comportamento do crescimento da biomassa, como a sua capacidade de produzir e acumular determinados compostos. Neste sentido, já existem vários estudos demonstrando que a cultura de microalgas em duas etapas sucessivas com meios de cultura diferentes consegue influenciar a acumulação e produção de produtos com alto valor comercial^{12,46}.

Os meios de cultura são preparados de maneira a permitir o crescimento de várias espécies de microalgas, apesar destas terem diferentes *uptakes* de nutrientes. Deste modo, é importante efetuar a otimização dos referidos meios, ainda que seja apenas uma pequena alteração, de forma a permitir que a microalga em questão obtenha uma maior quantidade de biomassa no final da cultura, aumentando o seu rendimento.

Neste âmbito, os principais macronutrientes a otimizar são o carbono, nitratos e os fosfatos, devido à sua importância no metabolismo celular, associados a alguns metais essenciais, que devido à sua baixa quantidade, são denominados por *trace elements* do meio de cultura⁴⁷.

Tal como acontece com a luminosidade, também é possível usar os nutrientes para induzir stress às microalgas e conseqüentemente aumentar a produção de certos compostos. Como referido no início do capítulo, o uso de uma elevada intensidade de luz vai induzir os mecanismos de defesa da microalga, embora no caso do controlo dos nutrientes, a técnica usada para indução de stress não seja o seu excesso, mas, pelo contrário, a sua escassez.

Este método é denominado por *starving* e baseia-se em retirar por completo um dos principais nutrientes usados pelas microalgas, sendo normalmente os nitratos ou os fosfatos^{47,48}. A caracterização do meio torna-se assim essencial para qualquer ensaio com microalgas, devido ao impacto deste no metabolismo das células.

2.6.3. Carbono

O composto mais importante para o crescimento das microalgas é o carbono. A biodisponibilidade deste é indispensável para o crescimento das microalgas nos mais diversos sistemas, sejam estas autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas.

No caso do modo heterotrófico, a fonte de carbono é orgânica, sendo que as mais usadas são a glucose, a sacarose e o etanol, devido à elevada energia por mol de substância⁴⁹. Este tipo de microalgas é muito usado no tratamento de efluentes devido à sua capacidade de usar diferentes fontes de carbono, tenham estas origem em afluentes industriais ou domésticos.

No caso das microalgas autotróficas, estas conseguem transformar o carbono inorgânico em energia. Devido ao elevado consumo deste composto pelas microalgas, muitas vezes é necessário enriquecer a cultura com CO₂ por injeção, com o propósito de aumentar a quantidade de dióxido de carbono dissolvido no meio. O borbulhamento de CO₂, em conjunto com ar, permite uma maior disponibilidade do CO₂ e ajuda na agitação do biorreator¹⁷.

2.6.4. Fosforo e azoto

Em conjunto com o carbono, estas duas moléculas são as que se encontram em maior quantidade na biomassa algal, como tal, tornam-se essenciais nos diferentes meios de cultura. A capacidade de efetuar biorremediação de diversos nutrientes, as microalgas conseguem alterar o seu Rácio de Redfield (rácio molar de C:N:P) conforme o rácio destes nutrientes no meio de cultura. Esta capacidade de adaptação permite manipular o *uptake* dos diferentes nutrientes induzindo a produção e acumulação de diferentes compostos com possível interesse.

Os restantes nutrientes podem variar consoante o tipo de microalgas e são altamente específicos para o modo de alimentação. No caso das microalgas de água doce, os mais comuns são o BBM, KM1, B1M5, BG-11, apresentando diferentes quantidades e fontes de nutrientes, sendo necessária a sua otimização para as microalgas em estudo, tendo sempre atenção aos compostos obtidos⁴⁶.

2.6.5. Temperatura

As microalgas encontram-se presentes nos mais diversos ambientes. Dependendo da temperatura, podem ser classificadas de mesotróficas, termofilias e psicrófilas, sendo o seu crescimento viável entre os -17°C e os 40°C. No entanto, segundo estudos efetuados, as espécies mais exploradas apresentam melhor crescimento entre os 20° e os 25°C⁵⁰. A temperaturas fora desta gama vai corresponder a diminuição da taxa de crescimento celular, podendo causar danos nas células e conseqüentemente a sua lise.

O principal efeito da temperatura na microalga diz respeito à sua atividade enzimática. A uma temperatura mais baixa à que a célula está aclimatizada, vai corresponder uma diminuição da sua atividade e, conseqüentemente, do seu metabolismo, enquanto que uma temperatura superior pode inibir a atividade enzimática, provocando problemas idênticos aos da temperatura com valores mais baixos.

O controlo da temperatura apresenta diversas limitações, especialmente, nos sistemas de cultura *outdoor*, onde a temperatura está maioritariamente dependente do ambiente e conseqüentemente, sofrendo maiores oscilações.

Nos estudos realizados ao longo deste projeto, as oscilações tiveram efeitos negativos no crescimento da biomassa demonstrando, assim, a relevância do seu controlo e do seu equilíbrio ao longo do tempo de cultura^{31,50}.

2.6.6. pH

O pH é um elemento crítico no controlo do meio de cultura, pois influencia a quantidade de compostos carbonatados no meio de cultura, uma vez que o seu valor influencia diretamente o CO₂ dissolvido disponível para as microalgas, bem como a solubilidade de alguns nutrientes⁵¹.

Grande parte das culturas de microalgas apresentam um crescimento ótimo entre pH 6 e 9, sendo por isso importante o controlo do pH, que pode ser ajustado com adição de CO₂.

Um aumento do dióxido de carbono no meio de cultura, vai provocar a redução do pH. O controlo tem especial relevância quando os meios de cultura apresentam grande densidade, uma vez que o metabolismo celular e a produção de metabolitos extracelulares aumentam o pH. A injeção de CO₂ permite ajustar e controlar os níveis de basicidade do meio criados pelas microalgas⁵² de uma forma suave e equilibrada .

No meio de cultura, durante o metabolismo das microalgas, nomeadamente no caso de espécies que fazem fotossíntese, a adição de CO₂ apenas necessita de ser efetuada durante o ciclo de dia da cultura, sob pena de reduzir em demasia o pH durante o ciclo da noite, altura em que as microalgas não utilizam o carbono no meio de cultura.

A figura 2.4 ilustra o efeito do pH sobre as espécies químicas derivadas do CO₂ presentes no meio.

A diminuição do pH para valores superiores ao intervalo de conforto das microalgas, irá induzir stress e consequentemente inibir o crescimento celular.

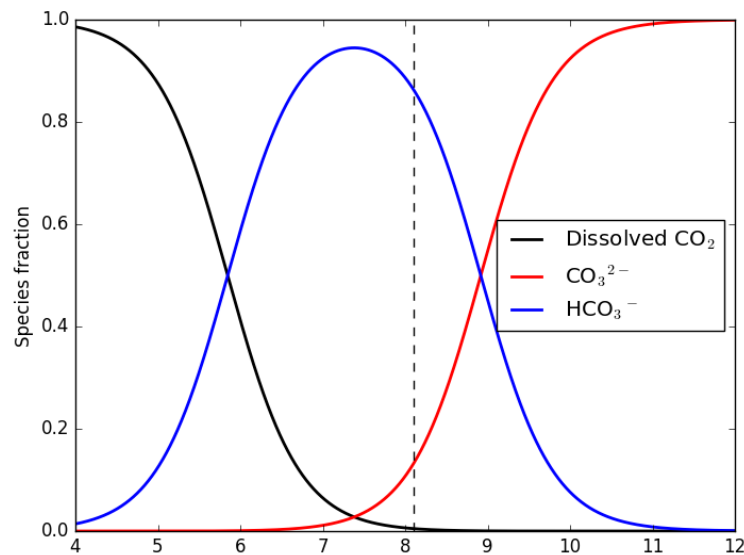


Figura 2.4 – Efeito do pH na disponibilidade do dióxido de carbono

Em casos específicos, o uso de culturas com valores de $5 < \text{pH} < 10$ permite solucionar alguns problemas do meio. Valores extremos de pH, no caso das microalgas o suportarem, podem ajudar a controlar contaminações por bactérias, fungos e outros microrganismos cuja presença pode comprometer a cultura a explorar.

2.6.7. Agitação

A agitação é necessária para ocorrer uma homogeneização dos nutrientes no meio de cultura, bem como para prevenir a sedimentação da biomassa, permitindo assegurar que todas as células estão igualmente expostas à luz e aos nutrientes⁵³.

Existem distintos métodos para a agitação dos diferentes tipos de sistemas. Contudo, falamos apenas dos mais usados:

- Agitação manual, no caso de sistemas laboratoriais e de pequena escala;
- Arejamento, para pequenos e médios sistemas;
- Agitação mecânica, seja esta induzida por bombas ou pelas pás de agitadores; método usado, principalmente, em sistemas industriais.

Independentemente do método utilizado para agitar o meio, é importante que daí não resulte grande produção de energia térmica, bem como que a agitação não induza tensões de corte superiores às que as microalgas suportam.

Devido à existência de tensões de corte, é importante controlar a intensidade de agitação, de modo a fornecer entropia suficiente para a homogeneização do meio de cultura, porém sem induzir stress às microalgas.

2.7. Modos de operação

A maioria das microalgas exploradas apresentam um metabolismo fotossintético, sendo este limitado pela intensidade da luz, como consequência da elevada concentração de biomassa no fotobiorreator. No entanto, não são apenas estas as microalgas exploradas. Microalgas heterotróficas e mixotróficas conseguem crescer em ambientes com ausência de luz, eliminando os fatores limitantes previamente referidos⁵⁴.

De acordo com as diferentes características de crescimento e da necessidade das células, é imprescindível otimizar os modos de operação de produção, consoante o produto de interesse e o metabolismo da microalga.

Atualmente, são usados três modos de operação com o objetivo de responder diferenciadamente às várias culturas

2.7.1. Descontínuo (Batch)

Este modo de operação é dos mais usados, devido à simplicidade do processo. Uma pequena quantidade de uma cultura de microalgas é adicionada ao meio de cultura inicial, originando um crescimento de biomassa ao longo do tempo. Com o aumento da biomassa, os fatores limitantes vão surgindo. No caso de culturas com microalgas fotossintéticas, o aumento da concentração da biomassa vai dificultar o processo, reduzindo a intensidade de luz ao longo do percurso ótico dentro do fotobiorreator condicionando o crescimento da cultura⁵⁵.

Em consonância com a limitação de luz, neste sistema também não ocorre uma alimentação de nutrientes. Assim, com o aumento da biomassa juntamente com o metabolismo celular, a escassez de nutrientes não permite obter uma concentração de biomassa equiparável aos restantes métodos.

Apesar das limitações, o modo descontínuo é um dos mais usados à escala industrial como no laboratório, devido à facilidade com que se efetua o controlo, bem como devido

à capacidade de transformar os seus fatores limitantes em vantagens, consoante os produtos finais de interesse⁵⁶. A título de exemplo, neste modo de operação, no final da cultura, devido à escassez de nutrientes e à limitação de luz, as microalgas encontram-se num meio mais “hostil” ao seu crescimento. Como resposta às condições desfavoráveis, estas são capazes de produzir uma maior quantidade de metabolitos, em detrimento da continuação do aumento da biomassa.

Atualmente, para a otimização da biomassa e da produção de metabolitos é necessário efetuar dois Batch: inicialmente com o objetivo de aumentar a biomassa algal e, posteriormente, após alteração do meio, com o propósito de aumentar a produção e a acumulação de produtos.

2.7.2. Semi-contínuo (Fed-Batch)

O método semi-contínuo foi desenvolvido para responder a alguma das limitações do método descontínuo. Neste caso, vão ser adicionados pequenas quantidades de nutrientes ao longo da cultura. A adição de nutrientes de forma descontínua vai aumentar a taxa de crescimento e conseqüentemente a biomassa no fim da cultura⁵⁷.

Este método é mais usado quando existe alguma inibição pelo substrato, como é o caso do uso de etanol como fonte de carbono das microalgas.

Em comparação com o método descontínuo, este permite a obtenção de uma maior quantidade de biomassa e, devido à renovação do meio, uma elevada taxa de reprodução celular.

2.7.3. Contínuo

O modo contínuo é um sistema aberto onde são adicionados, a um fluxo constante, nutrientes ao meio de cultura, no biorreator. À medida que os nutrientes são adicionados, é extraído meio de cultura, de modo a manter o mesmo volume durante todo o processo de cultura⁵⁸. Ao contrário dos métodos anteriores, este modo de operação permite manter uma densidade de biomassa constante, eliminando os problemas associados à difusão da luz no fotobiorreator. As culturas conseguem permanecer com estas características num período superior a 3 meses e com grande taxa de produtividade⁵⁹.

Devido ao resultado deste modo de operação, o mesmo é muito usado para o tratamento de efluentes, apesar de ser um método mais complexo, em relação aos anteriores para a produção de biomassa.

A renovação do meio de cultura permite não só adicionar nutrientes, como também extrair metabolitos com potencial de inibir o crescimento celular mantendo assim as condições ideais para o crescimento das microalgas ao longo de um espaço de tempo, teoricamente, ilimitado.

Uma das maiores limitações deste modo de operação é a dificuldade em otimizar o fluxo de alimentação de nutrientes devido à necessidade de renovar o meio de cultura. A reciclagem do meio após remoção da biomassa pode ser uma das possíveis soluções a este problema.

2.8. Tipos de biorreatores

Os biorreatores são usados para o cultivo de micro e macroalgas e visam criar as condições mais adequadas ao metabolismo da microalga, proporcionando crescimento de biomassa, tratamento de efluentes, fixação de CO₂ e produção de compostos⁶⁰. É importante destacar que os biorreatores para crescimento de microalgas têm que ter condições especiais quando comparados a biorreatores/fermentadores designados para fungos, bactérias e leveduras, destacando-se a capacidade de efetuar trocas gasosas e a difusão da luz ao longo do biorreator⁶¹.

2.8.1. Open Pond ou Raceways (Lagoa aberta/ Lagoa de pista)

Open pond/ raceways (Fig 2.5), tal como o nome sugere, este tipo de biorreator de grande escala, encontra-se totalmente exposto ao meio ambiente. É usado, essencialmente, para microalgas fototróficas tendo como fonte de energia, a luz solar.

As principais características que fazem destes sistemas os mais utilizados a nível industrial e em grande escala, são o baixo custo ao nível de construção, manutenção e operação.

A otimização destes biorreatores, sendo muito importante, pode ser efetuada com adição de borbulhamento de CO₂ e de nutrientes ao longo do percurso.

No entanto, nem todo o tipo de microalgas, pode ser usado neste sistema, devido ao facto de existirem algumas dificuldades ao usar determinadas microalgas.

A contaminação bacteriana ou mesmo por outras microalgas é uma das principais dificuldades presentes nestes sistemas; existindo alguns métodos que permitem reduzir a probabilidade destas situações acontecerem, nomeadamente elevar o nível do pH e/ou da salinidade e da temperatura⁶². Contudo nem todas as microalgas fotossintéticas conseguem permanecer nestas condições adversas.

A exposição do reator ao ambiente apresenta diversas consequências, nomeadamente: o favorecimento da evaporação, ausência de controle da temperatura, baixa concentração de CO₂, irregularidade da distribuição da luz e, em conjunto com uma potencial sedimentação da biomassa, ocorre uma diminuição da rentabilidade deste sistema quando comparado aos restantes.

Atualmente, a pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de grande escala (ex. biorreatores tubulares) veio permitir o tratamento de iguais volumes, mas com concentrações de biomassa bastante superiores a estes sistemas que, aparentemente, já chegaram ao seu limite de desenvolvimento e otimização⁶¹.



Figura 2.5 – Ilustração de um *raceway*

2.8.2. Fotobiorreatores fechados

Os sistemas de fotobiorreatores (Fig 2.6) são os que apresentam maior diversidade de designs e funções podendo ser usados em sistemas com capacidade inferior a um litro a sistemas com milhares de litros⁶².

O controlo das condições de cultura nestes sistemas é mais eficaz, e apesar de apresentar maiores custos, as concentrações de biomassa são bastantes mais elevadas permitindo o retorno do investimento⁶².

A diversidade de designs permite otimizar diferentes parâmetros da cultura, tais como as trocas gasosas, a agitação e o percurso ótico.

A principal aplicação deste tipo de biorreatores são as microalgas autotróficas e mixotróficas, devido à elevada superfície exposta à luz, podendo esta ser natural ou artificial.

Em comparação com lagoas abertas, as principais vantagens destes sistemas em relação aos *opens ponds* são o risco de contaminação ser bastante inferior e permitirem um melhor controlo das condições da cultura, potencializando o crescimento algal⁶³.

Como já referido, devido às necessidades de maior controlo, o custo de funcionamento e do equipamento é superior sendo necessário que o produto final apresente um valor

superior nomeadamente através da produção de antioxidantes e proteínas com função terapêutica.

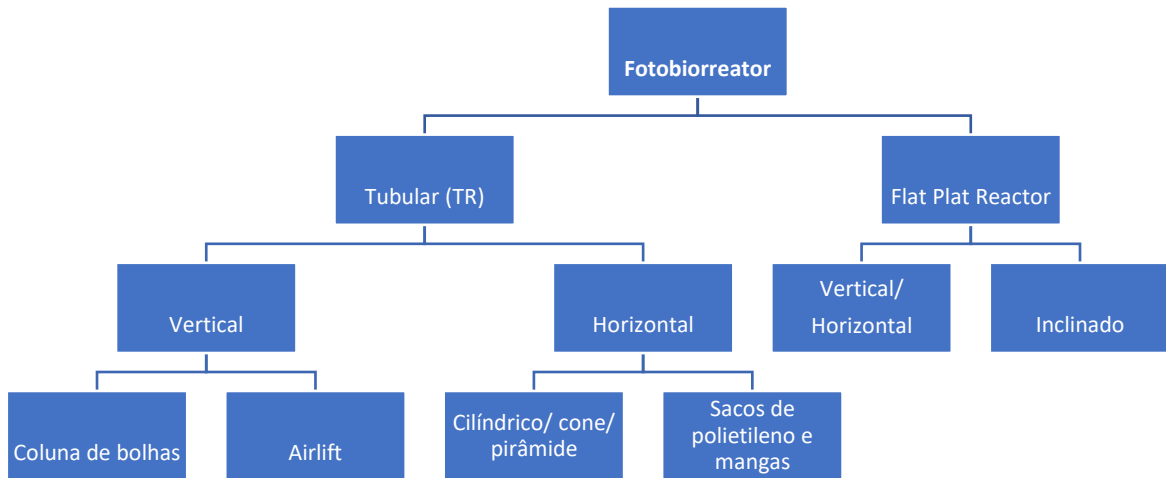


Figura 2.6 – Designs de biorreatores aplicados ao cultivo de microalgas

2.8.3. Fermentadores

Este tipo de biorreatores foram criados após adaptação de fermentadores usados em microrganismos heterotróficos, como é o caso de alguns fungos e bactérias.

De facto, este tipo de reator aproveita a capacidade de adaptação de algumas microalgas, como a *Chlorella vulgaris* e a *Dunaliella sp*, de conseguirem crescer e proliferar em meios heterotróficos.

O uso deste modo de crescimento vai permitir ultrapassar a grande maioria dos problemas associados aos outros tipos de culturas, nomeadamente:

- A dependência de luz, que encarece drasticamente o processo.
- A complexidade de controlo dos sistemas e a dificuldade em *upscale*⁶⁴.
- A necessidade de ter densidades baixas para facilitar a difusão da luz.
- As alterações do meio devido aos ciclos de dia/noite

As condições de cultura são bastante diferentes, começando pelo meio, no qual a fonte de carbono vai depender do metabolismo celular de cada tipo de microalga. Atualmente a glucose é a maior fonte de carbono orgânico seguida do acetato, lactato e outros açúcares⁶⁵. A glucose é assim considerada visto que, associado a um custo mais reduzido, apresenta a maior quantidade de energia por mol, 2,8kJ/mol, em comparação com as outras alternativas. Porém, as características de degradação destes compostos pelo

metabolismo celular aumenta a importância da biodisponibilidade de oxigênio no reator⁶⁶.

A biomassa produzida por este tipo de crescimento apresenta valores superiores de carboidratos e lipídios, quando comparados a sistemas autotróficos para o mesmo tipo de microalga (com capacidade para crescer em ambas as condições).

A grande variedade de biorreatores permite, assim, satisfazer todos os requisitos dos diferentes modos de crescimentos das microalgas, bem como, manipular o seu metabolismo de modo a atingir o interesse do projeto, quer seja ao maximizar a produção de biomassa, ou auxiliar no tratamento de afluentes e produzir compostos específicos para as mais variadas áreas.

2.9. Condições de stress

Atualmente, com os avanços de novas técnicas de investigação e devido ao aumento da exploração das microalgas, vão sendo conhecidos mecanismos intracelulares, que permitirão produzir compostos mais procurados por este tipo de mercado. A melhor compreensão dos mecanismos e a capacidade da sua manipulação através de fontes externas (stress) permitem o desenvolvimento de novos sistemas mais produtivos e rentáveis que podem ajudar a ultrapassar algumas das barreiras e a eliminar receios associados à exploração destes microrganismos⁶⁷.

As condições de stress podem ser separadas em dois grupos consoante as características do produto final pretendido, nomeadamente os lipídios e os pigmentos.

O entendimento dos diferentes mecanismos permite incentivar a microalga a produzir em maior quantidade um composto em detrimento do outro por exposição a ambientes de stress diferentes.

2.9.1. Produção lipídica

Os lipídios provenientes de microalgas são usados, maioritariamente, para dois fins dependendo do tamanho da sua cadeia de carbono, o biocombustível e a alimentação humana/animal³⁹.

Em organismos unicelulares, a biossíntese lipídica segue por um complexo mecanismo que após degradação da fonte de carbono, sucede a formação de Acetyl CoA. Após o Ciclo de Krebs, o Acetyl CoA é transformado, em conjunto com os nutrientes retirados do meio, em glutamina. A glutamina é posteriormente transformada em ácidos gordos, podendo

estes serem saturados ou insaturados sendo este rácio manipulável pelas diferentes condições do meio de cultura⁶⁷.

Os principais fatores de stress que aumenta a produção de lípidos são a temperatura, a intensidade luminosa e a concentração de nitratos no meio de cultura.

Estando a sua influência sintetizada no seguinte esquema (Fig 2.7):

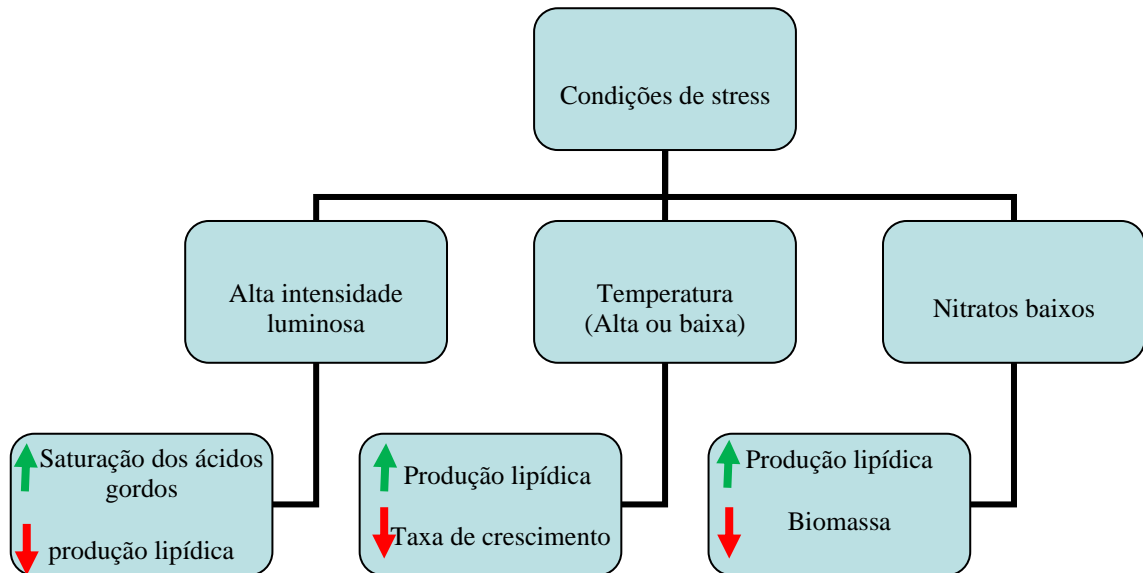


Figura 2.7– Vantagens e desvantagens dos vários métodos de stress para a produção de lípidos.

O controlo das condições de stress tem, assim, de ser monitorizado de modo a não induzir um elevado stress nas microalgas evitando reduzir a biomassa de tal forma que não compense o aumento efetuado ao mecanismo de produção lipídica pelo stress.

A otimização deste tipo de técnica, no sentido de manipular o mecanismo celular, exige um estudo antecipado que avalie a relação do aumento da produção de lípidos com a diminuição da biomassa da cultura, emergindo um ponto intermédio ideal.

2.9.2. Produção de carotenoides

Como referido anteriormente, as microalgas são bastante exploradas devido à sua capacidade de produzir diferentes compostos, sendo os pigmentos um dos principais produtos explorados.

Existem três grandes grupos de pigmentos. No entanto, atualmente, devido às diversas propriedades dos carotenoides, estes têm sido os mais explorados.

Existem mais de 600 carotenoides nas plantas onde se incluem as microalgas, sendo a sua principal função a proteção da microalga em condições desfavoráveis³⁵.

Em resultado da sua função nas microalgas, a manipulação para otimizar a produção destes compostos é possível de realizar, nomeadamente através de indução de stress, a este mecanismo é designado por carotenogénese.

A carotenogénese é influenciada pela presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) no interior da célula, sendo estes compostos criados em ambientes com elevada intensidade luminosa e em grande salinidade¹⁴.

Peróxidos, superóxidos, radicais de oxigénio e de hidroxilo são algumas das espécies dos compostos ROS. A redução da molécula de oxigénio, induz a produção de radicais, sendo estes que ativam o mecanismo de defesa da célula, seja esta animal ou vegetal⁶⁸.

O melhor entendimento das vias de carotenogénese, bem como, da indução de formação de ROS intracelularmente irá providenciar dados extremamente importantes para aumentar a eficiência da produção de carotenoides.

2.10. Recuperação da biomassa

A biomassa proveniente das microalgas apresenta uma elevada quantidade de componentes sendo maioritariamente constituída por carboidratos, tornando-a numa excelente fonte de energia⁶⁹ tanto para a alimentação como para biocombustíveis. No entanto, a extração deste produto apresenta um grande desafio devido à escala dos biorreatores e à necessidade de empregar o método mais eficiente do ponto de vista energético, amigável ao ambiente e economicamente viável.

Segundo vários estudos, o processo de recolha representa 20-30% do custo total da produção e recolha^{70,71}, salientando-se a importância de avaliar as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de recuperação. As maiores dificuldades de recolha decorre da semelhança de densidades entre as microalgas e a água (dificulta a centrifugação), a baixa força iónica do meio de cultura (dificulta a sedimentação) e a necessidade de concentrar a biomassa devido à baixa densidade dos meios de cultura, raramente são acima dos 10g/L⁶⁹.

As respostas a estes problemas passam pela filtração, centrifugação, floculação e flotação⁷².

2.10.1. Filtração

Este método utiliza uma membrana semi-permeável que permite a retenção das microalgas na membrana, mas que não impede a passagem do meio de cultura.

Uma das vantagens deste método é o baixo stress induzido às microalgas, sendo um dos métodos mais usados para espécies sensíveis, em especial, às tensões de corte. No

entanto, como grande parte dos métodos de filtração, a coagulação e o *fouling* membranar dificultam a praticabilidade deste processo a grande escala⁷².

2.10.2. Centrifugação

A centrifugação baseia-se na diferença de densidades e tamanho de partícula das microalgas com o meio de cultura. Este método é mais aplicado em pequenas escalas devido ao elevado consumo de energia e ao tempo necessário para a centrifugação de grandes volumes⁷¹. O uso desta técnica pode provocar lesões na membrana celular, tornando-a inviável aquando da extração de compostos sensíveis, podendo estes serem degradados quando expostos ao meio de cultura.

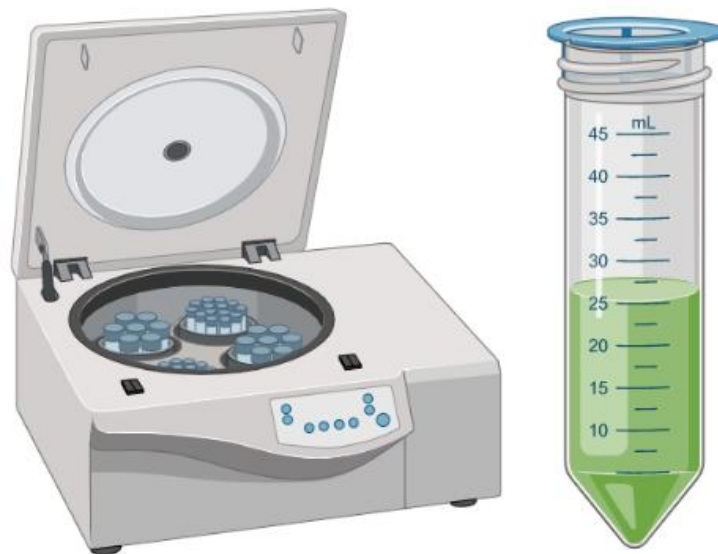


Figura 2.8– Exemplo de um sistema de centrifugação laboratorial

2.10.3. Floculação

A floculação é um processo onde as células das microalgas se aglomeram formando uma partícula de maior dimensão, o denominado floco. Esta transformação pode ser alcançada com ajuda de agentes de floculação: estes podem ser divididos em bio-floculantes e floculantes químicos. Atualmente, existe um grande número de agentes floculantes usados, mas os mais usados nesta indústria são os sais de ferro e sais de alumínio. No entanto, os agentes químicos não são biocompatíveis e necessitam de ser removidos para posterior tratamento das microalgas, o que representa um custo.

Os bio-floculantes estão continuamente a ser explorados para responder a esta desvantagem. Os mais usados têm sido os bio polímeros como o quitosano, cujas

características permitem o uso de menos quantidade de agente floculante e com percentagens de recuperação acima dos 90% ⁷³.

Dentro das várias técnicas já referidas, a floculação é considerada a mais eficiente e conveniente pois, pode ser utilizada nas mais diferentes condições de cultivo.

2.10.4. Flotação

A flotação é uma separação na qual bolhas de gás se ligam às células das microalgas, arrastando-as para a superfície do meio de cultura. A flotação é assim, muitas vezes, identificada como o oposto da sedimentação. Existem quatro métodos de flotação, nomeadamente flotação por ar dissolvido, ar disperso, flotação eletrolítica e por dispersão de ozono⁷¹. Em conjunto com a flotação, podem ser usados agentes floculantes de modo a facilitar a ligação entre as bolhas de gás e as partículas de biomassa. Apesar de ser eficiente, este método é usado mais restritamente, pois nem todas as condições de cultura apresentam as características necessárias para a eficácia do processo.

A recuperação de biomassa pode não ocorrer num processo único, devido á complexidade e condições dos meios de cultura. Um pré-tratamento e/ou uma concentração da biomassa pode ser necessário para melhorar a eficiência de recuperação, bem como diminuir o tempo do processo, por exemplo, ao diminuir o volume de meio a ser tratado.

Em suma, os diferentes métodos de recuperação de biomassa podem ser usados como processos individuais ou em conjunto (ex. Floculação/flotação), de modo a aumentar a eficácia dos mesmos e diminuir os custos associados. O produto final destes métodos pode ser apresentado em biomassa seca, húmida ou mesmo liofilizada, consoante o destino seguinte pretendido.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

A água desmineralizada é obtida no sistema RIOs™ 3 (Milipore, Estados Unidos); o CO₂ foi fornecido engarrafado, pela empresa Praxair (Porto, Portugal); o metanol e a acetona foram fornecidos pela LabChem (Zelienople, Pensilvânia, E.U.A.); a Astaxantina e o β-caroteno foram fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich (Missouri, E.U.A.).

3.1.2. Microalgas e meio de cultura

As microalgas utilizadas para os ensaios são da espécie *Haematococcus pluvialis* Flotow (CCAP 34/7) e *Chlorella Vulgaris*, tendo sido fornecidas pelas empresas Culture Collection of Algae and Protozoa (Escócia, Reino Unido) e Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal) respetivamente.

O meio utilizado para o crescimento das microalgas foi o meio GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS), preparado a partir dos nutrientes fornecidos pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal). A partir dos nutrientes, foram preparadas 4 soluções stock (soluções 1, 2, 3 e 4), com as concentrações que constam da tabela 3.1. Para as condições standard de cultura das microalgas, são usados 10 ml da solução stock da Tabela 3.1, para cada litro de meio, conduzindo as concentrações finais de 70 mg N/L, 20,46 mg P/L, 14,8 mg Mg/L, 13,6 mg Ca/L, para além dos oligómeros e vitaminas. O meio modificado (GM-M) é produzido com adição de 114 mg/L de KH₂PO₄, atingindo a concentração final de 46,4 mg P/L.

Tabela 3.1 - Composição das soluções stock de nutrientes e final.

Nutriente	Solução	Solução Stock (mg/L)	Solução Final (mg/L)
N (NaNO ₃)	1	7000	70
P (KH ₂ PO ₄)	1	2046	20,46
Mg (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2	1480	14,8
Ca (CaCl ₂)	3	1360	13,6
Oligómeros e vitaminas	4	1450	14,50

3.1.3. Instalação

As microalgas foram cultivadas em frascos “Schott”, Erlenmeyeres (ensaios de stress) e provetas de 1L dentro de um banho térmico de vidro transparente, com 50% do seu volume preenchido com água, com temperatura controlada (23°C a 25°C), de modo a eliminar as variações térmicas que influenciam o crescimento das microalgas. Este sistema encontra-se sobre dois agitadores magnéticos que permitem a homogeneização do meio sem provocar tensões de corte elevadas ao qual as microalgas são sensíveis. A estante de cultura de microalgas, fornecida pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal), está equipada com uma bomba de ar modelo v-60 da Hailea (Guangdong, China), para fornecimento de ar, possuindo filtros de nylon e válvulas para controlo do fluxo (Figura 3.1).

De modo a poder controlar os diferentes parâmetros, o sistema encontra-se acoplado a um controlador digital, nomeadamente para controlo dos ciclos de dia/noite e controlo dos pulsos de dióxido de carbono.

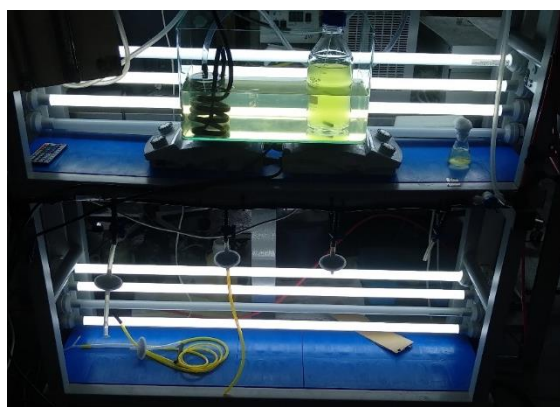


Figura 3.1 - Instalação do equipamento.

Para os ensaios nos quais a intensidade da luz aumentou ao longo do tempo de cultura, foi desenvolvido um sistema (Fig 3.2) baseado em LEDs PRO, da marca MAXLED, que permitem um controlo da intensidade da luz com valores entre os 2 e os 312 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, medidos no centro de um fotobiorreator vazio, a cerca de 5 cm da fonte luminosa.

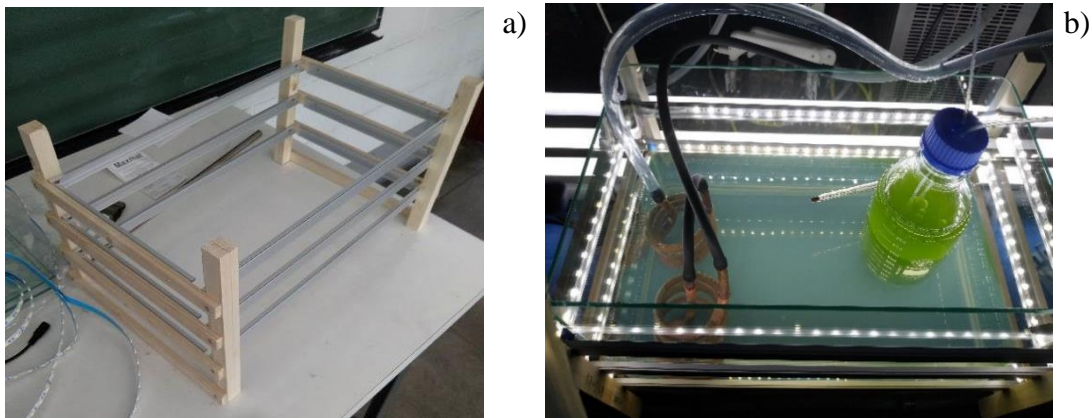


Figura 3.2 – a) Montagem do sistema de LEDs; b) Ensaio do sistema

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de biomassa algal

A produção de biomassa foi realizada em vários tipos de fotobiorreatores, de modo a avaliar a sua eficiência, tanto ao nível da produção de biomassa, como ao nível dos vários produtos de interesse.

O meio de cultura FWS-GW e o CO_2 foram otimizados, de modo a produzir uma maior quantidade de biomassa durante um menor tempo de cultura, mantendo o pH neutro. O fluxo de CO_2 foi sendo alterado de modo a obter uma concentração de CO_2 dissolvido entre os 20-30 mg/L no meio de cultura. Ao longo do processo de cultura, o CO_2 dissolvido foi medido com o teste Permanent CO_2 Plus pH da JBL (Alemanha).

O fluxo de ar foi fixo, sendo este fornecido por uma bomba de ar modelo V-60 da Hailea (Guangdong, China), após filtração em filtros de nylon, com tamanho de poro de 0,45 μm , para evitar contaminações.

Devido ao formato do fotobiorreator é necessário um elevado fluxo de ar para obter homogeneidade, resultando em um possível stress nas microalgas. Deste modo foi adicionado mais um método de agitação, nomeadamente agitação magnética. Ao usar na zona inferior da cultura um agitador magnético (100rpm) foi possível a diminuição do fluxo de ar, mantendo a agitação necessária para a homogeneidade da cultura.

3.2.1.1. Produção de biomassa algal em biorreator cilíndrico de 1L (8,6cm de diâmetro)

O reator consiste em frascos cilíndricos do tipo “Schott” de 1L, em sistema airlift e com agitação magnética. A geometria do vaso proporciona no máximo uma área/volume de 452 cm²/L, quando está exposto a luz de ambos os lados do sistema (Figura 3.3). No processo de otimização do meio e de CO₂, a exposição foi de um só lado, tendo-se considerado como área efetiva 226cm²/L.

O CO₂ foi injetado de 10 em 10 minutos, durante a fase de dia (12h/12h), durante 10 segundos ou 15 segundos, dependendo do pH do meio de cultura e da quantidade de biomassa no sistema, de modo a obter uma concentração de 20-30 mg/L de dióxido de carbono dissolvido.

O caudal de ar inicial foi de 0,8 L/(L meio.min), sendo este posteriormente adaptado para 0,35 L/(L meio.min).



Figura 3.3 - Fotobiorreator cilíndrico de 1 L, com 8,6cm de diâmetro durante os ensaios.

3.2.1.2. Produção de biomassa algal em biorreator cilíndrico de 1L (6 cm de diâmetro)

O reator air lift cilíndrico de 1L consiste num cilindro de vidro com 40 cm de altura por 6 cm de diâmetro, com uma área/volume de 753,6 cm²/L, apresentando uma exposição luminosa muito superior ao fotobiorreator apresentado anteriormente (Figura 3.4). No entanto, a sua homogeneização é mais difícil, apresentando tensões de corte superiores. Neste tipo de biorreatores o caudal de ar tem de ser superior, de modo a compensar a pressão induzida pela altura do reator, em conjunto com o propósito de não ocorrer sedimentação no fundo do sistema.

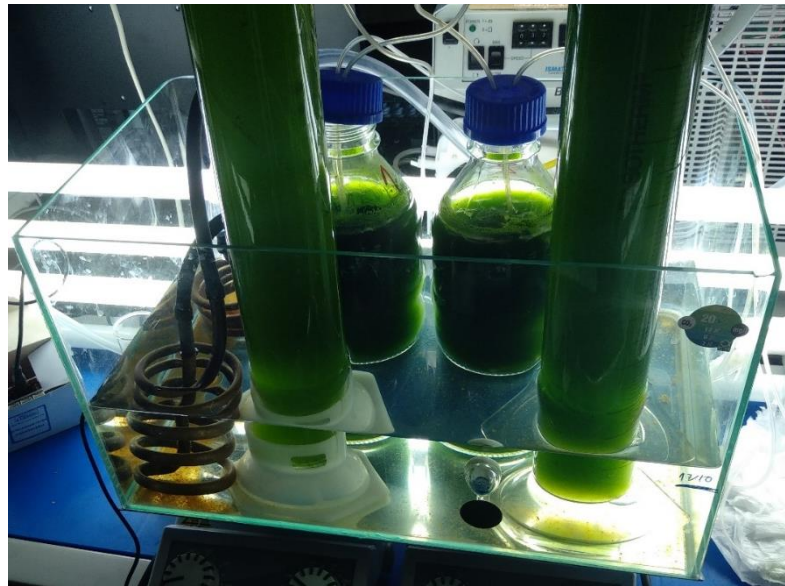


Figura 3.4 - Reator cilíndrico com menor diâmetro de 1L, com 5 cm de diâmetro.

3.2.1.3. Erlenmeyers 250mL – Ensaios de stress

Na segunda fase deste projeto, os ensaios de stress químico foram efetuados em erlenmeyers de 250mL (Figura 3.5) com agitação por borbulhamento de ar. Este tipo de sistema permite efetuar simultaneamente vários ensaios, possibilitando testar as várias concentrações do agente de stress em conjunto com as replicas necessárias para corroborar os resultados.



Figura 3.5 – Foto dos biorreatores para os ensaios de stress químico.

3.2.2. Indução de stress

Atualmente, a remoção de determinados nutrientes do meio de cultura, como é o caso do fosfato e do nitrato, associada a uma elevada intensidade luminosa são as técnicas mais usadas para gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) no meio intracelular.

Após a análise dos resultados de estudos efetuados sobre o uso de compostos geradores de ROS na superfície da folha do tabaco para influenciar o stress ao qual as células estão sujeitas⁷⁴, o uso desses compostos foi testado nas microalgas.

Na tentativa de induzir uma resposta de defesa ao expor as microalgas apenas a um tipo de ROS, foi usado o peróxido de hidrogénio em diferentes concentrações, com o objetivo de incrementar a produção lipídica e de carotenoides. Para comparação de resultados, em paralelo, foram efetuados ensaios nos quais a indução de stress foi efetuada pela remoção de nitratos e fosfatos.

Neste tipo de ensaios, a relação entre a concentração de biomassa da cultura e a concentração do ROS apresenta grande relevância, sendo importante um controlo sensível na fase inicial do ensaio.

As concentrações exploradas foram entre os 0,5 mM e os 15 mM para, sensivelmente, 2,5g/L de biomassa seca.

3.2.3. Controlo do processo

Com o objetivo de obter a maior base de dados possíveis com os diferentes ensaios é necessário controlar e monitorizar regularmente (2 em 2 dias) o estado das microalgas, bem como o seu crescimento.

3.2.3.1. Biomassa

Ao longo dos ensaios foi monitorizada a densidade ótica através de um espectrofotómetro, modelo Helios Omega (Thermo Scientific, Inglaterra), ao comprimento de onda mais indicado (680nm ou 750nm), sendo este parâmetro quantificado de 48 em 48 horas. Em paralelo com este método, foram efetuadas contagens, em triplicado, do número de células sendo utilizada a sua média no tratamento de resultados. Para este método foi usado uma câmara de Neubauer “Improved”. Após contagem do número de células, as unidades são convertidas para o volume de 1ml, através de fórmulas previamente estabelecidas.

O terceiro método para avaliar o crescimento foi efetuado através do peso da biomassa seca existente num determinado volume do meio de cultura. Para tal, retiram-se 10ml de amostra por ensaio, sendo de seguida recolhida a biomassa numa membrana de microfibras de vidro (47nm MFV3), previamente tarada, com ajuda de um filtro a vácuo. Após filtração e lavagem da membrana e da biomassa com água destilada, esta segue para uma estufa a 102°C durante 24h. A massa seca é calculada registando a diferença entre o peso da membrana antes da filtração e o peso da membrana com biomassa seca.

3.2.3.2. Luminosidade

A temperatura, pH e intensidade luminosa foram monitorizados através de sensores Arduino, conectados a um software Arduino IDE. Este sistema permite uma monitorização rápida dos referidos parâmetros, bem como um armazenamento de dados ao longo da experiência.

A monitorização e controlo da intensidade luminosa foi um dos parâmetros de maior relevância para este trabalho. O sensor de luz Grove TSL2561 permitiu monitorizar a intensidade luminosa no interior do meio de cultura permitindo acompanhar, por exemplo, a redução da intensidade luminosa ao longo do tempo de cultura ou permitindo aumentar a intensidade luminosa exterior fornecida ao biorreator ao longo do ciclo de crescimento. O sensor de luz Grove TSL 2561 foi adaptado de forma a poder ser inserido no meio de cultura. Para esse efeito, o sensor foi inserido e fixado dentro de um tubo de vidro fechado numa extremidade para garantir uma medição com elevada reprodutibilidade, de modo a diminuir as interferências do vidro na medição da intensidade da luz como é possível observar na figura 10.

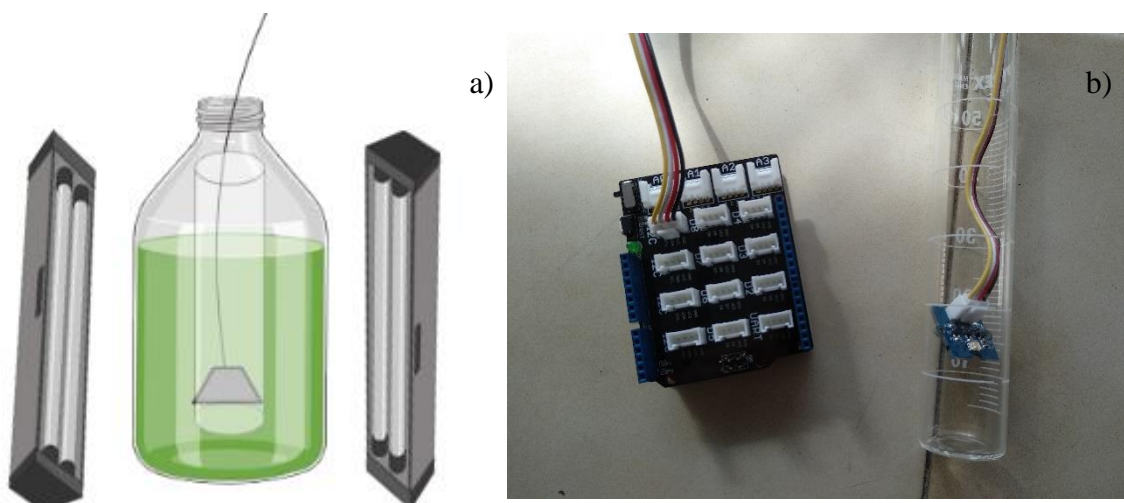


Figura 3.6 – a) Ilustração da medição de intensidade luminosa dentro do biorreator; b) Sistema montado.

No que respeita ao sistema de iluminação por LEDs (representado na figura 3.7), a sua intensidade é controlada por um comando. A partir da associação destes dois sistemas (sensores e LEDs) foi possível aumentar a intensidade da luz, à medida que aumenta a concentração da biomassa, de modo a estudar este fator limitante.

Com esta estratégia, foi possível manter a intensidade de luz no interior do biorreator sem, no entanto, induzir stress às microalgas quando estas estão em menor densidade. As características dos equipamentos emissores de luz são definidas em Lux's e pela cor de emissão, em conjunto com as características do sistema de cultura (geometria do sistema recetor e distância da fonte de luz), a avaliação em Lux não é adequada, sendo necessário a conversão de Lux's em PPFD (densidade do fluxo de fotões fotossintéticos ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)). Esta conversão pode ser efetuada com ajuda de dados já estabelecidos sobre as diferentes fontes de luz⁷⁵.

Ao longo dos ensaios foram usadas lâmpadas brancas fluorescentes e fitas LED 6500K, apresentando fatores de conversão 0,0014 e 0,01723 respetivamente. Estes valores foram tidos em conta ao longo deste trabalho experimental.

3.2.3.3. Caracterização do sistema de LEDs

As figuras 3.7 e 3.6 ilustram o sistema de LEDs e de quantificação da intensidade luminosa idealizados e construídos no laboratório para estudar a questão da possível limitação luminosa nas culturas.

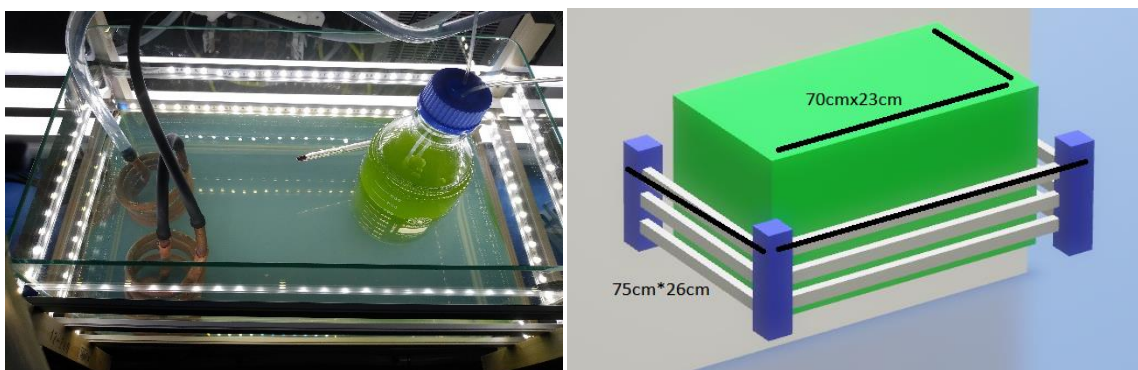


Figura 3.7 – Fotografia e esquema do sistema de iluminação por LEDs

O sistema de LEDs pode ser controlado entre o 1% e os 100% da sua intensidade luminosa, permitindo o aumento gradual da intensidade luminosa ao longo do ensaio. Para além dos LEDs, a montagem experimental inclui 4 lâmpadas florescentes que fornecem $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, sendo ainda possível ligar/desligar duas de cada vez.

A figura 3.8 mostra a variação da intensidade luminosa medida no centro da montagem, em $\mu\text{mol fotões /m}^2/\text{s}$ em função da intensidade dos LEDs, ilustrando assim a diferente quantidade de intensidades luminosas permitidas de gerar.

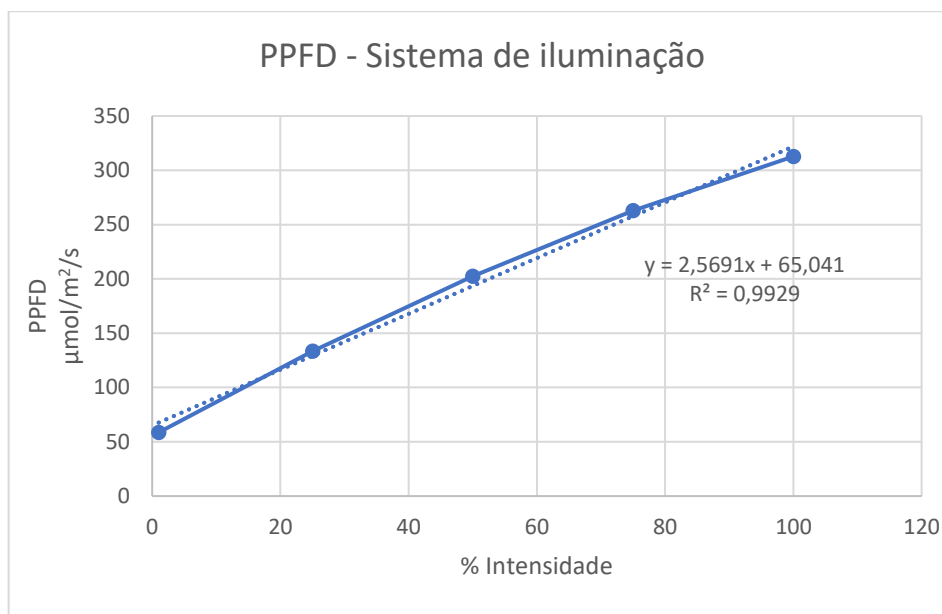


Figura 3.8 – Caracterização do sistema de LEDs + Lampâdas

Este sistema pode atingir os $312 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ($50\text{-}312 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$), sendo possível controlar dos $50 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ para cima. No caso da *C. vulgaris*, a intensidade luminosa ideal para o crescimento será entre os $30\text{-}45 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. Esta técnica irá permitir o aumento progressivo da luz, de modo a igualar estes valores **dentro do fotobiorreator** ao longo do ensaio.

3.2.3.4. Concentração de azoto e fosforo

No processo inicial de otimização do meio, é necessário identificar os fatores limitantes do crescimento da microalga. A nível de nutrientes, os dois compostos que as células consomem em maior quantidade são os fosfatos e os nitratos; deste modo, a sua concentração foi acompanhada usando os kits em cuvete LCK 339 e LCK 348 (Hach, Estados Unidos), para os nitratos e fosfato respetivamente (figura 3.9).

As leituras de absorvância das cuvetes foram realizadas por um espectrofotómetro (Figura 3.10) com tecnologia RFID modelo DR3900 (Hach, Estados Unidos da América) que indica a concentração dos compostos em mg/L.



Figura 3.9 – Kits para medição de nitrato e fosfato.



Figura 3.10 - Espectrofotómetro para leitura dos kits.

3.2.4. Extração e quantificação dos compostos

3.2.4.1 Extração de pigmentos

Para a extração de pigmentos tomou-se um volume de cultura que contivesse 200mg de biomassa seca. Para este efeito determinou-se previamente a concentração da biomassa. O volume do meio predefinido foi centrifugado a 3424 g, através de uma centrifugadora kn-70 da Kubota (Osaka, Japão), sendo o pellet lavado, ressuspendido e novamente centrifugado, de modo a eliminar possíveis interferentes na extração.

O pellet final foi ressuspendido numa solução de 15ml de acetona e metanol nas proporções de 2:1 v/v e posteriormente efetuada a lise celular das microalgas, através de um sonicador da Sonics Materials, Vibracell (Newtown, EUA).

A termo-sensibilidade dos pigmentos foi tida em conta, realizando pausas para arrefecimento da solução, entre os sucessivos períodos de sonicação evitando que a amostra sobreaquece.

Após lise, é efetuada uma nova centrifugação no qual o sobrenadante é recuperado e o pellet conservado a -20°C para posterior extração dos lípidos. O método foi repetido até não existir pigmentação no pellet, excepcionalmente foi necessário efetuar 2 vezes a extração.

Nas seguintes figuras (fig. 3.11 e 3.12) é visível a ausência de pigmentos no pellet após a extração e a diferença de pigmentação nos diferentes ensaios.

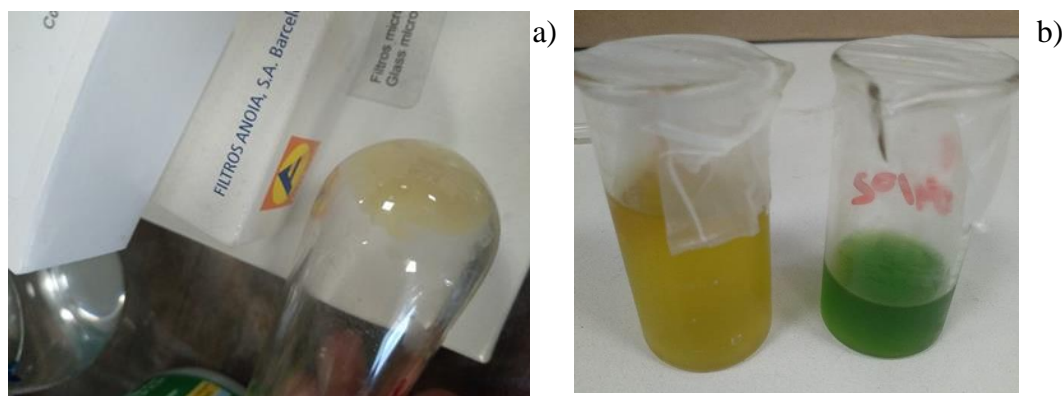


Figura 3.11 – a) Pellet após extração dos pigmentos; b) Solventes após extração dos pigmentos.

3.2.4.2. Extração de lípidos

O procedimento usado segue, no essencial o método de Bligh and Dyer (1959). A biomassa usada para a extração de lípidos resultou da extração dos pigmentos, correspondente ao pellet (representado na figura 3.11 a).

Os solventes usados para a extração são o clorofórmio e o metanol na proporção de 1:2v/v. Para cada extração foram utilizadas 10ml de solvente, sendo o pellet misturado durante 1 minuto com ajuda do sonicador. Após mistura, efetua-se uma centrifugação e o pellet é descartado, sendo posteriormente adicionados ao sobrenadante mais 4ml de clorofórmio e 4ml de água destilada, para ocorrer uma separação de fases.

Para ajudar na separação das duas fases dos solventes, a solução é centrifugada a baixas rotações (200-300rpm) durante 5 minutos.

No fim deste processo, o clorofórmio, em conjunto com os lípidos, são encontrados na zona inferior do tubo de ensaio e o metanol/água na zona superior, sendo esta fase descartada.

Os lípidos obtidos foram quantificados através de medições gravimétricas com base no peso obtido, após evaporação dos solventes.



Figura 3.12 - Sobrenadante recuperado após extração.



Figura 3.13 – Equipamento de evaporação rotativo

3.2.4.3. Quantificação dos compostos

Os solventes provenientes das extrações foram evaporados, utilizando um evaporador rotativo (Butchi, Flawil, Suíça) (Figura 3.13).

A quantificação lipídica, foi efetuada por pesagem após remoção dos solventes num balão volumétrico previamente seco e pesado.

Os pigmentos, após secagem, foram dissolvidos em metanol de qualidade HPLC e guardados a -20°C até posterior análise de identificação e quantificação.

4. Resultados e discussão

Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se e analisam-se os resultados obtidos relativos aos seguintes tópicos:

- Otimização do meio de cultura ([nutrientes], [CO₂]).
- Otimização da intensidade luminosa;
- Produção de biomassa algal em reatores com diferentes configurações, nomeadamente com diferentes relações de área de captação de luz, por unidade de volume.
- Métodos de indução de stress para a produção de metabolitos.
- Extração dos diferentes compostos de interesse.

4.1. Correlação da densidade ótica, concentração mássica e a quantidade de células na *H. pluvialis*

Com o objetivo de acompanhar a evolução da concentração das microalgas através de um método simples, como é a medição da densidade ótica, é necessário efetuar uma calibração, ou seja, estabelecer uma relação (reta de calibração) entre os diferentes parâmetros, nomeadamente concentração mássica e número de células. Deste modo, foi efetuado um ensaio de controlo no qual a biomassa (Fig 4.1) e o número de células foram relacionados com a densidade ótica do meio de cultura.

A figura 4.1 ilustra os resultados para uma das relações.

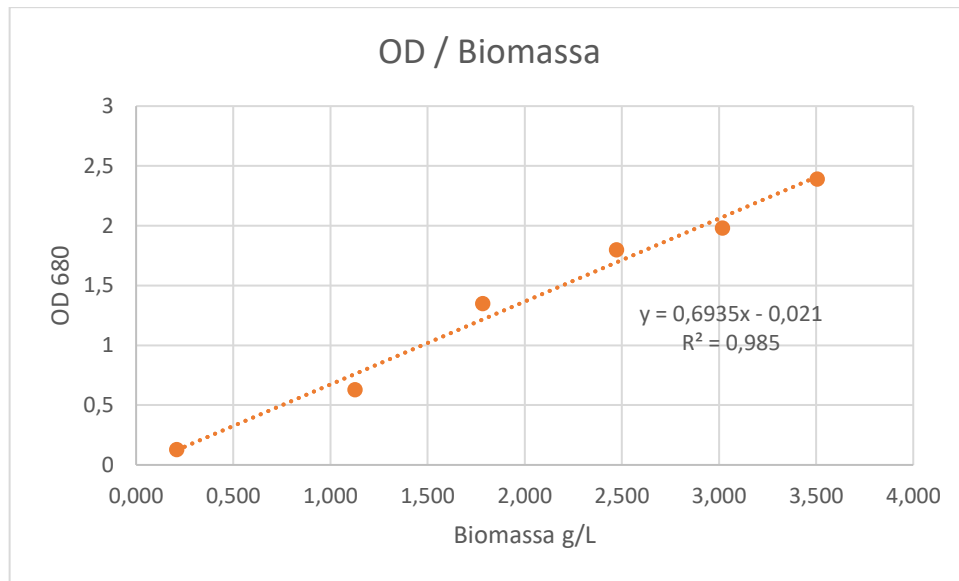


Figura 4.1 – Relação entre a concentração de biomassa e a densidade ótica para a microalga *Haematococcus pluvialis*.

A equação 1 representa a reta de calibração que irá permitir estimar a biomassa seca no meio de cultura através de medições da densidade ótica.

$$(I) \quad [\text{Biomassa}] = 0,6934 * \text{Abs (OD680)} - 0,021 \quad (1)$$

Do mesmo modo foi avaliada a relação entre a concentração numérica células e a densidade ótica, sendo a seguinte equação (II) a reta de calibração correspondente.

$$(II) \quad (\text{N}^\circ \text{ células/ml}) = 92\,699 * \text{Abs (OD680)} - 13\,449 \quad (2)$$
$$R^2 = 0,992$$

Em ambos os casos, o valor de R é superior a 95% o que permite validar este método para a quantificação da biomassa e do número de células através da medição da densidade ótica.

4.2. Otimização do meio de cultura

O trabalho de otimização começou por centrar-se na microalga *H. pluvialis* e posteriormente estendeu-se para a microalga *C. vulgaris*.

Os primeiros ensaios tiveram como objetivo identificar os principais fatores que limitam o crescimento das microalgas e avaliar diferentes mecanismos de os reduzir, com o intento de melhorar o crescimento de biomassa.

4.2.1 Haematococcus pluvialis

Para este efeito realizou-se uma experiência nas seguintes condições: Temperatura: 25°C +/- 0,5; [biomassa]_{t=0} = 15 mg/L ; Reator cilíndrico com 8,6 de diâmetro; Iluminação : 56 μmol/m²/s ; Meio de cultura FWS-GM; Microalga *Haematococcus pluvialis*.

A figura 4.2 representa a evolução da [biomassa] ao longo do tempo, medida através da densidade ótica.

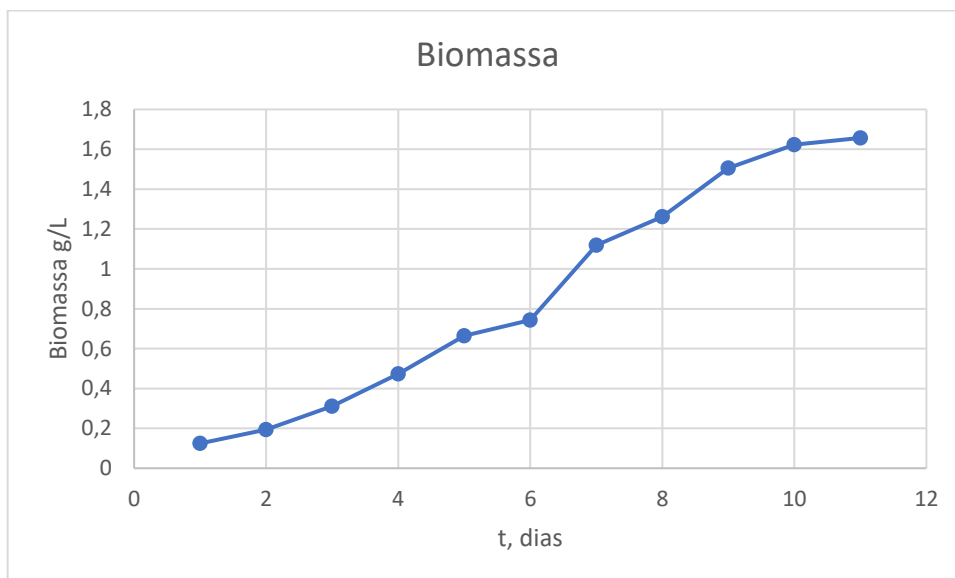


Figura 4.2– Quantificação da biomassa da *H.pluvialis* ao longo de um ciclo de cultura.

Tipicamente, o gráfico do crescimento da biomassa pode ser dividido em três fases.

A primeira fase (*lag*), caracteriza-se pela ausência do crescimento significativo da cultura; as microalgas seriam expostas a um novo ambiente sendo necessário uma adaptação da célula aos diferentes nutrientes e condições de cultura. Nesta fase, o crescimento das microalgas seria inferior, pois estaria a ocorrer uma otimização do metabolismo celular para melhor responder à situação em que se encontram.

No entanto, esta fase não se encontra presente na figura 4.2, pois as microalgas encontravam-se previamente num meio de cultura com condições semelhantes ao do ensaio representado.

A segunda fase, exponencial (*log*), entre o 1º e o 9º dia, as microalgas encontram-se na fase exponencial do seu crescimento. É nesta fase que ocorre um crescimento acentuado

das microalgas e como consequência, um elevado *uptake* de nutrientes do meio de cultura e produção de metabolitos.

Em especial, em culturas Batch, a disponibilidade de nutrientes é um dos fatores limitantes. Sendo estes alimentados na fase inicial da cultura, o elevado consumo nesta fase irá induzir a escassez em alguma altura da cultura, iniciando assim a fase estacionária.

A terceira fase, entre o 9^o e o 11^o dia, corresponde à diminuição do crescimento de biomassa devido a diversos fatores. Como previamente referido, o elevado consumo de nutrientes na fase exponencial irá levar à escassez dos mesmos induzindo uma redução da taxa de crescimento. Em conjunto com a escassez de nutrientes, a produção de metabolitos pode alterar as condições do meio de cultura, tornando-o mais hostil para as microalgas, como por exemplo, a alteração do pH do meio de cultura por libertação de produtos celulares.

Quando o microrganismo em estudo são microalgas fotossintéticas, um outro fator tem de ser tido em conta. A intensidade luminosa que chega às microalgas.

A principal característica da fase exponencial, é a elevada taxa de crescimento e como consequência, um aumento da densidade ótica do meio de cultura.

Uma elevada densidade ótica vai reduzir a intensidade luminosa que chega ao centro do biorreator, podendo assim ocorrer falta de luz para a fotossíntese das microalgas no centro do biorreator. Provavelmente, a evolução “pouco” exponencial registada na figura 4.2 é o reflexo deste fundamento.

A fase estacionária pode ocorrer principalmente devido a limitações de luz, escassez de nutrientes e produção de metabolitos que alterem o meio de cultura.

A figura 4.3, representa a diminuição da intensidade luminosa no **interior do biorreator** ao longo do tempo de cultura.

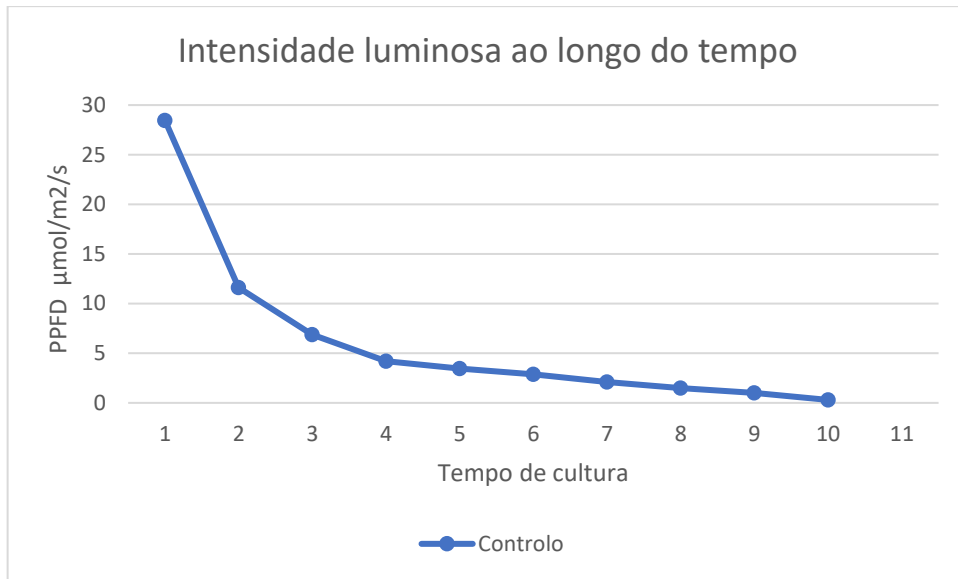


Figura 4.3 – Evolução da intensidade luminosa ao longo do tempo dentro do biorreator.

Ao 4º dia do ensaio, devido às concentrações da biomassa, já não é possível obter valores superiores a $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ dentro do reator. Estes baixos valores de intensidade luminosa são assim um importante fator a ter em conta ao longo do ciclo de cultura, lembrando que as microalgas fotossintéticas apresentam intensidades luminosas ideais entre os 20 e $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

A figura 4.4 mostra a relação entre a intensidade luminosa dentro do biorreator e a concentração de biomassa

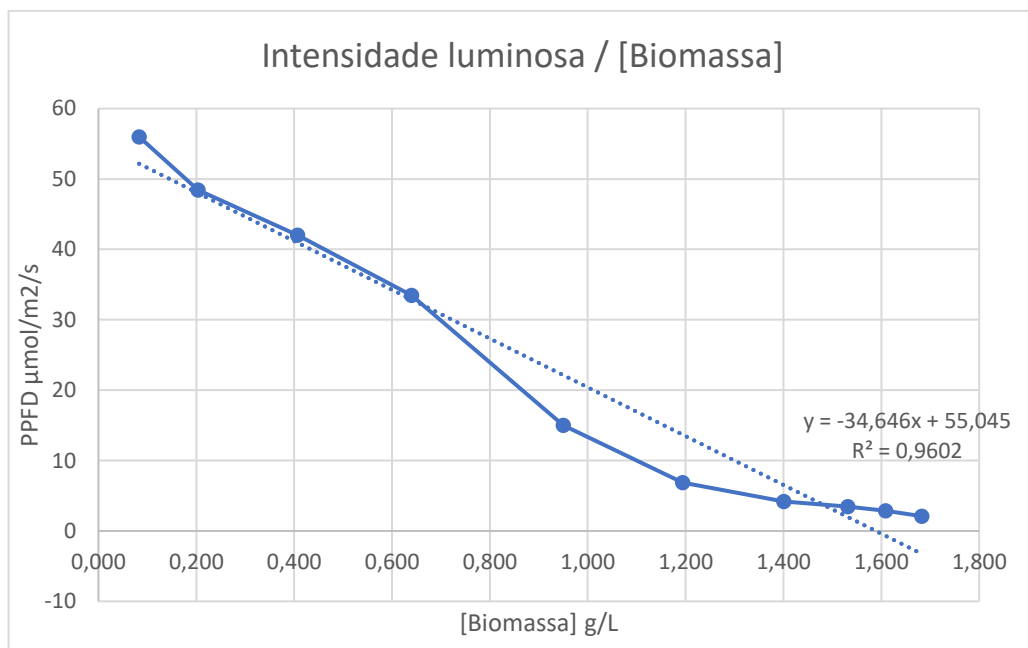


Figura 4.4–Relação entre intensidade luminosa e a concentração de biomassa.

Os resultados obtidos demonstram o decréscimo acentuado da intensidade luminosa no interior do fotobiorreator à medida que a biomassa aumenta. Esta característica, presente em culturas fotossintéticas, demonstra um dos grandes desafios em culturas industriais.

A diminuição da intensidade luminosa desde a periferia até ao centro dos reatores não permite realizar as habituais economias de escala obtidas com o aumento de volume dos reatores, tornando a homogeneização da biomassa no meio de cultura essencial para a produtividade.

Em conjunto com os resultados da intensidade luminosa, foram avaliadas as concentrações de fosforo e azoto: [P]-0,104mg/L e [N]-3,013mg/L ao fim de 10 dias de cultura (valores iniciais [P]-20,5 mg/L e [N]-70,0126 mg/L). A baixa [P] indica que este pode ser um dos fatores limitantes desta cultura, em conjunto com a intensidade luminosa no interior do reator.

Para avaliar se a velocidade de crescimento está a ser limitada pela intensidade luminosa e/ou pela escassez de certos nutrientes, nomeadamente [CO₂] e fósforo, prosseguiu-se com o conjunto de ensaios da Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Ensaio de otimização *H. pluvialis*

	Área/ Volume	Co2 +/- 5mg/L	PPFD* μmol/m2/s	Meio	Peso Seco g/L	nºcélulas/ ml	Taxa Cres. médio (10 dias) +/- 0,005
Nº1	452 cm ² /L	[12-20]	56	FWS- GM	1,622	2,35E+05	0,350 d-1
Nº2	452 cm ² /L	[12-20]	56	GM-M	1,694	2,58E+05	0,390 d-1
Nº3	753,6 cm ² /L	[12-20]	31	FWS- GM	0,756	1,55E+05	0,185 d-1
Nº4	753,6 cm ² /L	[30-50]	31	FWS- GM	0,991	1,93E+05	0,265 d-1

*Dentro do reator a t=0

A figura 4.5 demonstra a evolução da biomassa ao longo de 10 dias de cultura.

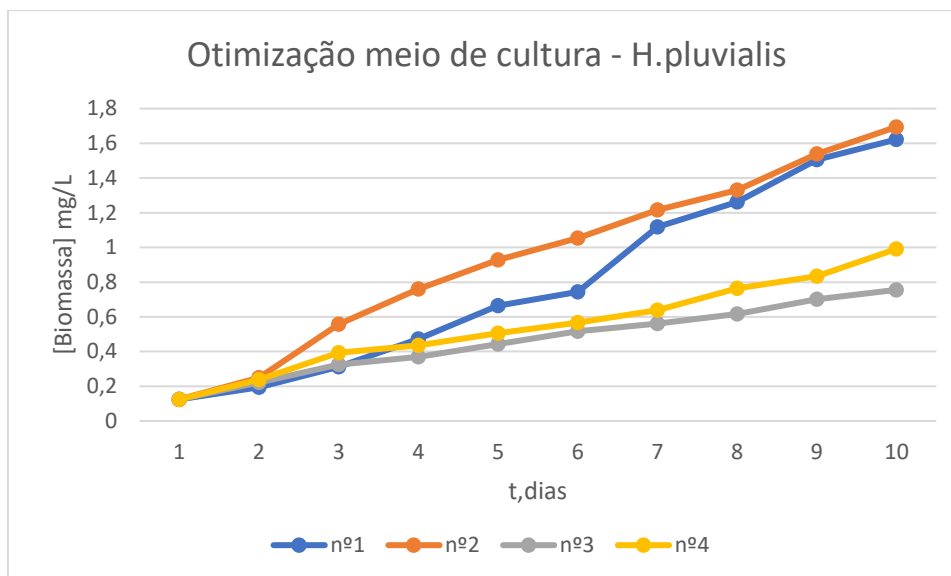


Figura 4.5 – [Biomassa] ao longo do tempo nos diferentes ensaios.

Como referido, neste primeiro passo de otimização foi tido em atenção o formato do fotobiorreator, sendo efetuados os ensaios aos pares. Nomeadamente os ensaios 1 e 2 com $452 \text{ cm}^2/\text{L}$ de exposição luminosa e os 3 e 4 com $753,6 \text{ cm}^2/\text{L}$. Existe uma diferença evidente na produção de biomassa entre estes dois tipos de reatores. O ensaio 1, onde a taxa de crescimento médio diário atingiu os $0,35 \text{ d}^{-1}$ apresenta uma área de superfície de $452 \text{ cm}^2/\text{L}$ e o ensaio 3, $753 \text{ cm}^2/\text{L}$ apresentando uma configuração com menor diâmetro, mas com mais altura, atingiu $0,185 \text{ d}^{-1}$.

A diferença entre a radiação emitida para os diferentes reatores, foi intencional com o intuito de igualar a **radiação total** a que ambas as configurações são expostas a volumes iguais de biomassa. Os reatores 3 e 4, com mais 60% da área superficial, são assim expostos a uma radiação inferior (- 55%) para diminuir a diferença da radiação à qual as microalgas são expostas nas duas diferentes configurações, permitindo assim a comparação do seu desempenho.

Apesar da semelhança da radiação total recebida pelas duas geometrias de reatores, esperava-se que a diminuição do percurso ótico uma diferença entre a produtividade, onde o reator com maior área de exposição apresenta-se uma maior taxa de crescimento, mas na realidade ocorreu o oposto. Porém, uma observação atenta mostra que, para o mesmo rácio de $\text{caudal}_{\text{ar}}/\text{volume}_{\text{meio}}$, a turbulência é maior no reator com maior área de exposição devido ao seu menor diâmetro. O borbulhamento de ar enriquecido com CO_2 foi feito com igual caudal em ambos os fotobiorreatores, no entanto, nos ensaios 3 e 4, devido à menor seção reta do reator, a velocidade superficial é maior e induz stress nas microalgas o que impediu o seu crescimento normal quando comparado a outros ensaios. O contraste entre os ensaios 1 e 2 consistiu em alterar o meio de cultura, de modo a facultar uma maior concentração de fosfato, após se ter verificado no ensaio inicial que

este nutriente poderia estar a ser limitante. Deste modo, aumentou-se a [P] de 20,456 mg/L para 46,4 mg/L, tendo-se observado um ganho pequeno, mas mensurável de biomassa. O último parâmetro explorado nesta 1ª série de ensaios foi a concentração de CO₂ dissolvido no meio de cultura.

Os valores ideais são à volta dos 20mg/L, no entanto devido ao aumento da biomassa ao longo do ciclo de crescimento, existe uma necessidade de maior suplementação. O ensaio 4 na figura 4.5 demonstra o resultado de adicionar CO₂ em maior quantidade.

Na fase inicial de cultura, a adição destes níveis de CO₂ pode dificultar em parte, o início da fase do crescimento exponencial das microalgas, principalmente, devido às alterações de pH. No entanto, posteriormente, após um aumento gradual do fluxo de CO₂, a biomassa irá aumentar de forma mais acentuada quando comparando com um controlo.

Esta 1ª série de resultados demonstrou que é importante ter atenção ao excesso da intensidade de agitação do meio de cultura, de modo a não ultrapassar determinados valores de tensões de corte. Para ultrapassar esta dificuldade, foi diminuído o caudal volumétrico de ar/volume e introduzida agitação mecânica moderada no fundo do reator para impedir a sedimentação da biomassa. Apesar do efeito apenas ter surgido nos reatores com menor diâmetro, esta técnica foi utilizada ao longo de todos os restantes ensaios de modo a salvaguardar algum possível stress devido às tensões de corte induzidas pela injeção de ar no reator.

Em relação ao meio modificado com mais [P] e ao CO₂ dissolvido, ambos os ensaios apresentaram melhores resultados quando comparados com o controlo, sendo estes os novos parâmetros a aplicar daqui a diante.

Os resultados com melhor desempenho são os do segundo ensaio, no qual o meio de cultura foi otimizado, apresentando 2,58E+05 células/ml e uma taxa específica de crescimento médio de 0,390 d⁻¹ ao fim de 10 dias. Os resultados obtidos são superiores aos obtidos por Tocquin et al.⁷⁶ para a mesma microalga, durante o screening de diferentes meios, à exceção do meio M1B5, no qual foi conseguido atingir 10E+05 células/ml; este meio apresenta um dos rácios mais baixos de N:P dos diferentes meios de cultura stock disponíveis, NO₃= 2,5 mM e PO₄=4,3 mM.

Ao comparar os resultados com meios de cultura nos quais as fontes de azoto são diferentes, nomeadamente o NH₄Cl e NaNO₃, estudos efetuados por Cifuentes et al.⁷⁷, o meio utilizado neste estudo apresentou novamente melhores resultados para o mesmo período de tempo de cultura, neste caso os meios investigados em estudos anteriores apresentaram 2,5E+05 e 1,6E+05 enquanto que o resultado obtido neste trabalho, permitiu alcançar as 2,58E+05 células/ml ao fim de 10 dias.

4.2.2. Contaminações na *Haematococcus pluvialis*.

Um dos grandes problemas da *Haematococcus pluvialis* é o seu crescimento lento, tornando-as bastante propensas a contaminações tanto por outras microalgas como por outros microorganismos. No início de novembro/dezembro de 2019, apareceu a pandemia do COVID-19; devido às restrições implementadas para o controlo deste vírus, a simples manutenção das microalgas revelou-se extremamente difícil. Após a fase de confinamento, a cultura não se apresentava nas melhores condições devido a contaminações bacterianas e à presença de outras microalgas e de paramécias.

As figuras 4.6 e 4.7 demonstram a contaminação por paramécias e por um microrganismo não identificado. As paramécias encontravam-se, maioritariamente, presentes em detritos celulares, enquanto que os outros microrganismos, encontravam-se acoplados à parede celular das microalgas demonstrando um comportamento parasitário (Figura 4.6 D).

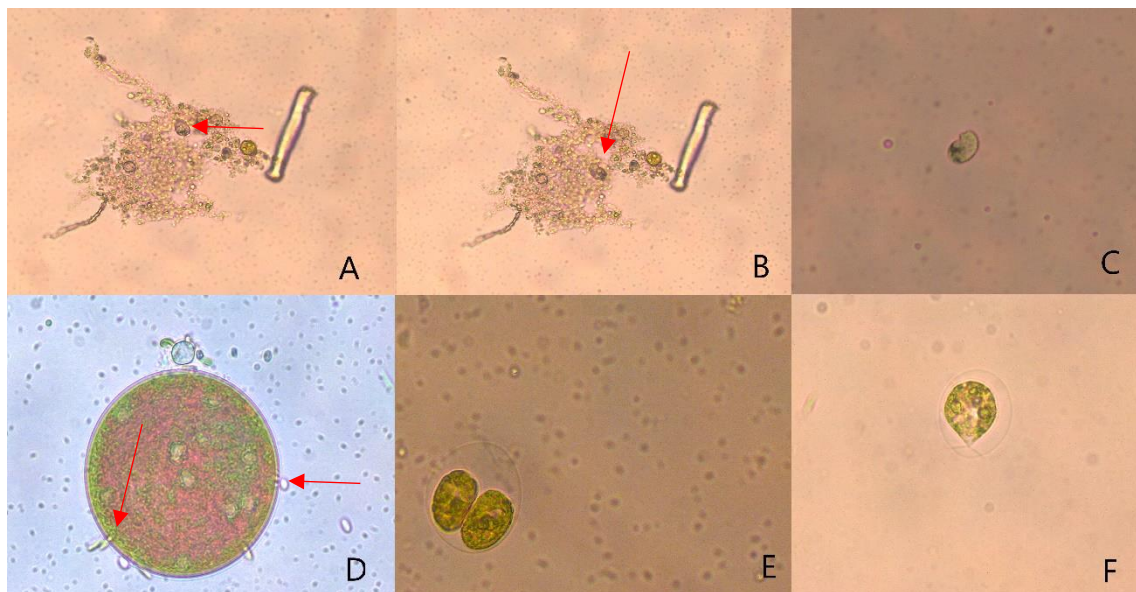


Figura 4.6– Observação de microscópio das condições da cultura de *H. pluvialis*. A e B paramécia no meio de detritos celulares, C – Paramécia no meio de cultura, D – Parasita e a microalga com evidências perceptíveis de stress, E – *H. pluvialis* em fase de replicação, F – *H. pluvialis* na fase móvel.

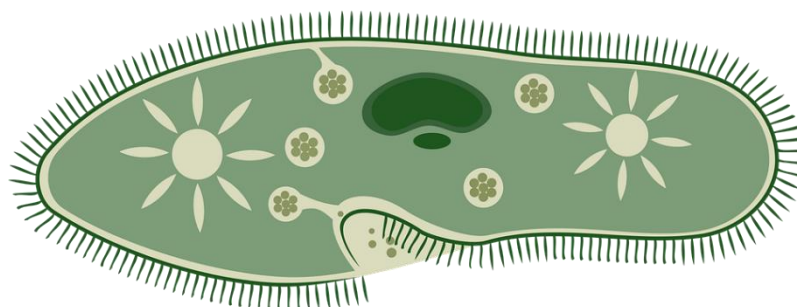


Figura 4.7– Representação de uma paramécia.

Apesar das condições hostis do meio de cultura havia indícios de replicação (Fig 4.6 E e F). Para recuperar a cultura foi aplicada a técnica de plaqueamento em agar enriquecido com meio de cultura com o intuito de obter colônias individuais e sem contaminação.

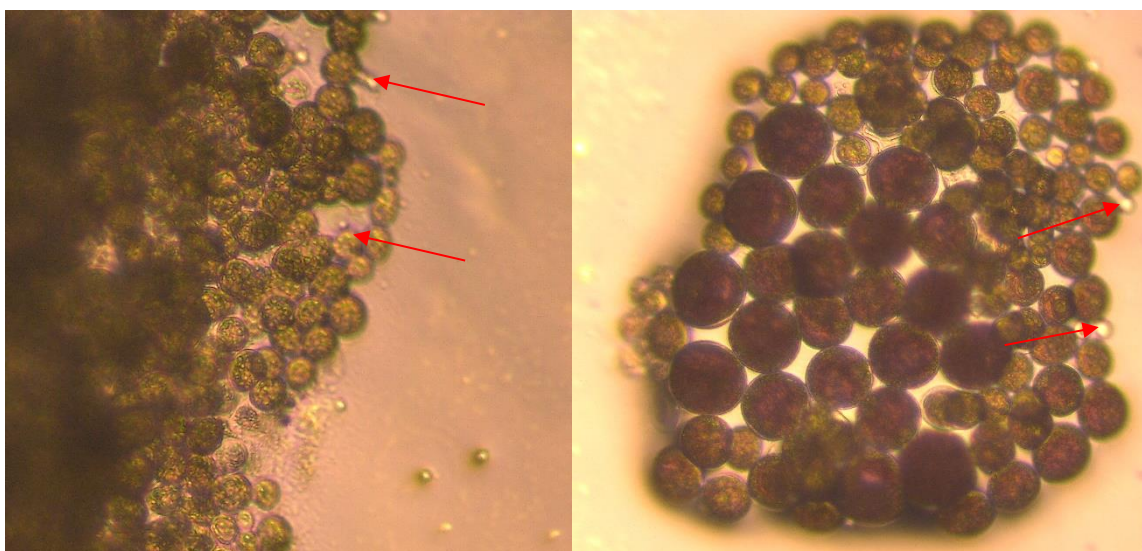


Figura 4.8– Imagem microscópica das colônias crescidas em agar.

As imagens obtidas (Fig. 4.8) por microscopia permitem observar que apesar de ter existido replicação algumas das contaminações mantiveram-se, particularmente o microrganismo parasitário, impossibilitando os trabalhos posteriores com esta microalga.

Apesar da impossibilidade de continuar com os ensaios da *H.pluvialis*, a informação obtida sobre a influência da intensidade luminosa dentro do reator foi transferida para novos ensaios com a *Chlorella vulgaris*.

4.2.3. *Chlorella vulgaris*

Os primeiros ensaios aplicados na *C. vulgaris* focaram-se, da mesma maneira que para a *H. pluvialis*, na otimização do meio de cultura, nomeadamente no dióxido de carbono dissolvido e do possível nutriente limitante.

Inicialmente, foi quantificado as concentrações de fosfato e nitrato numa fase final da cultura (15 dias). Os valores obtidos; [N]- 14,0 mg/L e [P]= 0,13 mg/L demonstram que o fósforo pode estar a ser limitante. Este comportamento também se verificou na cultura de *H. pluvialis*. Assim, o meio modificado (GM-M), com adição de mais 20,24 mg [P]/L ao FWS-GM, foi avaliado em conjunto com a adição de um maior fluxo de CO₂.

O fosforo adicionado provém do composto K₂HPO₄, estando este presente na grande maioria dos meios de cultura como uma das principais fontes de fosforo⁷⁸, como por exemplo, o GoldMedium FreshWater Species. A adição suplementar deste composto, não vai induzir, assim, a necessidade de adaptação das microalgas, já que é a mesma fonte com que foram pré-inoculadas.

Com o objetivo de avaliar possíveis limitantes, realizou-se uma série de experiências nas condições indicadas na Tabela 4.2, tendo-se mantido constantes os seguintes parâmetros:

Temperatura: 25°C +/- 0,5; OD_{t=0} 680nm= 0,2; Reator cilíndrico com 8,6 diâmetro; Iluminação exterior: 56 µmol/m²/s ; Microalga *Chlorella vulgaris*; Tempo de cultura : 10 dias.

Tabela 4.2 – Otimização da cultura da microalga *Chlorella vulgaris*.

	Área/ Volume	Co2 +/-5mg/L	PPFD* µmol/m2/ s	Meio	OD 680nm
Nº1	452 cm ² /L	[30-50]	56	FWS-GM	0,725
Nº2	452 cm ² /L	[12-20]	56	FWS-GM	2,008
Nº3	452 cm ² /L	[12-20]	56	GM-M	2,190

*Dentro do reator a t=0

A figura 4.9 demonstra a evolução da densidade ótica ao longo dos ensaios referidos na Tabela 4.2.

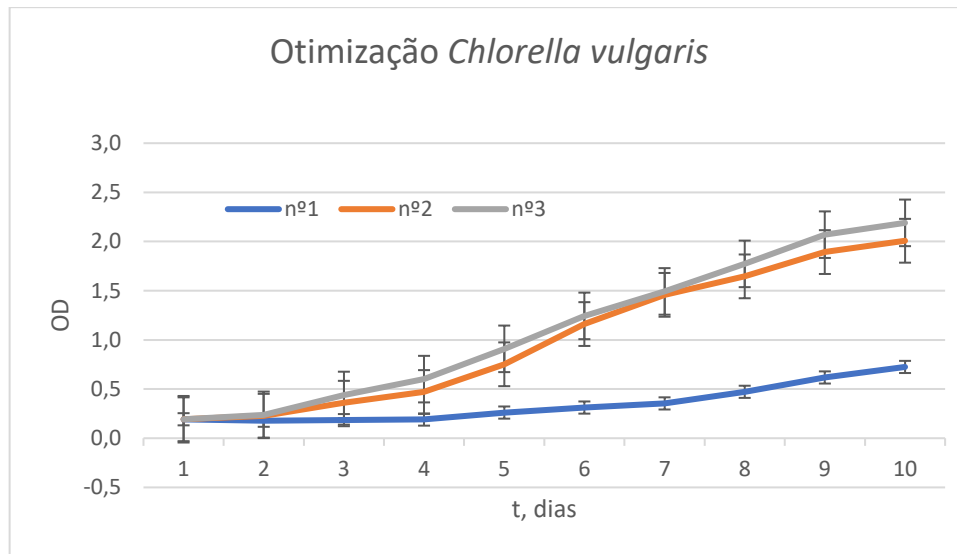


Figura 4.9 – Crescimento da densidade ótica dos 3 ensaios.

O ensaio nº3, permitiu obter uma taxa de crescimento de $0,47 \text{ d}^{-1}$, enquanto que o ensaio prévio efetuado na *H. pluvialis* alcançou os $0,39 \text{ d}^{-1}$, a diferença de quase $0,10$ ocorre devido ao próprio metabolismo celular. Uma das principais características da *C. vulgaris*, que a tornam bastante interessante, é o seu rápido crescimento nos mais diversos ambientes, por outro lado a *H. pluvialis* apresenta dos crescimentos mais lentos das microalgas, sendo este uma das desvantagens que dificulta a sua industrialização.

A *C. vulgaris* apresenta uma morfologia mais frágil quando comparada à *H. pluvialis*, por esta razão e com base nos resultados obtidos previamente, nesta experiência apenas foram usados reatores cilíndricos com diâmetro de $8,6 \text{ cm}$, sendo nestes que as microalgas são expostas a tensões de corte inferiores devido à geometria do reator.

Esta 1ª série de ensaios à *C. vulgaris* demonstra que ao contrário da *H. pluvialis*, a exposição a uma maior concentração de CO_2 dissolvido afeta negativamente o crescimento da biomassa. O ensaio iniciou-se com uma baixa concentração de biomassa (sensivelmente $0,2$ a OD_{680}) semelhante à densidade inicial do ensaio na *H. pluvialis* ($0,220$ a $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$); neste caso a adição de CO_2 alterou, principalmente, o pH do meio, dificultando e até mesmo impedido o crescimento das microalgas ao longo do ensaio. Em comparação com o controlo, o ensaio com mais dióxido de carbono ($30\text{-}50 \text{ mg/L}$) apresenta uma diminuição de 65% na quantidade de biomassa produzida representada pela densidade ótica.

Por outro lado, o meio de cultura modificado com maior concentração inicial de P, exhibe um aumento de 9% face ao controlo, apresentado a maior diferença no final da cultura, sendo esta a ocasião na qual a limitação do crescimento por escassez de fosfatos é mais

expectável. Deste modo, ao longo dos seguintes ensaios, as condições de cultura aplicados foram [CO₂] dissolvido entre 12-20 mg/L e o meio de cultura modificado.

4.3. Otimização da Intensidade Luminosa

Um dos principais fatores do crescimento de microalgas fotossintéticas é a luz. Tanto a intensidade como as características. Deste modo, é necessário perceber as características e particularidades da fonte luminosa a utilizar.

Como já foi referido, a luz disponível no interior do fotobiorreator sofre uma diminuição drástica com o aumento da densidade da cultura. No entanto, grandes intensidades luminosas no início da cultura, provocam stress nas microalgas, fragilizando o seu crescimento. O objetivo dos ensaios seguintes foi ultrapassar esta limitação, aumentando gradualmente a intensidade luminosa em conjunto com uma avaliação da cultura a nível de biomassa, OD, número de células e de pigmentos produzidos/acumulados.

4.3.1. Intensidade luminosa progressiva vs Intensidade luminosa fixa.

A figura 4.10 representa a evolução da intensidade luminosa no **interior do biorreator** ao longo do tempo de cultura com o sistema de LEDs, que permite proporcionar um aumento progressivo da luz, e sem esse mesmo sistema (controlo).

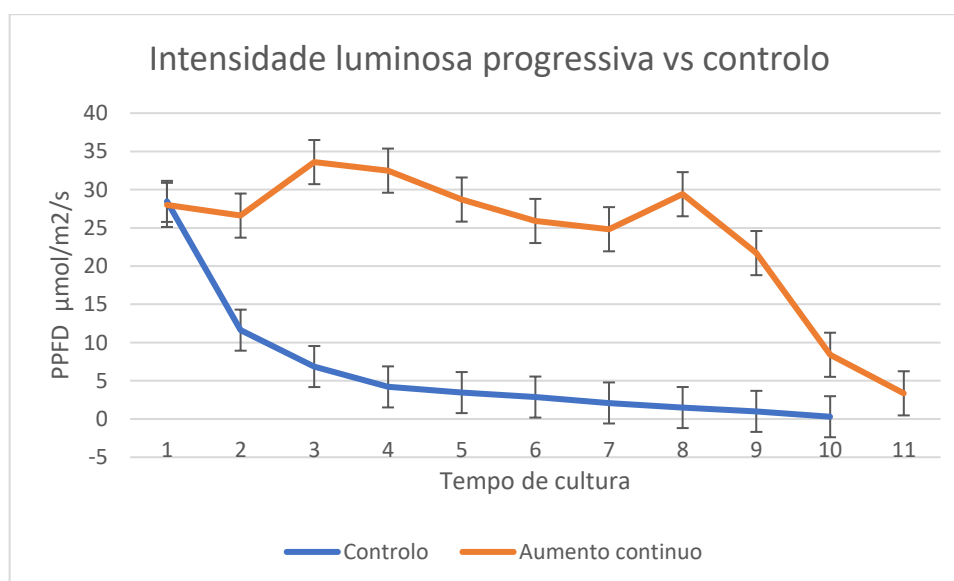


Figura 4.10 – Comparação entre a intensidade luminosa no interior do reator com e sem (controlo) sistema de LEDs .

Na figura 4.10, em conjunto com os valores do controlo, estão representados os dados obtidos dentro do reator com o sistema de LEDs. O aumento da intensidade luminosa do sistema foi manual, com o objetivo de manter valores superiores a 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ durante o ciclo de cultura. No entanto, após o 8º dia e apesar do sistema de LEDs se encontrar a 100% da sua intensidade, devido à elevada concentração de biomassa, tornou-se impossível manter os valores pretendidos no interior do reator.

Este sistema foi usado nos ensaios seguintes, de modo a poder avaliar o efeito do mesmo na biomassa e nos metabolitos produzidos ao compará-los a uma cultura com a radiação exterior constante.

4.3.2. Ensaio com diferentes intensidades luminosas

Nesta 2ª série de ensaios, foram avaliadas as respostas das microalgas a diferentes intensidades luminosas e em especial, ao aumento gradual da luz.

A tabela 4.3 descreve as condições dos ensaios e os respetivos resultados.

Tabela 4.3 – Características e resultados dos ensaios com a *C.vulgaris* ao longo de 27 dias.

	Designação	Área/ Volume	Co2 +/-5mg/L	PPFD (no centro do reator) $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Meio	OD 680nm
Nº1	Controlo	452 cm^2/L	[20-30]	30 t _{d=0}	GM-M	6,30
Nº2	Progressivo	452 cm^2/L	[20-30]	30-175	GM-M	7,75
Nº3	Stress	452 cm^2/L	[20-30]	175 t _{d=0}	GM-M	2,91

Os ensaios foram executados para demonstrar o efeito do aumento progressivo da luz nas microalgas; o controlo (ensaio Nº1) corresponde a utilizar ao longo de todo o ensaio a intensidade luminosa inicial do ensaio no ensaio progressivo, que significa as quatro luzes + LEDs a 1%; no ensaio Nº3 utilizou-se a intensidade luminosa alcançada no final do ensaio Nº2 (100%, quatro luzes e LEDs a 100%). No ensaio Nº2, a intensidade luminosa apresenta um aumento progressivo por aumento da % da intensidade luminosa

do sistema de LEDs, visando manter, no centro do reator, uma intensidade luminosa entre os 30-45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

A seguinte figura (4.11), ilustra a evolução do crescimento da biomassa ao longo do tempo de cultura dos ensaios propostos.

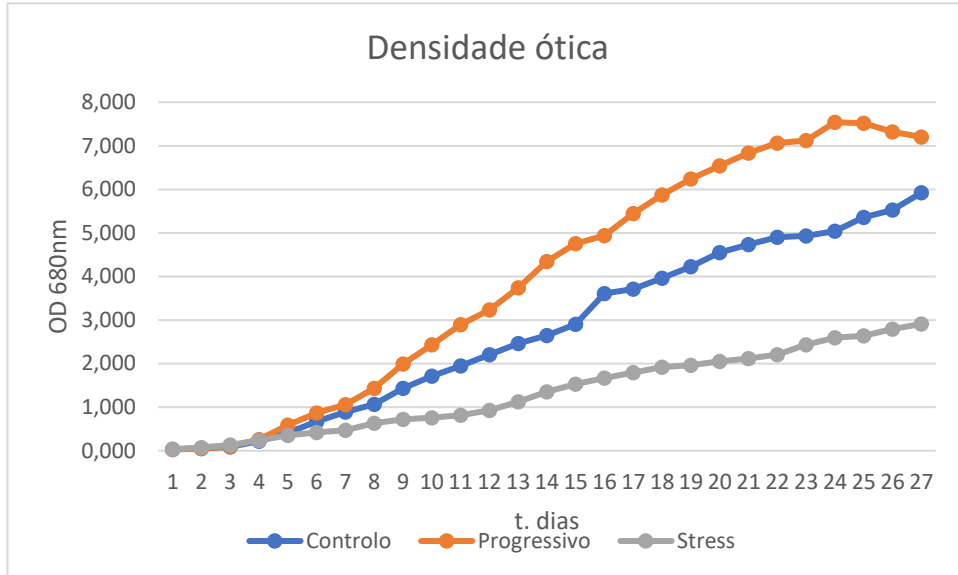


Figura 4.11 – Evolução da densidade ótica dos diferentes ensaios.

A figura 4.12 representa a evolução do número de células avaliada dois em dois dias.

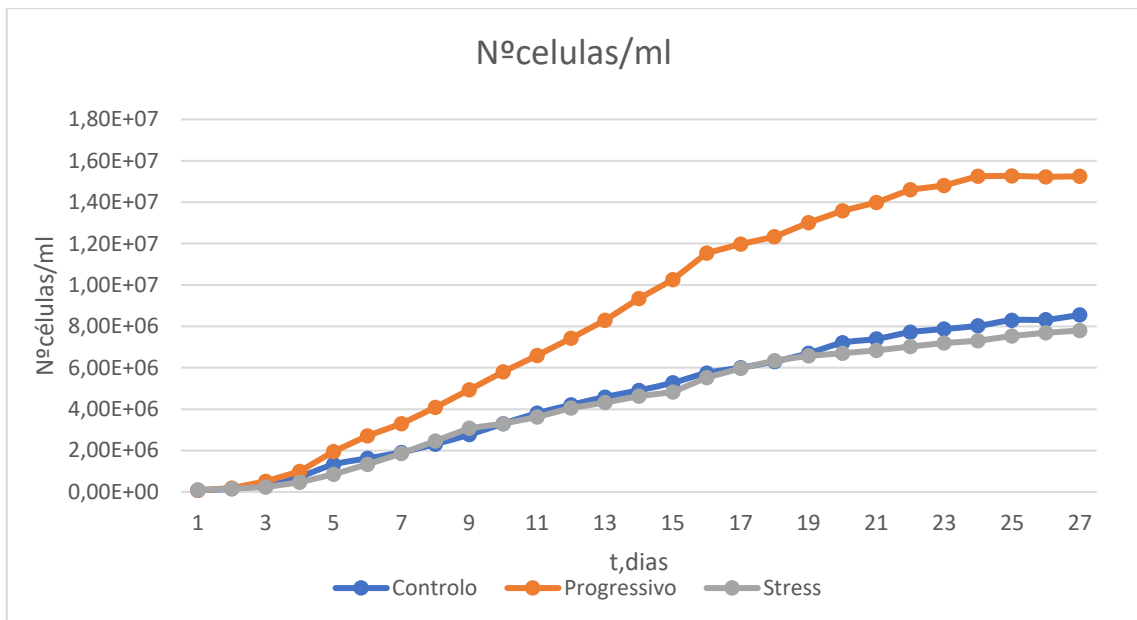


Figura 4.12 – Evolução das concentrações de células para os diferentes ensaios referidos na tabela 4.3.

Ambos os gráficos, representados nas figuras 4.11 e 4.12, apresentam comportamentos semelhantes; as diferenças entre a densidade ótica e o número de células acontecem devido ao diferente estado das microalgas, como por exemplo, o volume das mesmas.

A análise dos dados permite observar que o ensaio progressivo, no qual a intensidade luminosa sofreu um aumento gradual, apresenta valores de densidade ótica e de número de células bastante superior ao controlo e ao ensaio de stress. O ensaio progressivo apresenta, assim, um aumento de 47% em relação ao controlo ao 23^o dia do ensaio (fim da fase exponencial).

Na tabela 4.4 estão representados os resultados da monitorização do crescimento das microalgas nas diferentes condições de culturas.

Tabela 4.4 – Caracterização dos três ensaios ao fim de 23 dias.

23 dias de cultura	n^océlulas/ml	OD (860nm)	Taxa específica de Crescimento (23dias)
<i>N^o1 - Controlo</i>	7,88E+06	4,93	0,202 d-1
<i>N^o2- Progressivo</i>	1,48E+07	7,120	0,230 d-1
<i>N^o3 - Stress</i>	7,30E+06	2,593	0,187 d-1

Nos primeiros cinco dias (Figura 14.12), a cultura apresenta uma pequena fase de adaptação, seguida da fase logarítmica/exponencial de crescimento e de uma 3^a fase de crescimento (estacionário) apenas observada no ensaio progressivo a partir do 23^o dia. O segundo ensaio (progressivo) apresenta as três fases de crescimento; lag, log e estacionária. A 4^o fase (morte celular) não se encontra evidenciada devido ao tempo de cultura não ter sido o suficiente para, devido a um ambiente mais hostil associado às condições de cultura, ocorrer lise celular.

O ensaio progressivo apresenta os valores mais elevados de densidade ótica e do número de células, demonstrando que o aumento progressivo da intensidade luminosa influencia muito positivamente o crescimento da biomassa.

Como visto anteriormente, na figura 4.4, o aumento da biomassa afeta drasticamente a radiação de luz que chega ao centro do biorreator, diminuindo-a. O método proposto, no qual o aumento de luz é progressivo e proporcional ao crescimento de biomassa, permite reduzir, significativamente, as limitações associadas à luz, bem como ao percurso ótico dentro do reator, encaminhando a luz necessária para ocorrer fotossíntese, em grande

parte do volume do reator e não apenas nas zonas mais superficiais. Posteriormente, foi avaliado o efeito deste método na produção de pigmentos e lípidos por esta microalga com o intuito de entender os efeitos no metabolismo celular e se o método induz stress às microalgas devido às elevadas intensidades luminosas na superfície do reator.

Estes resultados permitem confirmar que a intensidade luminosa é um dos principais fatores que afeta o crescimento da biomassa e, apesar do crescimento ideal da *C.vulgaris* ser entre os 30 e 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, ao longo do ensaio a intensidade luminosa passa a ser um fator limitante, principalmente em fotobiorreatores com elevado percurso ótico.

Nestes ensaios a agitação foi efetuada através de agitação mecânica suave e por borbulhamento de ar/ CO_2 , impossibilitando a sedimentação da biomassa e a acumulação nas paredes do sistema. Assim, não se verificou dispersão ineficaz de luz nas paredes dos reatores. A ausência de floculação e sedimentação no ensaio controlo e progressivo permite confirmar que todas as microalgas se encontram alternadamente expostas à intensidade luminosa emitida e que apesar das elevadas intensidades luminosas presentes na fase final do ensaio progressivo, as microalgas não sofrem o stress demonstrado no ensaio de stress quando expostas à mesma radiação numa fase inicial (Figura 4.13 a). O aumento gradual da intensidade luminosa faculta às microalgas o tempo essencial para a sua adaptação às novas condições. Esta capacidade de adaptação e a elevada densidade de biomassa permitem um crescimento elevado quando comparado a um sistema no qual a intensidade luminosa externa não sofre aumento. O ensaio de stress obteve a densidade e o número de células mais baixo, tal como era esperado; a valores elevados de luz e em baixa densidade, as microalgas ativam os seus mecanismos de defesa (Figura 4.13 a) e reduzem o seu crescimento/multiplicação.

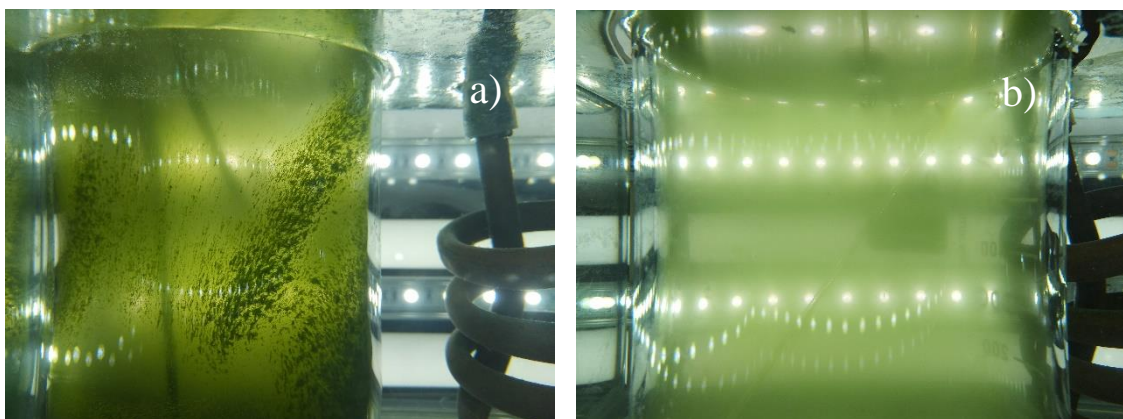


Figura 4.13 – Representação da resposta das microalgas à exposição inicial de luz. a) Aglomeração presente ao 3º dia no ensaio de stress; b) Dispersão uniforme da biomassa no ensaio de controlo e progressivo.

Apesar das condições de agitação serem idênticas nos três ensaios, apenas ocorreu a aglomeração no ensaio de stress ($175 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$); a aglomeração fornece às microalgas um microambiente menos hostil para a sua conservação. Este fenómeno é um dos sinais de stress das microalgas, em conjunto com a produção/acumulação acrescida de pigmentos e lípidos.

A segunda série de ensaios permitiu assim evidenciar a grande importância da intensidade luminosa e do seu controlo na produção de biomassa algal em microalgas fotossintéticas. Segundo os resultados obtidos, foi possível aumentar em 40% a produção de biomassa para o espaço de tempo de 23 dias de cultura. No entanto, não é apenas a biomassa que é utilizada, sendo importante quantificar e analisar os metabolitos produzidos pela microalga nas diferentes condições de cultura.

4.4. Quantificação e identificação de Pigmentos

O mercado atual deste microrganismo está dirigido maioritariamente para a biomassa, seguindo-se os pigmentos e os lípidos extraídos. Deste modo, é importante a caracterização destes compostos nas diferentes condições de cultura. Como iremos ver ao longo deste trabalho, as condições da cultura permitem manipular os diferentes compostos que as microalgas produzem, bem como o seu rácio.

São vários os métodos para quantificação destes compostos; neste trabalho os pigmentos foram quantificados por espectroscopia de UV-visível.

A espectroscopia é o método mais económico e rápido que o HPLC, sendo por isso bastante usado neste tipo de estudos apesar da sua incerteza ser ligeiramente superior. Existem diversas equações que permitem esta quantificação de pigmentos, consoante o tipo de microrganismo explorado.

Para a clorofila a e b as equações foram as seguintes (Jeffrey & Humphrey 1975⁷⁹):

$$\text{(III) Chl a } (\mu\text{g l}^{-1}) = 11.85 \cdot \text{DO664} - 1.54 \cdot \text{DO647} - 0.08 \cdot \text{DO630} \cdot (\text{v/V})$$

$$\text{(IV) Chl B } (\mu\text{g l}^{-1}) = -5.47 \cdot \text{DO664} + 21.03 \cdot \text{DO647} - 2.66 \cdot \text{DO630} \cdot (\text{v/V})$$

Estas equações são das mais usadas neste tipo de quantificação, tendo sido citada 66 647 vezes desde a sua descoberta em 1975. Associado às equações de quantificação, é necessário o estabelecimento de um protocolo de modo a diminuir o erro associado às absorvâncias dos diferentes solventes utilizados no processo de extração.

Para os carotenos, a equação é a seguinte (Strickland & Parsons 1972⁸⁰);

$$(V) \quad \text{Carotenoides } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 4\cdot\text{DO480}\cdot(v/V)$$

Após extração dos pigmentos com acetona, estas equações permitem obter uma estimativa da quantidade de pigmentos presente na biomassa com um erro inferior a 10%.

A tabela 4.5 resume os valores obtidos para a biomassa no ensaio n^o1 (controlo 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) e n^o2 (progressivo 30-175 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

Tabela 4.5 – Quantificação dos pigmentos e lípidos do ensaio de controlo e com intensidade luminosa progressiva.

	Chl a $\mu\text{g}/\text{g}$	Chl b $\mu\text{g}/\text{g}$	Chl a+b $\mu\text{g}/\text{g}$	Carotenoides $\mu\text{g}/\text{mg}$	w/w % lípidos
Controlo	0,508	0,591	1,100	2,74	3,11
Progressivo	0,937	0,129	1,066	3,72	3,66

Infelizmente não havia biomassa suficiente no ensaio N^o3 (Stress), pelo que não foi possível avaliar o teor de pigmentos na biomassa com o método acima referido.

Na literatura, o conteúdo lipídico na biomassa seca de *C.vulgaris* varia consideravelmente, podendo variar entre os 2 e os 60%⁸¹. A variação depende bastante do método de extração, bem como do modo da cultura e das condições em que as microalgas se encontram. Para além das diferenças nas condições de cultura, apesar da espécie ser a mesma (*C. vulgaris*) nos vários estudos analisados, existem diversas estirpes disponíveis com diferentes vias de crescimento e, conseqüentemente, diferentes capacidades de produção de metabolitos.

Os resultados obtidos no presente trabalho são superiores aos de Gonçalves et al.⁸², sendo que neste estudo foi obtido 2,8 % de W/w após otimização da irradiação luminosa e de diferentes períodos de dia/noite enquanto que neste trabalho, o ensaio da iluminação progressiva obteve 3,66% w/w.

Um outro estudo, efetuado por Lee et al.⁸³ apresentou valores superiores, nomeadamente 4,8% do peso da biomassa seca em lípidos com métodos de recuperação semelhantes.

Como já referido, as condições do meio de cultura influenciam a produção de metabolitos. Entre os dois ensaios caracterizados, é possível destacar a diferença entre o

rácio de clorofila a/ b apesar da soma de ambas apresentarem valores muito idênticos. Uma das possíveis causas pode relacionar-se com a limitação da luz no ensaio N^o1.

As clorofilas a e b desempenham funções distintas nas células vegetais; a clorofila a encontrasse normalmente em concentrações superiores e a sua principal função é a fotossíntese enquanto que a clorofila b, considerada menos essencial, apresenta a função de ampliação da faixa de luz disponível para a fotossíntese⁸⁴. Ou seja, esta capta energia proveniente de fontes luminosas e transfere a energia para a clorofila a de modo a esta conseguir realizar a fotossíntese. Este mecanismo pode explicar a maior quantidade de clorofila b presente no ensaio N^o1. O nível inferior de luz disponível para fotossíntese pode ter induzido a microalga a produzir maiores quantidades de clorofila b, com o objetivo de rentabilizar a pouca luz disponível no fotobiorreator.

A *C.vulgaris* não apresenta grande produção e acumulação de carotenos quando comparada a outras microalgas, no entanto estes são dos compostos com maior valor comercial no mercado das microalgas sendo importante avaliar a resposta da produção destes compostos às diferentes condições de cultura, com o intuito de estender a aplicação do novo método proposto a outras microalgas com melhores capacidades de produção.

Os valores obtidos (tabela 4.5) demonstram um aumento de cerca 36% na quantidade de carotenos no ensaio n^o2 face ao ensaio n^o1. O correspondente aumento dos lípidos foi cerca de 18%. Assim, tanto o teor de lípidos como de carotenoides responde significativamente ao perfil de intensidade luminosa, sendo ambos resposta das microalgas a um determinado fator de stress.

A produção de carotenoides (composto altamente antioxidante) é uma das respostas das microalgas ao stress, prevenindo o efeito degenerativo das possíveis espécies reativas de oxigénio às quais as microalgas são expostas. Por outro lado, a produção e acumulação lipídica, tem o objetivo de aumentar a reserva calórica na qual a microalga irá ter acesso em condições mais hostis que impeçam o seu normal metabolismo.

A diferença entre as quantidades destes compostos nos dois ensaios surge devido às diferentes fases onde as culturas se encontravam. A elevada densidade e a alta radiação luminosa na superfície do reator do ensaio n^o2 (progressivo), tornam (no 23^o dia) o ambiente menos propenso para o crescimento de biomassa em face ao ensaio de controlo (fig 4.12). Estas condições de cultura finais, mais hostis, permitem a maior acumulação de carotenoides e lípidos. Por outro lado, o aumento progressivo da intensidade

luminosa na fase exponencial da cultura aumenta, de modo significativo, a quantidade de biomassa presente na fase final.

A figura 4.14 ilustra a diferença, nos solventes, entre os pigmentos dos dois ensaios em estudo.

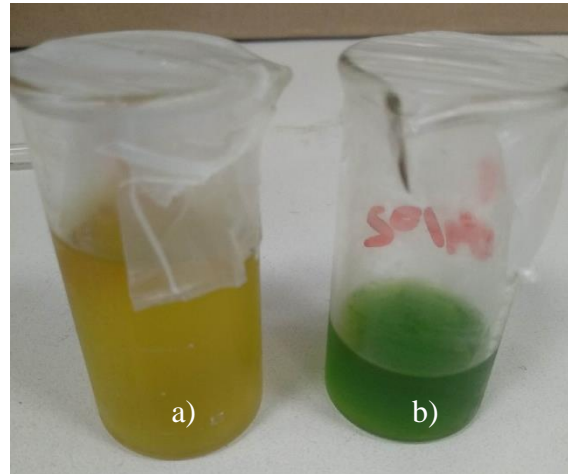


Figura 4.14 – Solventes após extração dos pigmentos: a) Ensaio nº2(progressivo); b) Ensaio nº1 (controle)

A diferença da coloração dos pigmentos extraídos ocorre devido à maior quantidade de carotenos presentes no ensaio progressivo. A clorofila a e b apresentam diferentes espectros de emissão; a clorofila a apresenta maior emissão no espectro verde e a clorofila b no espectro do laranja/avermelhado. A quantificação dos pigmentos demonstrou que existe maior quantidade de clorofila a no ensaio progressivo, deste modo, esperava-se que se este apresenta-se uma cor mais verde que o ensaio análogo. No entanto, o mesmo não acontece. A pigmentação mais amarelada do ensaio progressivo é, assim, causada devido à maior quantidade de carotenos presente.

O objetivo deste ensaio foi avaliar a influência do aumento da intensidade luminosa ao longo da cultura, sobre a taxa de produção da biomassa. No entanto, os dados obtidos demonstraram que o método proposto não só aumenta a biomassa, como permite manipular os rácios de clorofila produzidos e aumentar em 17,7% a produção lipídica e em 35,7% a carotenogénese aos 23^o dias de cultura. A conjugação dos dois resultados (incremento da biomassa em 47% e de carotenoides em 35%) traduz-se no incremento efetivo de 51,4% de carotenoides e de 22% de lípidos.

4.5. Percurso ótico

Os ensaios anteriores salientaram a importância da intensidade luminosa e as limitações no crescimento de biomassa associado a este parâmetro. Dos resultados obtidos, destaco

a necessidade de aumentar progressivamente a intensidade da luz ao longo do tempo de cultura de modo a acompanhar o crescimento da biomassa dentro do fotobiorreator. Outra forma de explorar a questão da intensidade luminosa, ainda que diferente, é a variação do percurso ótico. Para o efeito, produziram-se reatores com a mesma geometria, mas diferentes diâmetros (Figura 4.15). Os restantes parâmetros, tais como a temperatura, volume, CO₂, agitação, distância da fonte de luz, idade da biomassa e a intensidade luminosa da fonte foram idênticos em ambos os ensaios. (Intensidade luminosa 56 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)

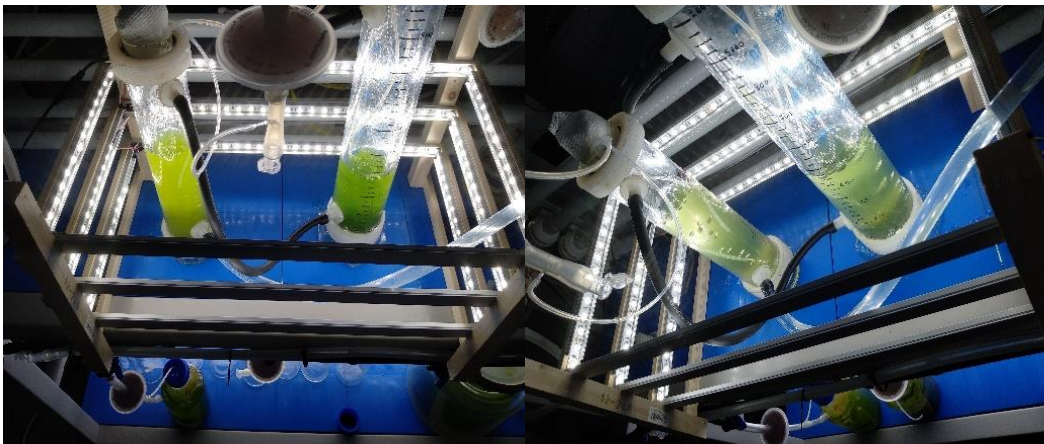


Figura 4.15 – Ensaio sobre percurso ótico; Ensaio N^o1- 4 cm de diâmetro* e N^o2 – 6 cm de diâmetro.

Na figura 4.15 é possível observar uma ligeira diferença de cor na biomassa produzida nos dois reatores aos primeiros cinco dias. A biomassa no reator de menor diâmetro apresenta uma coloração mais amarelada, indicando uma resposta das microalgas a um fator de stress (luz), sendo produzida maior quantidade de carotenoides e/ou clorofila b. Para o mesmo volume de meio reacional, o reator de menor diâmetro recebe cerca de mais 50% de radiação.

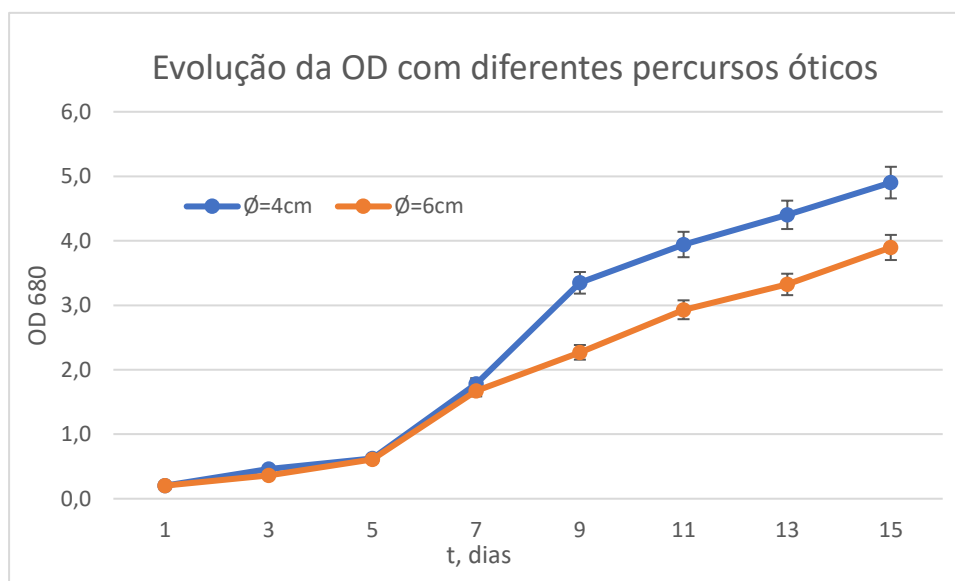


Figura 4.16 – Evolução da densidade ótica para os ensaios com diferentes diâmetros.

A figura 4.16 mostra a evolução da densidade ótica para os ensaios. Na fase inicial da cultura, entre o 1º e o 7º dia, o crescimento de biomassa apresenta respostas semelhantes. No entanto, nos dias seguintes e apesar da concentração inicial de biomassa, destaca-se um crescimento mais acentuado no ensaio realizado no reator de menor diâmetro, demonstrando influência do percurso ótico do reator. Estes resultados demonstram que não é apenas a intensidade de luz emitida que é relevante para o crescimento das microalgas, mas também o percurso ótico e a área específica do fotobiorreator (área de captação de luz/volume).

A otimização do crescimento de biomassa representa um dos principais focos da investigação realizada. Com o intuito de otimização tanto da biomassa como da produção de metabolitos, a cultura pode ser dividida em duas fases: a fase verde e a fase vermelha (stress). Esta metodologia permite a otimização da produção de biomassa e posteriormente, com uma alteração das condições de cultura, a ativação dos mecanismos de defesa das microalgas por indução de stress, induzindo assim a produção de uma maior quantidade de metabolitos. Os ensaios desenvolvidos ao longo deste trabalho, até este momento, focam-se na produção de biomassa tendo, no entanto, sido obtido valores interessantes na produção de metabolitos com o novo método proposto.

O ensaio seguinte foca-se na produção de metabolitos ao expor as microalgas a diferentes concentrações de um fator de stress específico.

4.6. Indução de Stress através de H₂O₂

Os ensaios anteriores permitiram a otimização da produção de biomassa explorando, maioritariamente, a intensidade de luz ao qual o fotobiorreator é exposto.

Esta última série de ensaios baseia-se na exposição das microalgas a peróxido de hidrogénio.

Todas as células produzem espécies reativas de oxigénio (ROS), no entanto quando presentes em excesso, estes compostos causam danos nas proteínas, lípidos e mesmo no ADN por reagirem com estas biomoléculas, alterando a conformação e consequentemente a atividade das mesmas. Existem várias doenças associadas ao excesso destes compostos como é o exemplo do Alzheimer, Parkinson's e algumas doenças oncológicas.

O peróxido de hidrogénio é o ROS mais estudado, pois encontra-se presente em grandes concentrações no ambiente devido à sua superior estabilidade quando comparado a outros compostos da mesma categoria. As microalgas são das principais fontes deste composto para o ambiente^{85,86} podendo serem produzidos no peroxissoma, cloroplastos, mitocôndria, plasma membranas e mesmo no retículo endoplasmático como resposta a condições hostis no meio de cultura. A sua produção intracelular vai ativar os diferentes mecanismos de defesa que as microalgas dispõem, nomeadamente o aumento da produção de antioxidantes, acumulação de lípidos, enrijecimento da parede celular, etc... Com base na resposta que estes compostos induzem nas microalgas e noutras células, são considerados mensageiros secundários.

O peróxido de hidrogénio foi o composto escolhido para o seguinte ensaio devido à sua função dentro da célula. Este método, ao contrário dos métodos atuais de stress, no qual as condições de cultura são alteradas para ocorrer a formação de ROS dentro da célula, este expõe as microalgas diretamente a um agente de oxigénio reativo. Uma das vantagens deste método provem da sua disponibilidade e do baixo custo deste composto no mercado, podendo ser uma alternativa viável a métodos mais dispendiosos como o aumento da intensidade luminosa.

O principal objetivo do ensaio seguinte foi permitir a comparação da resposta celular, nomeadamente na produção/acumulação de lípidos, com várias concentrações de peróxido de hidrogénio no meio, um controlo e um dos métodos mais usados para a indução de stress, a ausência de fosfatos no meio de cultura.

Os ensaios foram iniciados com uma concentração de biomassa seca de 2,5 g/L e com as mesmas condições de temperatura, volume, idade da biomassa e pH.

Para melhor entender o efeito do H₂O₂ no meio de cultura, foram aplicadas 9 concentrações diferentes, sendo estas comparadas com dois controles, um sem condições de stress e outro com ausência de fosfatos no meio de cultura.

Estes ensaios tiveram a duração de 3 dias, sendo que no primeiro dia a biomassa é extraída de uma cultura que corresponde à fase verde, exposta às novas condições de cultura (fase vermelha) e ao terceiro dia efetuada a extração de lípidos e pesagem da biomassa seca.

A tabela 4.6 apresenta as diferentes respostas dos ensaios;

Tabela 4.6 – Efeito da concentração de H₂O₂ sobre a resposta da *C.vulgaris*

Ensaio t=3 dias	Biomassa seca g/L	w/w, % lípidos/biomassa	g/L lípidos
Controlo	3,4	5,2	0,18
1 (0,50 nM)	3,1	4,3	0,13
2 (0,75 nM)	2,9	10,3	0,30
3 (1,00 nM)	3,2	8,0	0,26
4 (1,25 nM)	1,1	3,7	0,04
5 (1,50 nM)	1,2	2,3	0,03
6 (2,50 nM)	0,9	1,3	0,01
7 (5,00 nM)	Lise	0,0	0,00
8 (10,0 nM)	Lise	0,0	0,00
9 (15,0 nM)	Lise	0,0	0,00
10 (s/Fosfatos)	2,6	9,2	0,24

*Concentração inicial de biomassa = 2,5 g/L (biomassa em fase logarítmica)

As respostas avaliadas foram a biomassa seca, a relação entre o peso de lípidos e o peso de biomassa seca e quantidade de lípidos presentes em 1L de meio de cultura, o que conjuga os dois anteriores.

A percentagem de lípidos acumulados por quantidade de biomassa é um dos parâmetros mais importantes, pois os valores obtidos são independentes da quantidade de biomassa presente no meio de cultura, por outro lado, o parâmetro de g de lípidos/L de meio cultura permite quantificar não só a quantidade de lípidos que a biomassa produz, mas também é tido em conta a quantidade de biomassa produzida/degradada.

No presente estudo, os melhores resultados foram obtidos para uma concentração de H₂O₂ de 0,75mM, tendo-se atingido cerca de 10,3% de lípidos na biomassa, sem perdas

significativas de biomassa. Kong et al.⁸⁷ numa cultura autotrófica semelhante à nossa, obtiveram 7,76% enquanto que alcançaram 25,26% numa cultura heterotrófica. Os ensaios efetuados por Sun, et al.⁸⁸, em fed-batch, permitiram obter 36,49% usando glicerol como fonte de carbono numa cultura monofásica heterotrófica com a *C. vulgaris*. A análise dos diferentes estudos, demonstra que as culturas heterotróficas, apresentam, usualmente, uma maior quantidade de lípidos. No entanto ao comparar os resultados obtidos neste trabalho com outros ensaios autotróficos, os valores obtidos por stress químico com peróxido de hidrogénio são superiores aos ensaios de stress após remoção do fosforo no meio de cultura e do uso de elevadas radiações luminosas.

Os ensaios nº7,8,9 apresentaram lise celular, resultando mesmo numa “lixiviação” das microalgas. Ao fim de dois dias, com concentrações superiores a 5 nM, o stress induzido lisou mais de 90% das microalgas presentes, tornando estas concentrações sem interesse para o objetivo do ensaio (Figura 4.17).



Figura 4.17 – Lixiviação dos ensaios com mais de 5nM de peróxido de hidrogénio.

O controlo, como esperado, foi o ensaio que apresentou maior quantidade de biomassa devido à ausência de fatores de stress na cultura.

Os ensaios nº2 e 3, por um lado, e o ensaio nº10, foram os que apresentaram valores superiores de lípidos produzidos quando comparados com o controlo.

A figura 4.18 demonstra a resposta da produção de lípidos face ao controlo.

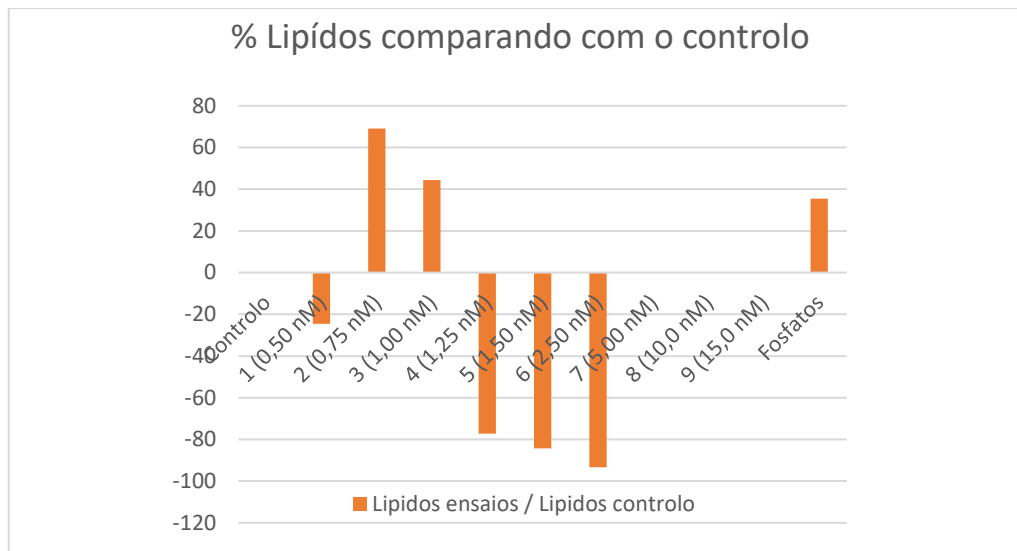


Figura 4.18 – Relação entre a quantidade de lípidos produzidos dos ensaios com o controlo

Os resultados obtidos têm especial interesse, pois o ensaio nº2 (0,75 nM) apresenta maior produção de lípidos do que o ensaio no qual os fosfatos foram removidos, sendo este método em conjunto com o aumento da intensidade luminosa um dos métodos mais utilizados a nível industrial.

Os resultados obtidos no ensaio em que a intensidade luminosa foi ampliada progressivamente, apresentam % lipídica (3,6 % w/w) inferior aos valores obtidos durante estes ensaios de stress químico (10,3% w/w), demonstrando assim, o interesse em dividir a cultura em duas fases. Sendo que a primeira, com o aumento progressivo da intensidade luminosa, otimizada para o crescimento da biomassa e uma segunda fase, no qual estes ensaios entram, com o intuito de aumentar a produção de metabolitos da microalga.

Ao longo dos ensaios, a biomassa diminui de modo proporcional ao aumento da concentração de H₂O₂; no entanto, a produção lipídica apresenta um comportamento diferente.

Os ensaios com concentração superior a 1,25 nM apresentam uma baixa produção lipídica em conjunto com uma diminuição da biomassa; nestas condições de cultura, as microalgas têm uma exposição elevada ao agente de indução de stress, limitando o seu metabolismo. Por outro lado, e em especial, o ensaio N^o2 e N^o3, a produção de lípidos aumentou até 69%, quando comparada com o controlo, apesar de ter ocorrido uma ligeira diminuição de biomassa (Figura 4.18, ensaio 2).

A figura 4.19 representa os resultados da conjugação do teor de lípidos com a concentração da biomassa.

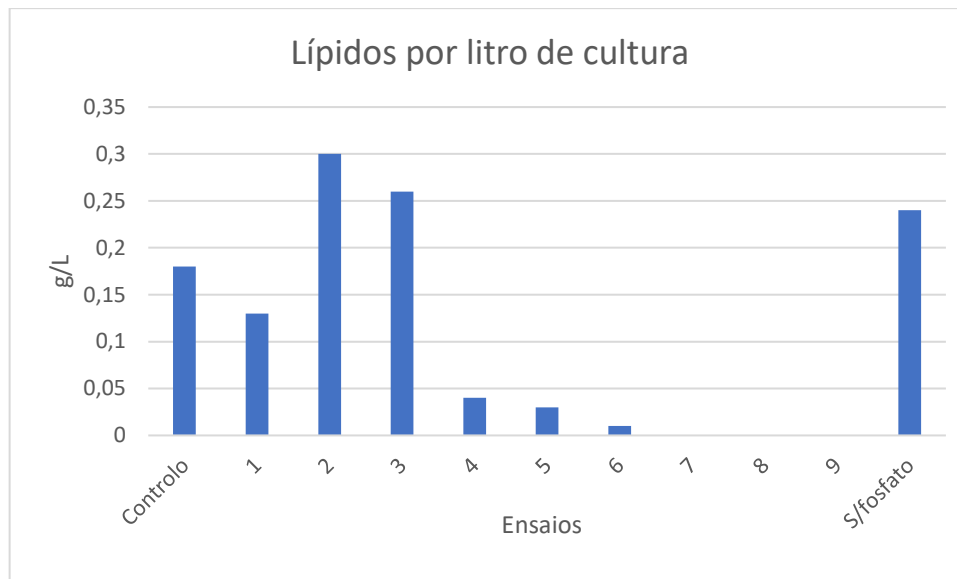


Figura 4.19 – Comparação da rentabilidade de lípidos por litro de cultura.

A figura 4.19 representa a rentabilidade, em gramas de lípidos por litro, dos diferentes ensaios. Estes valores sintetizam o efeito da concentração de H_2O_2 na produção de lípidos tendo em conta o de/acrécimo de biomassa na cultura. Os ensaios 2 e 3 apresentam os meios de cultura com maior produção lipídica. As concentrações (0,75nM e 1nM) permitem uma elevada produção lipídica e uma ligeira perda de biomassa que pouco interfere com a rentabilidade do processo global, aumentando assim o interesse deste método de stress para a indução da produção de metabolitos.

A utilização do peróxido de hidrogénio para a indução de stress celular é bastante usada na avaliação da resposta ao stress por parte de células animais; a transposição desta técnica para as células vegetais foi levemente abordada na literatura, sendo importante a avaliação de diferentes concentrações do composto e da aplicação da técnica a diversas microalgas, tornando os resultados obtidos neste estudo uma contribuição significativa.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, a importância das microalgas como uma possível resposta a diversos problemas económicos e ambientais tornou-se evidente, apesar de ainda existirem algumas dificuldades associadas aos elevados custos das diferentes técnicas de cultivo e recolha utilizadas.

Com o objetivo de reduzir os custos associados a estas culturas, este trabalho focou-se no aumento da rentabilidade da exploração destes microrganismos, aumentando a biomassa produzida no mesmo intervalo de tempo face aos métodos tradicionais. O trabalho iniciou-se com a microalga *H. pluvialis* e depois focou-se na *C. vulgaris* mais resistente e menos sensível a contaminações tornando-a uma opção mais produtiva e com melhor desempenho.

As componentes mais inovadoras do trabalho na *C. vulgaris* são duas: a primeira é relativa à otimização do crescimento da biomassa sob condições diferentes de exposição da luz e a segunda parte, diz respeito à produção e acumulação de lípidos ao expor as células a um dos principais compostos que proporciona a formação de espécies reativas de oxigénio, o peróxido de hidrogénio.

Os vários ensaios efetuados ao longo deste trabalho evidenciaram as principais limitações na cultura de microalgas fotossintéticas, propondo-se um novo método que permite aumentar em 47% a biomassa produzida, aumentando a intensidade luminosa exterior em proporção com o aumento da concentração de biomassa. Esta técnica permite disponibilizar luz suficiente para a fotossíntese no centro do fotobiorreator sem ocorrer fotoinibição na fase inicial da cultura. Ao longo dos 23 dias de cultura, as microalgas foram, assim, expostas a intensidades luminosas de 30 - 175 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na superfície do fotobiorreator. Esta metodologia permitiu, ainda, aumentar a produção de carotenoides e lípidos, em 51,4% e 22%, respetivamente, tendo em conta o acréscimo de biomassa.

Por outro lado, a indução de stress por via da introdução de H_2O_2 permitiu aumentar em 69% a produção de lípidos pela biomassa. Os resultados obtidos permitem concluir que a exposição extracelular a um ROS, irá aumentar a sua concentração intracelular e consequentemente induzir a ativação dos diferentes mecanismos de defesa das células, neste caso, a acumulação de lípidos.

Em futuros trabalhos, seria importante aplicar ambas as técnicas propostas para a otimização da biomassa, bem como para a produção de metabolitos, em diferentes espécies de microalgas. Salientando, o método de aumento progressivo da intensidade luminosa no reator em microalgas com um crescimento mais lento, como é o caso da *Haematococcus pluvialis* com o intuito de aumentar as taxas específicas de crescimento.

6. Referências

1. Khan, M. I., Shin, J. H. & Kim, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* **17**, 1–21 (2018).
2. Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling T. C & Show, P. L. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 121606 (2019) doi:10.1016/j.biortech.2019.121606.
3. Draper, A. M. & Weissburg, M. J. Impacts of global warming and elevated CO₂ on sensory behavior in predator-prey interactions: A review and synthesis. *Front. Ecol. Evol.* **7**, (2019).
4. European Environment Agency. *European Union CO₂ emissions: different accounting perspectives.* (2013).
5. Nayak, M., Karemore, A. & Sen, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Res.* **16**, 216–223 (2016).
6. Luo, X., Chen, K., Li, H. & Wang, C. The capture and simultaneous fixation of CO₂ in the simulation of fuel gas by bifunctionalized ionic liquids. *Int. J. Hydrogen Energy* **41**, 9175–9182 (2016).
7. Patel, A., Gami, B., Patel, P. & Patel, B. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **71**, 535–547 (2017).
8. Zappi, M. E. *Algal Biorefineries.* vol. 2.
9. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* **19**, 257–275 (2012).
10. Chacón-Lee, T. L. & González-Mariño, G. E. Microalgae for ‘Healthy’ Foods- Possibilities and Challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 655–675 (2010).
11. Liu, J., Sun, Z. & Chen, F. *Heterotrophic Production of Algal Oils. Biofuels from Algae* (Elsevier B.V., 2013). doi:10.1016/B978-0-444-59558-4.00006-1.
12. Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K. W. & Chen, F. Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* **233**, 326–331 (2017).
13. Zhang, C., Zhang, L. & Liu, J. The interrelation between photorespiration and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using metabolomic analysis. *Algal Res.* (2019) doi:10.1016/j.algal.2019.101520.
14. Poonkum, W., Powtongsook, S. & Pavasant, P. Astaxanthin induction in microalga *H. pluvialis* with flat panel airlift photobioreactors under indoor and outdoor conditions. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **45**, 1–17 (2015).
15. Stephenson, P. G., Moore, C. M., Terry, M. J., Zubkov, M. V. & Bibby, T. S. Improving photosynthesis for algal biofuels: Toward a green revolution. *Trends Biotechnol.* **29**, 615–623 (2011).
16. Rao, S. R., Ravishankar, G. a., Tripathi, U. & Sarada, R. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresour. Technol.* **68**, 197–199 (1999).
17. Roostaei, J., Zhang, Y., Gopalakrishnan, K. & Ochocki, A. J. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).

18. Heimann, K. & Huerlimann, R. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. *Handb. Mar. Microalgae Biotechnol. Adv.* 25–41 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-800776-1.00003-0.
19. Ben Chekroun, K., Sánchez, E. & Baghour, M. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *Int. Res. J. Public Environ. Heal.* **1**, 19–32 (2014).
20. Han, P., Lu, Q., Fan, L. & Zhou, W. A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Appl. Sci.* **9**, (2019).
21. Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu., Tao, Y., Chu, D. & Show, P. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci. Hum. Wellness* **8**, 16–24 (2019).
22. Vieira, V. V. (EABA). Value and Size Algae Biomass sector in Europe in 2016: current relevance future potential and for Biorefinery. (2017).
23. Bilal, M., Rasheed, T., Ahmed, I. & Iqbal, H. M. N. High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. *Front. Biosci. - Sch.* **9**, 319–342 (2017).
24. Spicer, A. & Molnar, A. Gene Editing of Microalgae: Scientific Progress and Regulatory Challenges in Europe. *Biology (Basel)*. **7**, 21 (2018).
25. Nesamma, A. A., Shaikh, K. M. & Jutur, P. P. Genetic Engineering of Microalgae for Production of Value-added Ingredients. *Handb. Mar. Microalgae Biotechnol. Adv.* 405–414 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-800776-1.00026-1.
26. Deniz, I., García-Vaquero, M. & Imamoglu, E. *Trends in red biotechnology: Microalgae for pharmaceutical applications. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products* (2017). doi:10.1016/B978-0-08-101023-5.00018-2.
27. Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 1463–1471 (1996).
28. Imbs, T. I., Ermakova, S. P., Malyarenko, O. S., Isakov, V. V. & Zvyagintseva, T. N. Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Coccophora langsdorfii* and in vitro investigation of their anticancer activity. *Carbohydr. Polym.* **135**, 162–168 (2016).
29. Abd, El-Hack, M. E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M.A., Khafaga, A.F., Mahgoub, S.A., Elnesr, S.S. & Gebriel, M.G. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 42–50 (2019).
30. Telford, W. G., Moss, M. W., Morseman, J. P. & Allnut, F. C. T. Cyanobacterial stabilized phycobilisomes as fluorochromes for extracellular antigen detection by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **254**, 13–30 (2001).
31. Ferreira, S.V. & Sant’Anna, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, (2017).
32. Amin, M., Chetpattanondh, P., Khan, M. N., Mushtaq, F. & Sami, S. K. Extraction and Quantification of Chlorophyll from Microalgae *Chlorella* sp. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **414**, (2018).
33. Horwitz, B. Role of chlorophyll in proctology. *Am. J. Surg.* **81**, 81–84 (1951).
34. Halim, R., Hosikian, A., Lim, S. & Danquah, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *Int. J. Chem. Eng.* **2010**, (2010).

35. Saini, R. K. & Keum, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* **240**, 90–103 (2018).
36. Alam, Md. A. & Xu, J.L. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (2020). doi:10.1007/978-981-15-0169-2.
37. Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y. & Jing, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.* **109**, 282–296 (2016).
38. Pragma, N., Pandey, K. K. & Sahoo, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **24**, 159–171 (2013).
39. Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L. & Wielgosz-Collin, G. *Lipids From Microalgae. Microalgae in Health and Disease Prevention* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/b978-0-12-811405-6.00005-0.
40. Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C. & Perales, J. A. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Res.* **49**, 465–474 (2014).
41. Guilherme, H. C. Bioremediation of liquid effluents using synergy between *Chlorella vulgaris* and bacteria. (2018).
42. Lehmuskero, A., Skogen Chauton, M. & Boström, T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Prog. Oceanogr.* **168**, 43–56 (2018).
43. Al-Qasbi, M., Raut, N., Talebi, S., Al-Rajhi, S. & Al-Barwani, T. A review of effect of light on microalgae growth. *Lect. Notes Eng. Comput. Sci.* **2197**, 608–610 (2012).
44. Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A. & Varela, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* **32**, 422–430 (2014).
45. Sharmila D., Suresh, A., Indhumathi J., Gowtham K., & Velmurugan N. Impact of various color filtered LED lights on microalgae growth, pigments and lipid production microalgae View project Isolation and Identification of Ethiopian Indigenous Microalgae and Its Potential for Phycoremediation of Industrial pollutants View pr. (2018).
46. Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T. Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. Yu X. Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **42**, 593–602 (2019).
47. Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M. & Soltani, N. Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU. *Bioresour. Technol.* **255**, 229–237 (2018).
48. Choi, Y. Y., Hong, M. E. & Sim, S. J. Enhanced astaxanthin extraction efficiency from *Haematococcus pluvialis* via the cyst germination in outdoor culture systems. *Process Biochem.* **50**, 2275–2280 (2015).
49. Prokop, A., Bajpai, R. K. & Zappi, M. E. *Algal biorefineries: Volume 2: Products and refinery design. Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design* (2015). doi:10.1007/978-3-319-20200-6.
50. Ras, M., Steyer, J. P. & Bernard, O. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **12**, 153–164 (2013).
51. Chen, C. Y. & Durbin, E. G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of

- marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **109**, 83–94 (1994).
52. Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A. & Ogden, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* **28**, 192–199 (2017).
 53. Sobczuk, T. M., Camacho, F. G., Grima, E. M. & Chisti, Y. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28**, 243–250 (2006).
 54. Pörs, Y., Wüstenberg, A. & Ehwald, R. A batch culture method for microalgae and cyanobacteria with CO₂ supply through polyethylene membranes. *J. Phycol.* **46**, 825–830 (2010).
 55. Remmers, I. M., Hidalgo-Ulloa, A., Brandt, B.P., Evers, W.A.C., Wijffels, R.H. & Lamers, P.P. Continuous versus batch production of lipids in the microalgae *Acutodesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* **244**, 1384–1392 (2017).
 56. Benvenuti, G. *et al.* Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **28**, 3167–3177 (2016).
 57. Boonma, S., Takarada, T., Peerapornpisal, Y., Pumas, C. & Chaiklangmuang, S. Semi-continuous cultivation of microalgal consortium using low CO₂ concentration for large-scale biofuel production. *J. Biotech Res.* **10**, 19–28 (2019).
 58. Tang, H., Chen, M., Simon Ng, K. Y. & Salley, S. O. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2468–2474 (2012).
 59. Gao, F., Li, G., Yang, Z.H., Zeng, G.M., Feng, L.J., Liu, J.Z., Liu, M., & Cai, H.w. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecol. Eng.* **92**, 55–61 (2016).
 60. Yan, N., Fan, C., Chen, Y. & Hu, Z. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–24 (2016).
 61. Catarina Guedes, A. & Xavier Malcata, F. Bioreactors for microalgae: A review of designs, features and applications. *Bioreact. Des. Prop. Appl.* 1–51 (2011).
 62. Płaczek, M., Patyna, A. & Witczak, S. Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation. *E3S Web Conf.* **19**, 1–10 (2017).
 63. Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X. R. & Liu, C. Z. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.* **9**, 178–189 (2009).
 64. Vonshak, A. Recent advances in microalgal biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **8**, 709–727 (1990).
 65. Griffiths, D. J., Thresher, C. L. & Street, H. E. The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon No. 1 strain). *Ann. Bot.* **24**, 1–11 (1960).
 66. Neilson, A. H. & Lewin, R. A. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia* **13**, 227–264 (1974).
 67. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front. Microbiol.* **7**, 1–19 (2016).
 68. Garg, N. & Manchanda, G. ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosyst.* **143**, 81–96 (2009).
 69. Menegazzo, M. L. & Fonseca, G. G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **107**, 87–107 (2019).
 70. Piasecka, A., Krzemińska, I. & Tys, J. Physical methods of microalgal biomass pretreatment. *Int. Agrophysics* **28**, 341–348 (2014).
 71. Pereira, A. L. dos S. *Ekp* **13**, 1576–1580 (2015).

72. Tan, J. Sem., Lee, S.Y., Chew, K.W., Lam, M.K., Lim, J.W., Ho S., & Show P.L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered* **11**, 116–129 (2020).
73. Zhu, L., Li, Z. & Hiltunen, E. Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnol. Biofuels* **11**, 1–10 (2018).
74. Lapshina, L. A., Reunov, A. V. & Nagorskaya, V. P. Effects of exogenous H₂O₂ on the content of endogenous H₂O₂, activities of catalase and hydrolases, and cell ultrastructure in tobacco leaves. *Biol. Bull.* **43**, 419–425 (2016).
75. Sharakshane, A. An easy estimate of the PFDD for a plant illuminated with white LEDs: 1000 lx= 15 μ mol/s/m². *bioRxiv* 289280 (2018).
76. Tocquin, P., Fratamico, A. & Franck, F. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. *J. Appl. Phycol.* **24**, 365–373 (2012).
77. Cifuentes, A. S., González, M. A., Vargas, S., Hoeneisen, M. & González, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.* **36**, 343–357 (2003).
78. Fathalipour K, N. G. Evaluating Effect of Di-potassium Hydrogen Phosphate (K₂HPO₄) on Accumulation of Some Secondary Metabolites in *Spirulina* cyst. *J. Ecosyst. Ecography* **05**, 5–6 (2015).
79. Nielsen, S. S. Pigment Analysis. *Instr. Man. Food Anal. Second Ed.* **167**, 67–69 (1998).
80. Picazo, A., Rochera, C., Vicente, E., Miracle, M. R. & Camacho, A. Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: A critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake. *Limnetica* **32**, 139–158 (2013).
81. Canelli, G., Neutsch, L., Carpine, R., Tevere, S., Giuffrida, F., Rohfritsch, Z., Dionisi, F., Bolten, C.J., & Mathys A. *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability. *Algal Res.* **45**, (2020).
82. Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M. & Simões, M. Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Int. J. Energy Environ. Eng.* **4**, 1–6 (2013).
83. Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y. & Oh, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* **101**, S75–S77 (2010).
84. Lakna. Difference Between Chlorophyll A and B Difference Between Chlorophyll A and B Main Difference-Chlorophyll A vs Chlorophyll B. *Pediaa* (2017).
85. Palenik, B. & Morel, F. M. M. Dark production of H₂O₂ in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* **33**, 1606–1611 (1988).
86. Rezayian, M., Niknam, V. & Ebrahimzadeh, H. Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicol. Reports* **6**, 1309–1313 (2019).
87. Kong, W., Yang, S., Wang, H., Huo, H., Guo, B., Liu, N., Zhang, A., & Niu, S. Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. *J. Appl. Phycol.* **32**, 1569–1579 (2020).

88. Sun, Y., Liu, J., Xie, T., Xiong, X., Liu, W., & Zhang, Y. Enhanced lipid accumulation by *Chlorella vulgaris* in a two-stage fed-batch culture with glycerol. *Energy and Fuels* **28**, 3172–3177 (2014).