



Indução da carotenogénese em *Chlorella* sp. para alteração  
da cor da biomassa

**Joana Raquel Almeida Galante**

2018





# Indução da carotenogénese em *Chlorella* sp. para alteração da cor da biomassa

**Joana Raquel Almeida Galante**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos  
Recursos Marinhos

Estágio realizado sob a orientação da Doutora Joana Gabriela Laranjeira da  
Silva e coorientação da Doutora Luísa Gouveia e da Doutora Clélia Neves  
Afonso

**2018**



Título: Indução da carotenogénese em *Chlorella* sp. para alteração da cor da biomassa

Copyright© Joana Raquel Almeida Galante

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche  
Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer a todo o apoio dado neste último ano. A Algafarm foi uma experiência de vida, que me ajudou a crescer não só como pessoa, mas também profissionalmente.

Em particular quero agradecer aos meus pais e todo o resto da minha família pelo incentivo e pela ajuda nesta etapa. As minhas amigas do coração, Catarina Almeida e a Ana Catarina Perfeito, por estarem sempre lá quando estou perdida e quando preciso de uma mão extra. E ao Luís Carlos Carvalho pelo apoio, carinho e, apesar de não entender nada disto, pela tentativa de compreender o que andava a fazer.

Um grande obrigado à Doutora Joana Silva por ter proporcionado esta oportunidade, pelo apoio, ajuda e preocupação durante a realização da tese. À Doutora Clélia Afonso, que mais uma vez foi minha orientadora, pela ajuda e apoio. E também a Doutora Luísa Gouveia pela disponibilidade e apoio durante todo o processo.

Também quero agradecer aos meus colegas da UID, Pedro Quelhas, Joana Teles, Bernardo Carvalho e Nádía Correia, que sem eles tudo seria muito mais difícil. Um grande obrigado por todo o que me ensinaram, pela ajuda e apoio.

A muitos outros que não referi, mas que também estiveram comigo nesta etapa, um muito obrigado.



## Resumo

No início do século XX, as microalgas começaram a despertar interesse na comunidade científica e, desde então, novos estudos permitiram o reconhecimento do seu potencial a ser usado para diversos fins. A *Chlorella* é uma das microalgas produzidas e comercializadas mundialmente. Existem neste momento três espécies de *Chlorella* reconhecidas no mercado Europeu como Novel Food o que permite que sejam comercializadas para alimentação humana. Devido ao facto de o consumo de algas não ser uma prática comum na União Europeia, nos últimos anos surgiram estudos para a incorporação desta alga na dieta europeia, com benefícios para a saúde humana.

O objetivo deste trabalho foi induzir a carotenogénese em duas estirpes de *Chlorella vulgaris* e uma estirpe de *Chlorella protothecoides*, privando as culturas da fonte de azoto no meio de cultivo.

Numa primeira etapa, as duas estirpes de *Chlorella vulgaris* foram inoculadas em reatores de 5 L com meio f/2 modificado. No passo seguinte, foram testadas duas condições: na primeira condição as culturas foram inoculadas com meio f/2 sem KNO<sub>3</sub> e na segunda condição o meio de cultivo apenas continha água da cimenteira. Em ambas as culturas, foi avaliada a concentração de clorofila e carotenóides, ao longo do ensaio. Verificou-se um decréscimo no teor de clorofila em ambas as culturas e uma acumulação de carotenóides apenas nas condições controlo. Foi observada a mudança de cor verde para cor amarela em *Chlorella vulgaris* e para cor alaranjada em *Chlorella vulgaris* Beijerinck (estirpe de controlo).

O ensaio seguinte, foi realizado em *outdoor* num Fotobiorreator de 2000L (FBR) e em três Green-wall de 45L (GW), usando *Chlorella vulgaris* crescida em fermentador. Após a indução das culturas, não foi observada uma mudança de cor significativa. Neste ensaio, foi avaliada a concentração de proteína. Observou-se uma descida na concentração de proteína nos reatores à medida que a fonte de azoto ia sendo consumida.

No último ensaio, o crescimento fez-se de modo heterotrófico usando a estirpe *Chlorella protothecoides*. Para isso, numa primeira etapa foi feito um teste em matraz com diferentes concentrações de amónia, onde se constatou que quanto mais baixa a concentração de amónia, maior a alteração da cor da cultura. A etapa seguinte foi realizada num fermentador de 5 L, onde não se observou mudança de cor da cultura.

Neste trabalho, foi possível realizar a indução nas culturas, mas apenas nos ensaios em pequena escala (ensaio em balão e em matraz).

**Palavras-chave:** *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, Microalgas, carotenogénese, mudança de cor, indução.

## Abstract

In the early twentieth century, microalgae began to awaken interest in the scientific community. To date, studies on this topic were scarce. In this new century, new studies have allowed the recognition of its potential. *Chlorella* is one of the microalgae produced and marketed worldwide. There are currently three species of *Chlorella* recognized in the European market as Novel Food. Recognition as Novel Food allows these species to be marketed for human consumption. Due to the fact that the consumption of algae is not a common practice in the European Union, in recent years there have been studies to incorporate this alga into the European diet.

The objective of this work was to induce carotenogenesis in two strains of *Chlorella vulgaris* and one strain of *Chlorella protothecoides*, depriving the cultures of the nitrogen source in the culture medium.

In a first step, the two strains of *Chlorella vulgaris* were inoculated into 5 L reactors with modified f/2 medium. In the next step, two conditions were tested: In the first condition the cultures were inoculated with f/2 medium without KNO<sub>3</sub> and in the second condition the culture medium contained only water from the cement. In both cultures, the concentration of chlorophyll and carotenoid was evaluated throughout the experiment. There was a decrease in chlorophyll content in both cultures and an accumulation of carotenoids only under the control conditions. The change from green to yellow color in *Chlorella vulgaris* and to orange color in *Chlorella vulgaris* Beijerinck (control strain) was observed.

The following assay was performed in outdoors on a 2000L Photobiorreactor (PBR) and three Green-wall 45L (GW), using *Chlorella vulgaris* grown in a fermenter. After induction of cultures, no significant color change was observed. In this assay, the protein concentration was evaluated. A decrease in protein concentration in the reactors was observed as the source of nitrogen was being consumed.

In the latter assay, the growth was done heterotrophically using the *Chlorella protothecoides* strain. For this, in the first stage a test was carried out in a flask with different concentrations of ammonia, where it was found that the lower the concentration of ammonia, the greater the change in the color of the culture. The next step was carried out in a 5 L fermenter, where no color change was observed.

In this work, it was possible to carry out the induction in the cultures, but only in small scale tests (balloon and flask assay).

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, Microalgae, carotenogenesis, color change, induction.

## Índice

1. Estado da arte .....	1
1.1. Produção de microalgas .....	1
1.2. ALGAFARM – Unidade de Produção de Microalgas .....	1
1.2.1. ALGAFARM e o <i>Scale up</i> exclusivamente autotrófico .....	2
1.2.2. ALGAFARM e o <i>Scale up</i> bifásico.....	2
1.2.3. ALGAFARM - Colheita e downstream.....	3
2. Microalgas.....	3
2.1. <i>Chlorella</i> sp.....	7
2.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	7
2.1.2. <i>Chlorella protothecoides</i> .....	8
2.2. Carotenogénese .....	9
3. Objetivos.....	10
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1. Meio de cultura e estirpes.....	11
4.2. Ensaio de crescimento .....	12
4.3. Ensaio da indução da carotenogénese em balão.....	13
4.4. Ensaio em reatores <i>outdoor</i> com inóculo proveniente da fermentação .....	14
4.5. Ensaio de crescimento em fermentador .....	15
4.6. Determinações analíticas.....	16
4.6.1. Determinação do teor de nitratos.....	16
4.6.2. Determinação do teor de pigmentos .....	16
4.6.3. Determinação do teor de proteína.....	16
4.7. Análise estatística.....	17
5. Resultados e Discussão .....	19
5.1. Ensaio de crescimento .....	19

5.2. Ensaio de indução da carotenogénese em balão. ....	20
5.3. Ensaio de indução de reatores <i>outdoor</i> - Green-wall (GW) e Fotobiorreatores (FBR)	28
5.4. Ensaio em fermentador.....	31
6. Conclusão.....	35
7. Referências.....	37
Anexos .....	43

## Índice de figuras

Figura 1-Fotografia aérea da unidade ALGAFARM .....	2
Figura 2- Imagem ilustrativa dos reatores de 5L inoculados com <i>Chlorella</i> sp. ....	13
Figura 3- Imagem ilustrativa de Fotobiorreatores (A) e Green-wall (B) .....	14
Figura 4- Imagem ilustrativa de um fermentador de cinco litros .....	15
Figura 5- Crescimento em fed-batch da cultura controlo, <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58, e da cultura teste, <i>Chlorella vulgaris</i> , em reatores de cinco litros (média $\pm$ desvio-padrão, n=3) ..	19
Figura 6- Concentração de clorofila em relação à cultura de controlo <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58 (cinza) e <i>Chlorella vulgaris</i> (cinza claro) relativo à condição 1 (média $\pm$ desvio-padrão, n=3), * representa $p < 0,05$ .....	21
Figura 7 - Concentração de clorofila em relação à cultura de controlo <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58 (cinza) e <i>Chlorella vulgaris</i> (cinza claro) relativo à condição 2 (média $\pm$ desvio-padrão, n=3), * representa $p < 0,05$ .....	22
Figura 8 - Concentração de carotenóides totais em relação à cultura de controlo <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58 (cinza) e <i>Chlorella vulgaris</i> (cinza claro) relativo à condição 1 (média $\pm$ desvio-padrão, n=3), * representa $p < 0,05$ .....	23
Figura 9 - Concentração de carotenóides em relação à cultura de controlo <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58 (cinza) e <i>Chlorella vulgaris</i> (cinza claro) relativo à condição 2 (média $\pm$ desvio-padrão, n=3), * representa $p < 0,05$ .....	24
Figura 10 - Concentração de clorofila (esquerda) e carotenóides (direita) relativos à condição 1 (cinza escuro) e condição 2 (cinza) na cultura de controlo, <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58 (média $\pm$ desvio-padrão, n=3), * representa $p < 0,05$ .) .....	25
Figura 11 -Concentração de clorofila (esquerda) e carotenóides (direita) relativos à condição 1 (cinza escuro) e condição 2 (cinza) na cultura de teste, <i>Chlorella vulgaris</i> (média $\pm$ desvio-padrão, n=3) .....	25
Figura 12 - Balões de <i>Chlorella vulgaris</i> , nas condições de ensaio 1 e 2 (da esquerda para a direita respetivamente), no dia 0 (imagens de cima) e último dia de ensaio (imagem de baixo). .....	26

Figura 13 - Balões de <i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58, nas condições de ensaio 1 e 2 (da esquerda para a direita respetivamente), no dia 0 (imagens de cima) e último dia de ensaio (imagem de baixo).....	26
Figura 14 - Concentração celular (células/ml) de <i>Chlorella protothecoides</i> do crescimento em matraz, nas diferentes concentrações de amónia (média $\pm$ desvio-padrão, n=2) .....	31
Figura 15 - Matrizes de <i>Chlorella protothecoides</i> no último dia do ensaio. ....	32
Figura 16 - Concentração celular (células/ml) de <i>Chlorella protothecoides</i> em fermentador de 5 L. ....	33

## Índice de tabelas

Tabela I - Aplicações das Microalgas. ....	4
Tabela II - Tipos de cultivo de microalgas e suas vantagens e desvantagens. ....	5
Tabela III- Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo.....	6
Tabela IV- Meio f/2 descrito por Guilard (1975), com alterações.....	11
Tabela V - Lista de espécies de microalgas utilizadas nos ensaios.....	12
Tabela VI - Produtividade volumétrica e taxa específica de crescimento das culturas em estudo, durante os 28 dias de crescimento .....	20
Tabela VII - Peso seco (g/L) das culturas crescidas em GW e FBR após doze dias de ensaio com adição de meio biológico no segundo dia do ensaio para os GW; e no nono dia para FBR. ....	28
Tabela VII - Concentração de proteína (%) em culturas crescidas em GW e FBR após doze dias de ensaio com adição de meio biológico no segundo dia do ensaio para os GW; e no nono dia para FBR. ....	29



## Lista geral de nomenclatura

ABS – Absorbância

CMP - Cimentos Maceira e Pataias

EFSA - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EUA - Estados Unidos da América

FBR - Fotobiorreator

FDA - Food and Drug Administration

FFDCA - Federal Food, Drug, and Cosmetic Act

GRAS - Generally Recognized as Safe

GW- Green-wall

GWP- Green-Wall Panel

LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia

LX – Unidade de medida da intensidade luminosa

PCA - Plate Count Agar

PS – Peso seco

ROS - Espécies reativas de oxigênio

UE – União Europeia



# 1. Estado da arte

## 1.1. Produção de microalgas

O desenvolvimento científico data de há muitos séculos atrás, mas apenas no início do século XX é que os avanços nos estudos sobre microalgas começaram a ser notórios. Um século depois do desenvolvimento de estudos sobre a sua constituição, desenvolvimento, reprodução e produção, as microalgas são usadas em diversos fins. Podem ser usadas, por exemplo, na alimentação humana e animal, na produção de fármacos e produtos de cosmética, na produção de biocombustíveis, plásticos, fertilizantes e no tratamento de efluentes. Apesar de todo este potencial, com a tecnologia atual o custo de produção ainda é elevado e não existe um processo de produção padronizado. Assim, a produção a uma escala industrial ainda tem um longo caminho a percorrer (Acién *et al.*, 2017).

Atualmente já existem empresas focadas no desenvolvimento de métodos de produção em larga escala de microalgas. Na Europa, começaram a surgir empresas como a AlgoSource (AlgoSource, 2016) e Fermentalg (Fermentalg, 2018) localizadas em França e a Algades (Algades, 2016) localizada em Espanha. Mas Portugal não ficou para trás. Em Portugal, existem pelo menos três empresas de produção de microalgas nomeadamente a ALGAFARM (SECIL, 2016), a Necton (Necton, 2018) e a BuggyPower (BUGGYPOWER, 2017).

## 1.2. ALGAFARM – Unidade de Produção de Microalgas

Este estágio foi realizado na empresa CMP/Algafarm (Cimentos Maceira e Pataias) pertencente ao grupo Secil, localizada em Pataias, Alcobaça. A empresa foi fundada em 1904 em Outão, Setúbal, mas apenas em 1923 é que foi criada a marca Secil. Nesta fábrica são produzidos produtos como betão pré-fabricado, revestimentos, painéis de fibra, cal hidráulica, rebocos, pedreiras, entre outros. A Secil é uma das principais empresas produtoras de cimento em Portugal, operando internacionalmente em Angola, Tunísia, Cabo Verde, Holanda, Brasil e Líbano (SECIL, 2016).

A ALGAFARM, unidade de produção de microalgas, pertence à empresa CMP (fig.1) e é considerada uma das maiores unidades de produção de microalgas, em sistema fechado, na Europa. A sua produção em larga escala é composta por fotobiorreatores (FBRs), para cultivo autotrófico e, por fermentadores para geração de inóculo Premium (F5L, F200L e F5000L).

Desta forma, o *scale up* da unidade poderá seguir a via exclusivamente autotrófica ou autotrófica em duas fases, sendo a primeira fase a geração de inóculo por fermentação.



Figura 1- Fotografia aérea da unidade ALGAFARM.

### 1.2.1. ALGAFARM e o *Scale up* exclusivamente autotrófico

Em condições controladas de esterilidade e tratamento de águas, o inóculo é cultivado à escala laboratorial, em reatores/balões de 5L. Posteriormente, os reatores de 5L são usados para inocular um green-wall (GW) de 1000L localizados numa estufa com temperatura e humidade controlada. As dimensões da estufa permitem a inoculação de 12 GW ao menos tempo. Numa fase posterior e após cultivo, a biomassa obtida nos GW é usada para inocular os FBRs exteriores. Os FBRs têm diferentes volumetrias classificando-se em FBRs tipo S (small; 5 reatores de 10m<sup>3</sup>), M (medium; 5 reatores de 30m<sup>3</sup>), L (large; 8 reatores de 90m<sup>3</sup>) e XL (extra-large; 1 reator de 180m<sup>3</sup>). Os reatores tipo S e M são considerados reatores de inoculação e os reatores tipo L e XL reatores de produção. A grande desvantagem deste tipo de *scale up* é o tempo de cultivo que poderá ser cerca de 3 meses (do balão ao produto final em pó).

### 1.2.2. ALGAFARM e o *Scale up* bifásico

Em 2016 e de forma a colmatar o tempo de *scale up* a unidade introduziu uma nova tecnologia de cultivo de microalgas – a fermentação. Neste processo heterotrófico, inicialmente a inoculação é realizada num fermentador de bancada de 5L a partir de culturas conservadas em Master Cell Banks, que posteriormente inoculam um fermentador de 200L e por último um fermentador de 5000L. O inóculo gerado no fermentador de 5000L é posteriormente usado para

*scale up* autotrófico em FBR. Todo este processo é realizado em poucas semanas e dá origem a grandes quantidades de biomassa. Ao contrário do processo em autotrofia que demoraria o dobro do tempo, este processo torna-se mais interessante devido à sua celeridade. Assim, o uso de fermentadores permitiu reduzir significativamente o tempo de *scale-up*. Contudo, nem todas as microalgas possuem o mecanismo de crescimento heterotrófico.

### 1.2.3. ALGAFARM - Colheita e downstream

A cultura crescida em autotrofia segue para colheita por concentração num sistema de membranas e posterior secagem por atomização. Atualmente a unidade está apta a comercializar biomassa em pó, em formato de comprimido e/ou cápsulas. A imagem da unidade prende-se com o fornecimento de *Chlorella vulgaris* de qualidade Premium sendo a mesma comercializada pela empresa AllMicroalgae sob a marca Allma. (Fonseca *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017).

## 2. Microalgas

As microalgas existem no planeta há milhares de milhões de anos e diferenciam-se das macroalgas pela sua constituição primitiva e pelo seu tamanho reduzido, entre 2-200 µm. Estes organismos têm um importante papel ecológico pois são o principal produtor de O<sub>2</sub> do planeta. Habitualmente estas algas crescem em água, mas certas espécies conseguem crescer em rochas, plantas, no solo e por vezes em animais como por exemplo nas preguiças. Também podem viver em simbiose com líquenes, corais e outros animais. Até agora existem microalgas classificadas em duas divisões de procarióticos (Cyanophyta e Phrochlorophyta) e nove divisões de eucarióticos (Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta e Chlorophyta) (Lee, 2008; Bhola *et al.*, 2014). Segundo Venkatesan *et al.*, 2015, os grupos de algas mais importantes em termos de abundancia são: diatomáceas (Bacillariophyceae); algas verdes (Chlorophyceae); cianobactérias (Cyanophyceae); e algas douradas (Chrysophyceae).

As microalgas possuem vários compostos bioativos que são usados na alimentação animal e humana, em produtos farmacêuticos e cosméticos. Estes compostos podem completar as necessidades nutricionais e energéticas e promover a saúde prevenindo algumas doenças. Podem ainda ser usadas em processos de biorremediação de efluentes líquidos e gasosos e na produção de compostos bioenergéticos. As microalgas ainda têm a vantagem, em comparação

a outros produtos alimentares, de não necessitarem de terras aráveis e poderem usar águas residuais como fontes de alimento para o seu crescimento (Vaz et al., 2016).

Na área dos combustíveis também tem existido um grande interesse em substituir os combustíveis fósseis por uma alternativa mais sustentável. Até agora a biomassa das microalgas já foi usada como uma fonte de componentes bioenergéticos como o biodiesel, bioetanol, metano, alcanos e hidrogénio (Gouveia, 2011; Lin *et al.*, 2017). Alguns estudos, também comprovaram que as microalgas têm a capacidade de retirar o carbono, o azoto e o fósforo de águas residuais, podendo ser no futuro próximo uma forma de tratamento destas (Znad *et al.*, 2018). Apesar dos exemplos mencionados anteriormente, a produção em larga escala de microalgas ainda não é totalmente sustentável considerando que os custos de investimento e operação continuam a ser bastante elevados e os mercados ainda pouco maduros no que se refere ao potencial e valor acrescentado deste tipo de biomassa. Na Tabela I são inumeradas algumas espécies e as suas várias aplicações.

Tabela I- Aplicações das Microalgas.

<b>Aplicação</b>	<b>Microalga (espécie)</b>	<b>Referência</b>
Alimentação humana	<i>Spirulina plantensis</i> , <i>Spirulina maxima</i> , <i>Chlorella ellipsoidea</i> , <i>Scenedesmus sp.</i>	Mata <i>et al.</i> , 2010
Alimentação animal	<i>Chlorella sp</i> , <i>Isochrysis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Tetraselmis sueca</i> , <i>Phormidium bohneri</i>	Venkatesan <i>et al.</i> , 2015. Guedes <i>et al.</i> , 2015 Mata <i>et al.</i> , 2010
Biocombustível	<i>Chlorella</i> , <i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Anabaena augstumalis</i> , <i>Calothrix sp.</i>	Prabondono e Amin, 2015.
Biorremediação	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bulgariu e Gavrilescu, 2015.
Cosmética	<i>Spirulina sp.</i> <i>Anacystis maxima</i> , <i>Halymenia durvillei</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> .	Ryu <i>et al.</i> , 2015
Farmacêutica	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Spirulina sp.</i> <i>Ulkenia sp.</i>	Barreira <i>et al.</i> , 2015

Para crescer as microalgas é necessária uma fonte de nutrientes, uma fonte luminosa e água. Muitas microalgas têm a capacidade de crescer em modo auto, hetero e mixotrófico, como é o caso da *Chlorella vulgaris*. No entanto, algumas microalgas crescem exclusivamente em autotrofia como é o caso da espécie salina *Nannochloropsis* sp. De modo geral, as microalgas crescem em autotrofia usando uma fonte de carbono inorgânica, o CO<sub>2</sub>. Quando a alga tem a capacidade de crescer heterotroficamente, é fornecida uma fonte de carbono orgânico, como o glicerol, acetato, açúcares (ex.: glucose) e hidratos de carbono hidrolisados (Safi *et al.*, 2014; Posten e Chen, 2016). No caso do crescimento mixotrófico, é possível usar uma fonte orgânica e inorgânica de carbono simultaneamente. Apesar disto, como acontece no caso anterior, nem todas as espécies tem capacidade de crescer em mixotrofia (Tabela II).

Tabela II-Tipos de cultivo de microalgas e suas vantagens e desvantagens.

Tipos de cultivo	Vantagens	Desvantagens	Referências
<b>Autotrofia</b>	Baixo custo. A luz induz a produção de alguns compostos de interesse. Possibilidade de usar meio de fontes alternativas (ex: águas residuais)	Baixa produtividade. É dependente das condições climáticas, quando realizado em larga escala.	Pires J., 2015
<b>Heterotrofia</b>	Elevadas produtividades Não necessita de luz. Fácil colheita.	Custos elevados (mão de obra, fonte de carbono e equipamento) Risco de contaminação. Poucas espécies crescem em heterotrofia.	Valea <i>et al.</i> , 2017 Pires J., 2015
<b>Mixotrofia</b>	Reduzida fotoinibição. Combina duas formas de nutrição (CO <sub>2</sub> e moléculas orgânicas). Elevada taxa de crescimento.	Grande risco de contaminação. Sistema pouco desenvolvido. Elevado custo do meio.	Valea <i>et al.</i> , 2017 Pires J., 2015

Os diferentes tipos de cultivos mencionados anteriormente, podem ser cultivados em diferentes sistemas de produção nomeadamente em sistemas de cultivo fechado e aberto. A Tabela III pretende ilustrar os diferentes sistemas as suas vantagens e desvantagens.

Consideramos um sistema de cultivo aberto quando o reator está diretamente exposto ao ambiente. Este sistema de cultivo pode ser realizado de forma natural (ex: lagoas) ou artificial (ex: tanques). As formas mais comuns de cultivo são raceways, lagoas de pista e lagoas circulares. De modo a permitir uma fácil exposição da luz solar a todas as células, estes sistemas devem ter entre 15 a 50 cm de profundidade máxima. Normalmente estas estruturas devem ser construídas preferencialmente perto de indústrias de energia ou indústrias que emitam grandes quantidades de CO<sub>2</sub>, permitindo assim que as culturas utilizem o CO<sub>2</sub> das indústrias (Safi *et al.*, 2014).

O sistema de cultivo fechado supera imensas desvantagens de sistema aberto. Uma das vantagens é o maior controlo sobre os parâmetros de cultura como luz, temperatura, pH e CO<sub>2</sub>. Isto permite produzir uma biomassa de maior “qualidade” podendo assim ter o consumo humano como objetivo final. Ambos os processos são usados hoje em dia, por isso a escolha do sistema dependerá da aplicação do produto final (Fonseca *et al.*, 2016).

Tabela III- Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo.

Sistema de cultivo	Vantagens	Desvantagens	Referências
<b>Sistema aberto</b> Raceways Lagoas Tanques abertos	Barato de contruir e operar. Economicamente viável em larga escala. Produção de produtos de baixo custo.	Suscetível a contaminações. Necessita de um clima favorável. Não é possível controlar intensidade luminosa. Baixa produtividade.	Fonseca <i>et al.</i> , 2016
<b>Sistema fechado</b> Fotobioreatores Green-walls	Maior produtividade. Maior controlo na cultura. Risco de contaminação reduzido. Menores custos na colheita.	Processo de <i>scale-up</i> e produção mais complexo. Sistema mais caro. Necessita de mais desenvolvimento.	Fonseca <i>et al.</i> , 2016

## 2.1. *Chlorella* sp.

A *Chlorella* é uma das microalgas considerada pela EFSA (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar) um ingrediente alimentar para consumo humano. Desta forma, atualmente é considerada um superalimento e frequentemente usada para fins alimentares e como suplementação dietética. A *Chlorella* é uma das melhores fontes de clorofila presentes na natureza, rica em proteína e aminoácidos essenciais, vitaminas e pigmentos.

Os teores de proteínas nas microalgas, podem variar entre 38% e 58% no caso da *Chlorella vulgaris* e 45-50% na *Haematococcus pluvialis*, podendo ainda chegar valores entre 50-70% de proteína na *Arthrospira platensis*, em relação ao peso seco (Hayes *et al.*, 2017). A proteína proveniente de microalgas contem todos os aminoácidos essenciais constituintes das proteínas animais, sendo até possível compará-las. Isto torna a microalga uma nova fonte benéfica de proteína. Também tem grandes quantidades de vitamina C,  $\beta$ -caroteno (provitamina A), vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, B12), vitamina E, vitamina K, biotina, ácido fólico e inositol (Udayan *et al.*, 2017).

### 2.1.1. *Chlorella vulgaris*

Duas das microalgas usadas neste estudo pertencem ao Domínio Eucariota, Reino Protista, Divisão Chlorofita, Classe Trebouxiophyceae, Ordem Chlorellaceae, Género *Chlorella* e espécie *Chlorella vulgaris*. Beijerinck (1890), descreveu pela primeira vez o género *Chlorella* quando observava uma *Chlorella vulgaris*. Desde então, várias espécies de diferentes habitats foram identificadas (Champenois *et al.*, 2015).

Esta espécie cresce em água doce e pensa-se que existe desde o período pré-cambriano mantendo a sua integridade genética desde então. Esta espécie tem uma forma esférica com um diâmetro de 2 a 10  $\mu\text{m}$  e possui uma parede celular de celulose que varia de espessura e composição de acordo com as condições que ocorrem para o seu crescimento (Hynstova *et al.*, 2018). O género *Chlorella* é fácil de cultivar, tem um ciclo de vida simples e vias metabólicas semelhantes às plantas superiores sendo um organismo modelo nos estudos sobre os mecanismos de fotossíntese e assimilação de dióxido de carbono (ciclo Calvin) (Posten e Chen, 2016). O seu crescimento foto-autotrófico é limitado quando existem situações de *stress*, nomeadamente nutrientes, aumento da intensidade luminosa, alteração do pH e limitação de carbono (Znad *et al.*, 2018).

Cientistas alemães no início do século 20, começaram a estudar o género *Chlorella* como uma possível fonte de proteína devido ao seu teor elevado. Mas só em 1950, num estudo realizado pela Instituição Carnegie de Washington (CIW), é que se iniciou o crescimento em larga escala de microalgas, mas com o objetivo de captar CO<sub>2</sub>. Hoje em dia, o Japão é o líder mundial do consumo de *Chlorella* (Safi *et al.*, 2014).

A *Chlorella* é uma das microalgas mais comercializadas mundialmente. Apesar de não ser um alimento tradicionalmente consumido na União Europeia, o seu acesso ao mercado europeu foi aprovado pelo Novel Food Regulation nº258/97, segundo o qual alimentos ou ingredientes alimentares que não tenham sido utilizados para consumo humano de forma significativa na União Europeia antes de 15 de maio de 1997 necessitam de uma avaliação de segurança. Do género *Chlorella*, existem três espécies que estão catalogadas como Novel Food: *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella luteoviridis*. Para além disso, fornecedores de *Chlorella* na Europa confirmaram que a *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* já existiam no mercado antes de 1997 (Champenois *et al.*, 2015).

Batista *et al.* (2008), realizou algumas experiências com *Chlorella vulgairs*, para incorporar em alimentados como maioneses, sobremesas com gelatina, bolachas, cereais de pequeno-almoço e massas. Todos estes alimentos estão diariamente na alimentação da dieta europeia. Ao incorporar uma pequena quantidade de *Chlorella vulgairs* nestes alimentos diariamente consumidos, permite uma melhor aceitação do consumo de *Chlorella*, sem ser necessário consumi-la diretamente (por exemplo em comprimido). Seguindo esta ideia, existe atualmente no mercado, a marca Allma, resultante de uma parceria da confeitaria Telhas (Várzeas, Leiria) e a ALGAFARM, fabrica biscoitos e “telhas” com *Chlorella vulgaris*.

### 2.1.2. *Chlorella protothecoides*

A *Auxenochlorella protothecoides*, mais conhecido por *Chlorella protothecoides*, pertence à classe Trebouxiophyceae. Esta microalga, tal como a *Chlorella vulgaris*, consegue crescer em autotrofia ou heterotrofia e é bastante conhecida pelo seu elevado teor lipídico (Xu *et al.*, 2006). Numa fermentação axénica esta espécie pode atingir teores de proteína entre 40 e 70% e ao contrário das outras espécies de *Chlorella*, esta tem uma parede celular rígida, que contém polímeros de glucose-manose. Para além disto, as células que cresceram em condições de heterotrofia, não contém clorofila, o que se revela vantajoso. Este comportamento é difícil de se obter noutras espécies do género *Chlorella* (Grossmann *et al.*, 2018). Campenni *et al.*

(2012), realizaram um estudo com *Chlorella protothecoides*, onde foi induzida a mudança de cor através de *stress* por NaCl e intensidade luminosa, em autotrofia. Neste estudo a microalga mudou de cor verde para um laranja avermelhado.

Ao contrário do que acontece com a *Chlorella vulgaris*, esta espécie não pertence a lista da União Europeia (UE) dos Novel Food. Apesar disso, nos Estados Unidos da América (EUA), consta na lista de Generally Recognized as Safe (GRAS). A GRAS é uma designação da Food and Drug Administration (FDA) em que um produto químico ou substância adicionada aos alimentos é considerada segura por especialistas, e por isto isenta da Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA) (FDA, 2018). Assim, apesar de não ser consumida na UE, o seu consumo é permitido nos EUA. Empresas como a ALVER (UE), ROQUETTE (UE) e Solazyme (EUA), são alguns exemplos de empresas que já comercializam esta espécie para fins alimentares.

## 2.2. Carotenogénese

Os carotenóides são responsáveis pela tonalidade amarela, laranja e vermelho nas plantas, algas, bactérias, fungos e alguns animais, e encontram-se geralmente dentro do plastídio. Estes são de origem isoprenóide, derivados de uma estrutura de cadeia de polieno de 40 carbonos com grupos cíclicos. Nos organismos foto-autotróficos são pigmentos acessório essenciais (Zhang *et al.*, 2014).

Os carotenóides são habitualmente organizados em carotenóides primários e secundários. Os carotenóides primários, como a luteína e o  $\beta$ -caroteno, desempenham um papel importante na transferência de energia durante a fotossíntese. Os carotenóides secundários, como astaxantina e cantaxantina, são usados quando a microalga se encontra em condições de *stress*. O *stress* leva a uma acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres, que são eliminados por estes carotenóides secundários (carotenogénese). Isto demonstra que não só são importantes para a transferência de energia como também desempenham um papel protetor na célula. Também podem ser divididos em carotenos (hidrocarbonetos sem oxigênio) como  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, e em xantofilas (hidrocarbonetos com oxigênio) como a luteína. (Schüler *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014)

É possível induzir a carotenogénese privando a alga de nutrientes, aumentando a intensidade luminosa, aumentando a salinidade da cultura, e/ou aumentando temperatura. As microalgas podem usar várias fontes de nutrientes, como nitrato, amónia e ureia, e usando

apenas uma destas fontes conseguem garantir o seu crescimento e reprodução. Quando isto acontece, o carbono fixado pela fotossíntese é desviado da síntese proteica para as vias de síntese de hidratos de carbono e lípidos, surgindo simultaneamente a acumulação de carotenóides secundários e diminuição do teor de clorofila nas células (Ikarán *et al.*, 2015).

Apesar da *Chlorella* sp. ser universalmente aceite como um alimento funcional e um superalimento, a sua cor verde nem sempre é desejável pela agroindústria. Por outro lado, é sabido que a cor verde clorofila, típica da espécie de *Chlorella* sp., poder-se-á alterar aquando as suas condições normais de crescimento são alteradas.

### 3. Objetivos

Este estágio teve como principal objetivo o estudo da produção de *Chlorella* sp. de forma a induzir a carotenogénese, que consequentemente, leva a alteração da cor verde para cor amarelada/alaranjada. A indução foi realizada privando a cultura de azoto presente no meio de cultura. A indução foi testada em três estirpes de *Chlorella* sp. (*Chlorella vulgaris* Beijerinck., *Chlorella vulgaris* e *Chlorella protothecoides*) em diversas condições de *stress*.

## 4. Materiais e Métodos

O procedimento experimental foi dividido em quatro fases:

**Fase 1.** Ensaio de crescimento

**Fase 2.** Ensaio de indução da carotenogénese, por depleção de azoto.

**Fase 3.** Ensaio de cultivo *outdoor*

**Fase 4.** Ensaio de fermentação

Todas estas estratégias serão devidamente exploradas abaixo. As experiências descritas neste trabalho foram realizadas nas instalações do CMP (Grupo Secil, Portugal), entre o dia 25 de setembro de 2017 e 30 de junho de 2018.

### 4.1. Meio de cultura e estirpes

O meio de cultura usado para os ensaios de crescimento e de indução foi o meio f/2, descrito por Guilard (1975), com as seguintes alterações: o  $\text{NaNO}_3$  foi substituído por  $\text{KNO}_3$  e não houve adição de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (Tabela IV). O anexo 1 contém a descrição completa do meio f/2 com as respetivas alterações. As alterações ao meio foram feitas devido a falta de reagentes. A concentração de azoto não sofreu alteração relativamente ao meio original (1mM). Tanto para a inoculação das culturas, como para a preparação do meio, foi usada água destilada.

Para o ensaio de cultivo *outdoor*, o meio usado foi meio biológico formulado pela Alfarm. Este meio resulta da combinação de dois fertilizantes granulares.

No ensaio de fermentação foi usado meio de fermentação Alfarm a 20 g/L de glucose.

Tabela IV- Meio f/2 descrito por Guilard (1975), com alterações.

Componentes	Solução Stock	Quantidade por Litro
$\text{KNO}_3$	75g/L	1 ml (solução stock)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5g/L	1 ml (solução stock)
Solução de <i>Trace metals</i>	-	1 ml da solução
Solução de Vitaminas	-	0,5 ml da solução

A *Chlorella vulgaris* Beijerinck, usada como controlo positivo, foi gentilmente cedida pelo Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG). As restantes estirpes de *Chlorella*, foram obtidas a partir da coleção de culturas da Algafarm. Antes do início dos ensaios, as culturas foram mantidas em meio autotrófico industrial Algafarm e no caso da *Chlorella protothecoides* em meio heterotrófico e em condições axénicas (Tabela V).

Tabela V: Lista de espécies de microalgas utilizadas nos ensaios.

<b>Espécies</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck.	LNEG	INETI 58
<i>Chlorella vulgaris</i>	Algafarm	<i>Chlorella</i> 0002
<i>Chlorella protothecoides</i>	Algafarm	<i>Chlorella</i> 0031

## 4.2. Ensaio de crescimento

O crescimento foi realizado em reatores de 5 L em triplicado (Fig.2). As culturas foram mantidas em arejamento, através de um tubo com um filtro ligado a um sistema de ar comprimido. Foi usado um filtro Midisart 2000 de 0.2  $\mu\text{m}$ . O  $\text{CO}_2$  foi adicionado através do sistema de ar. Quando o pH era superior a 8.5, o  $\text{CO}_2$  era ligado manualmente durante alguns minutos, de forma a manter o pH entre 7.5-8.5. Os reatores foram mantidos sob luz fluorescente contínua (24h) de cor branca, com intensidade luminosa de 6410 Lux (lx). Os cultivos foram mantidos a 24 °C.

De dois em dois dias, foi determinado o peso seco (g/L) e o teor de nitratos (em dias diferentes para cada espécie). O peso seco foi calculado através de uma balança de humidade  $\text{KERN}_{\text{DBS}}$ , onde o peso inicial do filtro foi subtraído ao peso final do filtro, e isto dividido pelo volume de cultura usada para a filtração. A filtração da cultura foi feita usando um copo de filtração e filtros de 47mm, VWR Glass microfibras filter. A metodologia do cálculo do teor de nitratos é explicada posteriormente, no ponto 4.6.1.

Como era pretendido que as culturas crescessem até atingirem a fase estacionária, foi fornecido meio f/2 cada vez que o teor de nitratos estava a baixo de 0.2 mM. Regularmente, foram realizadas observações microscópicas para garantir o bom estado da cultura. No total, o cultivo foi realizado durante 28 dias.



Figura 2- Imagem ilustrativa dos reatores de 5L inoculados com *Chlorella* sp.

#### 4.3. Ensaio da indução da carotenogênese em balão

Após o crescimento, realizado no ensaio anterior, as culturas foram lavadas duas vezes com soro fisiológico estéril (9 g/L de sal), de forma a garantir que não existiam vestígios de azoto no meio de cultura/cultivo quando esta fosse novamente inoculada para o ensaio seguinte.

Depois da lavagem com soro, a cultura foi centrifugada numa centrífuga HERMLE z300, a 3500 rpm durante 10 minutos, sendo de seguida inoculada em reatores de 1.5 L em triplicado.

A indução da carotenogênese foi testada em duas condições diferentes. Na primeira condição, o meio f/2 adicionado aos balões de 1,5L não continha  $KNO_3$ , ou seja, a cultura não tinha nenhuma fonte de azoto. Na segunda condição, não foi adicionado nenhum tipo de meio à cultura apenas continha água da cimenteira, que é rica em carbonatos. Esta água é usada regularmente na Algafarm.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições de arejamento, luz e temperatura descritas no ensaio anterior. Os ensaios apenas foram realizados com ambas as estirpes de *Chlorella vulgaris*. Uma vez por semana, foi analisado o teor de pigmentos (clorofila e carotenóides) descrito no ponto 4.6.3., para cada balão, de modo a observar as mudanças na concentração de clorofila e carotenóides.

#### 4.4. Ensaio em reatores *outdoor* com inóculo proveniente da fermentação

Para a realização do ensaio *outdoor*, foi utilizado inóculo de *Chlorella vulgaris* proveniente da fermentação gentilmente cedido pela equipa de produção da unidade.

O ensaio em *outdoor* foi realizado em reatores tipo Green-Wall (GW) de 45 litros e em fotobiorreatores (FBR) de 2000 litros (fig.3). Os GW e FBR foram inoculados com diferentes concentrações nomeadamente 0.3g/L, 0.8g/L, 1.1g/L para GW e 0.4 g/L no FBR, com meio biológico referido anteriormente. As culturas foram mantidas com arejamento com pulsos de CO<sub>2</sub>, estabilizando o pH em valores entre valores de 7.5 e 8.5. Os reatores tiveram em média 11 horas de exposição solar com temperatura média de 14 °C.



Figura 3- Imagem ilustrativa de Fotobiorreatores (A) e Green-wall (B)

Para garantir a carência de azoto foram monitorizadas ao longo do ensaio as concentrações de nitratos, como descrito no ponto 4.6.1., e o teor de amónio usando o kit Sera Amónio-Amónia, presentes no meio de cultura. Para além disto, foi testado semanalmente o teor de proteína, como descrito no ponto 4.6.4., presente nos GW e FBR; e o peso seco (g/L), como descrito anteriormente.

#### 4.5. Ensaio de crescimento em fermentador

A cultura de *Chlorella prototecoides* foi mantida em rampa de PCA armazenada a 4°C. Para dar início ao ensaio procedeu-se à inoculação de um loop de colónias numa matraz de 100 mL com meio de fermentação Algafarm, referido anteriormente, a 28 °C num agitador orbital SKY, denominado por P1.

No ensaio preliminar de estudo da influência da concentração de amónia, fez-se crescer em frascos de 250 mL com 100 mL de meio de cultura Algafarm com quatro concentrações de amónia diferentes (0.2 g/L, 0.5 g/L, 1 g/L e 3 g/L) em duplicado com as mesmas condições de crescimento que o P1. Foi usado como inóculo 4% (v/v) de um P1 de forma a começar com  $1 \times 10^6$  células/mL. O ensaio decorreu durante uma semana.



Figura 4- Imagem ilustrativa de um fermentador de cinco litros.

Procedeu-se ao aumento de escala de um P1 para um P2 de volume final de 300 mL, que, por sua vez, inóculou o fermentador de 5 L (fig.4). O fermentador de 5 L foi preparado com meio Algafarm, com alimentação automática da glucose sempre que a respiração celular indicava decréscimo de crescimento, o pH foi mantido a 6.5 por sistema automático com NaOH com medição por sensor de pH da Mettler Toledo, a temperatura foi mantida a 28 °C pelo banho Bath circulator RW3-2025 da Lab Companion e a percentagem de oxigénio dissolvido lida pelo sensor de oxigénio da Mettler Toledo e mantido a 40% com regulação automática da entrada

do fluxo de ar saturado e da velocidade de agitação. O ensaio em fermentação decorreu durante quatro dias.

O crescimento celular foi monitorizado por contagem celular em câmara de Neubauer-improved da Hirschmann e pela determinação do peso seco (g/L), como descrito anteriormente. Todo o manuseamento das culturas axénicas foi realizado seguindo as boas práticas laboratoriais em câmara de fluxo laminar TopSafe 1.5 da BioAir. Foi medida a concentração de glucose com um kit de glicemia FreeStyle Precision da Abbott assim como a concentração de amónia.

## 4.6. Determinações analíticas

### 4.6.1. Determinação do teor de nitratos

O teor de nitratos foi determinado de acordo com Armstrong (1963). Num tubo de ensaio foi diluído o sobrenadante em água destilada e adicionado ácido clorídrico a 60 mM. Depois as amostras foram medidas num espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 10s) a 220 e a 275 nm. Com os valores obtidos foi feita a diferença da ABS a 220nm e duas vezes o valor de ABS a 275nm. O valor da diferença foi convertido num valor final em mM, através de uma reta de calibração.

### 4.6.2. Determinação do teor de pigmentos

Na avaliação do teor de pigmentos, as amostras foram tratadas utilizando como solvente a acetona pura. Para isso, numa centrífuga HERMLE z300 as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos, até garantir 10 mg de biomassa fresca no tubo ensaio. Posteriormente, adicionou-se esferas de zircónia ao tubo, levou-se ao vórtex (Velp scientifica classic advanced), durante 15 minutos e por último foram adicionados 6 ml de acetona pura. O procedimento foi repetido até o pellet não apresentar cor. Para avaliar a quantidade de pigmentos totais foi realizado um espectro de varrimento (entre os 380 e 700 nm) em espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 10s) e os valores obtidos foram analisados num software de processamento de dados.

### 4.6.3. Determinação do teor de proteína

O teor de proteína foi determinado através do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Num tubo de ensaio com o pellet da cultura, com uma concentração de 1g/L de biomassa fresca, foi adicionada água destilada de modo a fazer uma lavagem as células, garantindo a ausência do

meio de cultivo e a não interferência com os resultados. Depois da lavagem, a amostra foi centrifugada (centrífuga HERMLE z300), descartou-se o sobrenadante e adicionou-se água destilada e NaOH até concentração final de 1 M. Após a adição do NaOH, os tubos foram colocados em banho-maria a 99°C, durante 10 minutos. Depois de arrefecidos foram novamente centrifugados. Foi retirado 1 mL do sobrenadante e adicionados 5mL reagente 1 descrito no método. Após 10 minutos no escuro foi adicionado 1ml reagente 2 e seguiu-se nova incubação no escuro durante 30 minutos. Foi realizada a leitura a 750nm no espectrofotômetro UV-VIS e os resultados foram analisado num software de processamento de dados.

#### 4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software IBM SPSS 25. Os resultados experimentais foram realizados com um nível de confiança de 95%. Foram realizadas comparações entre grupos usando *t-test*, com triplicados.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Ensaio de crescimento

Conforme se pode observar na figura 5, as culturas cresceram durante 25 dias até à fase exponencial tardia e posteriormente entraram em fase estacionária ou de declínio.

O meio f/2 usado no crescimento das culturas, e posteriormente usado também na indução, foi selecionado por ser um meio regularmente utilizado para crescimento e enriquecimento de microalgas (Harrison e Berges, 2005) assim como devido à sua ampla utilização em ensaios de depleção e indução (Campenni *et al.*, 2012). Apesar de ter um teor de nitratos relativamente baixo, a concentração foi mantida visto se pretender realizar ensaios de indução. O máximo de biomassa atingido durante o crescimento foi de 0,98 g/L para *Chlorella vulgaris* INETI 58 (controlo positivo) e 0,64 g/L para a *Chlorella vulgaris*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento das duas espécies ( $p \geq 0,05$ ; fig.5)

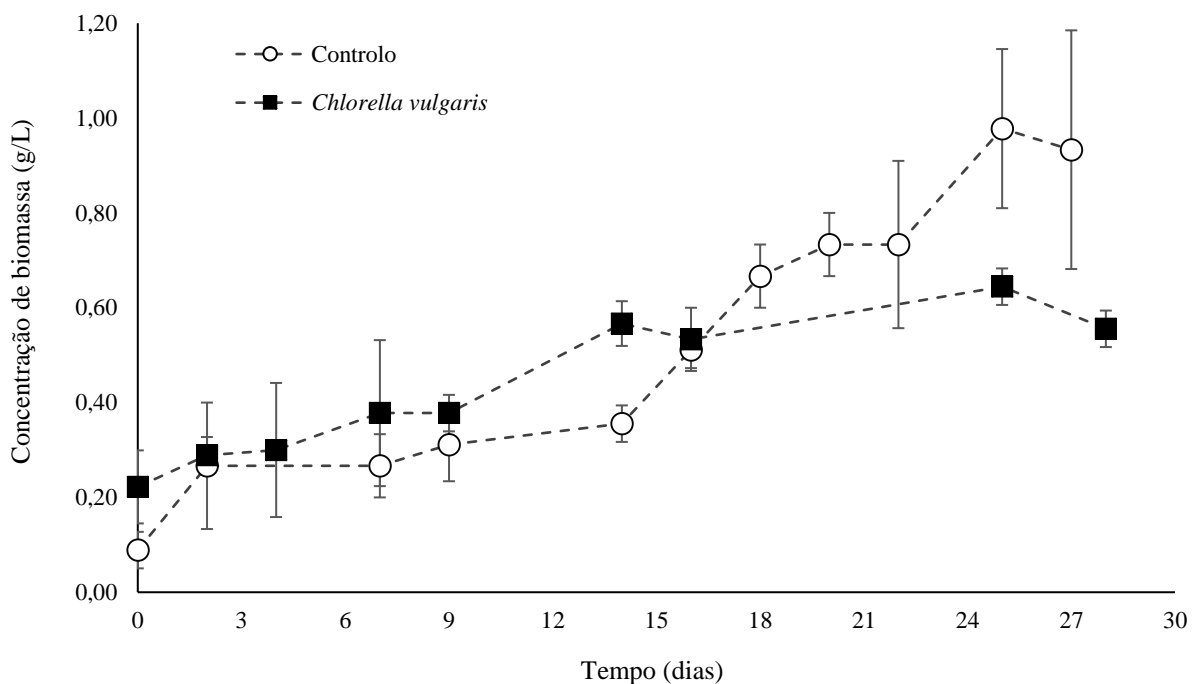


Figura 5-Crescimento em fed-batch da cultura controlo, *Chlorella vulgaris* INETI 58, e da cultura teste, *Chlorella vulgaris*, em reatores de cinco litros (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3).

Tabela VI- Produtividade volumétrica e taxa específica de crescimento das culturas em estudo, durante os 28 dias de crescimento.

<b>Culturas</b>	<b>Produtividade volumétrica máxima (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade volumétrica global (g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>Taxa específica de crescimento (dia<sup>-1</sup>)</b>
<i>Chlorella vulgaris</i> INETI 58.	0,18 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,12 ± 0,20	0,01 ± 0,004	0,03 ± 0,01

Após o crescimento das culturas, foi calculada a taxa de crescimento e a produtividade de ambas (Tabela VI). Comparando as duas culturas não houve diferenças estatísticas na produtividade volumétrica máxima ( $p \geq 0,05$ ). O mesmo não se verificou na taxa de específica de crescimento e produtividade volumétrica global. Nestes dois casos registaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Podemos observar que a *Chlorella vulgaris* INETI 58. teve melhores resultados e conseqüentemente um maior crescimento celular (fig.5).

## 5.2. Ensaio de indução da carotenogénese em balão.

Após o crescimento das culturas, foram iniciados os ensaios da indução de carotenogénese. Como foi dito anteriormente, nos ensaios de indução foram testadas duas condições. Na primeira condição a cultura foi inoculada com meio f/2 sem fonte de azoto (condição 1) e na segunda condição a cultura apenas continha água da cimenteira (condição 2). Os resultados obtidos permitem a comparação entre a concentração de clorofila e carotenóides entre as diferentes condições,

Conforme se pode observar na figura 6, a cultura controlo (*Chlorella vulgaris* INETI 58) começou com  $11,1 \pm 1,8$  mg de clorofila /g peso seco (PS) e a de *Chlorella vulgaris* com  $11,5 \pm 1,4$  mg de clorofila /g PS. Comparando os resultados relativos à concentração de clorofila na condição 1, é possível observar que, com o aumento do tempo de indução, aumentam as diferenças significativas entre as culturas. Podemos observar, que o teor de clorofila baixou gradualmente para a estirpe controlo, mas baixou drasticamente na *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo. No final a concentração de clorofila foi de  $1,4 \pm 0,5$  mg de clorofila /g PS no controlo e  $0,4 \pm 0,2$  mg de clorofila /g PS na *Chlorella vulgaris*.

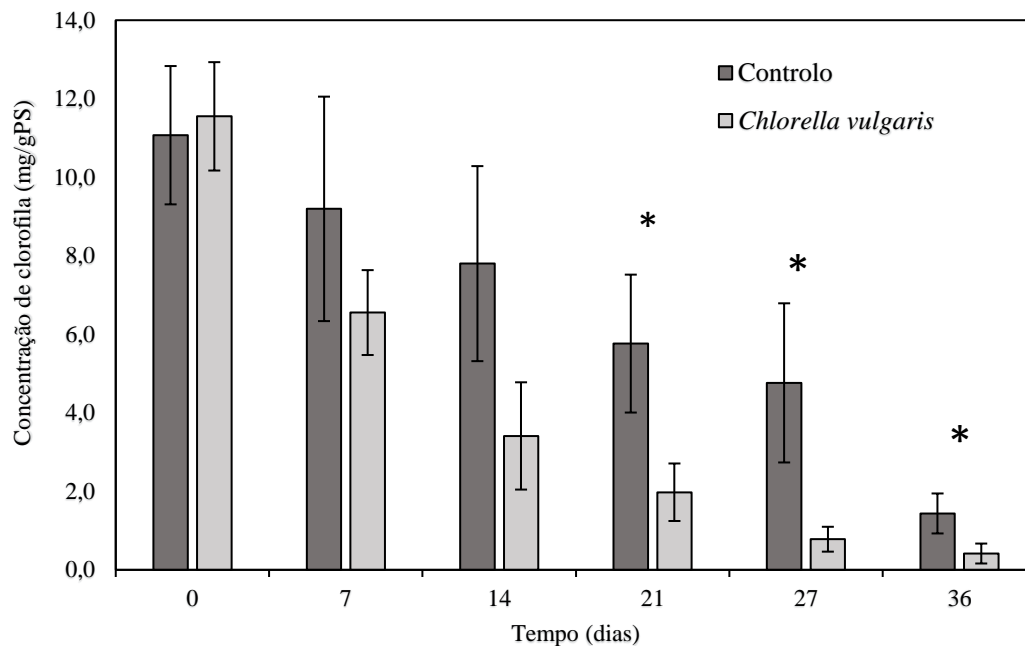


Figura 6- Concentração de clorofila em relação à cultura de controlo *Chlorella vulgaris* INETI 58 (cinza) e *Chlorella vulgaris* (cinza claro) relativo à condição 1 (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3), \* representa  $p < 0,05$ .

Analisando os resultados relativos a condição 2 (fig.7), observa-se que ambas tiveram um comportamento semelhante ao anterior, sendo que, comparativamente, a estirpe de *Chlorella vulgaris* não teve uma redução de clorofila tão significativa. A cultura controlo começou com  $15,1 \pm 1,6$  mg de clorofila /g PS e a de *Chlorella vulgaris* com  $13,4 \pm 3,5$  mg de clorofila /g PS. No final, apenas continha  $2,6 \pm 0,8$  mg de clorofila /g PS e  $0,5 \pm 0,1$  mg de clorofila /g PS, respetivamente (valores semelhantes ao observado anteriormente). Em ambas as condições existem diferenças estatisticamente significativas quando comparando a cultura controlo com a cultura de *Chlorella vulgaris* ( $p < 0,05$ ; fig. 6 e 7) para a concentração de clorofila, como foi possível constatar.

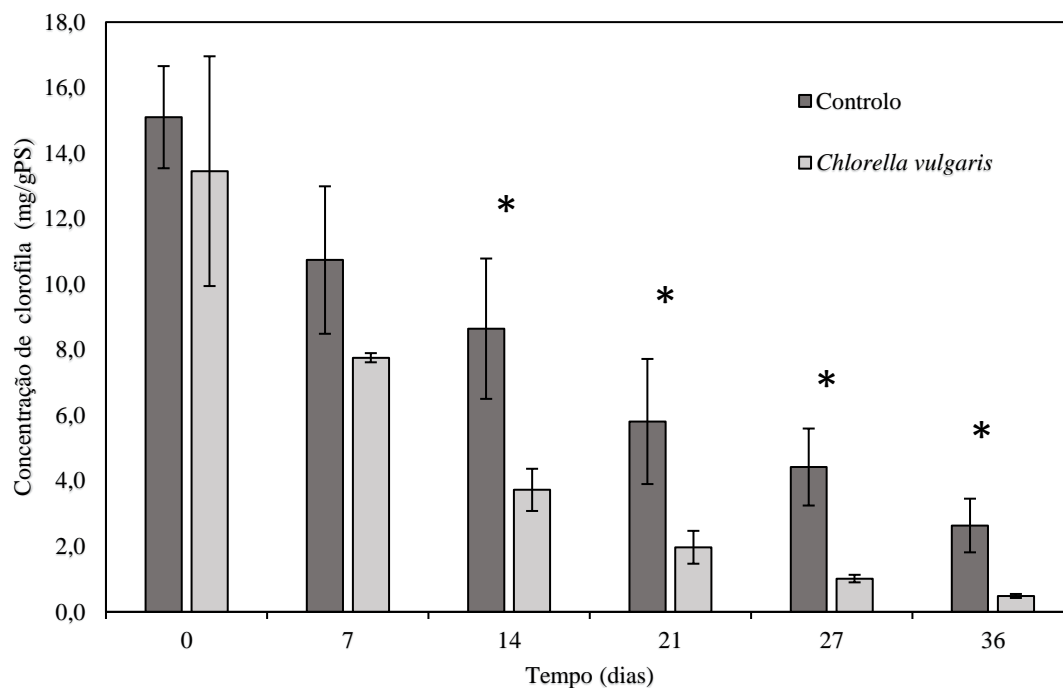


Figura 7- Concentração de clorofila em relação à cultura de controlo *Chlorella vulgaris* INETI 58 (cinza) e *Chlorella vulgaris* (cinza claro) relativo à condição 2 (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3), \* representa  $p < 0,05$

Os resultados quanto à concentração de carotenóides totais relativos à condição 1 (fig. 8), apresentaram um comportamento diferente das culturas anteriores. No caso do controlo, inicialmente tinha uma concentração de  $5,2 \pm 0,6$  mg de carotenóides /g peso seco (PS) de cultura, que se manteve praticamente inalterada ao longo do tempo, com a exceção do último dia que diminuiu para  $2,8 \pm 0,2$  mg de carotenóides /g PS. O mesmo não se observou na *Chlorella vulgaris*, onde houve uma diminuição gradual dos carotenóides. Esta cultura no início do ensaio continha  $3,6 \pm 0,4$  mg de carotenóides /g PS e no final apenas  $0,5 \pm 0,1$  mg de carotenóides /g PS.

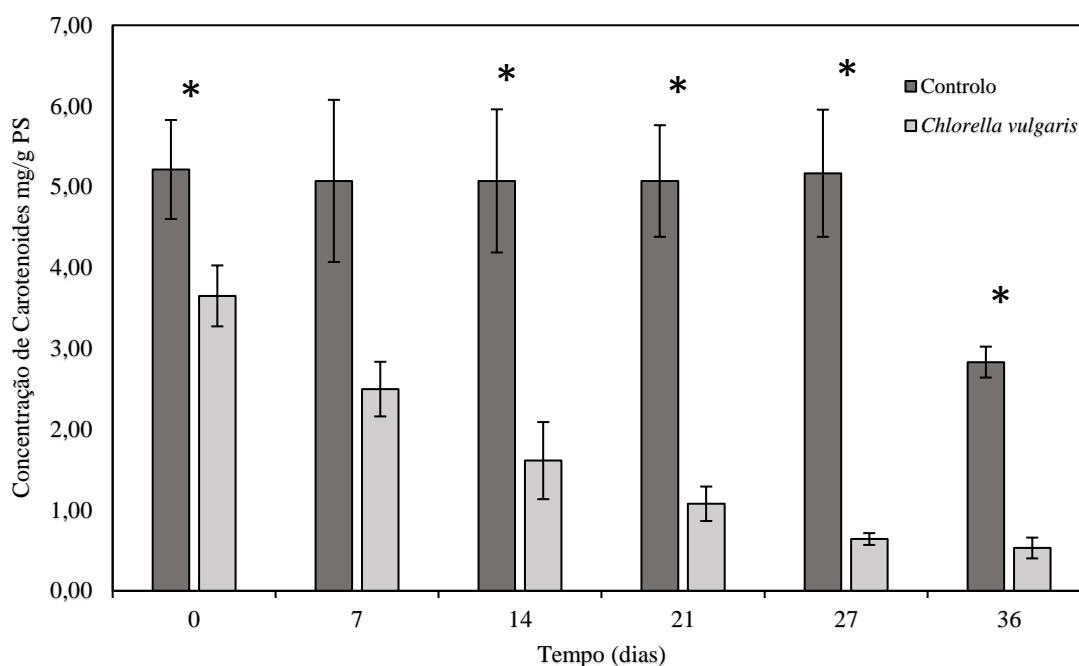


Figura 8 - Concentração de carotenóides totais em relação à cultura de controlo *Chlorella vulgaris* INETI 58 (cinza) e *Chlorella vulgaris* (cinza claro) relativo à condição 1 (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3), \* representa  $p < 0,05$ .

O efeito da privação de azoto foi semelhante na condição 2 (fig.9). A cultura controlo continuou com a concentração mais elevada de carotenóides, mas observou-se uma diminuição mais lenta relativamente à *Chlorella vulgaris*. As culturas começaram inicialmente com  $4,4 \pm 0,2$  mg/g PS e  $3,8 \pm 0,2$  mg/g PS, respetivamente para o controlo e para *Chlorella vulgaris*. No final apenas continham  $3,2 \pm 0,7$  mg/g PS e  $0,7 \pm 0,2$  mg/g PS. Estatisticamente estas diferenças também foram observadas para ambos os meios quando comparado a cultura de controlo com a cultura de *Chlorella vulgaris* ( $p < 0,05$ ; fig. 8 e 9) na concentração de carotenóides.

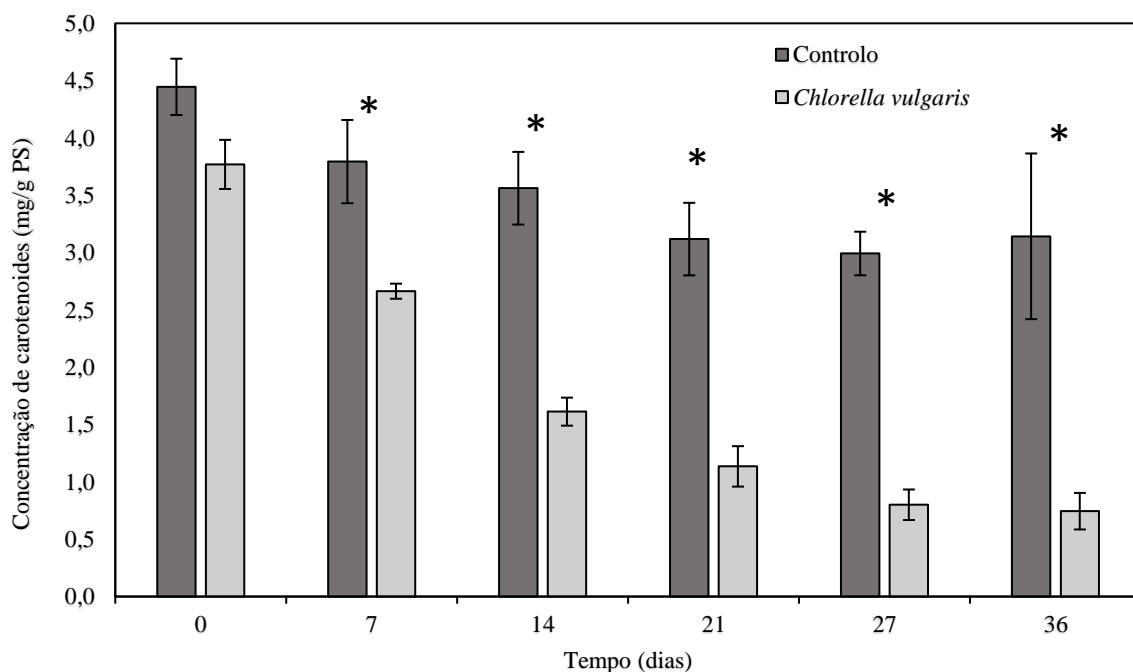


Figura 9 - Concentração de carotenóides em relação à cultura de controlo *Chlorella vulgaris* INETI 58 (cinza) e *Chlorella vulgaris* (cinza claro) relativo à condição 2 (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3), \* representa  $p < 0,05$ .

Comparando cada condição quanto à concentração de clorofila e carotenóides, a cultura de controlo (*Chlorella vulgaris* INETI 58) apresentou diferenças estatísticas entre as duas condições ( $p \geq 0,05$ ; fig.10).

No caso da *Chlorella vulgaris* esta não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as duas condições testadas, tanto na clorofila como nos carotenóides totais ( $p \geq 0,05$ ; fig.11).

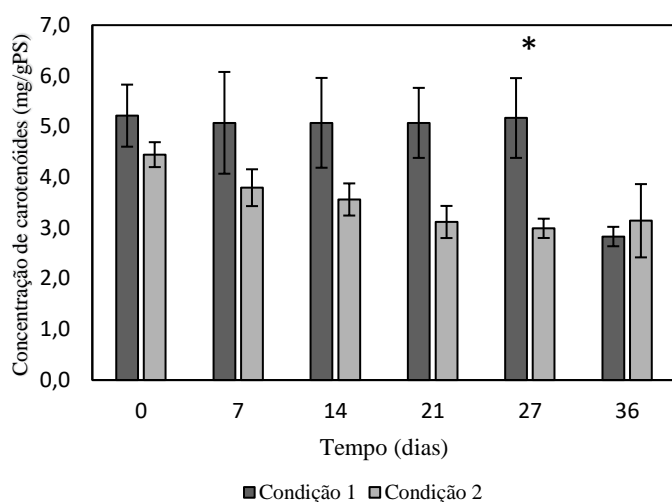
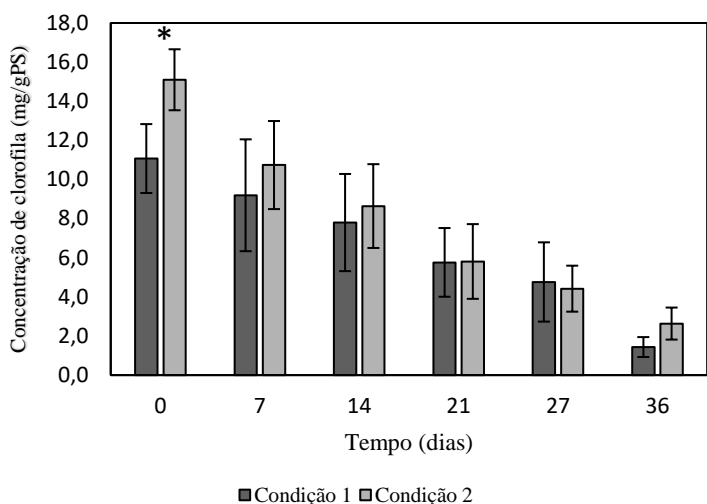


Figura 10 -Concentração de clorofila (esquerda) e carotenóides (direita) relativos à condição 1 (cinza escuro) e condição 2 (cinza) na cultura de controlo, *Chlorella vulgaris* INETI 58 (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3), \* representa  $p < 0,05$ .

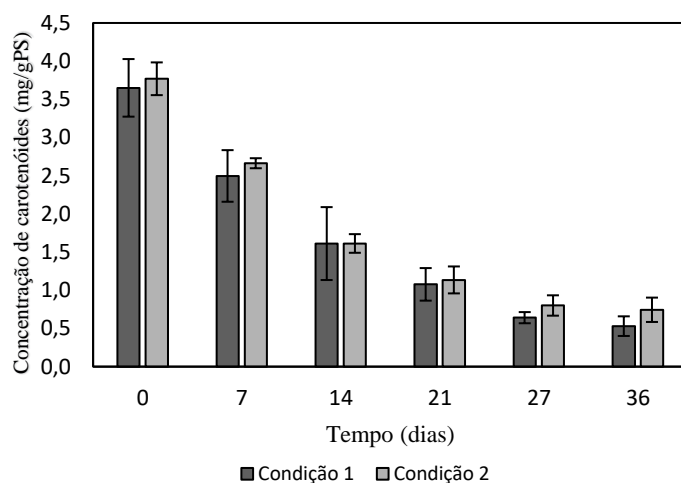
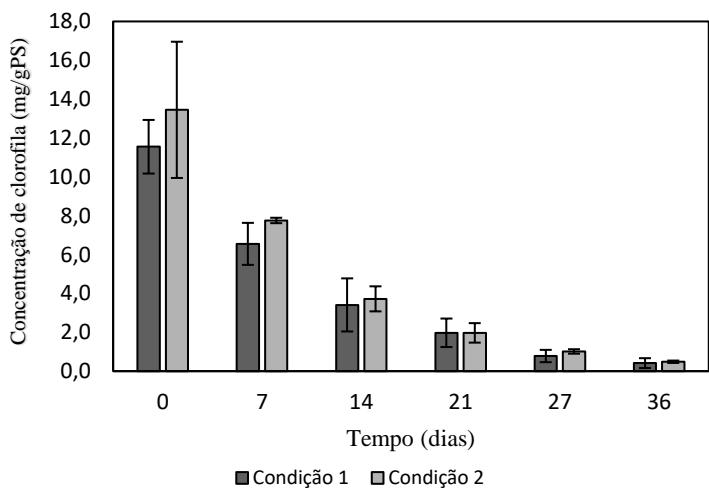


Figura 11 -Concentração de clorofila (esquerda) e carotenóides (direita) relativos à condição 1 (cinza escuro) e condição 2 (cinza) na cultura de teste, *Chlorella vulgaris* (média  $\pm$  desvio-padrão, n=3).

O objetivo principal deste ensaio foi determinar se com a privação de azoto, que é um dos mais importantes fatores de *stress*, seria possível alterar a cor típica dos géneros de *Chlorella* usados, nomeadamente de verde para amarelo/alaranjado. No início do ensaio ambas as culturas tinham uma cor verde muito semelhante entre elas. No final o controlo apresentou uma cor alaranjada e no caso da *Chlorella vulgaris* um amarelo esbranquiçado (fig.12 e 13).



Figura 12- Balões de *Chlorella vulgaris*, nas condições de ensaio 1 e 2 (da esquerda para a direita respectivamente), no dia 0 (imagens de cima) e último dia de ensaio (imagem de baixo).



Figura 13 - Balões de *Chlorella vulgaris* INETI 58, nas condições de ensaio 1 e 2 (da esquerda para a direita respectivamente) e no dia 0 (imagens de cima) e último dia de ensaio (imagem de baixo).

Zhang *et al.*, (2017) realizou um estudo com *Chlorella vulgaris* onde demonstrou que a acumulação de carotenóides é mais acentuada quando existe uma redução da concentração de nitratos. Também constatou que, apesar de menores concentrações de nitratos facilitarem a acumulação de carotenóides, o *stress* excessivo pode inibir a síntese destes, sendo provavelmente devido ao facto de a carotenogénese não prosseguir sem certas enzimas necessárias que por sua vez não podem ser sintetizadas sem nitratos.

Olhando para os resultados, foi possível ver um cenário semelhante ao anteriormente descrito por Zhang e seus colaboradores. De facto, no caso do controlo foi possível observar uma acumulação de carotenóides e simultaneamente uma degradação da clorofila. Apesar dos resultados dos dois meios não serem muito discrepantes, o crescimento em meio f/2 sem nitratos pareceu ser o mais bem-sucedido pois manteve a concentração de carotenóides estável ao longo do tempo. Já no caso da *Chlorella vulgaris*, não se observou acumulação de carotenóides, mas sim a sua degradação ao longo do tempo. Isto poderá ser devido a um *stress* excessivo da cultura como foi explicado por Zhang *et al.* (2017).

Outro estudo realizado por Campenni *et al.* (2012), testou as alterações ao longo do processo de carotenogénese em autotrofia, com diferentes concentrações de NaCl e luminosidade, usando *Chlorella protothecoides*. Deste estudo Campenni *et al.* (2012), observou uma acumulação de carotenóides e depois uma diminuição durante a fase de *stress*. Também constatou que na cultura mais diluída houve uma maior acumulação de carotenóides na fase de *stress*, concluindo assim que a luz é também um fator indutor na acumulação de carotenóides. A acumulação de carotenóides na presença de luz, dever-se-á muito provavelmente à função fotoprotetora dos carotenóides secundários.

A concentração de biomassa inicial das culturas durante o ensaio da indução foi superior comparativamente ao estudo realizado por Campenni *et al.* (2012). Esta elevada concentração inicial poderá ser um dos motivos para não se ter observado uma maior acumulação de carotenóides ao longo do ensaio de *stress*.

### 5.3. Ensaio de indução de reatores *outdoor* - Green-wall (GW) e Fotobiorreatores (FBR)

No ensaio seguinte de indução foram inoculadas três GW (45L) e um FBR (2000L) com cultura de *Chlorella vulgaris* crescida em fermentador. Sendo necessário uma grande quantidade de cultura para as inoculações, optou-se pelo uso de cultura de fermentador que é mais concentrada que culturas crescidas autotroficamente em balão. Como foi dito anteriormente, cada inóculo tinha uma concentração inicial diferente, de 0,3 g/L, 0,8 g/L, 1,1g/l para os GW 1, 2 e 3, respetivamente; e 0,4 g/L para o FBR.

Usualmente as indústrias com interesse na compra de *Chlorella*, pretendem que esta contenha pelo menos 50% de proteína. Sendo assim, neste ensaio foi necessário verificar, se na indução *outdoor*, a cultura continha a percentagem de proteína necessária para a sua comercialização.

Inicialmente, a cultura fornecida continha 137 mM de amónia no meio. Para além dos nitratos, a amónia é outra fonte de azoto para a *Chlorella* (Shi *et al.*, 2000). Havendo uma fonte de azoto na cultura, nesta fase inicial apenas foram adicionados à cultura micronutrientes e ferro (que fazem parte da constituição do meio biológico). Assim, não foi possível iniciar a indução logo após a inoculação. Após três dias de cultivo, as culturas consumiram totalmente a amónia no meio, tendo aumentado a sua biomassa de forma ligeira (Tabela VII).

Tabela VII– Peso seco (g/L) das culturas crescidas em GW e FBR após doze dias de ensaio com adição de meio biológico no segundo dia do ensaio para os GW; e no nono dia para FBR.

	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
<b>GW 1</b>	0,30	0,73	0,67	0,47	-
<b>GW 2</b>	0,80	1,27	1,07	1,20	1,47
<b>GW 3</b>	1,10	1,40	1,27	1,13	0,4
<b>FBR</b>	0,4	0,33	0,53	0,53	0,4

No período de tempo que decorreu o ensaio, foi adicionado uma vez microbiológico a todos os GW e também apenas uma vez ao FBR. A adição de meio aos GW, foi realizado dois dias após a inoculação e no caso do FBR foi nove dias depois da inoculação. A quantidade de meio adicionado, foi calculada de modo a que correspondesse a uma adição de 0,3 mM de azoto por litro de meio.

Observando os resultados dos valores de proteínas (Tabela VIII) correspondentes aos GW, verifica-se uma descida da percentagem de proteína nos primeiros dois dias. Esta diminuição não era esperada, visto que a cultura ainda continha amónio no meio e houve um aumento da biomassa. Numa tentativa de aumentar a percentagem de proteína foi adicionado microbiológico, como referido anteriormente. Após esta adição foi verificado o aumento da percentagem de proteína (Tabela VII), com exceção da cultura presente no GW 1, em que se verificou um aumento de proteína mais tarde. A cultura presente no GW 1 foi a única cultura que não sobreviveu até ao fim do ensaio, morrendo após o sétimo dia, provavelmente devido a uma contaminação. Outro fator a ter em conta, foi que durante todo o ensaio, as culturas em GW não sofreram nenhuma alteração de cor significativa.

Tabela VIII – Concentração de proteína (%) em culturas crescidas em GW e FBR após doze dias de ensaio com adição de meio biológico no segundo dia do ensaio para os GW; e no nono dia para FBR.

	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
<b>GW 1</b>	53	34	24	41	-
<b>GW 2</b>	55	33	43	47	49
<b>GW 3</b>	38	33	43	-	50
<b>FBR</b>	48	50	39	29	-

No caso do FBR, o ensaio correu de uma forma diferente. Como era de esperar, até consumir toda a amónia no meio, o teor de proteína aumentou. Depois do segundo dia, a proteína começou a diminuir e simultaneamente observou-se uma mudança de cor da cultura para um tom amarelado. Numa tentativa de aumentar a proteína, ao nono dia foi adicionado microbiológico. A adição de meio foi realizada da mesma forma que nos GW's, ou seja, garantindo um mínimo de 0,3 mM de azoto no meio. Ao contrário do que aconteceu em GW, a

adição de meio biológico não alterou a cor da cultura. Não foi possível avaliar a percentagem de proteína no último dia da cultura no FBR, devido a um erro de operador. Sendo assim, não foi possível concluir se a adição de meio aumentou ou diminuiu a percentagem de proteína na cultura.

Os resultados obtidos neste ensaio não são muito conclusivos. Será necessário repetir novamente a experiência para ter uma melhor compreensão do sucedido. Apesar disto, foi possível observar uma mudança de cor na biomassa presente no FBR. O design do FBR permite uma maior exposição solar, o que poderá ser um fator chave na observação de mudança de cor apenas no FBR.

Apesar de não ser o resultado pretendido, tudo indica que a mudança de cor, devido ao *stress*, leva a diminuição da proteína nesta espécie. Esta diminuição da percentagem de proteína, também foi observado por Guccione *et al.* (2014), que realizou ensaios em Green-Wall Panel (GWP) com várias espécies de *Chlorella*. O autor avaliou o teor de proteína em culturas com e sem privação de nutrientes e teve uma descida na percentagem desta, entre 10 a 20 %, em privação de nutrientes.

#### 5.4. Ensaio em fermentador

Uma vez que os ensaios anteriores em autotrofia para obter biomassa de cor amarela exigem uma operação de indução demasiado longa, realizaram-se testes de indução de carotenogénese em condições de heterotrófica. Nos ensaios anteriores, foram usadas estirpes de *Chlorella vulgaris*, mas foi verificado que o teor de proteína baixava após o início da indução. Sendo assim, o presente ensaio foi realizado usando uma estirpe de *Chlorella protothecoides* fornecida pela AlgaFarm.

Na primeira etapa do ensaio, foram realizados testes para verificar a que concentração de amónia se observava mudança de cor na cultura, para posteriormente se realizar o teste em fermentadores de 5 L. O ensaio inicial, foi realizado em matrizes de 250 ml em diferentes concentrações de amónia (0,2 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 3 g/L).

Com o decorrer do tempo, foi possível constatar que quanto maior a concentração de amónia no meio, maior é a concentração celular (figura 13), sendo que a maior concentração celular obtida foi de  $3,6 \times 10^8$  células/mL e a menor de  $9,7 \times 10^7$  células/mL, está diferença de crescimento verifica-se porque a amónia foi o reagente limitante no crescimento. Devido a pequena quantidade disponível de cultura neste ensaio, a biomassa foi quantificada através da contagem celular.

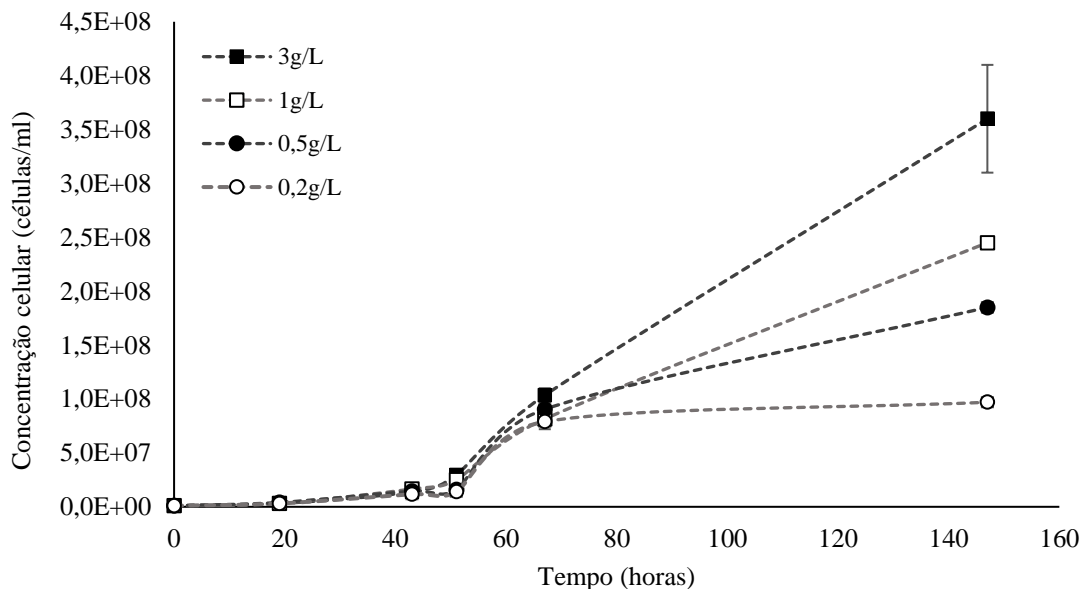


Figura 13 - Concentração celular (células/ml) de *Chlorella protothecoides* do crescimento em matraz, nas diferentes concentrações de amónia (média  $\pm$  desvio-padrão, n=2).

Visualmente, as culturas com menos concentração de amónia apresentaram um tom amarelado no final do ensaio, como pode-se observar na figura 14 uma vez que se encontram em *stress* nutricional.



Figura 14 - Matrazes de *Chlorella protothecoides* no último dia do ensaio.

No passo seguinte, procedeu-se ao aumento de escala para inocular um fermentador de bancada e fazer um ensaio em maior escala. Neste ensaio, na primeira fase era pretendido obter biomassa concentrada para se proceder posteriormente à indução. Este ensaio durou num total de quatro dias. A cultura cresceu até consumir toda a amónia presente no meio, o que aconteceu no fim do terceiro dia. Os primeiros dois dias do ensaio foram uma fase lag de crescimento da cultura em adaptação às condições ambientais do fermentador. Após ter sido consumida toda a amónia a cultura começou a perder biomassa (figura 15). O máximo de concentração de biomassa obtida foi de  $2,3 \times 10^9$  células/mL.

Com o decrescer da concentração de amónia, era esperado que se observasse alteração da cor da cultura tal como se observou no ensaio anterior. Ao contrário do esperado, a cultura não teve uma mudança de cor, possivelmente por necessitar de um *stress* mais longo.

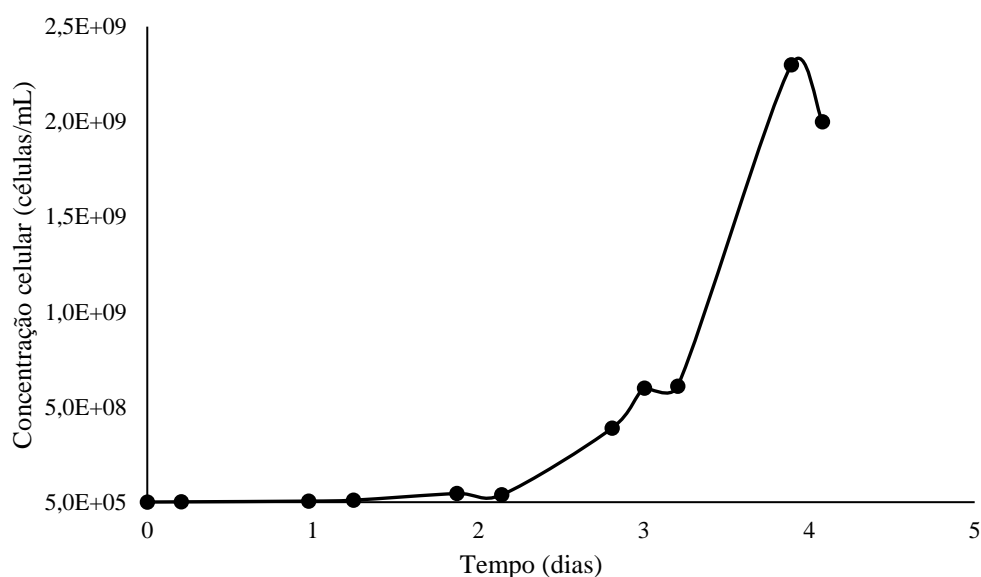


Figura 15 - Concentração celular (células/ml) de *Chlorella protothecoides* em fermentador de 5 L.

Heredia-Arroyo *et al.* (2010), realizou um estudo onde testou o crescimento de *Chlorella protothecoides* em auto, hétero e mixotrofia, em que observou uma mudança de cor da cultura em heterotrofia. O autor cresceu as culturas até à fase estacionária e a cultura em heterotrofia continha 15 g/L de glucose, usando extrato de levedura como fonte de azoto. Neste ensaio o autor observou mudança de cor da cultura, tal como ocorreu no ensaio em matraz. Apesar da fonte de azoto ser diferente, os ensaios são comparáveis. Isto permite constatar que a fonte de azoto é um fator importante no crescimento celular.

Outro estudo com *Chlorella protothecoides*, realizado por Shihira-Ishikawa e Hase, (1964), onde os autores realizaram o ensaio testando diferentes concentrações de glucose e ureia no meio, observaram uma cor amarelada quando a concentração de glucose é ligeiramente superior à concentração da ureia. Isto demonstra que existem várias formas diferentes de realizar a mudança de cor na cultura, o que poderia ser um trabalho interessante de realizar futuramente.

Tendo isto em conta, o ensaio em fermentador deveria ser novamente realizado para averiguar melhor os resultados da indução. Para além de repetir o ensaio, seria interessante avaliar o teor de proteína, caso ocorresse mudança da cor na cultura. Seguindo estudos como o de Shihira-Ishikawa e Hase, (1964), seria também interessante realizar ensaios usando outros fatores de *stress*.



## 6. Conclusão

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios, verifica-se que a indução através da limitação da fonte de azoto não foi bem-sucedida em todos os ensaios nas estirpes de *Chorella* (*Chlorella vulgaris* Beijerinck., *Chlorella vulgaris* e *Chlorella protothecoides*) usadas neste trabalho. Nos ensaios em pequena escala, como é o caso dos balões de 1,5 L em autotrofia e em matrizes de 250ml em heterotrofia, foi possível observar mudança de cor na cultura. Quando se procedeu ao *scale up* em ambos os tipos de cultivo, não se observou uma mudança de cor significativa, ou seja, não ocorreu a indução da carotenogénese.

Comparando os tipos de cultivo usados, o tempo de cultivo em heterotrofia é mais rápido comparativamente ao cultivo em autotrofia. Enquanto o ensaio em heterotrofia não demorou mais de uma semana, mesmo em pequena escala, em autotrofia demorou pelo menos um mês a ser realizado. O tempo é um fator importante a ter em conta quando se pretende produzir estes cultivos a uma escala industrial. Tendo em conta que os ensaios em fermentador revelaram ter um tempo de cultivo mais rápido, futuramente seria interessante aperfeiçoar esta forma de cultivo, de modo a perceber se as condições impostas foram as adequadas.

Durante o ensaio surgiu outra questão importante, para além da mudança de cor. Como foi dito anteriormente, a cultura necessita de ter uma quantidade mínima de proteína para ser comercializada. Sendo assim, um outro objetivo seria avaliar a percentagem de proteína, durante a realização do *scale up* da cultura. Neste trabalho apenas foi avaliada a percentagem e proteína no ensaio *outdoor*, pois não demonstrou ser necessário em fermentador visto que este não sofreu alteração de cor.

Sendo o processo de indução da carotenogénese uma área ainda por explorar para a indústria das microalgas, otimizar este processo recente seria de profundo interesse para o comércio de *Chlorella*. Assim, seria interessante testar outras formas de indução (usando por exemplo a glucose e/ou ureia) em diferentes estirpes da espécie de microalga estudada.



## 7. Referências

- Ación, F.G., Molina, E., Fernandez-Sevilla, J.M, Barbosa, M., Gouveia, L., Sepúlveda, C., Bazaes, J., Arbib, Z. 2017. “Economics of microalgae production”. *Microalgae- Based Biofuels and Bioproducts*. 487-503.
- Algades, 2016. Disponível em: <http://algades.com/>. Visto a 12 de setembro de 2018.
- AlgoSource, 2016. Disponível em: <https://algosource.com/en/>. Visto a 12 de setembro de 2018.
- Armstrong, F. 1963. “Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry.” *Analytical Chemistry*. 35, 1292–1294
- Barreira, L., Pereira, H., Gangadhar, K.N., Custódio L., Varela, J. 2015. “Medicinal Effects of Microalgae-Derived Fatty Acids”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 209-231.
- Batista, L Gouveia A. P., Sousa, I., Raymundo, L., Bandarra, N.M. 2008. "Microalgae in Novel Food Products". *Food Chemistry Research Developments*. 75-112.
- Bhola, V., Swalaha, F., Ranjith Kumar, R., Singh, M., Bux, F. 2014. “Overview of the Potential of Microalgae for CO<sub>2</sub> Sequestration.” *International Journal of Environmental Science and Technology*. 11, 2103–18.
- BUGGYPOWER, 2017. Disponível em: <http://www.buggypower.eu/pt/>. Visto a 12 de setembro de 2018.
- Bulgariu, L., Gavrilescu, M. 2015. “Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 457-469.
- Campenni, L., Nobre, B., Santos, C., Oliveira, A., Aires-Barros, M., Palavra, A., Gouveia, L. 2012. “Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions”. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97, 1383-1393.
- Champenois, J., Marfaing, H., Pierre, P. 2015. “Review of the Taxonomic Revision of *Chlorella* and Consequences for Its Food Uses in Europe.” *Journal of Applied Phycology*. 27, 1845–51.

- FDA: Generally Recognized as Safe (GRAS). Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/ucm2006850.htm>. Visto a 21 de junho de 2018.
- Fermentalg, 2018. Disponível em: <https://www.fermentalg.com/en/>. Visto a 12 de setembro de 2018.
- Fonseca, D., Guerra, L., Santos, E., Mendonça, S., Silva, J., Costa, L., Navalho, J. 2016. “ALGAFARM A Case Study of Industrial Chlorella Production”. MICROALGAL PRODUCTION for Biomass and High-Value Products. 295- 310.
- Gouveia, L. 2011. “Microalgae as a feedstock for biofuels”. Book SpringerBriefs. Springer Berlin Heidelberg Publisher. DOI 10.1007/978-3-642-17997.
- Grossmann, L., S. Ebert, J. Hinrichs, J. Weiss. 2018. “Effect of Precipitation, Lyophilization, and Organic Solvent Extraction on Preparation of Protein-Rich Powders from the Microalgae Chlorella Protothecoides.” Algal Research. 29, 266–76.
- Guccione, A., Biondi, N., Sampietro, G., Rodolfi, L., Bassi, N., Tredici, M. 2014. “Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor”. Biotechnology for Biofuels. 7, 1-12.
- Guedes, A.C., Sousa-Pinto, I., Malcata, F. 2015. “Application of Microalgae Protein to Aquafeed”. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. 93-125.
- Guillard, R.R.L. 1975. “Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.”. Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press. 26-60.
- Harrison, P., Berges, J. 2005. “Marine Culture Media”. Algal Culturing Techniques. 3, 21-33
- Harrison, P., Berges, J. 2005. “Marine Culture Media”. Algal Culturing Techniques. 3, 21-33
- Hayes, M., Skomedal, H., Skjanes, K., Mazur-Marzec, H., Torunska-Sitarz, A., Catala, M., Isleten Hosoglu, M., García-Vaquero, M. 2017. “Microalgal proteins for feed, food and health”. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. 347-368.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Hu, B. 2010. “Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic Chlorella protothecoides” . Applied Biochemistry and Biotechnology. 162, 1978-1995.

- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejdus, B., Hedbavny, J., Huska, D., Adam, V. 2018. “Separation, Identification and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls in Dietary Supplements Containing *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina Platensis* Using High Performance Thin Layer Chromatography.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 148, 108–118.
- Ikaran, Z., S. Suárez-Alvarez, I. Urreta, S. Castañón. 2015. “The Effect of Nitrogen Limitation on the Physiology and Metabolism of *Chlorella Vulgaris* Var L3.” *Algal Research*. 10, 134–44.
- Lee, R. 2008. “Phycology”. Quarta edição. Cambridge University Press. 1-534
- Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y, Cui, M., Yin, Y., Li, B., Wang, M., Meng, C., Gao, Z. 2017. “Plant Growth Regulators Promote Lipid and Carotenoid Accumulation in *Chlorella Vulgaris*.” *Journal of Applied Phycology*. 30, 1549-1561.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. “Protein measurement with the Folin Phenol Reagent”, *Journal Biological Chemistry*. 193, 265-275
- Mata, T., Martins A., Caetano, N. 2010. “Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 217–232.
- Necton, 2018. Disponível em: <http://www.necton.pt/empresa>. Visto a 29 de setembro de 2018.
- Pires, J. 2015. “Mass Production of Microalgae”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 55-68.
- Posten, C., Chen, S. 2016. “Microalgae Biotechnology”. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 153.
- Prabandono, K., Amin, S. 2015. “Biofuel Production from Microalgae”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 145-158.
- Ryu, B., Himaya, S.W.A., Kim, S. 2015. “Applications of Microalgae-Derived Active Ingredients as Cosmeceuticals.”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 309-316.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P., Vaca-Garcia, C. 2014. “Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 35, 265–78.

- Schüler, Lisa M. Schulze, P., Pereira, H., Barreira, L., León, R., Varela, J. 2017. “Trends and Strategies to Enhance Triacylglycerols and High-Value Compounds in Microalgae.” *Algal Research*. 25, 263–73.
- SECIL. 2016. SECIL: Uma historia com quase 100 anos. Diponível em: <http://www.secil-group.com/missao-visao-valores/historia/>. Visto a 31 de maio de 2018.
- Shi, X., Zhang, X., Chen, F. 2000. “Heterotrophic Production of Biomass and Lutein by *Chlorella Protothecoides* on Various Nitrogen Sources.” *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 312–318.
- Shihira-Ishikaea, I., Hase, E. 1964. “Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose”. *Plant & Cell Physiol*. 5, 227- 240.
- Udayan, A., Arumugam, M., Pandey, A. 2017. “Nutraceuticals From Algae and Cyanobacteria”. *Algal Green Chemistry*. 65-89
- Valea. S., Oancea, F., Fischer, F. 2017.” Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation”. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. 45-65.
- Vaz, B., Moreira, J., Morais, M., Costa, J. 2016. “Microalgae as a New Source of Bioactive Compounds in Food Supplements.” *Current Opinion in Food Science*. 7, 73–77.
- Venkatesan, J., Manivasagam, P., Kim S. 2015. “Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances”. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 1-9.
- Xu, H., Miao X., Wu, Q. 2006. “High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters”. *Journal of Biotechnology*. 126, 499–507
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., Chen, F. 2014. “Microalgal Carotenoids: Beneficial Effects and Potential in Human Health.” *Food & Function*. 5, 413-425.
- Zhang, P., Li, Z., Lu, L., Xiao, Y., Liu, J., Guo, J., Fang, F. 2017. “Effects of Stepwise Nitrogen Depletion on Carotenoid Content, Fluorescence Parameters and the Cellular Stoichiometry of *Chlorella Vulgaris*.” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 181, 30–38.

Znad, H., Ketif, A., Judd, S., AlMomani, F., Vuthaluru, H. 2018. "Bioremediation and Nutrient Removal from Wastewater by *Chlorella Vulgaris*." *Ecological Engineering* 110, 1–7.



## Anexos

Anexo 1 – Meio f/2 descrito por Guilard (1975), com alterações.

Meio f/2		
Componentes	Solução Stock	Quantidade por Litro
KNO <sub>3</sub>	75g/L	1 ml (solução stock)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5g/L	1 ml (solução stock)
Solução de <i>Trace metals</i>	-	1 ml da solução
Solução de Vitaminas	-	0.5 ml da solução
Solução de <i>Trace metals</i>		
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	3.15g
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	4.36g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180 g/L	1 ml (solução stock)
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22 g/L	1 ml (solução stock)
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 g/L	1 ml (solução stock)
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8 g/L	1 ml (solução stock)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3 g/L	1 ml (solução stock)
Solução de Vitaminas		
Thiamine · HCl (vitamin B1)	-	200mg
Biotin (vitamin H)	1 g/L	1 ml (solução stock)
Cyanocobalamin (vitamin B12)	1 g/L	1 ml (solução stock)