



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

LENON MEDEIROS BAUER

**CULTIVOS DE MICROALGAS COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS: INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO UVB E DA CONCENTRAÇÃO DE
NITROGÊNIO EM CULTIVOS DE CÉLULAS IMOBILIZADAS**

Porto Alegre

2021

LENON MEDEIROS BAUER

**CULTIVOS DE MICROALGAS COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS: INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO UVB E DA CONCENTRAÇÃO DE
NITROGÊNIO EM CULTIVOS DE CÉLULAS IMOBILIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de Doutor em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^a Dr^a. Rosane Rech
Co-orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Bauer, Lenon Medeiros

CULTIVOS DE MICROALGAS COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS: INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO UVB E DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO EM CULTIVOS DE CÉLULAS IMOBILIZADAS / Lenon Medeiros Bauer. -- 2021.

147 f.

Orientadora: Rosane Rech.

Coorientadora: Eliseu Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Bioestimulação. 2. Chlorella minutissima. 3. Imobilização. 4. Secagem. 5. UVB. I. Rech, Rosane, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Você vê coisas que existem e pergunta: “Por quê?”
Eu sonho com coisas que nunca existiram e pergunto:
“por que não?”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar capacidade para vencer cada obstáculo em minha caminhada, me dando oportunidades de crescer a cada desafio.

Aos meus pais, Claudiomar e Roseli, pelo amor incondicional e todo apoio e incentivo durante minha trajetória acadêmica.

À minha orientadora, Professora Rosane Rech, pela amizade, ensinamentos profissionais e pessoais, incentivos, por me tranquilizar nos momentos mais difíceis desta jornada e pelas conversas tão enriquecedoras.

Ao meu co-orientador, Professor Eliseu Rodrigues, pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Aos técnicos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), pela disponibilidade e auxílio durante a realização deste trabalho, em especial a Andressa pela amizade, carinho e apoio.

Às integrantes do Laboratório de Bioengenharia e queridas amigas, Carol, Tania, Carla e Mariel, pela amizade, companheirismo e auxílio fundamental na realização deste trabalho.

Aos iniciantes científicos que participaram deste trabalho, em especial à Aline e Lisieux, pela amizade, dedicação e ajuda na realização prática deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À UFRGS, por disponibilizar um ensino gratuito e de qualidade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 - Microalga <i>Chlorella minutissima</i>	24
Figura 3-2 - Microalga <i>Pseudoneochloris marina</i> (100x).....	25
Figura 3-3 - Representação da estrutura do β -caroteno.....	26
Figura 3-4 - Representação estrutural da clorofila. Clorofila <i>a</i> (R=CH ₃), clorofila <i>b</i> (R=CHO).	28
Figura 3-5 - Região ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético.....	33
Figura 3-6 - Diferentes métodos de imobilização. (a) Imobilização na superfície do suporte; (b) aprisionamento em matriz porosa; (c) Floculação celular (formação de agregados); (d) Barreiras de contenção mecânica.	36
Figura 3-7 - Formação do gel de alginato de cálcio: (a) Homopolímeros de unidades de ácido gulurônico em solução; (b) Ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio.....	37
Figura 4-1 - Fotobiorreatores de placa <i>air-lift</i>	45
Figura 4-2 - Fotobiorreatores de placa <i>air-lift</i> adaptados com os suportes de lâmpadas UVB (a); Visão interna do suporte acoplado ao fotobiorreator (b); Esquema do sistema de cultivo com aplicação de radiação UVB (c).	46
Figura 4-3 - Sistema para produção de <i>C. minutissima</i> imobilizada em esferas de alginato. .	47
Figura 4-4 - Esferas de <i>C. minutissima</i> imobilizada dispostas sobre a bandeja (a) e secador de bandejas (b).....	49
Figura 5-1 - Cinética de crescimento celular de <i>P. marina</i> submetida à diferentes tratamentos com UVB.....	57
Figura 5-2 - Teor de proteínas (mg g ⁻¹) e lipídios (mg g ⁻¹) da biomassa de <i>P. marina</i> cultivada sob diferentes tratamentos UVB. (*): Respostas diferentes em relação ao cultivo controle a 95% de confiança pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	58
Figure 6-1 - Photobioreactors airlift adapted with the support of UVB lamps (a); Side view of FBR (b).	Erro! Indicador não definido.
Figure 6-2 - Biomass concentration (g L ⁻¹) (a) and nitrogen consumption (N-NO ₃) (mg L ⁻¹) (b) of <i>Chlorella minutissima</i> cultures exposed to UVB radiation applied at different times. The curves show the average result of two independent cultures.....	Erro! Indicador não definido.

Figure 6-3 - Effect of different UVB treatments on (a) total chlorophylls (mg L^{-1}) and (b) total carotenoids (mg L^{-1}) content during the culture of *C. minutissima*. The curves show the average result of two independent cultures.**Erro! Indicador não definido.**

Figure 6-4 - Ratios of chlorophyll *a* (Chl *a*) to chlorophyll *b* (Chl *b*) (a) and total chlorophyll (Chl_T) to carotenoids (Car) (b) from cultures of *C. minutissima* exposed to different UVB treatments.**Erro! Indicador não definido.**

Figure 6-5 - Effect of different UVB treatments on lipids (a) and proteins (b) content in *C. minutissima* biomass. The bars show the average result of two independent cultures. Different letters mean a significant difference ($p \leq 0.05$) between treatments by the Tukey test.**Erro! Indicador não definido.**

Figure 6-6 - Effect of radiation UVB during cultures of *C. minutissima* on (a) FAMES profile (% of total FAMES), (b) FAMES content in microalgae biomass (mg g^{-1}), and (c) FAMES composition (% of total FAMES) (c). The bars show the average result of two independent cultures. (*): Significantly different responses compared with the control at 95% confidence by the Tukey test ($p \leq 0.05$).**Erro! Indicador não definido.**

Figure 7-1 - Effect of nitrogen concentration on the kinetics of total chlorophylls (a) and total carotenoids (b) in cultures of *C. minutissima* immobilized on alginate beads in FBR air-lift. (c). Nitrogen consumption by immobilized *C. minutissima* under different nitrogen concentrations in FBR air-lift. (○) $48 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ (■) $64 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ (▲) $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ (◇) $96 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ 87

Figure 7-2 - Microscopic images ($10 \times$) of the surfaces of the alginate beads containing *C. minutissima* at the start of the control batch cultivation (a) and at day 7 (b). 88

Figure 7-3 - Effect of nitrogen addition profile on (a) total chlorophylls, (b) total carotenoids, and (c) nitrogen concentration during fed-batch culture of *C. minutissima* immobilized in alginate beads in airlift photobioreactor. (○) Control; (■) BF32; (▲) BF19.2; (◇) BF96. The curves show the average result of two independent cultures. 92

Figure 7-4 - Effect of nitrogen addition profile during fed-batch culture of *C. minutissima* immobilized in alginate beads on (a) FAMES profile (% of total FAMES), (b) FAMES content in microalgae biomass (mg g^{-1}), and (c) FAMES composition (% of total FAMES) (c). The bars show the average result of two independent cultures. Different letters in the same line mean a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test. 95

Figure 8-1 - Total chlorophylls concentration and nitrogen concentration during fed-batch culture of *C. minutissima* immobilized in alginate beads in airlift photobioreactor. The curves show the average result of three independent cultures.**Erro! Indicador não definido.**

Figure 8-2 - Dimensional moisture curves (dry basis) as a function of time for immobilized *Chlorella minutissima* dehydrated at different temperatures. ... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 8-3 - Drying rate curve in function of moisture content of *Chlorella minutissima* immobilized dehydrated at different temperatures. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 8-4 - Arrhenius representation for effective diffusion coefficient (D_{eff}) in function of the inverse drying air temperature (30; 40 and 50 °C) of *Chlorella minutissima* immobilized in alginate beads. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 8-5 - Carotenoids stability (percent retention) of *Chlorella minutissima* immobilized in alginate beads during storage in accelerated conditions (40 °C), in the presence (a, c and e) and absence of light (b, d and f). Error bars represent standard deviation of the mean value. . **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1 - Comparativo entre os sistemas aberto e fechado para o cultivo de microalgas.	23
Tabela 3-2 - Comparação de métodos de produção entre fotobiorreatores.	23
Tabela 3-3 - Perfil de carotenoides e concentrações máximas (mg g^{-1}) obtidos para <i>Chlorella minutissima</i> e <i>Pseudoneochloris marina</i>	27
Tabela 3-4 - Perfil de ácidos graxos poli-insaturados presentes na biomassa de <i>C. minutissima</i> e <i>P. marina</i>	30
Tabela 3-5 - Estímulos em microalgas provenientes de diferentes condições de estresse à célula.	32
Tabela 4-1 - Concentrações de reagentes e soluções estoque empregados no meio de cultivo f/2 para as diferentes microalgas.	44
Tabela 4-2 - Planejamento experimental do perfil de adição de nitrogênio durante o cultivo em batelada alimentada de <i>C. minutissima</i> imobilizada.	48
Tabela 5-1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e teor de clorofilas em <i>P. marina</i> submetida à diferentes tratamentos com UVB.	58
Tabela 5-2 - Conteúdo de carotenoides (mg g^{-1}) da biomassa de <i>P. marina</i> cultivada sob diferentes tratamentos com UVB.	59
Table 6-1 - Effect of different UVB treatments on the maximum biomass concentration (X_{max}), maximum specific growth rate (μ_{max}) and doubling time (t_d) obtained in the cultures of <i>C. minutissima</i>	Erro! Indicador não definido.
Table 6-2 - Carotenoids profile (mg g^{-1} dry biomass) and vitamin A value ($\mu\text{g RAE g}^{-1}$ dry biomass) of <i>C. minutissima</i> cultivated under different UVB treatments.	Erro! Indicador não definido.
Table 7-1 - Experimental planning for nitrogen addition profile during fed-batch cultivation of immobilized <i>C. minutissima</i> . FB means fed-batch and the number represents the N-NO_3 concentration added each time.	84
Table 7-2 - Effect of different initial nitrogen concentration on biomass concentration and on chlorophylls, lipids and proteins content in biomass during batch cultures of <i>C. minutissima</i> immobilized in alginate beads.	89
Table 7-3 - Carotenoids profile of immobilized <i>C. minutissima</i> cultivated under different nitrogen concentrations.	90

Table 7-4 - Effect of nitrogen addition profile on biomass concentration and on chlorophylls, lipids and proteins content in biomass during fed-batch cultures of <i>C. minutissima</i> immobilized in alginate beads.	93
Table 7-5 - Effect of the profile of nitrogen addition on carotenoids profile during fed-batch cultures of <i>C. minutissima</i> immobilized in alginate beads.	94
Table 8-1 - Drying characterization of <i>Chlorella minutissima</i> immobilized in alginate beads.	Erro! Indicador não definido.
Table 8-2 - Carotenoids profile of immobilized <i>C. minutissima</i> submitted to different drying processes.	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	MICROALGAS	22
3.1.1	<i>Chlorella minutissima</i>	24
3.1.2	<i>Pseudoneochloris marina</i>	25
3.2	COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS.....	25
3.2.1	Carotenoides	26
3.2.2	Clorofilas	28
3.2.3	Ácidos graxos poli-insaturados.....	29
3.3	FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE MICROALGAS.....	30
3.3.1	Fatores nutricionais	30
3.3.2	Fatores de estresse.....	31
3.3.2.1	Radiação Ultravioleta.....	32
3.4	IMOBILIZAÇÃO CELULAR	35
3.4.1	Imobilização de microalgas	38
3.5	SECAGEM DE MICROALGAS	40
3.5.1	Estabilidade dos carotenoides durante a secagem e armazenamento de microalgas.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO	44
4.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
4.2.1	Cultivos com aplicação de radiação UVB.....	45
4.2.2	Cultivos com <i>C. minutissima</i> imobilizada.....	47
4.3	OPERAÇÕES DE SECAGEM DAS ESFERAS DE <i>C. minutissima</i>	48
4.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	50
4.4.1	Determinação da concentração de biomassa	50
4.4.2	Determinação da concentração de clorofilas e carotenoides totais.	51
4.4.3	Identificação e quantificação dos carotenoides por HPLC-DAD-MS	51
4.4.4	Determinação de nitrogênio (N-NO ₃)	52
4.4.5	Determinação de proteínas e lipídios	53

4.4.6	Identificação e quantificação de ácidos graxos	53
4.4.7	Velocidade específica de crescimento	54
4.5	ESTABILIDADE DOS CAROTENOIDES DURANTE O ARMAZENAMENTO ...	54
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
INTRODUÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO		56
5	EFEITO DA RADIAÇÃO UVB EM CULTIVOS DE <i>Pseudoneochloris marina</i>	57
5.1	EFEITO DA RADIAÇÃO UVB NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE <i>Pseudoneochloris marina</i>	57
6	ARTIGO 1 - UVB RADIATION POSITIVELY MODULATES GROWTH AND ACCUMULATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN <i>Chlorella minutissima</i>	ERRO!
INDICADOR NÃO DEFINIDO.		
6.1	INTRODUCTION	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6.2	MATERIAL AND METHODS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6.2.1	Microorganism and culture conditions	Erro! Indicador não definido.
6.2.2	UVB radiation application to cultivation	Erro! Indicador não definido.
6.2.3	Determination of biomass concentration and recovery of biomass	Erro! Indicador não definido.
6.2.4	Determination of nitrogen (N-NO ₃) and pigment concentration.....	Erro! Indicador não definido.
6.2.5	Carotenoids identification	Erro! Indicador não definido.
6.2.6	Determination of total soluble protein	Erro! Indicador não definido.
6.2.7	Analysis of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES).....	Erro! Indicador não definido.
6.2.8	Evaluation of growth parameters.....	Erro! Indicador não definido.
6.2.9	Statistical analysis	Erro! Indicador não definido.
6.3	RESULTS AND DISCUSSION	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6.3.1	Effect of UVB radiation on the growth kinetics of <i>Chlorella minutissima</i>	Erro! Indicador não definido.
6.3.2	Effect of UVB radiation on the biomass composition of <i>Chlorella minutissima</i>	Erro! Indicador não definido.
6.4	CONCLUSION.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7	ARTIGO 2 - EFFECT OF NITROGEN CONCENTRATION AND FED-BATCH CULTURE ON PIGMENTS, LIPIDS AND PROTEINS PRODUCTION BY IMMOBILIZED <i>Chlorella minutissima</i>	79

7.1	INTRODUCTION.....	81
7.2	MATERIAL AND METHODS	82
7.2.1	Microorganism e culture medium	82
7.2.2	Immobilization of <i>C. minutissima</i> on alginate beads	83
7.2.3	Culture of immobilized <i>C. minutissima</i> in airlift photobioreactor	83
7.2.4	Determination of nitrate and pigment concentration along the culture.....	84
7.2.5	Determination of total soluble protein.....	84
7.2.6	Carotenoids identification.....	85
7.2.7	Analysis of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES).....	85
7.2.8	Statistical analysis	86
7.3	RESULTS AND DISCUSSION	86
7.3.1	Effect of nitrogen on biomass concentration and composition.....	86
7.3.2	Effect of the profile of nitrogen addition on biomass concentration and composition	91
7.4	CONCLUSION	96
8	ARTIGO 3 – EFFECTS OF DRYING PROCESSES AND STORAGE ON CAROTENOIDS STABILITY OF <i>Chlorella minutissima</i> IMMOBILIZED IN ALGINATE BEADS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.1	INTRODUCTION.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.2	MATERIAL AND METHODS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.2.1	Microorganism e culture medium	Erro! Indicador não definido.
8.2.2	Immobilization of <i>C. minutissima</i> in alginate beads.....	Erro! Indicador não definido.
8.2.3	Culture of immobilized <i>C. minutissima</i> in airlift photobioreactors	Erro! Indicador não definido.
8.2.4	Determination of nitrogen (N-NO ₃) and pigment concentration during the culture	Erro! Indicador não definido.
8.2.5	Drying operations.....	Erro! Indicador não definido.
8.2.6	Carotenoids analysis.....	Erro! Indicador não definido.
8.2.7	Carotenoids stability during storage.....	Erro! Indicador não definido.
8.2.8	Statistical analysis	Erro! Indicador não definido.
8.3	RESULTS AND DISCUSSION	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.3.1	Cultivation of <i>Chlorella minutissima</i> immobilized in alginate beads.....	Erro! Indicador não definido.

8.3.2 Drying characterization of <i>Chlorella minutissima</i> immobilized in alginate beads	Erro! Indicador não definido.
8.4 CONCLUSION.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
10 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	115
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
APÊNDICES.....	138

RESUMO

As microalgas apresentam em sua composição uma gama de compostos bioativos de elevado interesse comercial, sendo empregadas para melhorar o valor nutricional de produtos alimentares e rações para animais, na indústria farmacêutica e na redução do efeito estufa a partir da fixação de CO₂. No entanto, busca-se alternativas para aumentar a sua produtividade e síntese de compostos bioativos a fim de tornar estes processos mais atrativos economicamente. Com o objetivo de buscar estratégias para aumentar a concentração de biomassa e a produção de compostos bioativos em microalgas, o presente trabalho foi dividido em duas partes, sendo que na primeira parte estudou-se os efeitos da radiação UVB aplicada em diferentes tempos de exposição (2, 4, 6, 8 e 10 h d⁻¹) em cultivos de *Pseudoneochloris marina* e *Chlorella minutissima*, avaliando o seu efeito na concentração de biomassa, carotenoides e ácidos graxos. Os tratamentos UVB (10 W m⁻²) durante 6 h d⁻¹ em cultivos de *P. marina* apresentaram efeito inibitório na concentração de biomassa, lipídios e pigmentos, enquanto que exposições mais curtas não apresentaram efeito significativo. Já os tratamentos UVB aplicados por 6 h d⁻¹ e 10 h d⁻¹ aumentaram a concentração de biomassa de *C. minutissima* em 27 % (1,14 ± 0,01 g L⁻¹) e 20 % (1,07 ± 0,05 g L⁻¹), respectivamente, em relação ao controle (0,89 ± 0,06 g L⁻¹). O conteúdo de all-*trans*-zeaxantina aumentou entre 1,4 - 2,0 vezes em todos os cultivos tratados com UVB. Além disto, o conteúdo de ácido α -linolênico e ácido eicosapentaenoico foram estimulados com o aumento do tempo de exposição UVB. Desta forma, *C. minutissima* demonstrou resistência ao estresse causado pela UVB, obtendo aumentos simultâneos na produção de biomassa e compostos bioativos, agregando valor à biomassa com potencial biotecnológico para a indústria alimentícia e farmacêutica. Na segunda etapa do trabalho realizou-se cultivos de *C. minutissima* imobilizadas em esferas de alginato de cálcio avaliando o efeito da concentração de nitrogênio (48 – 96 mg L⁻¹) e o perfil de adição de nitrogênio durante o cultivo em batelada alimentada, na produção de biomassa, proteínas, lipídios, carotenoides e ácidos graxos. No cultivo em batelada, 96 mg L⁻¹ de N-NO₃ promoveram a maior concentração de biomassa (1,65 ± 0,08 g L⁻¹), clorofilas, proteínas e carotenoides, cerca de 2,8, 1,5 e 1,3 vezes maior que o controle (48 mg L⁻¹ N-NO₃), respectivamente. Com cultivos em batelada alimentada foi possível otimizar a produtividade de *C. minutissima* imobilizada. O cultivo em batelada alimentada com três adições de 96 mg L⁻¹ de N-NO₃ proporcionou maior concentração de biomassa (2,13 ± 0,02 g L⁻¹) e um aumento no teor de clorofilas (1,7 vezes), carotenoides totais (1,3 vezes) e proteínas (1,6 vezes) em comparação com o cultivo em batelada. O teor de PUFAS, tais como, ácido linoleico (LA, C18:2n-6) e α -linolênico (ALA, C18:3n-3) também aumentaram na biomassa, promovendo assim seu enriquecimento nutricional com compostos de alto valor agregado e de interesse biotecnológico, o que aliado a técnica de imobilização celular auxilia na redução nos custos de produção de microalgas. A partir das melhores condições de cultivo definidas realizou-se a secagem de *C. minutissima* imobilizada a fim de estender sua vida de prateleira, para tal foram

descritas as características das curvas de secagem por convecção (30 - 50 °C) e investigada a influência dos processos de secagem (secagem convectiva e liofilização) no teor de carotenoides, bem como a estabilidade de carotenoides durante o armazenamento após a secagem (na presença e ausência de luz). Os valores de difusividade efetiva variaram entre $0,23 - 0,79 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e a energia de ativação foi de $49,39 \text{ kJ mol}^{-1}$. A melhor condição de secagem (50 °C) apresentou os menores valores de umidade, atividade de água e tempo de secagem, além de não degradar os carotenoides na biomassa final. A imobilização em alginato mostrou-se promissora em manter quantidades expressivas de carotenoides durante o armazenamento em condições aceleradas (40 °C), principalmente quando mantidas no escuro, preservando 80 % dos carotenoides totais, após 30 dias de armazenamento. Com isso, foi possível estender a vida útil de *C. minutissima* imobilizada em esferas de alginato por meio de um método de secagem simples, rápido e econômico, preservando os carotenoides durante o processo, além de conservar esses compostos durante o armazenamento.

Palavras-chave: Bioestimulação, *Chlorella minutissima*, imobilização, secagem, UVB.

ABSTRACT

Microalgae have in their composition a range of bioactive compounds of high commercial interest. They have been used to improve the nutritional value of food products and animal feed, in the pharmaceutical industry and reduce the greenhouse effect from CO₂ fixation. However, alternatives are sought to increase their productivity and synthesis of bioactive compounds to make these processes more economically attractive. To pursue strategies to increase biomass concentration and stimulate the synthesis of bioactive compounds by microalgae, the present work was divided into two parts. In the first part, the effects of UVB radiation applied at different exposure times were studied (2, 4, 6, 8 and 10 h d⁻¹) in cultures of *Pseudoneochloris marina* and *Chlorella minutissima*, evaluating their effect on the concentration of biomass, carotenoids, and fatty acids. UVB treatments (10 W m⁻²) for 6 h d⁻¹ in cultures of *P. marina* showed an inhibitory effect on the concentration of biomass, lipids, and pigments, while shorter exposures did not have a significant effect. UVB treatments applied for 6 h d⁻¹ and 10 h d⁻¹ increased the biomass concentration of *C. minutissima* by 27 % (1.14 ± 0.01 g L⁻¹) and 20 % (1.07 ± 0.05 g L⁻¹), respectively, in relation to the control (0.89 ± 0.06 g L⁻¹). The content of all-*trans*-zeaxanthin increased between 1.4 - 2.0 times in all cultures treated with UVB. Besides, the content of α-linolenic acid and eicosapentaenoic acid were stimulated with increased UVB exposure time. *C. minutissima* demonstrated resistance to the stress caused by UVB, showing simultaneous increases in the production of biomass and bioactive compounds, adding value to biomass with biotechnological potential for the food and pharmaceutical industry. In the second stage of the work, cultures of *C. minutissima* immobilized in calcium alginate beads were performed, evaluating the effect of nitrogen concentration (48 - 96 mg L⁻¹) and the nitrogen addition profile during cultivation in fed-batch, in the production of biomass, proteins, lipids, carotenoids and fatty acids. In batch culture, 96 mg L⁻¹ of N-NO₃ promoted the highest concentration of biomass (1.65 ± 0.08 g L⁻¹), chlorophylls, proteins and carotenoids, about 2.8, 1.5 and 1.3 times greater than the control (48 mg L⁻¹ N-NO₃), respectively. With fed-batch cultures, it was possible to optimize the productivity of immobilized *C. minutissima*. Fed-batch cultures with three additions of 96 mg L⁻¹ of N-NO₃ provided a higher concentration of biomass (2.13 ± 0.02 g L⁻¹) and an increase in chlorophyll content (1.7 times), total carotenoids (1.3 times) and proteins (1.6 times) compared to batch culture. The content of PUFAS, such as linoleic acid (LA, C18: 2n-6) and α-linolenic acid (ALA, C18: 3n-3) also increased in biomass, thus promoting its nutritional enrichment with compounds with high added value and biotechnological interest, which combined with the cell immobilization technique helps to reduce the costs of producing microalgae. From the best cultivation conditions defined, the drying of immobilized *C. minutissima* was carried out in order to extend its shelf life. For this purpose, the characteristics of the convection drying curves (30 - 50 °C) were described and the influence of drying processes (convective drying and lyophilization) in the carotenoid content, as well as the carotenoid stability during storage after drying (in the presence and absence of light). The effective diffusivity values varied between 0.23 - 0.79 × 10⁻¹⁰ m² s⁻¹ and the activation energy was 49.39 kJ mol⁻¹. The best drying condition (50 °C) showed the lowest values of moisture, water activity and drying time, in addition to not degrading the carotenoids in the final biomass. Alginate immobilization has shown promise in maintaining expressive amounts of carotenoids during storage under accelerated conditions (40 °C), especially when kept in the dark, preserving 80 % of the total carotenoids after 30 days of storage. With this, it was possible to extend the useful life of *C. minutissima* immobilized in alginate beads through a simple, fast and economical drying method, preserving the carotenoids during the process in addition to conserving these compounds during storage.

Keywords: Biostimulation, *Chlorella minutissima*, drying, immobilization, UVB.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos fotossintéticos que utilizam a energia da luz para a fixação de CO₂ e consumo de energia, apresentando uma biomassa rica em compostos bioativos, tais como, ácidos graxos essenciais, carotenoides, clorofilas, vitaminas e uma gama de compostos com elevado interesse biotecnológico e farmacêutico (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014).

Estes compostos vêm ganhando o mercado de alimentos funcionais, o qual apresenta uma demanda de novos ingredientes bioativos, podendo ser utilizados pela indústria de alimentos para o desenvolvimento de produtos funcionais com alegações cientificamente sustentadas. Neste sentido, vem sendo dada grande relevância para compostos naturais, tais como carotenoides, glutathiona, compostos fenólicos, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e suas bioatividades associadas (HERRERO et al., 2015). Por exemplo, é sabido que os carotenoides possuem efeitos positivos contra doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e degeneração macular relacionada à idade, devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SHARONI et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

Devido a sua composição, as microalgas tornaram-se uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos alimentos e produtos funcionais, podendo ser incorporadas em pães, *snacks*, doces e bebidas (VAZ et al., 2016; GARCÍA-SEGOVIA et al., 2017; LUCAS et al., 2018; DIPRAT et al., 2020), aumentando seu valor nutricional, e assim, afetar positivamente a saúde humana, reduzindo os riscos de doenças e enfermidades (MATOS et al., 2017).

O mercado de produtos de microalgas atingiu US\$ 11,1 bilhões em 2018, com uma estimativa de crescimento anual de 6,2 %, devendo atingir US\$ 18 bilhões em 2026. A conscientização do consumidor sobre os benefícios das microalgas, a busca por fontes alternativas de proteínas e a demanda por aplicações cosméticas e nutracêuticas, levou à demanda por ingredientes e produtos à base de microalgas, contribuindo para o elevado crescimento de mercado (DATA, 2020). Buscar formas alternativas e econômicas de aumentar a produtividade de microalgas, bem como a síntese dos seus compostos, podem tornar sua produção ainda mais atrativa.

Neste sentido, buscando aumentar a produção de microalgas, estudos vêm sendo realizados a fim de estimular o crescimento e o comportamento metabólico destes microorganismos, para que haja maior produtividade e síntese de compostos bioativos (HENRARD et al., 2015; HERRERO et al., 2015; HIDALGO; CIUDAD; NAVIA, 2015; SINGH et al., 2016; BAUER et al., 2017).

Dentre estes estudos, destacam-se aqueles que utilizam o estresse biológico para obter estímulos na produção de microalgas, tais como, privação de nutrientes, estresse salino e temperatura (CHEN et al., 2017; MENEGOL et al., 2017). Além disto, métodos alternativos de estresse vêm sendo estudados, sendo a aplicação de radiação ultravioleta B (UVB) um destes métodos. No entanto, há muitos parâmetros a serem avaliados durante o cultivo que influenciam diretamente nos efeitos biológicos proporcionado pela radiação UVB, como por exemplo, o tempo de exposição à radiação, a irradiância, além do tipo de célula e do seu estado biológico (BALAN; SURAIHKUMAR, 2014). Por isso, poucos trabalhos na literatura conseguiram efeitos positivos na síntese de compostos bioativos e no crescimento celular em cultivos de microalgas (WANG et al., 2009; BALAN; SURAIHKUMAR, 2014), apresentando na sua grande maioria efeitos deletérios à célula. Fato que torna necessário estudos específicos para cada espécie.

No que tange os custos de cultivos de microalgas, a etapa de recuperação da biomassa do meio líquido é responsável por cerca de 20 a 30 % dos custos totais de produção, sendo a centrifugação a técnica comumente empregada, porém, a que demanda maiores custos energéticos. A técnica de imobilização celular em esferas de alginato possibilita a redução dos custos energéticos de produção, pois com uma filtração convencional é possível separar as células do meio de cultivo (DASSEY; THEEGALA, 2013). Além disto, a imobilização protege as células dos danos de cisalhamento e evita o sombreamento no interior dos fotobiorreatores, provocado pelas incrustações celulares nas superfícies, aumentando assim a produtividade das microalgas. Apesar disto, os estudos sobre a produção de compostos bioativos por microalgas imobilizadas ainda são escassos, sendo limitados a remoção de nutrientes de efluentes (DE-BASHAN; BASHAN, 2010).

A modulação de nutrientes no meio de cultivo é outra ferramenta utilizada para otimização da produção de microalgas e seus compostos (MENEGOL et al., 2017; GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019), sendo o nitrogênio um dos principais nutrientes envolvido neste processo. Porém, não há na literatura trabalhos abordando a modulação de nitrogênio em cultivos de células imobilizadas.

Considerando a carência literária sobre o efeito da radiação UVB em cultivos de microalgas e da modulação de nitrogênio em cultivos de microalgas imobilizadas com foco na produção de compostos bioativos, se faz necessário estudar novos métodos para aumentar a produção de biomassa de microalgas e de seus compostos bioativos de elevado interesse comercial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimular a concentração de biomassa e a produção de compostos bioativos em microalgas a partir da aplicação de radiação UVB e da modulação de nitrogênio em cultivos de células imobilizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da radiação UVB sobre a produção de biomassa e de compostos bioativos durante o cultivo de *Pseudoneochloris marina* e *Chlorella minutissima*;
- Determinar as melhores concentrações de nitrogênio para a produção de biomassa e compostos bioativos em cultivos de *Chlorella minutissima* imobilizadas em esferas de alginato;
- Avaliar a influência da adição de nitrogênio em diferentes etapas do cultivo de *Chlorella minutissima* imobilizada, na produção de biomassa e de compostos bioativos;
- Descrever as características de secagem convectiva de *Chlorella minutissima* imobilizada sob diferentes temperaturas de secagem;
- Avaliar a influência dos processos de secagem (convectiva e liofilização) no teor dos carotenoides da biomassa de *Chlorella minutissima* imobilizada;
- Estudar a estabilidade dos carotenoides durante o armazenamento (na presença e ausência de luz) de *C. minutissima* imobilizada desidratada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGAS

As microalgas são a denominação genérica de um grupo de micro-organismos heterogêneos, unicelulares e podem ser eucarióticas ou procarióticas (cianobactérias). Devido à sua alta eficiência fotossintética, estão entre os micro-organismos fotoautotróficos mais produtivos da natureza para geração de biomassa e captura de CO₂ (SAYRE, 2010).

O cultivo de microalgas em grande escala para fins comerciais iniciou por volta de 1960 no Japão, com a microalga *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* em 1970 no México, ambas utilizadas para suplemento alimentar. Após, houve a disseminação do mercado de alimentos utilizando microalgas através do mundo, apresentando rápido desenvolvimento em diversos países como França, Estados Unidos, China e Índia (BECKER, 2013).

As microalgas do gênero *Chlorella* são uma das mais importantes no âmbito comercial. De acordo com Spolaore (2006), em 2005 a produção mundial em peso seco foi de 2000 t, tendo como principal aplicação a nutrição humana, na qual a biomassa seca é processada na forma de pó, cápsulas ou comprimidos. Além disso, a microalga *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana. Atualmente no site de consultas de alimentos registrados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)(2019), há mais de 50 produtos à base de *Chlorella*, produzidos em forma de cápsulas, tabletes, pastilhas, pós e bebidas.

As microalgas são cultivadas principalmente fotoautotroficamente, no entanto, algumas espécies são capazes de se desenvolver de modo heterotrófico ao degradar substâncias orgânicas. Ao contrário das plantas terrestres, as microalgas não necessitam de terra fértil ou irrigação, podendo se desenvolver em meios salinos, alcalinos ou águas residuais, sem competir pela água doce destinada ao consumo (GAO et al., 2016). Além disso, por serem fotossintéticas, podem ser usadas na mitigação de CO₂, como por exemplo, na captura de efluentes gasosos de termoelétricas (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016).

Estes micro-organismos proporcionam uma fonte quase inexplorada de produtos, sendo potencial fonte renovável para diversas aplicações, tais como, na produção de biocombustíveis, no tratamento de águas residuais, na nutrição humana e animal, bem como na produção de fármacos e moléculas de alto valor comercial (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014).

Um sistema de cultivo eficiente é um dos fatores principais para aumentar a produção de biomassa de microalgas. Os fotobiorreatores utilizados para tais cultivos podem ser classificados em abertos (lagoas, tanques circulares, *raceway*) e fechados (tubulares vertical, horizontal, placa plana, *airlift*) (LOURENÇO, 2006). A Tabela 3-1 apresenta a comparação entre os sistemas aberto e fechado para o cultivo de microalgas.

Tabela 3-1 - Comparativo entre os sistemas aberto e fechado para o cultivo de microalgas.

Parâmetros	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Riscos de contaminação	Alto	Baixo
Perdas de CO ₂	Alto	Baixo
Perdas evaporativas	Alto	Baixo
Eficiência do uso da luz	Pobre	Excelente
Razão Área/Volume	Baixo	Alto
Área requerida	Alto	Baixo
Controle de processo	Difícil	Fácil
Produtividade de biomassa	Baixo	3 a 5 vezes > aberto
Custos de investimento	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Custos de manutenção	Alto	Baixo
Scale-up (escalonamento)	Fácil	Difícil
Ação de chuvas	Afeta diretamente a produção	Insignificante
Reprodutibilidade dos parâmetros de produção	Difícil	Fácil

Fonte: adaptado de Mata; Martins e Caetano (2010).

Os tanques abertos são os mais empregados em larga escala por serem mais econômicos. No entanto, os cultivos de sistemas fechados por possuírem maior controle dos parâmetros de processo, principalmente microbiológicos, apresentam maiores produtividades, e geralmente são aplicados na produção de compostos de alto valor agregado. A Tabela 3-2 apresenta a comparação de métodos de produção entre fotobiorreatores.

Tabela 3-2 - Comparação de métodos de produção entre fotobiorreatores.

Variáveis	Raceway	Tubular	Placa plana
Eficiência fotossintética (Sol) (%)	1,5	3	5
Produção de biomassa (t ha ⁻¹)	21	41	64
Custo de produção de biomassa seca (R\$ kg ⁻¹)	16,25	13,63	19,57

Fonte: Norsker et al., (2011).

3.1.1 *Chlorella minutissima*

A microalga *Chlorella minutissima* é uma clorofícea eucariótica, unicelular, de forma esférica ou elipsoidal, pertencente à classe Trebouxiophyceae e ordem Chlorellales. Esta espécie é caracterizada por possuir um pequeno tamanho de célula (1 - 3,5 μm), com média de 2 μm em condições naturais (Figura 3-1) (HUSS; SCHARPF; KESSLER, 1989). Pode estar presente em águas doces ou marinhas e não possui flagelos para motilidade (LOURENÇO, 2006)

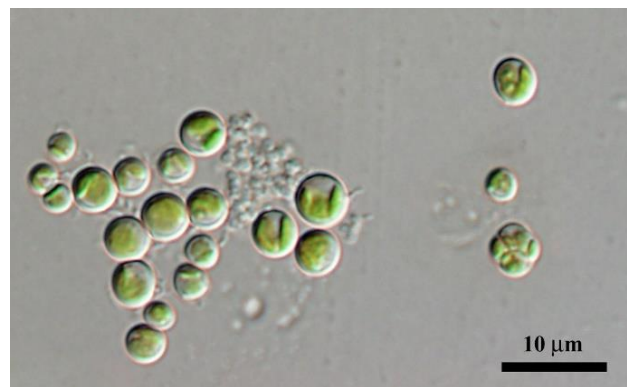


Figura 3-1 - Microalga *Chlorella minutissima*

Fonte: *Culture Collection of Autotrophic Organisms* (CCAO) (2019).

A biomassa de *C. minutissima* é fonte natural de vários compostos com atividades biológicas (por exemplo, carotenoides, ácidos graxos, compostos fenólicos) o que possibilita uma gama de aplicações, desde a alimentação animal e a aquicultura até à nutrição humana (SETO; WANG; HESSELTINE, 1984; JOO et al., 2001; CUSTÓDIO et al., 2012; SAFAFAR et al., 2015).

C. minutissima apresenta rápido crescimento e altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, tornando sua biomassa potencialmente útil na elaboração de alimentos funcionais e produtos farmacêuticos (TANG et al., 2011; DASH; BANERJEE, 2017). Sua biomassa pode apresentar elevada atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (AREMU et al., 2015). Além disto, possui habilidade de acumular lipídios em sua biomassa a partir de uma variedade de compostos orgânicos (LI et al., 2011; HIGGINS; VANDERGHEYNST, 2014).

3.1.2 *Pseudoneochloris marina*

A *Pseudoneochloris marina* é uma alga verde (clorófitas), pertencente a classe Ulvophyceae e ordem Ulvales. É eucariótica, de célula única, não apresenta parede celular e possui formato esférico de aproximadamente 3 µm quando jovens e 17 µm na maturidade (Figura 3-2). Se reproduz através de seus zoósporos biflagelados, os quais tornam-se esféricos na quiescência (WATANABE et al., 2000).



Figura 3-2 - Microalga *Pseudoneochloris marina* (100x)

Há poucos estudos que investigaram a composição bioquímica de *Pseudoneochloris marina*. Após sua identificação por Watanabe et al. (2000), o estudo de Gonçalves, Menegol e Rech (2019) foi o primeiro a avaliar sua composição bioquímica, encontrando quantidades significativas de all-*trans*-luteína, all-*trans*-zeaxantina e all-*trans*-β-caroteno. Essa cepa mostrou-se fonte de ácidos graxos essenciais, tais como ácido linoleico (C18:2n-6) e ácido α-linolênico (C18:3n-3), com uma relação ω6: ω3 de 1,6:1, considerada ideal para a saúde humana, visto que o consumo atual (em torno 20:1) é considerado prejudicial. Além disto, *Pseudoneochloris marina* apresenta potencial biotecnológico para produção de PHB (polihidroxibutirato) (ROBERT; IYER, 2019).

Microalgas do gênero *Pseudoneochloris* sp. possuem alta produção de biomassa (8,1 g L⁻¹) e carboidratos (5,5 g L⁻¹), mostrando-se como potencial candidata para a produção de biocombustíveis, como etanol e metano (AKETO et al., 2020).

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS

A diversidade de microalgas reflete em diferentes metabolismos e propriedades bioquímicas. Estes micro-organismos possuem a capacidade de sintetizar vasta gama de compostos bioativos de alto valor agregado que podem ser usados como compostos

farmacêuticos, produtos alimentares e pigmentos naturais (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014).

3.2.1 Carotenoides

Cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa das clorófitas são as clorofilas e os carotenoides. Estudos demonstram que é possível incrementar a síntese destes compostos através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum estresse (PINTO et al., 2011; MULDER et al., 2014).

Os carotenoides são tetraterpenoides (C₄₀) formados pela união de oito unidades isoprenoides (C₅), ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro, conforme mostra a Figura 3-3, que apresenta a estrutura do β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Todos os carotenoides apresentam como característica comum a cadeia poliênica, um longo sistema de duplas ligações conjugadas, rico em elétrons, o qual é responsável pela atividade antioxidante destes compostos (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009). A alternância de ligações duplas e simples presentes na estrutura dos carotenoides gera um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a absorção do oxigênio singlete e radicais livres, interrompendo as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (MCNULTY, 2008; SILVA; 2010).

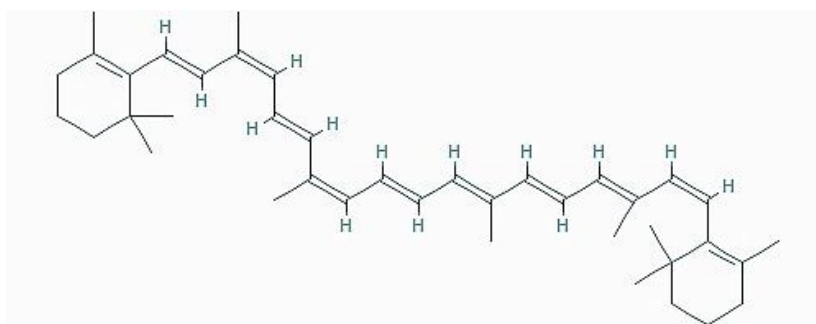


Figura 3-3 - Representação da estrutura do β -caroteno

Fonte: PubChem Compound Database,(2019a)

Os carotenoides são classificados em carotenos, quando formados apenas por carbono e átomos de hidrogênio (β -caroteno, α -caroteno e licopeno) ou xantofilas, quando carregam pelo menos um átomo de oxigênio (Zeaxantina, luteína e astaxantina) (CAZZANIGA et al., 2016). Da mesma forma que as clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da

fotossíntese, mas também possuem a função de proteger os fotossistemas quando há luz em excesso, funcionando como uma espécie de filtro (LOURENÇO, 2006).

O perfil de carotenoides das microalgas é bem diversificado, variando com a espécie. Os carotenoides majoritários presentes na biomassa de *C. minutissima* e *P. marina* são luteína, zeaxantina, α e β -caroteno (REDAELLI, 2012; DINESHKUMAR; DASH; SEN, 2015; GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019).

Tabela 3-3 - Perfil de carotenoides e concentrações máximas (mg g^{-1}) obtidos para *Chlorella minutissima* e *Pseudoneochloris marina*.

Perfil de carotenoides	Concentração máxima (mg g^{-1})	
	<i>C. minutissima</i> ^{1,2}	<i>P. marina</i> ³
<i>all-trans</i> -violaxantina	-	0,29
<i>cis</i> -violaxantina	-	0,20
<i>all-trans</i> -Luteoxantina	-	0,06
13- <i>cis</i> -luteína	-	0,14
13'- <i>cis</i> -luteína	-	0,03
<i>all-trans</i> -luteína	6,05	1,38
<i>all-trans</i> -zeaxantina	0,49	0,61
15- <i>cis</i> - β -caroteno	-	0,06
<i>all-trans</i> - α -caroteno	-	0,52
13- <i>cis</i> - β -caroteno	-	0,13
<i>all-trans</i> - β -caroteno	0,1	0,47
9- <i>cis</i> - β -caroteno	-	0,18

Referências: [1] (REDAELLI, 2012); [2] (DINESHKUMAR et al., 2015); [3] (GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019).
- : não quantificados.

As xantofilas, luteína e zeaxantina, são resultantes do processo de hidroxilação do α -caroteno e β -caroteno, respectivamente. Possuem a função de facilitar a absorção da luz azul e verde provenientes da energia solar, necessária para fotossíntese. Estes dois carotenoides possuem a propriedade de acumular-se na mácula ocular, prevenindo a degeneração macular relacionada à idade, a qual ocorre entre a população idosa (KOO; NEURINGER; SANGIOVANNI, 2014). Além disto, estudos sugerem que estes pigmentos reduzem os riscos de doenças cardiovasculares e protegem a pele dos danos causados por radiação UV (SANTOCONO et al., 2007; ROBERTS; GREEN; LEWIS, 2009).

O β -caroteno é o carotenoide que apresenta a maior atividade provitamina A, pois quando clivado ao meio libera duas moléculas de retinol (vitamina A). Recentemente, estudos clínicos também mostraram que a ingestão de dietas ricas em β -caroteno estão relacionadas à

diminuição da incidência de cânceres, doenças cardiovasculares, e degeneração macular relacionada à idade (SHARONI et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

O mercado mundial de carotenoides totalizou US\$ 1,6 bilhão em 2016. Espera-se que este mercado chegue a US\$ 2,2 bilhões em 2026, com uma taxa de crescimento anual de 3,5 %. O valor de mercado em 2019 de β -caroteno e luteína foram de US\$ 484 e 292 milhões, respectivamente, e almeja-se um aumento para US\$ 654 e 473 milhões até 2027, com taxas de crescimento anual de 3,3 e 5,9 %, respectivamente (DATA, 2019).

3.2.2 Clorofilas

Todas as microalgas possuem clorofilas (*a* e *b*) em sua composição, apresentando cerca de 4 % destes pigmentos quando cultivadas em condições normais, podendo chegar até 10 % do seu peso seco dependendo das condições de cultivo (HARUN et al., 2010). Estruturalmente, as clorofilas são tetrapirrólicas com um átomo de magnésio ligado no centro (Figura 3-4).

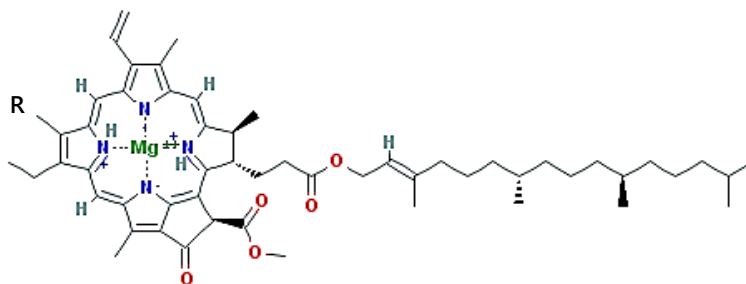


Figura 3-4 - Representação estrutural da clorofila. Clorofila *a* (R=CH₃), clorofila *b* (R=CHO).

Fonte: PubChem Compound Database, (2019b).

Além do seu papel importante na fotossíntese microalgal, as clorofilas apresentam alto valor de mercado. Estes pigmentos, assim como outros corantes naturais, são mais seguros e saudáveis do que as alternativas sintéticas, o que é importante para as indústrias de alimentos, as quais vêm seguindo a tendência de oferecer alimentos mais naturais aos consumidores (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Além disto, sua aplicação como nutracêutico vem ganhando atenção por apresentar capacidade antioxidante (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011), desintoxicante, anti-inflamatórias e preventivas sobre o câncer (FERRUZZI;

BLAKESLEE, 2007; MCQUISTAN et al., 2012), o que estimula sua aplicação na indústria farmacêutica.

A capacidade antioxidante das clorofilas é dependente da sua estrutura molecular. Lanfer-Marquez, Barros e Sinnecker, (2005) observaram que o grupo aldeído presente na clorofila *b* confere maior atividade antioxidante a este pigmento, do que o grupo metil presente na clorofila *a* (Figura 3-4). Além disto, derivados da clorofila, tais como, feofitina *b* e feoforbídeo *b*, apresentam maior atividade antioxidante do que as clorofilas.

De acordo com LI et al. (2015b) a clorofilina, derivada da clorofila, possui preço de mercado de 150 € kg⁻¹ e, portanto, é capaz de compensar quantidade considerável do custo de produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

3.2.3 Ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 (PUFA n-3) são de grande importância terapêutica, em particular o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3). Esses compostos são capazes de prevenir várias doenças, como aterosclerose (CHANG et al., 2014), doença cardíaca coronária (PATTERSON et al., 2015), hipertrigliceridemia (MAKI et al., 2014), doença inflamatória do intestino, disfunção imune e desordens cognitivas (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009).

A fonte mais comum para obtenção de EPA e DHA é a partir do pescado. Contudo, as microalgas são produtoras primárias de PUFAs n-3, os quais são acumulados ao longo dos níveis tróficos (ADARME-VEGA et al., 2012). Algumas espécies sintetizam EPA e DHA em grandes quantidades, alcançando níveis maiores que de outras fontes (bactérias, fungos e peixes), o que as tornam atrativas do ponto de vista nutricional e comercial. Além disto, o óleo de microalgas é seguro e bem tolerado, raramente apresentando queixas gastrointestinais, como odor a peixe e eructação (TUR et al., 2012).

A biomassa de *Chlorella minutissima* pode apresentar em sua biomassa grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (até 78 % dos lipídios totais), tais como, o ácido linoleico (C18:2n-6) e α -linolênico (C18:3n-3) (LI et al., 2011; PEREIRA et al., 2018) a partir dos quais, o organismo humano sintetiza DHA e EPA (MARTIN et al., 2006). A Tabela 3 - 4 apresenta o perfil de ácidos graxos poli-insaturados (%) presentes na biomassa de *C. minutissima* e *P. marina*.

Tabela 3-4 – Perfil de ácidos graxos poli-insaturados presentes na biomassa de *C. minutissima* e *P. marina*.

Perfil de ácidos graxos poli-insaturados	% em relação aos ácidos graxos totais	
	<i>C. minutissima</i> ^{1,2,3}	<i>P. marina</i> ⁴
Ácido linoleico, C18:2n-6	8,2	33,4
Ácido γ -linolênico, C18:3n-6	7,9	1,9
Ácido α -linolênico, C18:3n-3	3,9	14,1
Ácido dihomo- γ -linolênico, C20:3n-6	4,6	0,7
Ácido eicosatrienóico, C20:3n-3	-	2,8
Ácido araquidônico, C20:4n-6	5,6	0,5
Ácido eicosapentaenoico, C20:5n-3	44,7	1,3
Ácido docosahexaenoico, C22:6n-3	0,8	-

Referencias: [1](AREMU et al., 2015); [2](SETO; WANG; HESSELTINE, 1984); [3](FERREIRA et al., 2017); [4](GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019). - : não quantificados.

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Cultivos de microalgas ainda apresentam elevado custo de produção, por isto se faz necessário buscar alternativas para aumentar a sua produtividade e a síntese de compostos bioativos, bem como utilizar técnicas de cultivo que visem a redução de custos a fim de tornar estes processos mais viáveis economicamente.

3.3.1 Fatores nutricionais

A composição do meio de cultivo é um dos fatores que mais influenciam as taxas de crescimento e produtividade, além de afetar as características da biomassa. As microalgas necessitam de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes para seu desenvolvimento (LOURENÇO, 2006). Estudos sobre a nutrição de microalgas permitem avaliar o papel destes elementos químicos na formação de biomassa e na síntese de macromoléculas e compostos bioativos.

O carbono é o macroelemento mais importante no cultivo de microalgas, estando presente em todas as substâncias sintetizadas pelas células (carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, vitaminas), sua concentração na biomassa pode variar de 40 a 50 %, sendo um fator limitante para o crescimento (LOURENÇO, 2006). O ar atmosférico (0,036 % de CO₂) é a principal fonte inorgânica de carbono em cultivos autotróficos, no entanto é insuficiente

para a demanda do cultivo, sendo necessário o suprimento de CO_2 ou HCO_3^- para atingir taxas elevadas de crescimento (GROBBELAAR, 2013).

O nitrogênio é o segundo macroelemento mais importante no desenvolvimento microalgal, envolvido principalmente na síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e pigmentos. As principais fontes nitrogenadas utilizadas pelas microalgas são na forma de nitrato (NO_3^-), amônia (NH_4^+) e ureia (GROBBELAAR, 2013). As microalgas tendem a sintetizar mais proteínas e clorofilas quando o meio de cultivo é rico em nitrogênio, ao passo que na ausência deste composto a concentração de clorofilas cai, afetando diretamente o crescimento celular (LOURENÇO, 2006; ZHU et al., 2014). No entanto, esta privação proporciona o acúmulo de lipídios pela célula, variando o perfil lipídico dependendo da espécie (BREUER et al., 2012).

O fósforo é essencial para o crescimento das microalgas e participa de alguns processos celulares tais como: transferência de energia, biossíntese de ácidos nucleicos e DNA. Assim como o nitrogênio, o fósforo é um dos fatores limitantes do crescimento. É comum sua suplementação em excesso devido sua facilidade de se ligar a outros íons (CO_3^{2-} e ferro) resultando na sua precipitação, o que o torna indisponível nutricionalmente para as microalgas (GROBBELAAR, 2013).

3.3.2 Fatores de estresse

As microalgas exibem um metabolismo capaz de experimentar mudanças profundas em resposta a diferentes condições ambientais, em particular, para os chamados fatores de estresse, os quais podem provocar mudanças drásticas. Quando cultivadas em condições de estresse, estes micro-organismos possuem a capacidade de mudar o seu padrão e a estratégia metabólica, a fim de lidar com as dificuldades nas condições ambientais específicas. Por sua vez, essa mudança afeta a composição da biomassa, flutuando o teor relativo dos compostos contidos na mesma (HU, 2013). Quando as condições ambientais são extremas e as microalgas crescem sob estresse, elas sintetizam e produzem diferentes metabólitos secundários, os quais funcionam como uma tentativa destes micro-organismos de manter as suas taxas de crescimento ou para aumentar as chances de sobreviver sob estas condições ambientais desfavoráveis (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

Metabólitos secundários referem-se aos compostos que não são usados para o metabolismo primário de microalgas (divisão celular e metabolismo) e que incluem compostos que atuam como antioxidantes, hormônios, antibióticos e toxinas (SKJÅNES; REBOURS;

LINDBLAD, 2013). Alguns destes metabólitos secundários tem particular interesse por serem produtos de alto valor agregado com diversas aplicações biotecnológicas.

Condições de estresse vêm sendo empregadas nos cultivos de microalgas a fim de estimular o crescimento celular e a síntese de compostos bioativos. A Tabela 3-3 apresenta as principais condições e seus respectivos estímulos biológicos.

Tabela 3-5 –Estímulos em microalgas provenientes de diferentes condições de estresse à célula.

Condições de estresse	Microalga	Estímulos	Referência
Campos magnéticos	<i>Chlorella kessleri</i>	Crescimento, pigmentos, lipídios, proteínas e atividade antioxidante	Bauer et al. (2017)
	<i>Spirulina sp.</i>	Crescimento, proteínas e ficocianina	Deamici et al. (2016)
Concentração salina	<i>Chlorella kessleri</i>	Clorofilas, proteínas e carboidratos	Small et al. (2012)
	<i>Isochrysis galbana</i>	Lipídios	Jung et al. (2019)
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	PUFAs	Arroussi et al. (2015)
	<i>Dunaliella salina</i>	PHA	Shrivastav et al. (2010)
Intensidade de luz	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Lipídios	Jung et al. (2019)
	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Carotenoides totais e carboidratos	George et al. (2014)
Privação de nitrogênio	<i>Dunaliella salina</i>	β -Caroteno e ácido linolênico	Lamers et al. (2010)
	<i>Monoraphidium sp.</i>	Tocoferóis	Singh et al. (2020)
	<i>Dunaliella salina</i>	Crescimento e β -caroteno	Lamers et al. (2012)
Privação de fósforo	<i>Synechocystis sp.</i>	PHB	Panda et al. (2006)
	<i>Dunaliella salina</i>	Lipídios	Almutairi (2020)
	<i>Synechocystis sp.</i>	PHB	Panda et al. (2006)
	<i>Dunaliella sp.</i>	β -caroteno e glicerol	Phadwal e Singh (2003)
Temperatura	<i>Chlorella protothecoides</i>	Luteína	Sho, Wu e Chen (2006)
	<i>Dunaliella salina</i>	α e β -Caroteno	Gómez e González (2005)
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Tjahjono et al. (1994)

Além das condições de estresse comumente utilizadas citadas acima, alguns autores vêm buscando condições alternativas de proporcionar tal estresse com intuito de estimular os compostos bioativos presentes na célula. Uma dessas alternativas é a radiação ultravioleta B.

3.3.2.1 Radiação Ultravioleta

A radiação eletromagnética emitida pelo sol abrange um vasto espectro de comprimentos de ondas, o qual é dividido em três regiões principais: radiação ultravioleta (RUV; 100-400 nm), luz visível (PAR; 400-760 nm) e radiação infravermelha (IR; >760 nm) (Figura 3-5). O espectro que corresponde ao visível também corresponde a faixa de ondas absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, denominada radiação fotossinteticamente ativa

(PAR). Na faixa de radiação ultravioleta (RUV), apenas os espectros mais longos, UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm), são capazes de atingir a superfície da terra, enquanto que a UVC (100-280 nm) é totalmente absorvida pela camada de ozônio. As definições acima de RUV foram estabelecidas no “*Second International Congress of Light*” que ocorreu em Copenhague, DK (COBLENTZ, 1932).

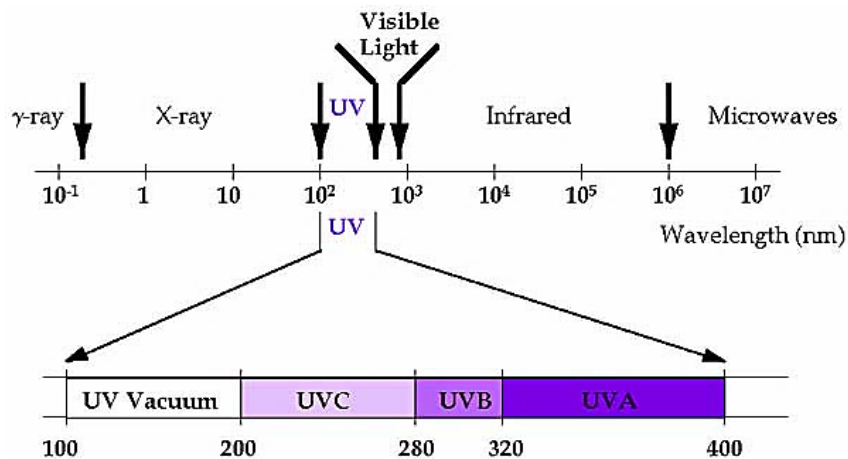


Figura 3-5 - Região ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético.

Fonte: Soehnge; Ouhtit e Ananthaswamy, (1997).

A camada de ozônio absorve cerca de 90 % da radiação UVB emitida pelo sol e esta pode penetrar a água em uma profundidade de 20 a 30 m no oceano. Este fato pode propiciar um ambiente de estresse as microalgas (ZHANG et al., 2015). Em geral, doses elevadas de radiação UVB tem sido relatadas como causadoras de estresse em microalgas, levando a danos no DNA, diminuição da fotossíntese, peroxidação lipídica e de inibição de crescimento (BEARDALL et al., 2002; GAO; GUAN; HELBLING, 2007; MA et al., 2012). Entre os diversos processos fisiológicos, a fotossíntese é potencialmente o alvo principal da radiação UV.

No entanto, há poucos trabalhos abordando o assunto no que tange a produção de biocompostos por microalgas. A respostas biológicas à radiação UVB não são lineares, sendo seus efeitos biológicos dependentes de diversos fatores, tais como, irradiâncias e tempo de exposição. Além disto, cada micro-organismo pode responder de diferentes maneiras à radiação (LIANG; BEARDALL; HERAUD, 2006).

Zhang et al. (2015) avaliaram a aplicação de diferentes irradiâncias (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 kJ m⁻²) de UVB em cultivos de *Dunaliella salina*. Os cultivos foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer com 300 mL de meio f/2, iluminância de 80 μmol m⁻² s⁻¹, a 22 °C,

durante 4 d, sendo agitados duas vezes ao dia. Os autores observaram que as maiores irradiâncias (0,75 e 1,00 kJ m⁻²) afetaram negativamente as concentrações de clorofilas (*a* e *b*) na célula, com reduções em torno de 25 %, enquanto que irradiâncias menores (0,25 e 0,50 kJ m⁻²) não afetaram o conteúdo destes pigmentos, no entanto apresentaram maiores teores de carotenoides totais, cerca de 50 %. Segundo os autores, os carotenoides têm a capacidade de proteger a célula frente a radiação UVB, o que poderia explicar o fato de radiações menores não terem afetado o conteúdo de clorofilas. Os autores observaram uma diminuição no transporte de elétrons na célula proporcional a elevação da irradiância.

Wang et al. (2009) estudaram os efeitos da radiação UVB no cultivo de *Chlamydomonas* sp. ICE-L, isoladas do gelo em uma região da Antártida. As cepas foram cultivadas em meio f/2 durante 14 d, em ciclo claro/escuro 12:12 h, 0,13 – 0,19 μmol m⁻² s⁻¹, à 6 - 8 °C. Os cultivos foram expostos à irradiâncias de 35 e 70 mW cm⁻², durante 12 h d⁻¹ e foram comparados com o cultivo controle (sem aplicação de UVB). Os resultados demonstraram que a radiação UVB inibiu o crescimento celular em 28,4 % (35 mW cm⁻²) e 68,2 % (70 mW cm⁻²). Os autores observaram uma elevação nos níveis de espécies reativas nos três primeiros dias de cultivo, seguido de uma redução. O conteúdo de radical superóxido (O₂⁻) chegou a 113,6 % quando exposta à 35 mW cm⁻² e à 377,7 % em 70 mW cm⁻². Enquanto que a peroxidação lipídica, medida através da produção de malondialdeído, aumentou em 152 % (35 mW cm⁻²) e 283 % (70 mW cm⁻²), em relação ao controle. Os autores também avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, peroxidase e catalase) e observaram uma correlação positiva com a produção de O₂⁻, apresentando maiores atividades nos primeiros dias de cultivo, seguida de uma redução. Estes resultados indicam que a radiação UVB proporciona um estresse oxidativo nas células, mas seu sistema de defesa enzimático auxilia na neutralização de espécies reativas.

Balan e Suraishkumar (2014) investigaram a influência da radiação UV (UVA e UVB) em cultivos de *Chlorella vulgaris* NIOT5. Os cultivos foram realizados em meio f/2-Si a 25 °C, 100 rpm, fotoperíodo claro/escuro 16:08 h, 68 μmol m⁻² s⁻¹, durante 15 d. A aplicação de RUV (10 W m⁻²) ocorreu em diferentes fases de crescimento, nomeadas como, fase log inicial (1-5 d), fase log final (6-10 d), fase estacionária (11-15 d) e durante todo os 15 d de cultivo, em cada fase, a aplicação de luz branca (PAR) deu-se nas primeiras 6 h de cultivo, seguida de 6 h de RUV (UVA, UVB ou UVA+UVB), 5 h de PAR e por fim 8 h sem luz. Os ensaios com RUV aplicados durante os 15 d consecutivos estimularam o crescimento celular, apresentando valores de μ_{máx} 3 (UVA); 4,3 (UVB) e 4,2 (UVA + UVB) vezes maior que o cultivo controle (sem aplicação de RUV). A aplicação de RUV na fase log inicial foi mais

efetiva na estimulação celular do que na fase log final, obtendo $\mu_{\text{máx}}$ semelhantes, sendo a radiação UVB a que apresentou novamente maior estímulo de crescimento, 4,2 vezes maior que o controle.

No mesmo trabalho os autores constataram que a radiação UVB estimulou a produção de clorofilas em estado excitado tripleto ($^3\text{Chla}^*$), radical livre que por sua vez desencadeou a produção de outras espécies reativas, tais como, os radicais superóxido e hidroxila. No entanto, os autores observaram que a produção destes radicais aumentou em 10 vezes o tamanho da antena do fotossistema II (constituída basicamente de clorofilas), o que tornou mais eficiente a captura de energia pela célula, auxiliando assim na fotossíntese. Fato que explicaria o estímulo celular proporcionado pela UVB à célula. Este trabalho demonstra que a produção de espécies reativas pode influenciar positivamente o crescimento microalgal, através da modulação de parâmetros fotossintéticos.

O conteúdo de vitaminas nas microalgas também pode ser afetado pela radiação UVB. O teor de vitamina D₃ em *Nannochloropsis oceanica* aumentou com o aumento do tempo de exposição à radiação UVB (3, 6, 18 e 24 h d⁻¹, por 7 dias), passando de < 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ (controle) para 0,48 $\mu\text{g g}^{-1}$ (UVB 24 h d⁻¹). No entanto, em *Rhodomonas salina*, *Chlorella minutissima* e *Arthrospira máxima*, nenhuma modulação da concentração de vitamina D₃ foi registrada (< 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$) (LJUBIC et al., 2020). Com exceção deste trabalho que aborda apenas o efeito da radiação UVB na produção de vitamina D₃ por *C. minutissima*, não há na literatura trabalhos abordando a influência da radiação UVB na produção de biomassa e de compostos bioativos por *C. minutissima* e *P. marina*.

3.4 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Devido à sua baixa concentração no cultivo (0,5 - 2,5 g L⁻¹), pequeno tamanho celular (5 - 50 μm de diâmetro) e a densidade similar a água do meio de cultivo ($\pm 1020 \text{ kg m}^{-3}$), os custos e consumo de energia na etapa de recuperação de biomassa são preocupações significativas que precisam ser tratadas adequadamente (LI et al., 2008c). A maioria dos sistemas de produção de microalgas utiliza a centrifugação para recuperar a biomassa do meio líquido, a qual representa uma fração importante da demanda total de energia do processo de produção (BILAD et al., 2012).

Dependendo da espécie, densidade celular e condições de cultivo, estima-se que a recuperação de biomassa contribua de 20 a 30 % para o custo de produção (DASSEY; THEEGALA, 2013). Além disto, a exposição de microalgas a altas forças gravitacionais e de

cisalhamento pode danificar a estrutura celular, prejudicando a produção de compostos intracelulares de alto valor agregado (HARUN et al., 2010).

A imobilização celular apresenta-se como uma técnica alternativa para a etapa de recuperação de microalgas. As células imobilizadas são mais facilmente recuperadas do meio líquido pelo simples método de filtração, o que não demanda altos consumos de energia (LAM; LEE, 2012), além de proteger as células contra a força de cisalhamento. Relacionando os custos de material para imobilização com os custos de energia gastos na recuperação de células livres (por centrifugação), obtém-se uma economia de 90 % com a utilização de células imobilizadas, tornando a imobilização economicamente atraente para o cultivo de microalgas (DASSEY; THEEGALA, 2013; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

Algumas espécies de microalgas (por exemplo, *Chlorella minutissima*) tendem a formar aglomerados e aderir nas superfícies dos fotobiorreatores, diminuindo a incidência de luz no interior dos mesmos e reduzindo a produtividade do cultivo. A imobilização celular evita as incrustações, auxiliando na limpeza dos reatores (KOURKOUTAS et al., 2004).

As técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro categorias principais baseadas no mecanismo físico empregado (Figura 3-6): (a) fixação ou adsorção em superfícies sólidas, (b) aprisionamento em matriz porosa, (c) autoagregação por floculação ou com agentes de ligação cruzada (d) contenção celular atrás de barreiras (PILKINGTON et al., 1998).

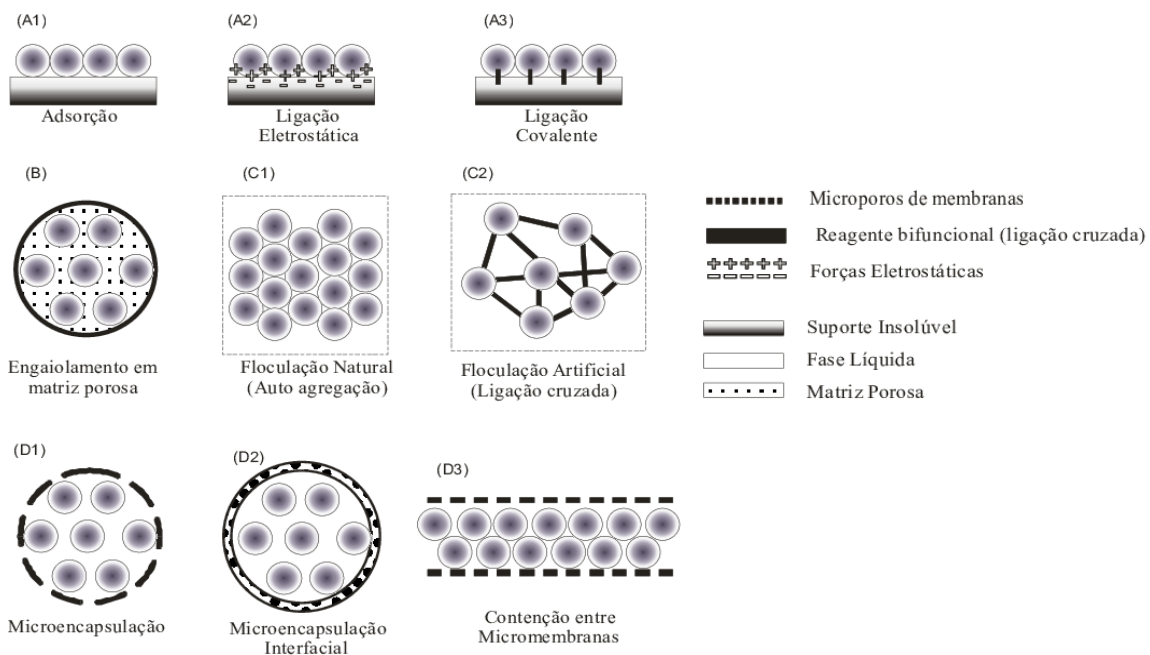


Figura 3-6 - Diferentes métodos de imobilização. (a) Imobilização na superfície do suporte; (b) aprisionamento em matriz porosa; (c) Floculação celular (formação de agregados); (d) Barreiras de contenção mecânica.

Fonte: Covizzi et al., (2007).

O método mais comum de imobilização é o aprisionamento em matriz porosa, no qual destaca-se a imobilização em esferas de alginato de cálcio, uma das técnicas mais utilizadas pelas vantagens que apresenta como matriz-suporte. O alginato é um heteropolissacarídeo natural, formado por ligações glicosídicas (1-4) de ácido α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (L), de composição e sequência variáveis. Comercialmente, são extraídos principalmente de algas marrons, amplamente utilizado na produção de fármacos e pela indústria de alimentos, conferindo aos alimentos propriedades de textura, como espessamento, aderência, emulsificação ou gelificação (PESO-ECHARRI et al., 2012; PARREIDT; MÜLLER; SCHMID, 2018).

O processo de gelificação ocorre na presença de cátions multivalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+}), sendo o íon cálcio o mais utilizado pela indústria alimentícia. A gelificação ocorre pela produção de uma zona de ligação entre unidades de α -L-gulurônico da molécula de alginato que se ligam fisicamente através do íon cálcio formando uma estrutura física chamada de modelo "caixa de ovos" (Figura 3-7) (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

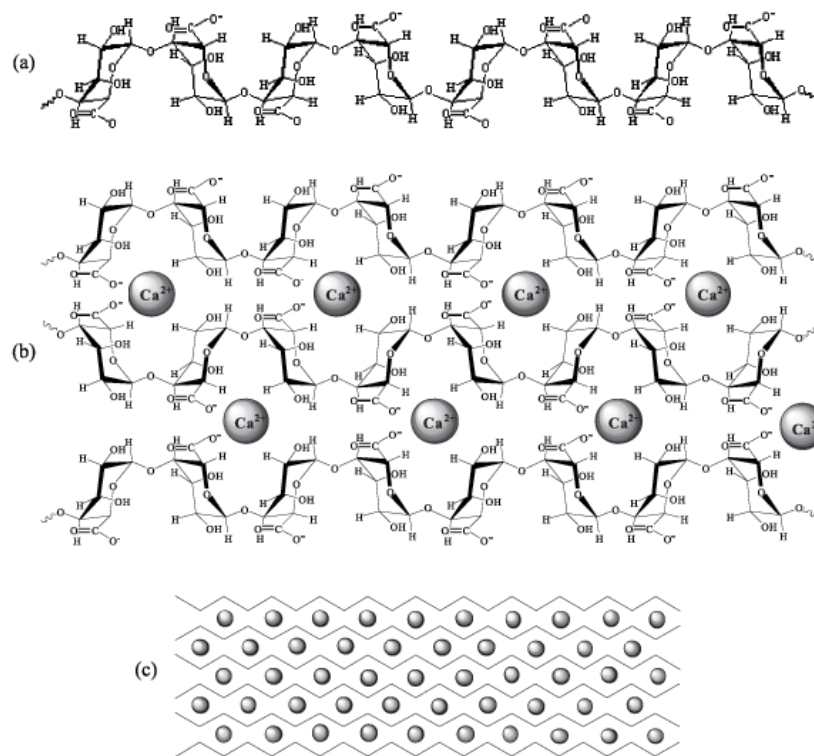


Figura 3-7 - Formação do gel de alginato de cálcio: (a) Homopolímeros de unidades de ácido gulurônico em solução; (b) Ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio.

Fonte: Kawaguti e Sato (2008).

O alginato é frequentemente empregado como agente encapsulante para a proteção de compostos bioativos, células e micro-organismos, por formar uma matriz altamente versátil, biocompatível, atóxica e biodegradável, além de apresentar alta transparência, ideal para cultivos de microalgas (LAM; LEE, 2012). Estudos evidenciam que o alginato de cálcio é capaz de proteger os alimentos durante o seu processamento e armazenamento frente a algumas condições, como calor, diferentes pH e presença de oxigênio, possibilitando que os compostos encapsulados permaneçam biodisponíveis, mantendo suas atividades funcionais (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

Na imobilização celular em esferas de alginato de cálcio uma suspensão de microalgas é misturada a uma solução de alginato de sódio. Essa mistura é gotejada em solução contendo CaCl_2 , formando grânulos. Após a gelificação as células são aprisionadas dentro do gel. Durante a permanência na solução salina, os íons cálcio são transportados para o centro da esfera e um estado de equilíbrio é atingido, variando de 15 min a 12 h, dependendo das condições experimentais, tais como temperatura, concentração do sal, diâmetro da esfera, tipo e concentração de alginato, e concentração da suspensão celular (KAWAGUTI; SATO, 2008).

3.4.1 Imobilização de microalgas

As principais aplicações com imobilização de microalgas em esferas de alginato incluem a remoção de nutrientes e metais pesados no controle de qualidade da água de piscicultura e no tratamento de efluentes (CHEN, 2001; RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010; RICHARDS; MULLINS, 2013), bem como no armazenamento a longo prazo de microalgas (CHEN, 2001). No entanto, poucos estudos possuem enfoque na produção de compostos bioativos (tais como, carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados) a partir desta técnica, principalmente com o intuito de estimular estes compostos na célula, sendo limitados a produção de lipídios para produção de biocombustíveis (RICHARDS; MULLINS, 2013; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

Moreira et al. (2006) avaliaram a estabilidade de esferas de alginato frente a água do mar com o objetivo de cultivar *Phaeodactylum tricornutum in situ*. Para tal, foram avaliadas duas concentrações dos cátions divalentes, cálcio e estrôncio (2,0 % e 4,0 %) e o uso do polícatión quitosana na formação das esferas de alginato 4,9 % (p/v). A concentração de 4 % para ambos os tratamentos mostrou maior estabilidade em relação a concentração de 2 % (apresentando diminuição no diâmetro de 1 – 14 % a partir do 8 dia de cultivo). As maiores taxas específicas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foram encontradas para os tratamentos sem quitosana,

com valores em torno de $1,4 \text{ d}^{-1}$ (2 % SrCl) e $1,2 \text{ d}^{-1}$ (2 % e 4 % CaCl; 4 % SrCl). Ao passo que, esferas com adição de quitosana apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ 4 vezes menor, indicando uma menor difusão de nutrientes nas esferas devido a diminuição da porosidade.

Chen (2001) avaliou viabilidade da técnica de imobilização na preservação de *Scenedesmus quadricauda* durante o armazenamento a longo prazo e testou o uso de microalgas imobilizadas no controle da qualidade da água na piscicultura. As células imobilizadas estavam vivas e mantiveram suas atividades fisiológicas após 3 anos de armazenamento no escuro ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sem meio de cultivo). Foi observado o desaparecimento do pirenoide de *S. quadricauda* após o armazenamento a longo prazo. No entanto, o pirenoide foi reconstruído quando as células foram cultivadas novamente em meio aquoso na presença de luz, indicando que as células permaneceram vivas ao consumir os tampões de reserva dos pirenoides. As concentrações de amônio na água diminuíram acentuadamente com culturas imobilizadas. O autor conclui que a imobilização em esferas de alginato de *S. quadricauda* pode ser utilizada tanto no estoque de culturas em bancos de cepas, bem como no controle da qualidade da água em culturas de tilápia.

Cheirsilp, Thawechai e Prasertsan (2017) cultivaram *Nannochloropsis* sp. imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e avaliaram a influência de diferentes volumes de esferas (10 %, 15 % e 25 %) em relação ao volume de meio (400 mL), na concentração de biomassa, produção de lipídios, ácidos graxos e pigmentos, e compararam com o cultivo controle (células livres). Os autores observaram que o volume de 25 % apresentou concentração de biomassa ($0,67 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) superior aos outros tratamentos (10 % e 15 %) e similar ao cultivo controle ($0,79 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$). Esta condição também apresentou a menor densidade celular nas esferas em relação a 10 % e 15 %. Fato que facilita a maior transferência de nutrientes e CO_2 entre a fase líquida e a sólida. Além disto, os teores de lipídios, clorofilas e carotenoides totais da condição com 25 % não apresentaram diferença estatística em relação ao controle. O teor de ácidos graxos insaturados na biomassa das células imobilizadas foi 1,3 vez maior do que nas células livres.

Neste mesmo trabalho, os autores utilizaram efluente secundário da fabricação de óleo de palma como meio de cultivo de *Nannochloropsis* sp imobilizadas, com o objetivo de reduzir custos de produção, estimular os teores lipídios, mitigar CO_2 e remover nitrogênio e fósforo do efluente. O cultivo em batelada repetida ocorreu em fotobiorreator de leito fluidizado (2 L) com iluminância contínua de $47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 d. O efluente foi 100 % substituído a cada 3 dias e no 7º dia as esferas foram substituídas por novas. A concentração máxima de biomassa chegou a $3,28 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ e o teor de lipídios a $0,36 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, com resultados semelhantes entre os dias 1-7 e 7-14, demonstrando boa reprodutibilidade do sistema

de cultivo. A remoção média de DQO no efluente foi de 45 a 55 %, a mitigação de CO₂ e a remoção de nitrogênio e fósforo foi maior que 90 %. Estes resultados indicam a potencialidade de cultivo de microalgas imobilizadas para fitorremediação de efluentes industriais, mitigação de CO₂ e produção de lipídios (CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

Soo et al. (2017) investigaram a estabilidade de esferas de alginato de cálcio em meio salino e a viabilidade de *Nannochloropsis* sp. imobilizada no tratamento de água marinha. Para tal, diferentes concentrações de alginato de sódio (1 %, 3 %, 4 % e 6 %) e CaCl₂ (0,3 %, 1 %, 2 %, 3 % e 4 %) foram testadas. As esferas foram incubadas em meio f/2 em agitador orbital durante 15 dias. As esferas apresentaram maior estabilidade com o aumento das concentrações de alginato e CaCl₂. Sendo a maior estabilidade com 6 % de alginato e 2 % de CaCl₂. Posteriormente, o crescimento celular e a remoção de nitrogênio amoniacal (NH₄⁺-N) por *Nannochloropsis* sp. imobilizada foram comparados com cultivos de células livres. A taxa específica de crescimento das células imobilizadas (0,063 h⁻¹) e a remoção de NH₄⁺-N (82,2 %) foram significativamente maior quando comparados ao cultivo de células livres, 0,027 h⁻¹ e 47,3 %, respectivamente. Demonstrando assim o potencial da técnica de imobilização de microalgas marinhas no tratamento de água de aquicultura, além de sua biomassa poder ser explorada como alimento vitalício e fonte bioquímica valiosa para a preparação de rações.

3.5 SECAGEM DE MICROALGAS

A preservação da biomassa de microalgas após a recuperação do meio líquido requer a remoção adicional de umidade através da secagem. A secagem é um método empregado para reduzir o teor de umidade dos produtos agrícolas, diminuindo as atividades enzimáticas e microbianas, aumentando a vida útil dos produtos e reduzindo o custo de embalagem, armazenamento e transporte, devido a diminuição do peso e volume (MUJUMDAR; LAW, 2010).

Os principais métodos utilizados para secagem de microalgas são, secagem solar, secagem convectiva, secagem por pulverização (*spray drying*) e liofilização (AHMED et al., 2015; HOSSEINIZAND; SOKHANSANJ; LIM, 2018; AGBEDE et al., 2020), e podem representar cerca de 30 % do custo total de produção (BAGCHI; RAO; MALLICK, 2015). Portanto, é necessário buscar métodos de secagem adequados que reduzam o custo geral de produção de microalgas.

A secagem solar é o método tradicional de secagem de produtos agrícolas usando a radiação solar. É um método barato, porém requer grandes superfícies de secagem, é

dependente do clima, apresenta taxas de secagem lentas devido às baixas temperaturas, além de ficar sujeito à contaminação, levando à degradação da biomassa e tornando difícil manter a qualidade do produto final (AGBEDE et al., 2020).

A secagem por ar quente ou convectiva, utiliza equipamentos mecânicos, como um forno ou secador de bandejas, fornecendo ar quente ao material a ser seco à uma temperatura e velocidade de ar específicas. É um processo popular para desidratação de microalgas, sendo mais higiênico e proporcionando melhor uniformidade na secagem (OLIVEIRA et al., 2009; DISSA et al., 2010). No entanto, fatores como temperatura e tempos prolongados de secagem podem afetar a composição da biomassa, como proteínas e pigmentos (HOSSEINIZAND; SOKHANSANJ; LIM, 2018). Oliveira et al. (2010) desidrataram *Spirulina platensis* em secador de bandeja à 55 °C e não observaram diferença significativa na composição dos ácidos graxos da biomassa seca em relação à biomassa fresca, porém, o conteúdo de ficocianina foi degradado em 37 %.

A técnica de *spray drying* é o método mais comumente empregado para secagem de microalgas, obtendo-se um produto na forma de pó. A secagem com *spray dryer* é utilizada principalmente para obtenção de composto de alto valor agregado, devido a boa conservação destes compostos (CHEN; CHANG; LEE, 2015). No entanto, devido ao alto custo, não é economicamente viável para produtos de baixo valor agregado como biocombustíveis e proteínas (CARDOSO et al., 2011).

A liofilização é amplamente utilizada na indústria de alimentos, bem como em muitas pesquisas, pois preserva as características originais do produto, oferecendo maior qualidade ao produto seco em comparação a outros métodos de secagem. Esse processo é adequado para produtos e composto sensíveis ao calor, pois utiliza baixas temperaturas de processamento (CHIMSOOK, 2018). Em comparação com a secagem por convecção, infravermelho e *spray drying*, a liofilização mantém a maior quantidade de proteínas na biomassa desidratada, com perdas inferiores a 10 % (DESMORIEUX; HERNANDEZ, 2004). No entanto, o processo de liofilização apresenta um custo elevado, sendo de 4 a 8 vezes maior em comparação com a secagem convectiva (RATTI, 2001).

3.5.1 Estabilidade dos carotenoides durante a secagem e armazenamento de microalgas

O método de secagem pode ter um grande impacto na degradação e retenção de nutrientes de microalgas (AHMED et al., 2015; HOSSEINIZAND; SOKHANSANJ; LIM, 2018). Processos de secagem rápidos e com temperaturas médias são importantes para manter

a qualidade dos fitonutrientes presentes na biomassa desidratada (PRASETYANINGRUM; DJAENI, 2012). Além disto, o método de secagem pode influenciar na estabilidade dos compostos durante o armazenamento, devido a estrutura obtida na matriz final, como tamanho de partícula e porosidade (RYCKEBOSCH et al., 2011). A estabilidade durante o armazenamento também é dependente de diversos fatores, como a composição antioxidante natural da biomassa, as condições de embalagem e o tempo de armazenamento (SAFAR et al., 2017).

A mesma estrutura poliênica conjugada que concede aos carotenoides suas propriedades antioxidantes, também os tornam suscetíveis à oxidação, apresentando alta sensibilidade à luz, oxigênio e temperatura (BOON et al., 2010), por isso, quando o objetivo é a produção destes compostos de alto valor agregado, os métodos de secagem devem garantir sua estabilidade durante o processamento e armazenamento a longo prazo.

Processos de secagem envolvendo altas temperaturas, como secagem em forno, resultam na desnaturação de proteínas, ácido ascórbico e degradação dos carotenoides, podendo afetar antioxidantes em produtos alimentícios (SHILTON, 2003). Stramarkou et al. (2017) avaliaram a influência da secagem convectiva em forno (60 °C; 4,5 h) e por liofilização na degradação dos carotenoides de *Chlorella vulgaris*. A menor degradação ocorreu por liofilização (57 %), enquanto a secagem por ar quente resultou em 91 % de degradação destes pigmentos, quando comparados à biomassa fresca. Prasetyaningrum e Djaeni (2012) estudaram a secagem de *Spirulina* em leito de espuma (*foam-mat drying*) sob diferentes temperaturas (50 - 70 °C), técnica utilizada para alimentos sensíveis ao calor. O teor de β -caroteno obtido na melhor condição de secagem da biomassa (60 °C, 40 min) foi de 1,4 mg g⁻¹, quantidade similar ao encontrado na biomassa comercial de *Spirulina* desidratada (1,5 mg g⁻¹).

Shekarabi et al. (2019) avaliaram a influência de diferentes métodos de secagem no teor de carotenoides de *Isochrysis galbana*. A biomassa foi seca por liofilização (-84 °C, 12 h), *spray dryer* (140 -150 °C/80 - 85 °C, 6 - 8 s), secagem solar (22 - 36 °C, 2 dias) e secagem em forno (60 °C, 12 h). O maior teor de carotenoides foi obtido por liofilização (1,06 μ g mg⁻¹), seguido por secagem solar (0,85 μ g mg⁻¹) e forno (0,84 μ g mg⁻¹), enquanto que o menor teor foi obtido por *spray dryer* (0,73 μ g mg⁻¹).

Ryckenosch et al. (2011) avaliaram a influência da secagem (liofilização e *spray drying*) e armazenamento na estabilidade de carotenoides na microalga *Phaeodactylum tricorutum*. Foi observado uma redução de 25 % no teor de carotenoides após a secagem por *spray dryer*, provavelmente ocasionado pela degradação térmica (180 °C - 70 °C), porém não houve degradação dos carotenoides durante o armazenamento (35 dias). Já a liofilização não

alterou o conteúdo inicial de carotenoides após a secagem, no entanto, após o armazenamento (35 dias) a degradação dos carotenoides foi superior à obtida pela secagem por *spray dryer*.

O processo de liofilização, embora proporcione menor degradação dos compostos durante o processo, torna a amostra mais porosa, o que permite maior contato dos carotenoides com o oxigênio durante o armazenamento, aumentando assim sua degradação (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Ahmed et al. (2015) também observaram a perda de astaxantina ao secar por *spray dryer* extratos de *Haematococcus pluvialis*, enquanto que a liofilização proporcionou um maior rendimento de astaxantina devido à ausência de tratamento térmico.

Safafar et al. (2017) estudaram os efeitos da temperatura (5, 20 e 40 °C) e exposição ao ar (sob vácuo vs. pressão ambiente) em *Nannochloropsis salina* liofilizada e armazenada durante 56 dias. O teor de carotenoides reduziu em todos os experimentos ao longo do tempo. O armazenamento em baixa temperatura (5 °C) teve mais eficácia na preservação dos carotenoides do que as condições de armazenamento com redução de oxigênio. Além disto, dentre os carotenoides, as xantofilas apresentaram menor estabilidade ao longo do tempo, em relação aos carotenos.

Uma alternativa para a proteger os carotenoides durante os processos de secagem e armazenamento é através da imobilização com alginato de cálcio, revestindo a biomassa e reduzindo a área de contato com o oxigênio. Estudos demonstram o potencial do alginato como matriz de revestimento de carotenoides na produção de microcápsulas por *spray dryer*, aumentando a estabilidade dos carotenoides à luz, temperatura e oxigênio (ZHANG et al., 2017; LI et al., 2018). Leach et al. (1998) utilizaram alginato de cálcio para microencapsular *Dunaliella salina* seguido por secagem em leito fluidizado (70 °C, 10 min). Foram avaliados a influência de diferentes concentrações de alginato (3,3, 4,3 e 7,3 g de alginato L⁻¹) na estabilidade do β - caroteno após a secagem e durante o armazenamento das microcápsulas. O percentual de degradação de β - caroteno após a secagem variou com a concentração de alginato, entre 13 % (4,7 g L⁻¹) e 21 % (3,3 g L⁻¹), enquanto que a degradação após 58 dias de armazenamento (no escuro e sob atmosfera de nitrogênio) variou entre 5 % (3,3 g L⁻¹) e 65 % (7,3 g L⁻¹).

No entanto, até o momento não há trabalhos publicados na literatura que tenha abordado a secagem de microalgas imobilizadas em esferas de alginato, por isso se faz necessário avaliar o potencial desta técnica na estabilidade dos carotenoides durante a secagem e armazenamento das esferas secas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Pseudoneochloris marina* e *Chlorella minutissima*, as quais pertencem ao banco de algas do Laboratório de Bioengenharia (ICTA/UFRGS). Sendo mantidas em meio de cultivo f/2, (Tabela 4-1), em estufa termostaticada à 20 °C, com iluminância de 5,2 klx ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e fotoperíodo de 12 h claro/escuro.

Tabela 4-1 - Concentrações de reagentes e soluções estoque empregados no meio de cultivo f/2 para as diferentes microalgas.

	<i>C. minutissima</i>	<i>P. marina</i>
Composição	Quantidade (L)	
Sal marinho artificial	34 g	34 g
NaCl	-	17 g
NaNO ₃	0,3 g	0,3 g
Solução de elementos traço	1 mL	1 mL
Solução de fosfato de sódio	1 mL	1 mL
Solução de silicato de sódio	1 mL	1 mL
Solução de vitaminas	1 mL	1 mL
Solução de tampão TRIS	1 mL	1 mL

Fonte: Guillard, (1975)

Solução de elementos traço (mg L⁻¹): CuSO₄.5H₂O (9,8); ZnSO₄. 7H₂O (22); COCl₂.6H₂O (10); MnCl₂.4H₂O (180); Na₂MoO₄.4H₂O (6,3); Na₂EDTA (4,36) e FeCl₃.6H₂O (3,15).

Solução de vitaminas (mg L⁻¹): Tiamina (100); Cianocobalamina (0,5) e Biotina (0,5).

Solução de fosfato e silicato de sódio (mg L⁻¹): NaH₂PO₄.H₂O (5) e Na₂SiO₃ (30).

As soluções estoque foram preparadas segundo Lourenço (2006), autoclavadas a 121 °C por 15 min (Prismatec, Autoclave vertical CS), exceto a solução de vitaminas que foi esterilizada por microfiltração (*Sartorius Stedim Biotech*). A solução tampão foi composta por 50 g de tris (C₄H₁₁NO₃), aproximadamente 30 mL de HCl P.A. (para ajuste do pH) e água destilada para aferição de volume total de 200 mL.

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.2.1 Cultivos com aplicação de radiação UVB

Os cultivos foram realizados em modo descontínuo em fotobiorreatores de placa *air-lift* de acrílico, com capacidade de 2,4 L, contendo camisa de aquecimento e resfriamento conectada a um banho térmico com temperatura programada (KOCHEM et al., 2014) (Figura 4-1). A assepsia dos fotobiorreatores foi realizada pela adição de 5 mL de NaClO 2,5 %, preenchidos totalmente com água e mantendo a aeração por 12 h. Após foram adicionados 10 mL de solução de Na₂S₂O₃ (250 g L⁻¹) e mantido por 2 h sob aeração. Após este período os fotobiorreatores foram esvaziados e lavados com água destilada estéril para recebimento do meio de cultivo e inóculo de microalgas.

Os cultivos foram mantidos à 27 °C, iluminância contínua de 18 klx (245 μmol m⁻² s⁻¹), durante 7 - 8 dias, quando atingiram a fase estacionária. As culturas foram suplementadas diariamente com 1 mL L⁻¹ de solução de metais traço e 1 mL L⁻¹ de solução de fosfato. A aeração do sistema foi realizada por meio de mangueiras com sistema de filtração utilizando filtros de membrana de 0,22 μm, conectadas às pedras porosas. A vazão de 1 L min⁻¹ de ar comprimido foi controlada por meio de rotâmetro.

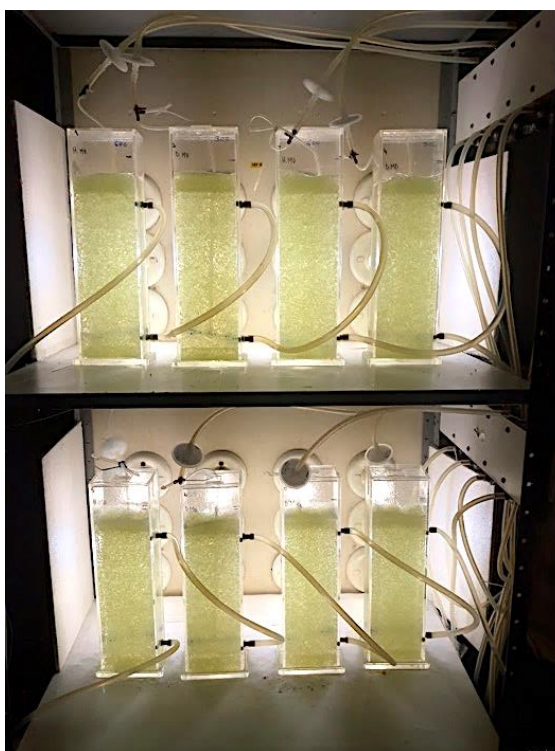


Figura 4-1 - Fotobiorreatores de placa *air-lift*.

Os cultivos iniciaram a partir da adição de 240 mL de inóculo em 2160 mL de meio f/2. Os inóculos foram preparados 7 dias antes da realização do cultivo, a partir da adição de 24 mL de inóculo do banco de cepas (item 4.1) em 216 mL de meio f/2, mantidos em câmara incubadora com agitação orbital de 90 rpm a 27 °C e iluminância contínua de 5,8 klx ($78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os cultivos foram realizados em duplicata.

Diferentes tratamentos com aplicação de radiação UVB foram realizados variando o tempo de exposição dos cultivos à radiação UVB. Para os cultivos com *P. marina* aplicou-se UVB durante 2, 4 e 6 h d⁻¹, enquanto que para os cultivos com *C. minutissima* a aplicação ocorreu durante 2, 4, 6, 8 e 10 h d⁻¹. A radiação foi obtida de lâmpadas USHIO G8T5E-UVB (8 W), com pico em 306 nm. As lâmpadas UVB foram dispostas na lateral dos fotobiorreatores, como mostra a Figura 4-2. A irradiância foi mensurada através de um medidor de radiação UV (LUTRON, UV-340A), obtendo 10 W m^{-2} . O cultivo controle foi realizado apenas com luz PAR, acoplados com a mesma estrutura dos cultivos com UVB, a fim de receber a mesma quantidade de luz.

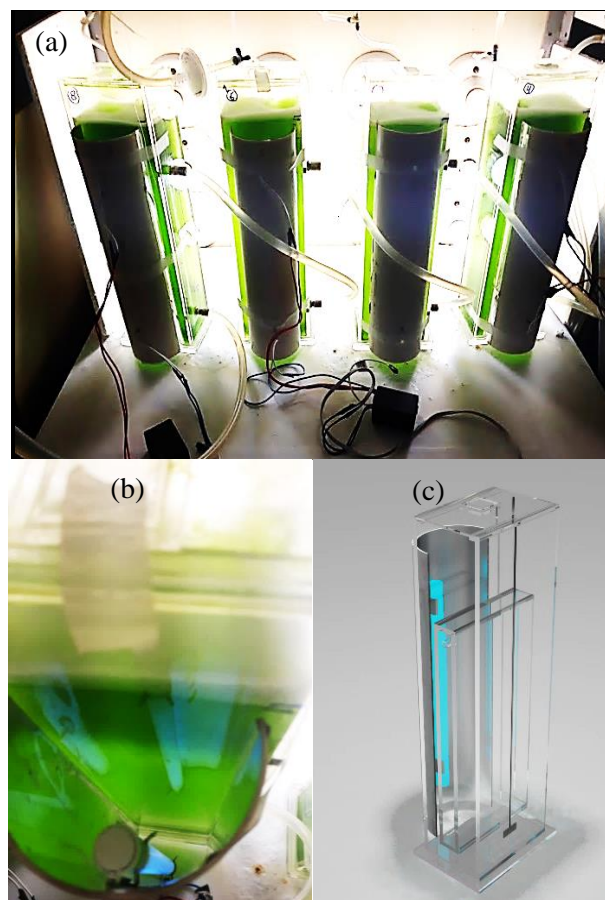


Figura 4-2 – Fotobiorreatores de placa *air-lift* adaptados com os suportes de lâmpadas UVB (a); Visão interna do suporte acoplado ao fotobiorreator (b); Esquema do sistema de cultivo com aplicação de radiação UVB (c).

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação ($10000 \times g$; 4°C ; 10 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada (48 h, -70°C), liofilizada e armazenada (-20°C) para posterior caracterização.

4.2.2 Cultivos com *C. minutissima* imobilizada

A microalga *C. minutissima* foi imobilizada em esferas de gel de alginato de acordo com o procedimento modificado de Moreira et al. (2006), com alteração da concentração de alginato de sódio: uma solução de alginato-microalga 4 % foi obtida pela mistura de volumes iguais de inóculo de microalga (descrito em 4.2.1) e uma solução de alginato de sódio 8 % (80 g L^{-1}). Com auxílio de uma bomba peristáltica, a solução alginato-alga foi gotejada em solução de CaCl_2 4 % (40 g L^{-1}) sob agitação para formar as esferas de alginato de cálcio (diâmetro aproximado de 3 mm) (Figura 4-3). Após 1 hora de estabilização em solução de CaCl_2 , os grânulos foram lavados com água destilada estéril e transferidos para os fotobiorreatores.

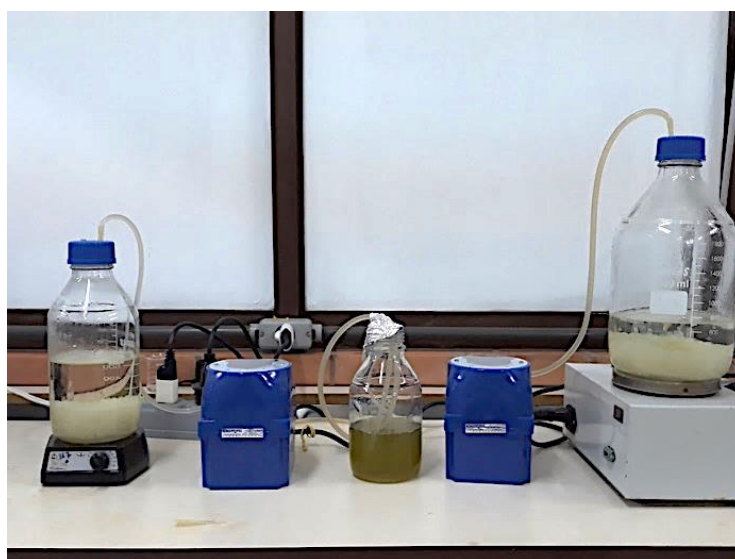


Figura 4-3 – Sistema para produção de *C. minutissima* imobilizada em esferas de alginato.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de *air-lift* (KOCHEM et al., 2014) preenchidos com 525 mL de esferas e 1575 mL de meio f/2. Os fotobiorreatores foram continuamente iluminados (18,0 klx), a taxa de fluxo de ar foi mantida em 1 L min^{-1} enriquecido com CO_2 (fração de volume de 1 %), e a temperatura foi $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Amostras do meio de cultivo (2 mL) e células imobilizadas (10 esferas) foram retiradas para análise de nitrogênio (N-NO_3) e pigmentos, respectivamente.

No primeiro conjunto de experimentos, cultivos em batelada foram realizados em duplicata durante 7 dias utilizando meio f/2 modificado com diferentes concentrações de NaNO_3 : 300, 400, 500 e 600 mg L^{-1} , correspondendo a 48, 64, 80 e 96 mg L^{-1} de N-NO_3 , respectivamente. As culturas foram suplementadas diariamente com 1 mL L^{-1} de solução de metais traço e 1 mL L^{-1} de solução de fosfato (CHAGAS et al., 2015).

Com base nos resultados, cultivos em batelada alimentada (FB) foram realizados adicionando nitrogênio em etapas durante o cultivo, de acordo com a Tabela 4-2. Um cultivo em batelada com concentração inicial de 96 mg L^{-1} de N-NO_3 foi utilizado como controle. Os cultivos em batelada e em batelada alimentada FB32, FB19,2 foram executadas por 7 dias e a cultura BF96 foi executada por 10 dias, quando atingiram a fase estacionária de crescimento.

Tabela 4-2 - Planejamento experimental do perfil de adição de nitrogênio durante o cultivo em batelada alimentada de *C. minutissima* imobilizada.

Cultivo	Adição de N-NO_3 (mg L^{-1}) durante o cultivo					N- NO_3 Total (mg L^{-1})
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	
Controle	96	0	0	0	0	96
FB19,2	19,2	19,2	19,2	19,2	19,2	96
FB32	32	0	32	0	32	96
FB96	96	0	96	0	96	288

Ao final do cultivo, as esferas foram removidas do fotobiorreator por filtração, lavadas com água destilada e dissolvidos em solução de citrato de sódio 3 % (30 g L^{-1}) com auxílio de um agitador magnético (20 min). A biomassa foi centrifugada (10.000 $\times g$, 5 min), lavada com água destilada, novamente centrifugada, congelada ($-70\text{ }^\circ\text{C}$), liofilizada, pesada e armazenada ($-22\text{ }^\circ\text{C}$) para posterior análise (proteínas, lipídios, ácidos graxos e carotenoides). As esferas foram observadas por microscopia óptica no início e ao final dos cultivos.

4.3 OPERAÇÕES DE SECAGEM DAS ESFERAS DE *C. minutissima*

Baseado nas melhores condições de cultivo obtida na Seção 4.2.2, realizou-se o estudo da secagem das esferas de *C. minutissima* imobilizada. Ao final do cultivo, as esferas foram retiradas do fotobiorreator por filtração, lavadas com água destilada e destinadas aos processos de secagem. Parte das esferas foi congelada e liofilizada para serem comparadas aos processos de secagem convectiva.

Os experimentos de secagem com *C. minutissima* imobilizada foram conduzidos em secador convectivo de bandeja (DS-600, DAS Dehydrators, SP, Brasil) (Figura 4-4b), com velocidade de ar constante ($1,25 \text{ m s}^{-1}$) e variando a temperatura do ar de secagem em 30, 40 e 50 °C. Aproximadamente 100 g de esferas foram colocadas em bandejas de aço inoxidável perfuradas ($0,0848 \text{ m}^2$) (Figura 4-4a). As secagens foram realizadas em triplicata.

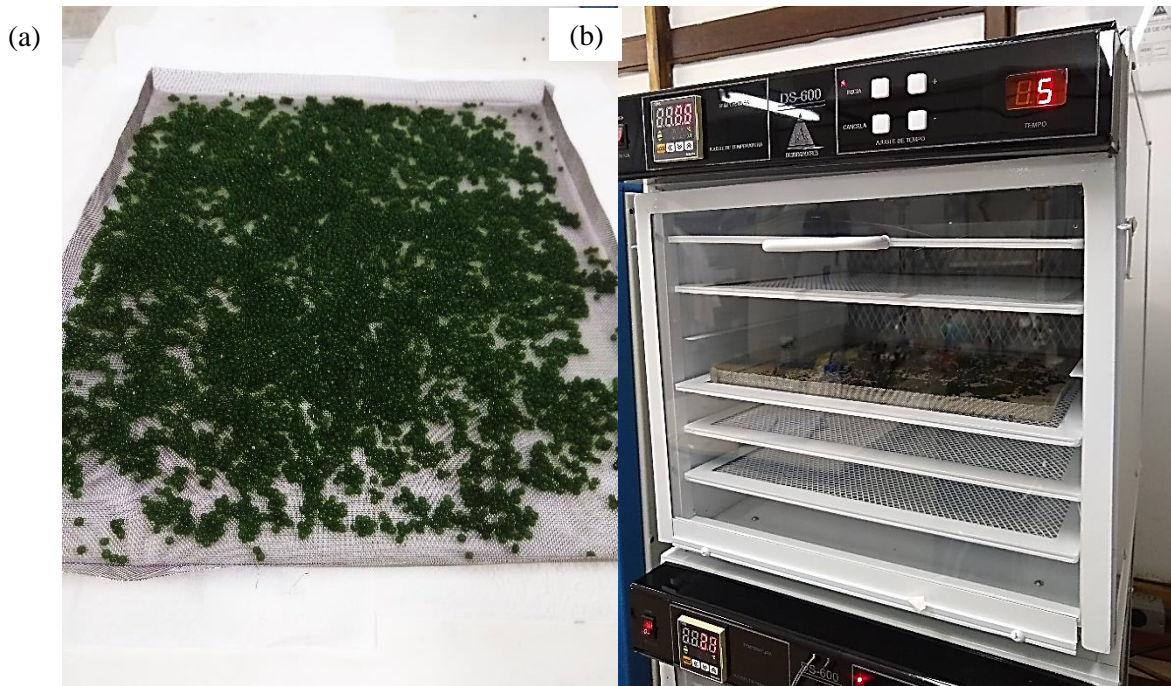


Figura 4-4 – Esferas de *C. minutissima* imobilizada dispostas sobre a bandeja (a) e secador de bandejas (b).

Os processos de secagem foram monitorados determinando-se a variação da massa das amostras ao longo do tempo em intervalos de 5 min, até a obtenção do peso constante. A cinética de secagem foi analisada pelas curvas de razão de umidade (adimensional) em função do tempo de secagem (Eq. 1) e da taxa de secagem em função do teor de umidade do material (base seca), para cada temperatura (IBARZ; BARBOSA-CANOVAS, 2003).

$$MR = \frac{X - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} \quad (1)$$

onde, MR é a razão de umidade adimensional; X é o teor de umidade no tempo t , X_0 é o teor de umidade inicial e X_{eq} é o teor de umidade de equilíbrio, obtido por regressão linear dos dados experimentais da taxa de secagem *versus* tempo ao final do processo. Todos os valores de umidade foram expressos em quilograma de água por quilograma de matéria seca (kg kg^{-1}).

A difusividade efetiva da água nas esferas foi calculada utilizando a equação de difusão de Fick (Eq. 2) aplicado a uma esfera (CRANK, 1975):

$$MR = \frac{6}{\pi^2} \exp\left(\frac{\pi^2 D_{eff} t}{r^2}\right) \quad (2)$$

onde D_{eff} é a difusividade efetiva da umidade ($m^2 s^{-1}$) e r é o raio da esfera(m).

Para avaliar a influência da temperatura no coeficiente de difusão efetivo, foi utilizada a equação de Arrhenius (Eq. 3), descrita a seguir:

$$D = D_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

onde D é a difusividade efetiva ($m^2 s^{-1}$), D_0 é o fator pré-exponencial, E_a é a energia de ativação ($kJ mol^{-1}$), R é a constante universal dos gases ($8.314 kJ kmol^{-1} K^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

Os coeficientes da expressão de Arrhenius foram obtidos a partir da linearização da Equação 3 com a aplicação do logaritmo natural (Eq. 4): A energia de ativação é determinada a partir da inclinação do gráfico de Arrhenius, $\ln D_{eff}$ vs. $1/T$.

$$\ln D_{eff} = \ln D_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4)$$

Ao final dos processos de secagem as microalgas imobilizadas desidratadas foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno e armazenadas ($-18^\circ C$) no escuro para posterior análise. O teor de umidade das esferas secas foi determinado de acordo com o protocolo AOAC (AOAC, 2000). A atividade de água (a_w) foi determinada através de um medidor portátil de atividade de água (HygroPalm, Rotronic, Bassersdorf, Suíça) à $20 \pm 1,5^\circ C$.

4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.4.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa (X) dos cultivos de células livres foi determinada diariamente em duplicata por espectrofotometria (750 nm), mediante a leitura da densidade

ótica das culturas e correlacionando com a massa seca de biomassa, através de uma curva de calibração (CHAGAS et al., 2015).

4.4.2 Determinação da concentração de clorofilas e carotenoides totais.

As concentrações de clorofilas totais ($a + b$) e carotenoides totais foram determinadas por espectrofotometria à 664, 649 e 470 nm, mediante extração com etanol P.A. 95 % ($v v^{-1}$), segundo a metodologia desenvolvida por Lichtenthaler et al. (2001). Para os cultivos de células livres, 2 mL de cultivo foram centrifugados ($10000 \times g$ por 5 min) e o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de etanol. Para os cultivos com célula imobilizada, 10 esferas foram dissolvidas em solução de citrato de sódio 3 % ($30 g L^{-1}$) sob agitação em agitador orbital (15 min) e centrifugadas ($10000 \times g$ por 5 min), ao precipitado adicionou-se 2 mL de etanol. Os extratos foram mantidos ao abrigo de luz por 12 h à 4 °C. O conteúdo total de clorofilas a , b e carotenoides ($mg L^{-1}$) foram calculados de acordo com as Equações 5, 6 e 7, respectivamente.

$$\text{Clorofila } a = 13,36 (A_{664}) - 5,19 (A_{649}) \quad (5)$$

$$\text{Clorofila } b = 27,43 (A_{649}) - 8,12 (A_{664}) \quad (6)$$

$$\text{Carotenoides totais} = 1000 (A_{470}) - 2,13 (Chl a) - 97,64 (Chl b)/209 \quad (7)$$

4.4.3 Identificação e quantificação dos carotenoides por HPLC-DAD-MS

Os carotenoides foram extraídos da biomassa liofilizada (20 mg) previamente macerada com óxido de alumínio (20 mg) (CERÓN-GARCÍA et al., 2018). A extração exaustiva foi realizada em tubos de vidro (15 mL) com acetato de etila (3 vezes) e metanol (2 vezes), seguido de agitação em vortex e de centrifugação ($3000 \times g$ por 5 min). O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo chato e seco em evaporador rotativo ($T < 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$). O extrato seco foi transferido para uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico (1:1), onde foi adicionado uma solução metanólica de KOH (10 %) para a saponificação por cerca de 16 h. O álcali foi removido por lavagem do extrato com água destilada, e o solvente foi evaporado num evaporador rotativo ($T < 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$). O extrato seco foi armazenado a $-22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro sob uma atmosfera de nitrogênio (MANDELLI et al., 2012). As extrações foram realizadas em duplicata.

O extrato seco saponificado foi dissolvido em uma mistura de MeOH/MTBE ($50:50 v v^{-1}$). A determinação dos carotenoides ocorreu em HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto,

Japão), conectado em série com um espectrômetro de massa (Esquire 4000, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com fonte de ionização APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

A separação dos carotenoides ocorreu em uma coluna C₃₀ YMC (5 µm, 250 mm × 4,6 mm) utilizando como fase móvel um gradiente linear de metanol/MTBE de 95:5 a 70:30 (v v⁻¹) durante 30 min, seguido de 50:50 (v v⁻¹) durante 20 min, e mantendo esta proporção por 15 min. A vazão foi 0,9 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna de 29 °C (RODRIGUES et al., 2014)

Os carotenoides foram quantificados por meio de uma curva analítica de seis pontos de all-*trans*-β-caroteno (1 a 15 mg L⁻¹). A curva foi linear (R² = 0,99, p <0,05), os limites de detecção e quantificação foram 1 mg L⁻¹ e 3,2 mg L⁻¹, respectivamente. Os resultados foram expressos em miligramas de all-*trans*-β-caroteno por grama de biomassa seca (mg g⁻¹).

O valor da vitamina A foi calculado de acordo com o fator de conversão NAS-IOM (NAS-IOM, 2001), em que 12 µg de all-*trans*-β-caroteno na dieta corresponde a 1 µg de atividade equivalente de retinol (RAE), a atividade utilizada foi de 100 % para all-*trans*-β-caroteno e os resultados foram expressos em µg de RAE g⁻¹. Para fornecer atividade da vitamina A, um carotenoide deve ter pelo menos um anel β-ionona não substituído ligado à cadeia de polienos e pelo menos 11 carbonos. Assim, os seguintes carotenoides foram considerados para calcular a atividade da vitamina A das microalgas: 15-*cis*-β-caroteno, all-*trans*-α-caroteno, 13-*cis*-β-caroteno, all-*trans*-β-caroteno e 9-*cis*-β-caroteno.

4.4.4 Determinação de nitrogênio (N-NO₃)

O consumo de nitrato no meio de cultivo foi determinado diariamente por espectrofotometria segundo metodologia proposta por Cataldo et al. (1975b), a partir da nitração do ácido salicílico (ácido 2-hidrobencóico) por íons NO₃⁻ que ocorre em pH alcalino formando o ácido 5-nitrossalicílico de coloração amarela (λ = 410 nm). Para tal, centrifugou-se 2 mL do meio de cultivo (10000 × g por 5 min) e uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante foi dispensada em Erlenmeyer (125 mL), adicionou-se 0,8 mL de solução de ácido salicílico (50 g L⁻¹ em H₂SO₄ concentrado), aguardou-se 20 min e adicionou-se 19 mL de NaOH 2 mol L⁻¹, em seguida foi realizada a leitura da absorbância. Os resultados foram convertidos em teores de nitrogênio (N-NO₃) (mg L⁻¹), utilizando uma curva analítica construída com NaNO₃.

4.4.5 Determinação de proteínas e lipídios

As proteínas foram extraídas da biomassa de acordo com o método proposto por Li et al. (2015a), com modificações. Para tal, foram adicionados 5 mL de água destilada à biomassa (25 mg) a fim de hidratá-la, e esta foi mantida *overnight* a 4 °C e posteriormente, centrifugada (3000 × g, 10 min). Ao *pellet* foram adicionados 5 mL de NaOH (1 mol L⁻¹), o extrato foi agitado em vortex e aquecido à 95 °C por 30 min, seguido de resfriamento até temperatura ambiente e centrifugação (3000 × g, 10 min). A partir deste extrato foi medido o teor de proteínas seguindo o método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina.

O teor de lipídios totais foi determinado gravimetricamente pelo método adaptado proposto por Kochert (1978) a partir de 100 mg de biomassa liofilizada macerada com 100 mg de óxido de alumínio. Pesou-se a biomassa em um tubo de vidro com tampa, adicionou-se 2 mL da solução de clorofórmio/metanol (2:1, v v⁻¹), agitou-se o tubo em vortex e centrifugou-se (4500 rpm por 4 min). O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em outro tubo. O procedimento foi repetido até obter uma biomassa branca. No tubo de coleta foram adicionados 3 mL de solução de cloreto de magnésio e 0,3 mL de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, agitou-se o tubo em vortex e centrifugou-se (4500 rpm por 4 min).

A parte inferior contendo o clorofórmio foi transferida para um Becker previamente seco e tarado. O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente por diferença da massa residual pela massa do Becker vazio em razão da massa inicial da amostra.

4.4.6 Identificação e quantificação de ácidos graxos

Para a determinação dos ácidos graxos, 3 mL da fração lipídica extraída da biomassa liofilizada (4.3.5) foram transferidos para um tubo de ensaio com tampa e secos em fluxo de nitrogênio. Aos tubos adicionou-se 1,5 mL de solução metanólica de NaOH (0,5 N), aqueceu-se em banho-maria em ebulição por 5 min e após resfriados adicionou-se 2 mL de solução de BF₃ 10 % em metanol, aqueceu-se novamente à 100 °C durante 30 min, sob atmosfera de N₂. Após o resfriamento da mistura, adicionou-se 2 mL de iso-octano aos tubos e 5 mL de solução saturada de NaCl, agitou-se manualmente por 30 s e após a separação das fases coletou-se 1 mL do iso-octano (contendo os ésteres metílicos) e transferiu-se para um vial. A amostra foi seca sob fluxo de N₂ e armazenado a -22 °C. Em todas as etapas da extração foi

adicionado N₂ ao tubo para remoção do oxigênio. (JOSEPH; ACKMAN, 1992). As extrações foram realizadas em duplicata.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram identificados por cromatografia gasosa (GC Model 2010, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipados com um amostrador e injetor automatizado, detector de ionização de chama (FDI) e coluna capilar de sílica fundida (SBL 100, Shimadzu, 30 m × 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 μm). O solvente das amostras foi o hexano e a temperatura do detector de ionização de chama (FID) foi 250 °C. A temperatura do forno foi fixada em 50 °C durante 1 min e aumentada para 200 °C em um gradiente de 25 °C min⁻¹, seguido de um gradiente de 3 °C min⁻¹ até atingir 230 °C.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com o método AOCS (1997). A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando o tempo de retenção com uma mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME-MIX 37, padrão Sigma®) previamente analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O padrão interno utilizado foi BHT (hidroxitolueno butilado).

4.4.7 Velocidade específica de crescimento

A partir das concentrações de biomassa (X , g L⁻¹) foram obtidas as concentrações máximas de biomassa ($X_{máx}$, g L⁻¹) dos cultivos e avaliada a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹), obtida pela regressão linear de $\ln X$ vs tempo durante a fase exponencial de crescimento da microalga. O tempo de duplicação (T_d , d) foi determinado durante a fase de crescimento exponencial para cada cultivo, através da equação $t_d = \ln 2 / \mu_{máx}$ (SCHMIDELL et al., 2001).

4.5 ESTABILIDADE DOS CAROTENOIDES DURANTE O ARMAZENAMENTO

A partir das melhores condições de secagem obtidos no item 4.4, avaliou-se a estabilidade dos carotenoides das esferas secas sob condições aceleradas de armazenamento. Os experimentos foram realizados em uma câmara à 40 °C, na presença (62 μmol m⁻² s⁻¹) e na ausência de luz, durante 14 e 30 dias, respectivamente. As esferas secas foram acondicionadas em sacos de polietileno e os pontos foram retirados em duplicatas.

O teor de carotenoides nas esferas secas, durante o armazenamento, foi determinado após as retiradas dos pontos. As esferas foram dissolvidas em citrato de sódio 3 % sob agitação,

centrifugadas ($10000 \times g$, 5 min), a biomassa foi lavada com água destilada, novamente centrifugada, congelada, liofilizada e armazenadas. O teor de carotenoides na biomassa foi avaliado de acordo com o método descrito em 4.4.3. A retenção dos carotenoides (R) durante o armazenamento foi calculada através da equação $R (\%) = C_t/C_0 \times 100 \%$, onde, C_t e C_0 são os teores de carotenoides nas esferas secas em um tempo específico t e no início do armazenamento, respectivamente.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para comparação entre médias com nível de significância (α) de 0.05.

INTRODUÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi dividido em duas partes escritas em quatro Capítulos (5, 6, 7 e 8). A primeira parte aborda aos experimentos com aplicação de radiação ultravioleta-B em cultivos de *Pseudoneochloris marina* (Capítulo 5) e *Chlorella minutissima* (Capítulo 6), a fim de avaliar seus efeitos na concentração de biomassa e na produção de compostos bioativos. No estudo preliminar realizado com *P. marina* foi possível observar o efeito da radiação UVB em uma cepa de microalga sem parede celular, servindo como referência para os estudos com *C. minutissima* (com parede). Os dados obtidos com *P. marina* foram publicados na forma de resumo expandido nos Anais do 6º Simpósio de Segurança Alimentar (SSA), em maio de 2018. O estudo com *C. minutissima* gerou o artigo científico intitulado “Effect of UVB radiation on the production of biomass, carotenoids, lipids and fatty acids in cultures of *Chlorella minutissima*” (Capítulo 6), o qual será submetido para publicação em revistas científicas da área.

A segunda parte do trabalho aborda os estudos com cultivos de *Chlorella minutissima* imobilizada (Capítulos 7 e 8). O Capítulo 7 apresenta os resultados dos efeitos da concentração de nitrogênio e do perfil de adição do mesmo no crescimento e na produção de compostos bioativos por *C. minutissima*. Esta etapa foi escrita na forma de artigo científico, intitulado “Potential of immobilized *Chlorella minutissima* for the production of biomass, proteins, carotenoids and fatty acids”, o qual foi publicado na revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

O Capítulo 8 foi desenvolvido a partir das melhores condições avaliadas no Capítulo 7. Neste tópico foi avaliado a estabilidade dos carotenoides durante a secagem e armazenamento das esferas de alginato de *C. minutissima*, gerando o artigo intitulado “Effects of drying processes and storage on carotenoids stability of *Chlorella minutissima* immobilized in alginate beads”, o qual será submetido para publicação em revistas científicas da área. Ao final, estão incluídos apêndices relevantes para a complementação do trabalho

5 EFEITO DA RADIAÇÃO UVB EM CULTIVOS DE *Pseudoneochloris marina*

5.1 EFEITO DA RADIAÇÃO UVB NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE *Pseudoneochloris marina*

Na primeira parte deste experimento avaliou-se o efeito de diferentes tempos de exposição de radiação UVB em cultivos de *Pseudoneochloris marina*, na produção de biomassa, macromoléculas e pigmentos. O cultivo controle e com aplicação de UVB durante 2 h d⁻¹ e 4 h d⁻¹ apresentaram fase exponencial de crescimento entre o 1° e o 5° d, com tendência a estabilização após esse período (Fig. 5-1). Já quando exposto à UVB durante 6 h d⁻¹ houve tendência a fase de morte celular ao final do cultivo (após 7° d).

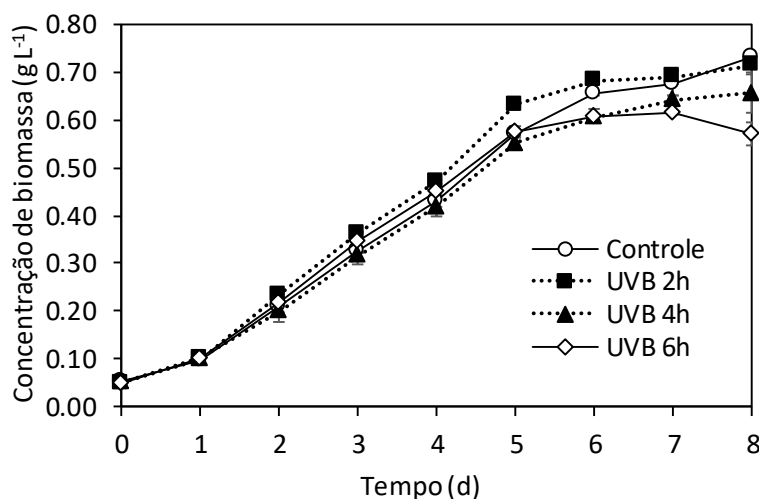


Figura 5-1 - Cinética de crescimento celular de *P. marina* submetida à diferentes tratamentos com UVB.

Os cultivos com exposição à UVB durante 2 h d⁻¹ e 4 h d⁻¹ não apresentaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) na concentração de biomassa em relação ao cultivo controle, no entanto a exposição de 6 h d⁻¹ demonstrou ser prejudicial ao crescimento celular, obtendo $X_{\text{máx}}$ ($0,61 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$) no sétimo dia de cultivo, enquanto que o cultivo controle ($0,73 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) e as condições UVB 2h ($0,71 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) e UVB 4h ($0,66 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$), apresentaram $X_{\text{máx}}$ no oitavo dia de cultivo (Tabela 5-1). Gonçalves et al. (2019) cultivarem *P. marina* sob diferentes níveis de temperatura (20 – 28 °C) e intensidade de luz ($140 - 364 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e obtiveram concentrações de biomassa variando entre 0,70 – 1,80 g L⁻¹.

O efeito inibitório na concentração de biomassa observado com o tratamento de 6 h d⁻¹ pode se dar pela diminuição da concentração de clorofilas totais na célula, a qual foi reduzida em 14,3 % em relação ao cultivo controle (10,64 ± 0,35 mg g⁻¹), prejudicando o processo da fotossíntese pela célula (Tabela 5-1).

A radiação UVB não afetou significativamente a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) dos cultivos quando comparados ao cultivo controle, com valores variando entre 0,69 e 0,71 d⁻¹ (Tabela 5-1).

Tabela 5-1 - Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e teor de clorofilas em *P. marina* submetida à diferentes tratamentos com UVB.

Parâmetros	Controle	UVB 2h	UVB 4h	UVB 6h
$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	0,73 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,04 ^a	0,61 ± 0,00 ^b
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,69 ± 0,02 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,02 ^a	0,70 ± 0,01 ^a
Clorofilas totais (mg g ⁻¹)	10,64 ± 0,35 ^a	10,62 ± 0,31 ^a	9,54 ± 0,19 ^b	9,12 ± 0,44 ^b

Letras iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os tratamentos com UVB não demonstraram afetar significativamente ($p \leq 0,05$) o teor de proteínas na biomassa de *P. marina*, variando entre 169 mg g⁻¹ e 179 mg g⁻¹ (Fig. 5-2). No entanto, quando aplicado durante 6 h d⁻¹ houve redução de 18,6 % no teor de lipídios em relação ao cultivo controle (76,0 ± 4,2 mg g⁻¹) (Fig. 5-2). Gonçalves et al. (2019) ao cultivarem *P. marina* sob diferentes níveis de temperatura (20 – 28 °C) e intensidade de luz (140 - 364 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 7 dias, obtiveram teores de proteínas variando entre 100 - 236 mg g⁻¹, enquanto o teor de lipídios variou entre 97 e 132 mg g⁻¹.

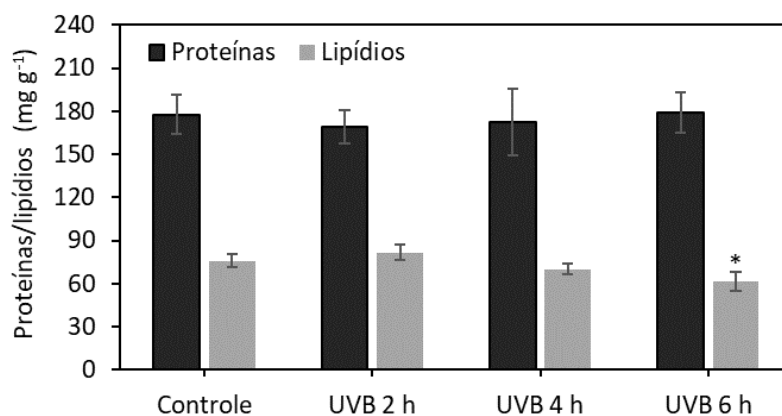


Figura 5-2 - Teor de proteínas (mg g⁻¹) e lipídios (mg g⁻¹) da biomassa de *P. marina* cultivada sob diferentes tratamentos UVB. (*): Respostas diferentes em relação ao cultivo controle a 95% de confiança pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os efeitos da radiação UVB sobre as células podem ser influenciados por fatores como, irradiância, tempo de exposição à UVB, o tipo e o estado fisiológico da célula. Dependendo destes fatores, a radiação UVB pode provocar estresse oxidativo nas microalgas através da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (WANG et al., 2009; BALAN; SURAIISKUMAR, 2014). A exposição prolongada à radiação UVB no presente estudo pode ter levado ao aumento do estresse celular, o que explicaria a redução no teor de lipídios (UVB 6 h), através de uma oxidação lipídica.

Zeeshan e Prasad (2009) cultivaram *Nostoc muscorum* e *Plectonema boryanum* sob diferentes tempos de exposição à UVB ($0,4 \text{ W m}^{-2}$, 15 – 60 min). Os autores observaram que a radiação UVB induziu a formação de malondialdeído (MDA), indicando peroxidação lipídica na célula. Os teores de MDA aumentaram com o tempo da exposição à UVB, obtendo após 60 min de exposição teores de MDA 22 % (*N. muscorum*) e 15 % (*P. boryanum*) maiores que os cultivos controle (sem aplicação de UVB).

De acordo com o perfil de carotenoides da biomassa de *P. marina* (Tabela 5-2), os carotenoides majoritários nesta cepa foram all-*trans*-luteína, seguido de all-*trans*- β -caroteno e all-*trans*- α -caroteno, totalizando em torno de 66 % dos carotenoides. A exposição à UVB durante 6 h d^{-1} reduziu em 26,4 % o conteúdo de all-*trans*-luteína ($1,17 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1}$), e em 28,8 % o conteúdo total de carotenoides ($3,26 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$), em relação ao cultivo controle.

Tabela 5-2 - Conteúdo de carotenoides (mg g^{-1}) da biomassa de *P. marina* cultivada sob diferentes tratamentos com UVB.

Carotenoides	Controle	UVB 2h	UVB 4h	UVB 6h
all- <i>trans</i> -Violaxantina	$0,33 \pm 0,07^{ab}$	$0,46 \pm 0,05^a$	$0,20 \pm 0,04^b$	$0,26 \pm 0,03^b$
<i>cis</i> -Violaxantina	$0,21 \pm 0,02^a$	$0,23 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,04^a$
all- <i>trans</i> -Luteoxantina	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,04 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,01^a$
13- <i>cis</i> -Luteína	$0,18 \pm 0,03^{ab}$	$0,21 \pm 0,02^a$	$0,16 \pm 0,02^a$	$0,13 \pm 0,02^b$
13'- <i>cis</i> -Luteína	$0,03 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,00^a$
all- <i>trans</i> -Luteína	$1,59 \pm 0,27^a$	$1,82 \pm 0,20^a$	$1,38 \pm 0,21^{ab}$	$1,17 \pm 0,02^b$
all- <i>trans</i> -Zeaxantina	$0,17 \pm 0,04^a$	$0,17 \pm 0,02^a$	$0,11 \pm 0,03^a$	$0,11 \pm 0,05^a$
15- <i>cis</i> - β -Caroteno	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,04 \pm 0,00^a$	$0,04 \pm 0,00^a$
all- <i>trans</i> - α -Caroteno	$0,53 \pm 0,04^{ab}$	$0,55 \pm 0,03^a$	$0,43 \pm 0,04^{ab}$	$0,39 \pm 0,08^b$
13- <i>cis</i> - β -Caroteno	$0,18 \pm 0,01^{ab}$	$0,18 \pm 0,01^{ab}$	$0,13 \pm 0,01^b$	$0,13 \pm 0,03^{ab}$
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	$0,63 \pm 0,05^a$	$0,64 \pm 0,04^a$	$0,54 \pm 0,03^a$	$0,55 \pm 0,04^a$
9- <i>cis</i> - β -Caroteno	$0,28 \pm 0,02^a$	$0,27 \pm 0,01^{ab}$	$0,22 \pm 0,02^b$	$0,24 \pm 0,01^{ab}$
Total	$4,20 \pm 0,43^{ab}$	$4,65 \pm 0,39^a$	$3,45 \pm 0,33^{bc}$	$3,26 \pm 0,34^c$

Letras iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Assim como ocorreu com os lipídios, um possível estresse celular provocado pela exposição prolongada à radiação UVB explicaria a diminuição dos carotenoides no tratamento com 6 h d⁻¹. Os lipídios, juntamente com os complexos pigmentos-proteínas (fotossistemas), são alguns dos alvos atacados pelas EROs em altas concentrações (BHANDARI; SHARMA, 2011).

A *all-trans*-luteína atua como desativador de radicais livres e EROs (HU et al., 2008), além disso, é capaz diminuir a peroxidação lipídica induzida por UVB (CHITCHUMROONCHOKCHAI et al., 2004). Sua capacidade protetora explicaria a redução de *all-trans*-luteína no tratamento com 6 h d⁻¹.

O equilíbrio das EROs intracelulares depende tanto da sua produção dentro das células durante o metabolismo, quanto da sua remoção pelo sistema de defesa antioxidante, o qual inclui antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e peroxidase) e não enzimáticos (carotenoides, glutatona, vitaminas E e C) (GAMMONE; RICCIONI; D'ORAZIO, 2015). Assim, antioxidantes não enzimáticos, tais como os carotenoides, e sua capacidade de inibir a formação de radicais livres, são importantes para proteger as células da radiação UVB.

Em resumo, a aplicação de radiação UVB de 10 W m⁻² durante 6 h d⁻¹ em cultivos de *P. marina* teve efeito inibitório na concentração de biomassa, lipídios e pigmentos, enquanto que exposições mais curtas não apresentaram efeito significativo. O estresse salino proporcionado pela adição de NaCl ao meio de cultivo e a ausência de parede celular na cepa de *P. marina*, são outros fatores que podem ter contribuído para os efeitos deletérios encontrado neste estudo. A parede celular, além de ter função estrutural nas microalgas, é capaz de ligar íons metálicos em locais com carga negativa (MACFIE; WELBOURN, 2000). Espécies do tipo *Chlorella* são conhecidas por serem resistentes a condições de estresse, além de apresentarem parede celular espessa (SYDNEY et al., 2018). Com isso, buscou-se avaliar a influência da radiação UVB em cultivos de *Chlorella minutissima*.

7 ARTIGO 2 - EFFECT OF NITROGEN CONCENTRATION AND FED-BATCH CULTURE ON PIGMENTS, LIPIDS AND PROTEINS PRODUCTION BY IMMOBILIZED *Chlorella minutissima*



<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101601>

POTENTIAL OF IMMOBILIZED *Chlorella minutissima* FOR THE PRODUCTION OF BIOMASS, PROTEINS, CAROTENOIDS AND FATTY ACIDS

Lenon Medeiros Bauer^a, Eliseu Rodrigues^a, Rosane Rech^a

^aInstitute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author: rrech@ufrgs.br

Highlights

- The autotrophic growth of *C. minutissima* immobilized in Ca-alginate was evaluated.
- High nitrogen stimulated carotenoids, chlorophylls, protein and lipids biosynthesis.
- Profile of nitrogen addition did not affect biomass growth and composition.
- Lutein was the major carotenoid identified in immobilized *C. minutissima* biomass.
- Linoleic acid and α -linolenic acid were the main PUFAs identified in the biomass.

ABSTRACT

This work investigated the potential of *Chlorella minutissima* immobilized in alginate beads for biomass and bioactive compounds production. The effects of nitrogen concentration in the culture medium (48 to 96 mg L⁻¹ N-NO₃) and the nitrogen addition profile during fed-batch culture were evaluated. In batch cultures, the initial nitrogen concentration of 96 mg L⁻¹ N-NO₃ produced the highest chlorophyll and protein contents in biomass, about 2.8 and 1.5-fold higher than the control (48 mg L⁻¹ N-NO₃), respectively. The biomass concentration (1.65 ± 0.01 g L⁻¹) and carotenoid content (11.0 ± 0.8 mg g⁻¹) were 21.3 % and 32.6 % higher than the control (48 mg L⁻¹ N-NO₃), but similar to the other nitrogen concentrations tested (64 and 80 mg L⁻¹ N-NO₃). Fed-batch cultures were performed in order to optimize the productivity of immobilized *C. minutissima*. The fed-batch culture with three additions of 96 mg L⁻¹ of N-NO₃ resulted in

the highest biomass concentration ($2.13 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$) and an increase in chlorophylls (1.7-fold), carotenoids (1.3-fold) and proteins (1.6-fold) content in biomass compared to batch culture. The contents of all-*trans*-lutein and polyunsaturated fatty acids were $5.31 \pm 0.46 \text{ mg g}^{-1}$ (dry cell weight) and $52.0 \pm 0.9 \%$ of total fatty acids, respectively, similar or higher than free cell cultures. The culture of immobilized *C. minutissima* cells showed to be a promising technique towards decreasing microalgae production costs. Through fed-batch cultures, it was possible to increase the production of biomass and compounds of biotechnological interest.

Keywords: alginate; fatty acids; immobilization; lutein; microalga; pigments;

7.1 INTRODUCTION

Microalgae are photosynthetic organisms capable of providing a biomass rich in bioactive compounds, such as essential fatty acids, carotenoids, chlorophylls, vitamins, and a range of high biotechnological and value-added compounds (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Due to their rich composition, microalgae have been exploited by the chemical, pharmaceutical, food and energy industries (VIGANI et al., 2015; BASHIR et al., 2016; SANTOS et al., 2016; LUCAS et al., 2018).

During microalgae production, biomass harvesting can represent 20 to 30 % of the total production cost, depending on factors such as species, cell concentration, and growing conditions; so it is mandatory to look for alternative technologies aiming to lower harvesting costs of microalgae production processes (DASSEY; THEEGALA, 2013; SINGH; PATIDAR, 2018). Compared to free cells, immobilized cells are harvested easily by simple filtration with low energy consumption (LAM; LEE, 2012). Equating the raw material costs for cell immobilization and the energy costs for harvesting free cells by centrifugation, the use of immobilized cells reduced up to 90 % of the total cost, making this technique economically attractive for microalgae cultivation (DASSEY; THEEGALA, 2013; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017). Moreover, the exposure of microalgae to high gravitational and shear forces during centrifugation can damage the cell structure, with negative impacts on the recovery of high-value intracellular compounds (HARUN et al., 2010).

The most common method for cell immobilization is entrapment in calcium alginate beads, which is a non-toxic and high-transparency polymer, thus ideal for microalgae cultures (LAM; LEE, 2012). Alginate is a natural polysaccharide extracted from brown-algae cell wall and is widely used as a food additive (PESO-ECHARRI et al., 2012). During cultivation, it

protects the cells from shear forces and avoids shading caused by cellular incrustations on the inner surfaces of the photobioreactors (KOURKOUTAS et al., 2004). In addition, immobilization on alginate beads allows microalgae cells to be stored for long periods of time without losing their viability (CHEN, 2001); the microalgae-alginate beads can be further used for the preparation of foods with high nutritional value, as well as in animal feed.

Most microalgae immobilization studies have focused on the removal of nutrients and contaminants from residual waters (DE LLASERA et al., 2017; PILTZ; MELKONIAN, 2018), but only a few studies have used this technique for bioactive compounds production (TRIPATHI; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017). Studies have shown that the biomass production of immobilized microalgae, as well as bioactive compounds synthesis, are similar or higher in immobilized cell cultures (TRIPATHI; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017; SOO et al., 2017; SRINUANPAN et al., 2019). However, there is a lack of studies aiming to understand and optimize immobilized microalgae cultures.

This work studied the culture of *Chlorella minutissima* cells immobilized in alginate beads grown in flat-plate airlift photobioreactors. Batch and fed-batch cultures were performed to evaluate the influence of nitrogen on biomass production and on pigments, proteins and lipids biosynthesis.

7.2 MATERIAL AND METHODS

7.2.1 Microorganism e culture medium

The microalgae *Chlorella minutissima* BE001 was obtained from the culture collection of the Department of Marine Biology at Fluminense Federal University (Niteroi, Brazil). The stock-culture was maintained at 20 °C and 5.2 klx ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under a 12/12 h photoperiod (light/dark) in f/2 medium (GUILLARD, 1975) modified by Gonçalves et al. (2019). The microalgae pre-cultures for the different cultivations were prepared by adding 10 % (v/v) of microalgae stock-culture in modified f/2 medium. The flasks were incubated on a rotary shaker at 28 °C and 5.8 klx ($78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continuous illumination for 7 days

7.2.2 Immobilization of *C. minutissima* on alginate beads

The microalga was immobilized on alginate gel beads according to the modified procedure of Moreira et al. (2006), with a change in concentration of sodium alginate: 4 % alginate-microalgae solution was obtained by mixing equal volumes of microalga inoculum and sodium alginate solution 8 % (80 g L^{-1}). The solution was dropped into CaCl_2 solution (40 g L^{-1}) under agitation to form the calcium alginate beads (approximate diameter of 3 mm) using a peristaltic pump. After 1-h stabilization in the CaCl_2 solution, the beads were washed with sterile distilled water and transferred to the photobioreactors (PBRs).

7.2.3 Culture of immobilized *C. minutissima* in airlift photobioreactor

The cultures of immobilized *C. minutissima* cells were performed in flat-plate airlift photobioreactors (KOCHEM et al., 2014) filled with 525 mL of beads and 1575 mL of culture medium. The photobioreactors were continuously illuminated ($18.0 \text{ klx} / 245 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at the riser side, the airflow rate was kept at 1 L min^{-1} of air-enriched CO_2 (1 % volume fraction), and the temperature was $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Samples of the culture medium (2 mL) and immobilized cells (10 beads) were taken for analysis of nitrogen (N-NO_3) and pigments.

In the first set of experiments, batch cultures were performed in duplicate using f/2 medium modified with different concentrations of NaNO_3 : 300, 400, 500 and 600 mg L^{-1} , corresponding to 48, 64, 80 and 96 mg L^{-1} of N-NO_3 , respectively. The cultures were supplemented daily with 1 mL L^{-1} of a trace-metals solution and 1 mL L^{-1} of phosphate solution (CHAGAS et al., 2015) and run for 7 days.

Based on the results, a set of fed-batch (FB) cultures was performed by adding nitrogen in steps during the culture, according to Table 7-1. A batch culture with an initial N-NO_3 concentration of 96 mg L^{-1} was included as a control. The batch and the fed-batch BF32, BF19.2 cultures were run for 7 days and the BF96 culture was run for 10 days.

Table 7-1 - Experimental planning for nitrogen addition profile during fed-batch cultivation of immobilized *C. minutissima*. FB means fed-batch and the number represents the N-NO₃ concentration added each time.

Culture	N-NO ₃ added (mg L ⁻¹) at each day of culture					Total N-NO ₃ (mg L ⁻¹)
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Batch (Control)	96	0	0	0	0	96
FB19.2	19.2	19.2	19.2	19.2	19.2	96
FB32	32	0	32	0	32	96
FB96	96	0	96	0	96	288

All cultures were done in duplicate. At the end of the culture period, the beads were removed from the photobioreactor by filtration, washed with distilled water, and dissolved in 30 g L⁻¹ sodium citrate. The biomass was centrifuged (10000 × g, 10 min), frozen (-70 °C), lyophilized, weighed and stored for further analysis (proteins, lipids, fatty acids and carotenoids). The beads were observed by optical microscopy at the beginning and the end of the culture.

7.2.4 Determination of nitrate and pigment concentration along the culture

The nitrate concentration was determined in the culture medium by the nitro-salicylic acid method (CATALDO et al., 1975b) and correlated to a standard curve. The results were expressed in milligrams of nitrogen (N-NO₃) per liter of culture medium (mg L⁻¹).

The pigments (chlorophylls and total carotenoids) were analyzed daily in the biomass. Ten beads were dissolved in 2 mL 3 % sodium citrate solution (30 g L⁻¹) in an orbital shaker for 15 min and centrifuged (10000 × g, 10 min) (MOREIRA et al., 2006). The total chlorophylls (Chl *a* + Chl *b*) and total carotenoids were extracted from the biomass pellet with 2 mL ethanol 95 % (overnight, 4 °C, dark). The samples were centrifuged and the pigments were quantified by spectrophotometry at 664 nm (*A*₆₆₄), 649 nm (*A*₆₄₉) and 470 nm (*A*₄₇₀) (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). The results were expressed in mass of pigment per volume of culture medium (mg L⁻¹). The analyses were done in duplicate.

7.2.5 Determination of total soluble protein

The protein was extracted from the lyophilized biomass according to Li et al. (2015a) with modifications in the volumes of the solutions. The lyophilized biomass was

hydrated with 5 mL distilled water (overnight, $T < 5$ °C) and centrifuged ($3000 \times g$, 10 min, 10 °C). Five milliliters NaOH solution (1 M) were added to the pellet, mixed in a vortex, and heated at 95 °C for 30 min. The samples were cooled to room temperature and centrifuged ($3000 \times g$, 10 min). The supernatant was used for protein measurement by the Lowry method (LOWRY et al., 1951), using bovine serum albumin as standard. Both the extraction and the analyses were done in duplicate.

7.2.6 Carotenoids identification

The carotenoids were exhaustively extracted from 20 mg lyophilized biomass following the procedure described by Cerón-García et al. (2018). The carotenoids were analyzed by HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with binary pump (model LC-20AD) and an online degasser connected in series with a diode array detector (DAD) with an iron trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source (Bruker Daltonics, Esquire model 6000, Bremen, Germany). All experimental conditions of the HPLC-DAD-MS system were the same previously reported (RODRIGUES et al., 2014).

The carotenoids were quantified using a six-point analytical curve all-*trans*- β -carotene (1 to 15 mg L⁻¹). The curve was linear ($R^2 = 0.99$, $p < 0.05$), the limit of detection was 1 mg L⁻¹, and the limit of quantification was 3.2 mg L⁻¹. The results were expressed in milligrams of all-*trans*- β -carotene per gram of dry biomass (mg g⁻¹). Both the extractions and the analyses were done in duplicate.

7.2.7 Analysis of lipids and fatty acid methyl esters (FAMES)

The lipids were extracted from 100 mg lyophilized biomass by the method described by Bligh and Dyer (1959). The fatty acids were analyzed following the method of Joseph and Ackman (1992). The identification was performed by gas chromatography (GC Model 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with automated sampler and injector, flame ionization detector, and fused silica capillary column (SBL 100, Shimadzu, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness). The chromatographic conditions were the same reported previously (GONÇALVES; MENEGOL; RECH, 2019). Both the extractions and the analyses were done in duplicate.

7.2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software Statistica[®] (12.0, Statsoft Inc., Tulsa, USA). Statistical significance was determined by ANOVA and Tukey tests with a significance level of 0.05.

7.3 RESULTS AND DISCUSSION

7.3.1 Effect of nitrogen on biomass concentration and composition

The results indicate an increase in total chlorophylls and carotenoids concentration in the culture medium with the increase of the initial nitrogen concentration until the fourth day of cultivation; after this period, the chlorophylls concentration showed a slight decrease, and carotenoids concentration stabilized (Fig. 7-1). The highest chlorophyll concentration ($160 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$) was observed in the fourth day of cultivation for the highest initial nitrogen concentration ($96 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$), being 2.7-fold higher than the chlorophyll concentration of the control culture ($48 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$) (Fig. 7-1a, $p = 0.0008$). The maximum carotenoids concentration ($68 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$) in this condition occurred on the seventh day, about 2.3-fold higher than the control culture (Fig. 7-1b, $p = 0.0017$).

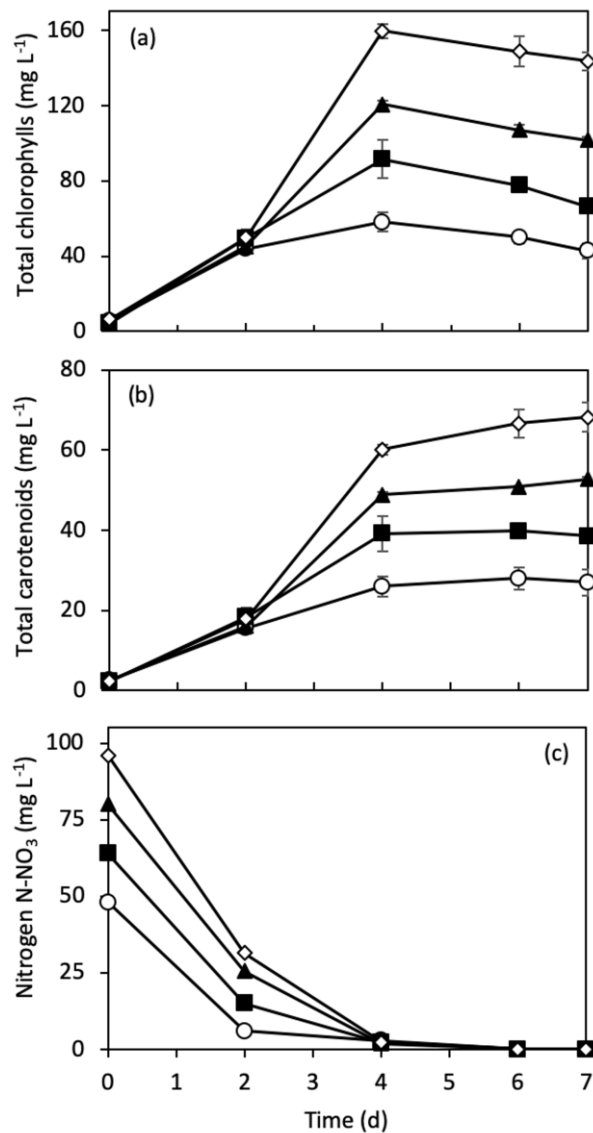


Figure 7-1- Effect of nitrogen concentration on the kinetics of total chlorophylls (a) and total carotenoids (b) in cultures of *C. minutissima* immobilized on alginate beads in FBR air-lift.

(c). Nitrogen consumption by immobilized *C. minutissima* under different nitrogen concentrations in FBR air-lift. (○) 48 mg L⁻¹ N-NO₃ (■) 64 mg L⁻¹ N-NO₃ (▲) 80 mg L⁻¹ N-NO₃ (◇) 96 mg L⁻¹ N-NO₃.

The chlorophylls content in biomass increased with initial nitrogen concentration. Nitrogen starvation directly affects chlorophyll production, and, consequently, its intracellular content in microalgae cells (LI et al., 2008a; RIAL et al., 2013). The lack of nutrients reduces photosynthetic rate, respiration rate, and photochemistry efficiency, in addition to damaging the photosystem II (PSII) (ZHANG et al., 2013).

The chlorophylls content is an indicator of the photosynthesis rate, which directly influences microalgae productivity (CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017). The

significant increase with time in chlorophyll content during the cultivation indicates that immobilized *C. minutissima* showed excellent development, being limited only by nitrogen deprivation in the medium (Fig. 7-1a and c). Studies with immobilized microalgae have demonstrated that they present photosynthetic and growth responses similar or superior to free-cell cultures (ROBINSON et al., 1986; SOO et al., 2017; SRINUANPAN et al., 2019).

According to the microscopy image, on the seventh day of cultivation it is possible to observe *C. minutissima* colonies of different sizes distributed both on the surface and inside the alginate beads (Fig. 7-2), suggesting that microalga growth is not being limited by the diffusion of nutrients and CO₂, or by light availability in the beads. The diffusion limitations imposed by the matrix porosity and the biomass accumulation can have a negative impact on cell growth. Additionally, it is essential that the matrix possesses light permeability for cultures of photosynthetic microorganisms (GARBAYO et al., 2003; KOURKOUTAS et al., 2004). The alginate matrix is clear and highly porous, allowing easy diffusion of CO₂ and simple inorganic ions, such as nitrate and phosphate, making them available for cells both on the surface and inside the beads (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

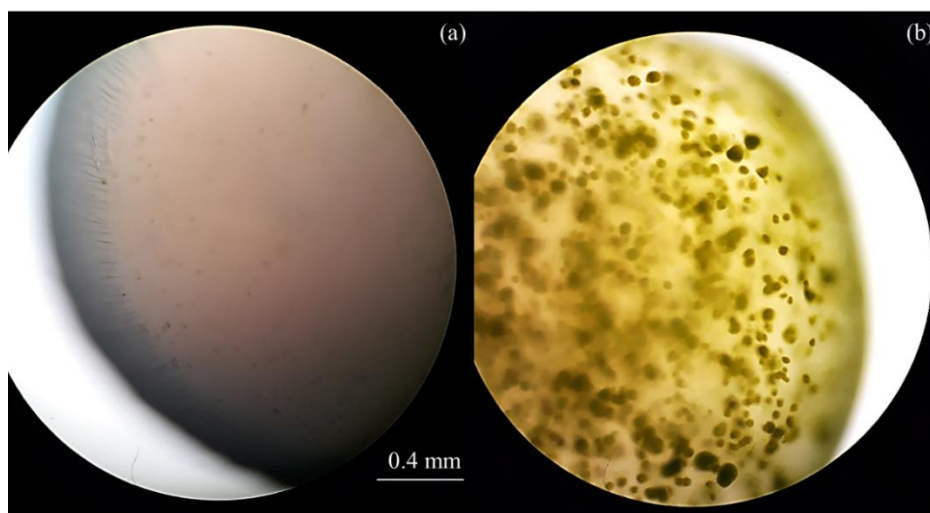


Figure 7-2 - Microscopic images (10 ×) of the surfaces of the alginate beads containing *C. minutissima* at the start of the control batch cultivation (a) and at day 7 (b).

The highest initial nitrogen concentration (96 mg L⁻¹ N-NO₃) stimulated in 21.3 % the final biomass concentration (1.65 ± 0.08 g L⁻¹) compared with the control culture (Table 7-2). Also, there was an increase in the content of chlorophylls (176 %) and lipids (19 %) in the final biomass. This increase in biomass concentration may be due to the higher chlorophylls content, making light absorption more efficient, which can assist in cell growth (SMALL;

HÜNER; WAN, 2012). There was no significant difference in the final biomass concentration and lipid content for initial nitrogen concentrations higher than 64 mg L⁻¹; however, there was a proportional rise in the content of chlorophylls and proteins with the increase of the initial nitrogen concentration. The protein content in the biomass increased by 1.1 (64 mg L⁻¹ N-NO₃), 1.3 (80 mg L⁻¹ N-NO₃), and 1.6-fold (96 mg L⁻¹ N-NO₃) compared with the control culture (112 ± 5 mg g⁻¹), resulting in protein enrichment of the *C. minutissima* biomass (Table 7-2). Microalgae tend to synthesize more proteins when the culture medium is rich in nitrogen (CAI; PARK; LI, 2013).

Table 7-2 - Effect of different initial nitrogen concentration on biomass concentration and on chlorophylls, lipids and proteins content in biomass during batch cultures of *C. minutissima* immobilized in alginate beads.

Initial Nitrogen Concentration (mg L ⁻¹ N-NO ₃)	Final Biomass Concentration (g L ⁻¹)	Final Biomass Composition (mg g ⁻¹)		
		Chlorophylls	Lipids	Protein
48	1.36 ± 0.01 ^b	8.5 ± 0.8 ^d	112 ± 5 ^b	119 ± 2 ^d
64	1.55 ± 0.00 ^{ab}	11.6 ± 0.1 ^c	122 ± 1 ^{ab}	126 ± 1 ^c
80	1.59 ± 0.02 ^{ab}	17.3 ± 0.3 ^b	123 ± 9 ^{ab}	151 ± 1 ^b
96	1.65 ± 0.08 ^a	23.6 ± 0.8 ^a	134 ± 7 ^a	178 ± 7 ^a

Results represent the mean values ± standard deviation of two independent runs.

Different letters in the same column mean a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

C. minutissima free cells cultured in BMM medium (40 mg L⁻¹ N) showed a protein content of 134 mg g⁻¹ (FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017), similar to the protein content in the lowest level of nitrogen in this study. In another report, *C. minutissima* free cells presented an increase in the concentrations of biomass, proteins, and chlorophylls at higher concentrations of nitrogen (AREMU et al., 2015). These observations are similar to those found for immobilized cell cultures in the present study, demonstrating that the metabolic behavior of the cells is maintained with the immobilization technique. Microalgae accumulate intracellular nitrogen in the form of several compounds (amino acids, proteins, RNA, and pigments). These compounds serve as a nitrogen reservoir in the long term, and the decrease in intracellular protein content is usually a result of the lack of an external source of nitrogen (DORTCH et al., 1984). The lipids content reported in this work (112 to 134 mg g⁻¹) are also similar to the ones

reported for *C. minutissima* free cells cultured in BG 11 medium (10 % lipids) (JENA et al., 2011).

Twelve carotenoids were identified in *C. minutissima* biomass (Table 7-3). All-*trans*-lutein was the major one, followed by all-*trans*-zeaxanthin, all-*trans*- β -carotene, and all-*trans*- α -carotene. Together they represent approximately 76 % (mass fraction) of the total carotenoid content. The highest carotenoid content ($11.0 \pm 0.8 \text{ mg g}^{-1}$) was achieved at the highest initial nitrogen concentration (96 mg L^{-1} of N-NO₃), 1.3-fold higher than the control condition (48 mg L^{-1} of N-NO₃).

Table 7-3 - Carotenoids profile of immobilized *C. minutissima* cultivated under different nitrogen concentrations.

Carotenoids (mg g ⁻¹)	Initial Nitrogen Concentration (mg L ⁻¹ N-NO ₃)			
	48	64	80	96
all- <i>trans</i> -violaxanthin	0.19 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.05 ^a	0.25 ± 0.01 ^a	0.28 ± 0.06 ^a
<i>cis</i> -violaxanthin	0.34 ± 0.05 ^b	0.43 ± 0.02 ^b	0.58 ± 0.03 ^a	0.69 ± 0.08 ^a
13- <i>cis</i> -lutein	0.35 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.07 ^b	0.25 ± 0.01 ^b	0.22 ± 0.02 ^b
13'- <i>cis</i> -lutein	0.09 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
all- <i>trans</i> -lutein	2.91 ± 0.16 ^c	3.40 ± 0.20 ^{bc}	3.97 ± 0.29 ^{ab}	4.15 ± 0.46 ^a
all- <i>trans</i> -zeaxanthin	1.17 ± 0.06 ^c	1.39 ± 0.14 ^{bc}	1.50 ± 0.12 ^{ab}	1.74 ± 0.18 ^a
<i>cis</i> -zeaxanthin	0.08 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.02 ^{ab}	0.06 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.00 ^b
15- <i>cis</i> - β -carotene	0.11 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
all- <i>trans</i> - α -carotene	0.79 ± 0.04 ^b	0.83 ± 0.05 ^{ba}	0.97 ± 0.08 ^a	1.00 ± 0.10 ^a
13- <i>cis</i> - β -carotene	0.35 ± 0.02 ^b	0.39 ± 0.02 ^b	0.47 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.03 ^a
all- <i>trans</i> - β -carotene	1.25 ± 0.07 ^b	1.33 ± 0.06 ^{ba}	1.51 ± 0.11 ^a	1.57 ± 0.16 ^a
9- <i>cis</i> - β -carotene	0.68 ± 0.03 ^a	0.68 ± 0.05 ^a	0.70 ± 0.03 ^a	0.62 ± 0.07 ^a
Total carotenoids	8.29 ± 0.31 ^c	9.16 ± 0.43 ^{bc}	10.5 ± 0.6 ^{ab}	11.0 ± 0.8 ^a

Results represent the mean values ± standard deviation of two independent runs.

Different letters in the same line correspond to a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

The decline in carotenoid content as the initial nitrogen concentration decreases (Table 7-3) may be directly related to the reduction of the chlorophyll content. Chlorophyll degradation is the first signal of nitrogen starvation, reducing the activity of PSI and PSII reaction centers and, consequently, the carotenoids present in these centers. All-*trans*- β -carotene is the primary accessory pigment present in PSI and PSII (BROWN, 1987), while all-

trans-lutein is present in the light-harvesting complex I (LHCI) and II (LHCII) (LIU et al., 2004; CAZZANIGA et al., 2016).

The content of carotenes, all-*trans*- β -carotene ($1.57 \pm 0.16 \text{ mg g}^{-1}$) and all-*trans*- α -carotene ($1.00 \pm 0.10 \text{ mg g}^{-1}$), was stimulated at 1.3-fold at the highest concentration of nitrogen. In relation to xanthophylls, this increase was 1.4 and 1.5-fold for all-*trans*-lutein ($4.15 \pm 0.46 \text{ mg g}^{-1}$) and all-*trans*-zeaxanthin ($1.74 \pm 0.18 \text{ mg g}^{-1}$) contents, respectively.

C. minutissima free cells presented 3.24 mg g^{-1} of lutein (DINESHKUMAR et al., 2015), value similar to the ones in the lowest nitrogen concentrations (48 and 64 mg L^{-1} of N-NO_3) used in the present work (Table 7-3). After optimization in the BBM medium (184.3 mg L^{-1} of N), the authors obtained a lutein content of 6.05 mg g^{-1} .

7.3.2 Effect of the profile of nitrogen addition on biomass concentration and composition

The previous experiments showed that initial nitrogen concentration of $96 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ does not result in higher biomass and specific carotenoid content compared with $80 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$; thus it was chosen for the following experiments to study the effect of the nitrogen addition profile on biomass yield and composition during fed-batch culture.

The profile of nitrogen addition (control, FB32, and FB19.2 cultures) did not affect pigments production, reaching maximum chlorophylls and carotenoid concentration on the sixth day for all conditions (Fig. 7-3). However, the extra nitrogen addition (FB96) enhanced the maximum production of chlorophyll and total carotenoids by 2.1 and 1.8-fold, respectively, compared to the control culture. The fluctuation in the nitrogen level in FB96 was due to the nitrogen additions during the cultivation; after the end of the additions (4th day), there was a progressive decrease in nitrogen concentration due to its consumption by cells. In contrast to the control batch, FB32, and FB19.2 cultures, on which nitrogen was consumed by the fifth day of culture, nitrogen was available to cells until the ninth day in FB96 (Fig. 7-3c). Self-shading caused by high cell densities in photobioreactors has been reported as a limiting factor for microalgae growth (SFORZA et al., 2012). However, the present results suggest that nutrient limitation was the factor responsible for the decrease in growth of the immobilized cells; thus, the addition of extra nitrogen during the cultivation showed to intensify pigment production (Fig. 7-3).

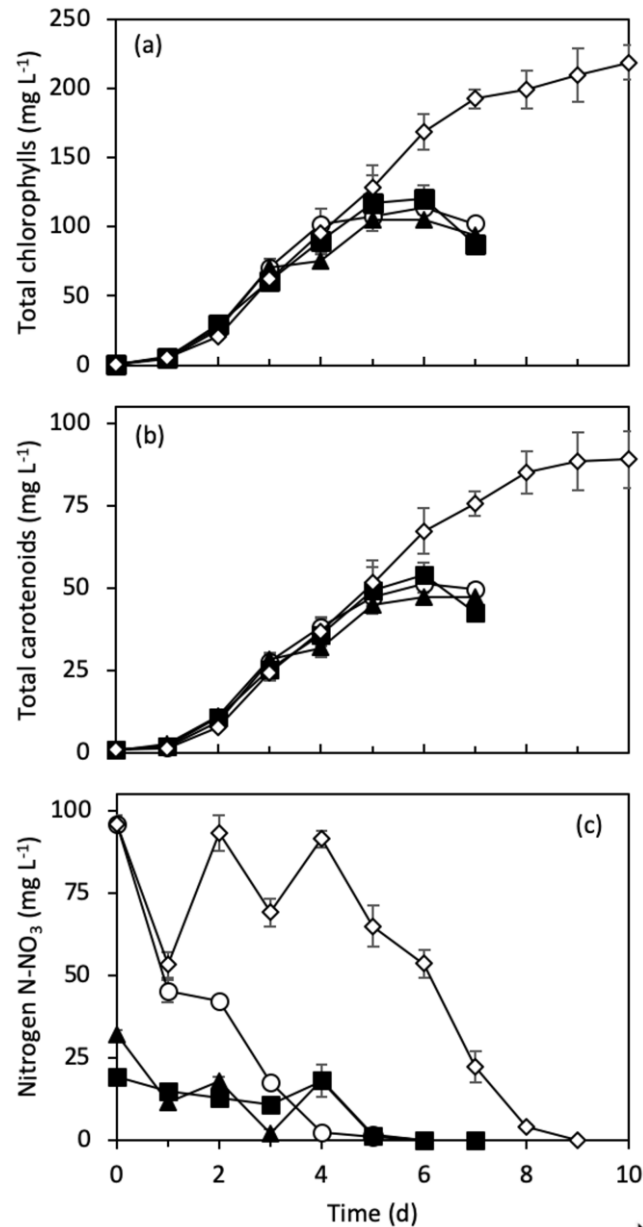


Figure 7-3 - Effect of nitrogen addition profile on (a) total chlorophylls, (b) total carotenoids, and (c) nitrogen concentration during fed-batch culture of *C. minutissima* immobilized in alginate beads in airlift photobioreactor. (○) Control; (■) BF32; (▲) BF19.2; (◇) BF96. The curves show the average result of two independent cultures.

In addition to their essential role in microalgal photosynthesis, chlorophylls and carotenoids have a high market value. These pigments, like other natural dyes, are considered safer and healthier than their synthetic alternatives and are being used by the food industry in a trend of offering products with natural ingredients to consumers (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Besides, carotenoids, chlorophylls, and their derivatives have been gaining attention due to their antioxidant capacity (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011;

ZHANG et al., 2019), detoxifying, anti-inflammatory and preventive on cancer (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; MCQUISTAN et al., 2012; SHARONI et al., 2012) and macular degeneration (KOO; NEURINGER; SANGIOVANNI, 2014) activities.

The biomass concentration achieved in BF96 ($2.13 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$) was 1.3-fold higher than the one in the batch culture with initial addition of 96 mg L^{-1} of N-NO_3 (Table 7-4). FB96 culture also showed the highest chlorophylls (1.7-fold), lipids (1.3-fold), and proteins (1.6-fold) contents in biomass. The batch results showed no statistical difference in final biomass and lipids content among initial nitrogen ranging from 64 to 96 mg L^{-1} of N-NO_3 (Table 7-2). However, the nitrogen addition during the culture of immobilized cells proved to be an attractive option to stimulate microalga growth and biosynthesis of pigments and macromolecules, increasing the commercial value of the biomass.

Table 7-4 - Effect of nitrogen addition profile on biomass concentration and on chlorophylls, lipids and proteins content in biomass during fed-batch cultures of *C. minutissima* immobilized in alginate beads.

Nitrogen addition ($\text{mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$)	Final Biomass Concentration (g L^{-1})	Final Biomass Composition (mg g^{-1})		
		Chlorophylls	Lipids	Protein
Batch (Control)	1.67 ± 0.00^b	16.6 ± 0.1^b	146 ± 3^b	150 ± 11^b
FB19.2	1.62 ± 0.06^b	14.6 ± 0.1^b	137 ± 5^b	170 ± 16^b
FB32	1.61 ± 0.01^b	15.7 ± 0.6^b	136 ± 5^b	141 ± 11^b
FB96	2.13 ± 0.01^a	27.9 ± 0.5^a	187 ± 6^a	237 ± 10^a

Results represent the mean values \pm standard deviation of two independent runs.

Different letters in the same line correspond to a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

The FB96 culture presented the highest carotenoid content ($12.6 \pm 0.8 \text{ mg g}^{-1}$), 1.3-fold higher than batch culture (Table 7-5). Lutein was the major carotenoid identified in *C. minutissima* biomass ($5.31 \pm 0.46 \text{ mg g}^{-1}$ in FB96); this result is similar to the ones reported in the literature for free cells of *C. minutissima* ($2.67 - 6.05 \text{ mg g}^{-1}$) (DINESHKUMAR et al., 2015), and for other species of microalgae ($2.67 - 5.56 \text{ mg g}^{-1}$) (YEN; SUN; MA, 2011; HO et al., 2014; MA et al., 2018).

The carotenoid composition was not affected by the addition of nitrogen in steps. However, the all-*trans*-zeaxanthin content ($0.56 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1}$) in FB96 was reduced by 2.3-fold, whereas all-*trans*-violaxanthin ($1.23 \pm 0.14 \text{ mg g}^{-1}$) was stimulated in 3.4-fold, relative to the control batch culture.

Table 7-5- Effect of the profile of nitrogen addition on carotenoids profile during fed-batch cultures of *C. minutissima* immobilized in alginate beads.

Carotenoids (mg g ⁻¹)	Nitrogen Addition (mg L ⁻¹ N-NO ₃)			
	Control	FB19.2	FB32	FB96
all- <i>trans</i> -violaxanthin	0.36 ± 0.04 ^b	0.49 ± 0.05 ^b	0.34 ± 0.07 ^b	1.23 ± 0.14 ^a
<i>cis</i> -violaxanthin	0.47 ± 0.06 ^{bc}	0.54 ± 0.01 ^b	0.41 ± 0.03 ^c	0.89 ± 0.06 ^a
13- <i>cis</i> -lutein	0.31 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.02 ^b	0.45 ± 0.01 ^a
13'- <i>cis</i> -lutein	0.07 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.01 ^a
all- <i>trans</i> -lutein	3.96 ± 0.12 ^b	3.90 ± 0.21 ^b	3.17 ± 0.16 ^c	5.31 ± 0.46 ^a
all- <i>trans</i> -zeaxanthin	1.30 ± 0.04 ^a	0.97 ± 0.09 ^b	0.94 ± 0.14 ^b	0.56 ± 0.02 ^c
<i>cis</i> -zeaxanthin	0.05 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^a
15- <i>cis</i> -β-carotene	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
all- <i>trans</i> -α-carotene	0.75 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.09 ^b	0.76 ± 0.05 ^b	1.05 ± 0.04 ^a
13- <i>cis</i> -β-carotene	0.33 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.04 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.02 ^a
all- <i>trans</i> -β-carotene	1.27 ± 0.02 ^b	1.37 ± 0.14 ^b	1.17 ± 0.08 ^b	1.80 ± 0.09 ^a
9- <i>cis</i> -β-carotene	0.57 ± 0.01 ^a	0.59 ± 0.06 ^a	0.52 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.05 ^a
Total carotenoids	9.5 ± 0.3 ^{bc}	9.7 ± 0.5 ^b	8.2 ± 0.4 ^c	12.6 ± 0.8 ^a

Results represent the mean values ± standard deviation of two independent runs.

Different letters in the same line correspond to a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

The analysis of the fatty acids methyl esters (FAMES) showed that the major fatty acids found in *C. minutissima* biomass were palmitic acid (C16:0), linoleic acid (LA, C18:2n-6) and α-linolenic acid (ALA, C18:3n-3) (Fig. 7-4a). FAMES content in biomass did not differ significantly ($p \geq 0.05$) among the experiments, ranging between 38.9 mg g⁻¹ and 45.9 mg g⁻¹ (Fig. 7-4b). However, FAMES composition was affected by the profile and the amount of nitrogen added throughout the fed-batch cultures. The monounsaturated fatty acids (MUFAs) and the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) contents increased significantly in FB96, being 11.6 % and 52 % of the FAMES content, respectively (Fig. 7-4c). This result was mainly due to the increase of the primary fatty acids LA and ALA, and the consequent proportional reduction of palmitic acid in this culture condition. The highest saturated fatty acids (SFA) content was observed in the cultures FB32 and FB19.2 (49 %) (Fig. 7-4c), due to the increase in C16:0 content (Fig. 7-4a). Nitrogen deprivation in microalgal cultures tends to increase SFA content and decrease PUFAs content (LAMERS et al., 2012; LI et al., 2014; KARPAGAM et al., 2015), indicating that the treatments FB32 and FB19.2 provided conditions of nitrogen

starvation to the culture. This restriction was not observed for FB96, which presented the lowest SFA content (36 %).

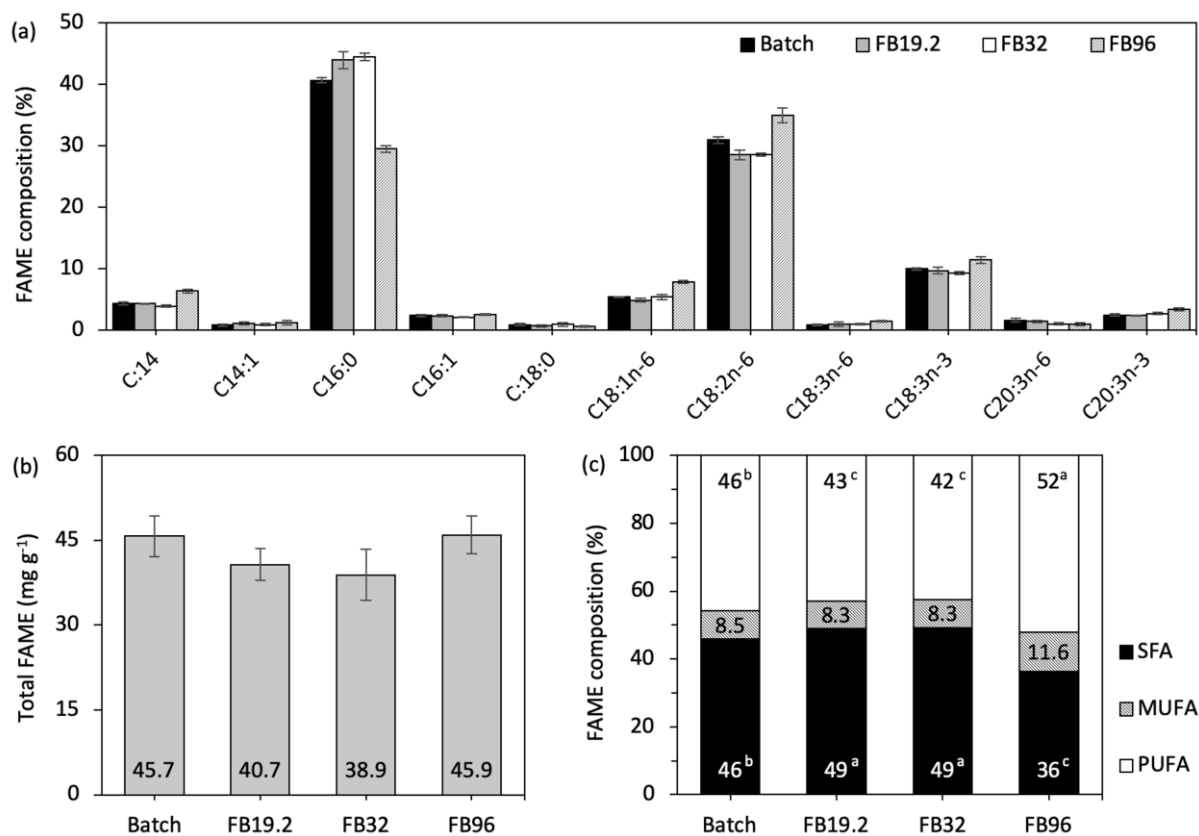


Figure 7-4 - Effect of nitrogen addition profile during fed-batch culture of *C. minutissima* immobilized in alginate beads on (a) FAMES profile (% of total FAMES), (b) FAMES content in microalgae biomass (mg g⁻¹), and (c) FAMES composition (% of total FAMES). The bars show the average result of two independent cultures. Different letters in the same line mean a significant difference ($p \leq 0.05$) by Tukey test.

The high levels of PUFAs obtained in the present study with FB96 are comparable or superior to other studies with *C. minutissima* free cells cultures (2.1 % - 77.6 %) (CHEN et al., 2011; LI et al., 2011; AREMU et al., 2015; PEREIRA et al., 2018). *Nannochloropsis* sp. immobilized cultures showed a 2.4-fold increase in PUFAs (21.5 %) compared with free-cell culture (CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017).

PUFAs omega 3 ($\omega 3$) have great therapeutic importance, in particular, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), which have been associated to the reduction of the risk of some diseases, such as atherosclerosis (CHANG et al., 2014), coronary heart disease (PATTERSON et al., 2015), hypertriglyceridemia (MAKI

et al., 2014), inflammatory bowel disease, immune dysfunction and cognitive disorders (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009). The human organism can synthesize EPA and DHA from LA and ALA, and the ideal $\omega 6:\omega 3$ ratio to convert ALA to DHA is between 2:1 and 3:1. *C. minutissima* biomass presented significant amounts of LA and ALA, with a $\omega 6:\omega 3$ ratio around 2.6 (MARTIN et al., 2006). The high contents of PUFAs found in immobilized *C. minutissima* biomass makes it interesting in the pharmaceutical industry and for nutritional enrichment of foods.

The immobilization of *Chlorella minutissima* in alginate beads has proven to be a viable technique for the production of biomass and bioactive compounds, showing results similar or better than conventional free cell cultures. The results of the present study suggest that alginate beads did not impose limitations to nutrients availability for the microalga colonies developing in the interior of the beads. The tests with different nitrogen concentrations in the culture medium allowed to increase the production of carotenoids and polyunsaturated fatty acids. Moreover, alginate has high transparency, permitting the passage of light into the beads during the cultivation of immobilized microalgae.

The alginate beads are easily harvested through simple sieving, reducing production costs by eliminating the biomass centrifugation step, which demands a high amount of energy (CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017). The immobilization technique also prevents incrustation of microalga biomass on the inner walls of the photobioreactor, a common problem in free cell cultures. Additionally, the easy separation process can facilitate the total or partial reuse of the culture medium, requiring only the addition of micronutrients (DAS et al., 2016) and decreasing the water consumption of the whole process. Finally, alginate is affirmed as a GRAS (Generally Recognized As Safe) compound, being safe for food and pharmaceutical purposes (PARREIDT; MÜLLER; SCHMID, 2018); thus, it is possible to eliminate the alginate-microalga separation step for some specific applications.

7.4 CONCLUSION

This study showed that immobilization techniques could be used to grow microalgae cells for bioactive compounds production. High nitrogen concentration increased biomass growth, as well as pigments, proteins and lipids contents in immobilized *C. minutissima* biomass. The profile of nitrogen addition during fed-batch cultivation did not affect biomass growth and composition. However, a fed-batch culture with high nitrogen addition showed to further increase chlorophylls, carotenes, proteins, and omega-3 fatty acids in the

biomass. Thus, it is possible to combine the nutritional enrichment of the biomass with the practicality of immobilized cell harvesting for microalgae cultivation.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors are grateful for the support.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram aplicadas técnicas não convencionais com a intenção de aumentar a concentração de biomassa e de compostos de alto valor agregado produzidos por microalgas, bem como, avaliar o potencial de métodos de cultivos mais econômicos a fim de tornar mais atrativo o cultivo de microalgas.

A aplicação de radiação UVB em cultivos de *C. minutissima* demonstrou ser uma alternativa eficaz em aumentar a concentração de biomassa e o teor de compostos bioativos, como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados, agregando valor à biomassa com potencial biotecnológico para a indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, foi possível observar que o efeito da radiação UVB pode apresentar diferentes respostas dependendo do tipo de micro-organismo e do tempo de exposição das células à UVB, sendo prejudicial à cepa de *P. marina* quando exposta por tempos mais prolongados. Isto demonstra a importância em se estudar os efeitos da radiação UVB em diferentes espécies de microalgas a fim de encontrar as melhores condições para aumentar sua produção.

C. minutissima apresentou excelente desenvolvimento quando imobilizada em esferas de alginato, técnica esta que reduz os custos energéticos de produção. Neste estudo observamos a importância nutricional do nitrogênio para os cultivos, e através da sua modulação foi possível aumentar a concentração de biomassa, proteínas e lipídios, bem como, compostos de alto valor de mercado, tais como all-*trans*-luteína, all-*trans*- β -caroteno, all-*trans*- α -caroteno e all-*trans*-violaxantina, além de ácidos graxos poli-insaturados, como ácido linoleico (LA) e α -linolênico (ALA). Com isto, foi possível produzir uma biomassa rica nutricionalmente, podendo ser utilizada na alimentação humana e animal, bem como, na extração de corantes naturais e compostos com propriedades funcionais.

A imobilização de *C. minutissima* em alginato protegeu os carotenoides durante a secagem convectiva (50 °C) da biomassa, de maneira similar ao método de liofilização. A biomassa seca foi capaz de manter quantidades expressivas de carotenos e xantofilas durante o armazenamento em condições aceleradas. Com isso, foi possível estender a vida útil desta microalga imobilizada por meio de um método simples, rápido e econômico, obtendo-se um produto final rico em carotenoides. Além de obter uma nova forma de apresentação de consumo de microalgas, podendo ser utilizadas na elaboração de pratos, bem como adicionada na formulação de novos alimentos, agregando valor nutricional a eles.

10 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar outros parâmetros que afetam os efeitos ocasionados pela radiação UVB na produção de biomassa e compostos bioativos, como irradiâncias e tempos de exposição, bem como investigar outras cepas resistentes a radiação UVB.
- Estudar a aplicação de radiação UVB em cultivos em larga escala.
- Testar maiores concentrações de nitrogênio nos cultivos em batelada alimentada de *C. minutissima* imobilizada, a fim de aumentar a produção de biomassa e de compostos bioativos.
- Investigar métodos de extração de pigmentos diretamente da microalga imobilizada.
- Estudar o tempo de vida útil da biomassa imobilizada e desidratada.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-SHADY, A. M.; EL-SHEEKH, M. M.; EL-NAGGAR, A. H.; ABOMOHRA, A. E. F. Effect of UV-B radiation on growth, photosynthetic activity and metabolic activities of *Chlorococcum* sp. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 21–27, 2008.

ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 96–105, 2012.

AGBEDE, O. O.; OKE, E. O.; AKINFENWA, S. I.; WAHAB, K. T.; OGUNDIPE, S.; AWORANTI, O. A.; ARINKOOLA, A. O.; AGARRY, S. E.; OGUNLEYE, O. O.; OSUOLALE, F. N.; BABATUNDE, K. A. Thin layer drying of green microalgae (*Chlorella* sp.) paste biomass: Drying characteristics, energy requirement and mathematical modeling. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100467, 2020.

AGHBASHLO, M.; KIANMEHR, M. H.; SAMIMI-AKHJAHANI, H. Influence of drying conditions on the effective moisture diffusivity, energy of activation and energy consumption during the thin-layer drying of berberis fruit (*Berberidaceae*). **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 10, p. 2865–2871, 2008.

AHMED, F.; LI, Y.; FANNING, K.; NETZEL, M.; SCHENK, P. M. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*. **Food Research International**, v. 74, p. 231–236, 2015.

AKETO, T.; HASHIZUME, R.; YABU, Y.; HOSHIKAWA, Y.; NOJIMA, D.; MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; TAKANO, H.; TANAKA, T. Characterization of a novel marine unicellular alga, *Pseudoneochloris* sp. strain NKY372003 as a high carbohydrate producer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 687–692, 2020.

AL-RASHED, S. A.; IBRAHIM, M. M.; EL-GAALY, G. A.; AL-SHEHRI, S.; MOSTAFA, A. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 706–712, nov. 2016.

ALMARAZ-DELGADO, A. L.; FLORES-URIBE, J.; PÉREZ-ESPAÑA, V. H.; SALGADO-MANJARREZ, E.; BADILLO-CORONA, J. A. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. **AMB Express**, v. 4, p. 57, 13 ago. 2014.

ALMUTAIRI, A. W. Effects of nitrogen and phosphorus limitations on fatty acid methyl esters and fuel properties of *Dunaliella salina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 26, p.

32296–32303, 2020.

ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 163–173, 12 jan. 2011.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta de registros de alimentos**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/alimentos/>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

AOAC. Official methods of analysis, association of analytical chemists. 15th ed., Washington D. C. **Washington D. C. USA**, 2000.

AOCS; SOCIETY, A. O. C.; AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS; SOCIETY., A. O. C.; AOCS. **Sampling and analysis of commercial fats and oils. AOCS Official Method Cc 6-25**. [Place of publication not identified]: [publisher not identified], 1997.

AREMU, A. O.; NEMÉNYI, M.; STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J. Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. **Journal of Phycology**, v. 51, n. 4, p. 659–669, 2015.

ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; BENNIS, I.; EL MERNISSI, N.; WAHBY, I. Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. **Renewable Energy**, v. 77, p. 15–19, 2015.

BAGCHI, S. K.; RAO, P. S.; MALLICK, N. Development of an oven drying protocol to improve biodiesel production for an indigenous chlorophycean microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 207–213, 2015.

BALAN, R.; SURAIISHKUMAR, G. K. Simultaneous increases in specific growth rate and specific lipid content of *Chlorella vulgaris* through UV-induced reactive species. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 2, p. 291–299, mar. 2014.

BASHIR, S.; SHARIF, M. K.; BUTT, M. S.; RIZVI, S. S. H.; PARAMAN, I.; EJAZ, R. Preparation of Micronutrients Fortified *Spirulina* Supplemented Rice-Soy Crisps Processed Through Novel Supercritical Fluid Extrusion. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. e12986, 4 jul. 2016.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; DA ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, n. 0960–8524, p. 1425–1432, 2017.

BAUER, L. M.; RODRIGUES, E.; RECH, R. Potential of immobilized *Chlorella minutissima* for the production of biomass, proteins, carotenoids and fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural**

Biotechnology, v. 25, p. 101601, 2020.

BEARDALL, J.; HERAUD, P.; ROBERTS, S.; SHELLY, K.; STOJKOVIC, S. Effects of UV -B radiation on inorganic carbon acquisition by the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). **Phycologia**, v. 41, n. 3, p. 268–272, maio 2002.

BECKER, E. W. Microalgae for Human and Animal Nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 461–503.

BHANDARI, R. R.; SHARMA, P. K. Photosynthetic and biochemical characterization of pigments and UV-absorbing compounds in *Phormidium tenue* due to UV-B radiation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 2, p. 283–292, 2011.

BILAD, M. R.; VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLEAERT, K.; VANKELECOM, I. F. J. Bioresource Technology Harvesting microalgal biomass using submerged microfiltration membranes. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 343–352, 2012.

BIZ, A. P.; CARDOZO-FILHO, L.; ZANOELO, E. F. Drying dynamics of microalgae (*Chlorella pyrenoidosa*) dispersion droplets. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 138, n. January, p. 41–48, 2019.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, 1959.

BOELEN, P.; VAN DIJK, R.; DAMSTÉ, J. S. S.; RIJPSTRA, W. I. C.; BUMA, A. G. J. On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. **AMB Express**, v. 3, p. 1–9, 2013.

BOON, C. S.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 6, p. 515–532, 2010.

BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217–226, 2012.

BROWN, J. S. Functional Organization of Chlorophyll *a* and Carotenoids in the Alga, *Nannochloropsis salina*. **Plant Physiology**, v. 83, n. 2, p. 434 LP – 437, fev. 1987.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.

CARDOSO, A. S.; ELIZA, G.; VIEIRA, G.; KAPPES, A. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 9, n. 4, p. 542–549, 2011.

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric

determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975a.

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 11 jan. 1975b.

CAZZANIGA, S.; BRESSAN, M.; CARBONERA, D.; AGOSTINI, A.; DALL'OSTO, L. Differential Roles of Carotenes and Xanthophylls in Photosystem I Photoprotection. **Biochemistry**, v. 55, n. 26, p. 3636–3649, 5 jul. 2016.

CERÓN-GARCÍA, M. C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; LÓPEZ-ROSALES, L.; GARCÍA-CAMACHO, F.; MOLINA-GRIMA, E. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). **Food Chemistry**, v. 257, n. March, p. 316–324, 2018.

CERÓN-GARCÍA, M. D. C.; CAMPOS-PÉREZ, I.; MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; BERMEJO-ROMÁN, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Stability of carotenoids in *scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under various storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6944–6950, 2010.

CHAGAS, A. L.; RIOS, A. O.; JARENKOW, A.; MARCÍLIO, N. R.; AYUB, M. A. Z.; RECH, R. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 981–988, jun. 2015.

CHANDRA, R.; DAS, P.; VISHAL, G.; NAGRA, S. Factors affecting the induction of UV protectant and lipid productivity in *Lyngbya* for sequential biorefinery product recovery. **Bioresource Technology**, v. 278, n. January, p. 303–310, 2019.

CHANG, C. L.; TORREJON, C.; JUNG, U. J.; GRAF, K.; DECKELBAUM, R. J. Incremental replacement of saturated fats by n-3 fatty acids in high-fat, high-cholesterol diets reduces elevated plasma lipid levels and arterial lipoprotein lipase, macrophages and atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 2, p. 401–9, jun. 2014.

CHEIRSILP, B.; THAWECHAI, T.; PRASERTSAN, P. Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 787–794, 2017.

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M. A.; CHANG, J. S.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

CHEN, C. L.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Dewatering and Drying Methods for Microalgae. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 443–454, 2015.

- CHEN, C.; VENKITASAMY, C.; ZHANG, W.; KHIR, R.; UPADHYAYA, S.; PAN, Z. Effective moisture diffusivity and drying simulation of walnuts under hot air. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 150, 2020.
- CHEN, M.; GARCIA, M. E. D.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O.; ABUNASSER, N.; TANG, H. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2280–2287, 2011.
- CHEN, Y. C. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. **Aquaculture**, v. 195, n. 1–2, p. 71–80, 2001.
- CHENG, J.; LU, H.; HUANG, Y.; LI, K.; HUANG, R.; ZHOU, J.; CEN, K. Enhancing growth rate and lipid yield of *Chlorella* with nuclear irradiation under high salt and CO₂ stress. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 220–227, 2016.
- CHIMSOOK, T. Effect of freeze drying and hot air drying methods on quality of cordycepin production. **MATEC Web of Conferences**, v. 192, p. 8–11, 2018.
- CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; BOMSER, J. A.; GLAMM, J. E.; FAILLA, M. L. Biochemical and Molecular Actions of Nutrients Xanthophylls and α -Tocopherol Decrease UVB-Induced Lipid Peroxidation and Stress Signaling in Human Lens Epithelial Cells 1, 2. **The journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3225–3232, 2004.
- CHOKSHI, K.; PANCH, I.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.
- COBLENTZ, W. W. The Copenhagen meeting of the second international Congress on light. **Science**, v. 76, n. 1975, p. 412 LP – 415, 4 nov. 1932.
- COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Da. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143, 2007.
- CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Oxford: Oxford University Press, 1975.
- CULTURE COLLECTION OF AUTOTROPHIC ORGANISMS (CCAO). *Chlorella cf. minutissima*. Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-cf-minutissima>>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- CUSTÓDIO, L.; JUSTO, T.; SILVESTRE, L.; BARRADAS, A.; DUARTE, C. V.; PEREIRA, H.; BARREIRA, L.; RAUTER, A. P.; ALBERÍCIO, F.; VARELA, J. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 134–140, 2012.

- DAS, P.; THAHER, M. I.; ABDUL HAKIM, M. A. Q. M.; AL-JABRI, H. M. S. J.; ALGHASAL, G. S. H. S. Microalgae harvesting by pH adjusted coagulation-flocculation, recycling of the coagulant and the growth media. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 824–829, 2016.
- DASH, A.; BANERJEE, R. Enhanced biodiesel production through phyco-myco co-cultivation of *Chlorella minutissima* and *Aspergillus awamori*: An integrated approach. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 502–509, 2017.
- DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 241–245, 2013.
- DATA, R. and. **Carotenoids Market Reports and Data**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.reportsanddata.com/report-detail/carotenoids-market>>. Acesso em: 5 mar. 2020.
- DATA, R. and. **Global Algae Products Market Reports and Data**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.reportsanddata.com/press-release/global-algae-product-market>>. Acesso em: 20 maio. 2020.
- DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Bioresource Technology Immobilized microalgae for removing pollutants : Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1611–1627, 2010.
- DE BOER, F. Y.; IMHOF, A.; VELIKOV, K. P. Photo-stability of lutein in surfactant-free lutein-zein composite colloidal particles. **Food Chemistry: X**, v. 5, n. June 2019, p. 100071, 2020.
- DE LLASERA, M. P. G.; SANTIAGO, M. L.; FLORES, E. J. L.; TORIS, D. N. B.; HERRERA, M. R. C. Mini-bioreactors with immobilized microalgae for the removal of benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene from water. **Ecological Engineering**, v. 121, p. 89–98, 2017.
- DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 62–67, 2016.
- DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, n. July 2017, p. 168–174, 2018.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiautschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 5, p. 649–659, 1996.
- DESMORIEUX, H.; HERNANDEZ, F. Biochemical and physical criteria of *Spirulina* after different drying processes. **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**, n. August, p. 900–907, 2004.
- DINESHKUMAR, R.; DASH, S. K.; SEN, R. Process integration for microalgal lutein and biodiesel

production with concomitant flue gas CO₂ sequestration: a biorefinery model for healthcare, energy and environment. **RSC Advances**, v. 5, n. 90, p. 73381–73394, 2015.

DINESHKUMAR, R.; DHANARAJAN, G.; DASH, S. K.; SEN, R. An advanced hybrid medium optimization strategy for the enhanced productivity of lutein in *Chlorella minutissima*. **Algal Research**, v. 7, p. 24–32, 2015.

DIPRAT, A. B.; MENEGOL, T.; BOELTER, J. F.; ZMOZINSKI, A.; RODRIGUES VALE, M. G.; RODRIGUES, E.; RECH, R. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, jan. 2017.

DIPRAT, A. B.; SILVEIRA THYS, R. C.; RODRIGUES, E.; RECH, R. *Chlorella sorokiniana*: A new alternative source of carotenoids and proteins for gluten-free bread. **LWT**, v. 134, p. 109974, 2020.

DISSA, A. O.; DESMORIEUX, H.; SAVADOGO, P. W.; SEGDA, B. G.; KOULIDIATI, J. Shrinkage, porosity and density behaviour during convective drying of spirulina. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 3, p. 410–418, 2010.

DORTCH, Q.; CLAYTON, J. R.; THORESEN, S. S.; AHMED, S. I. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. **Marine Biology**, v. 81, n. 3, p. 237–250, 1984.

FDA. **Hazard Analysis and Risk-Based Preventive Controls for Human Food: Draft Guidance for Industry - Chapter 4: Preventive Controls**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/99572/download>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

FERREIRA, S. P.; HOLZ, J. C. P.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. Fatty acid profile of *Chlorella* biomass obtained by fed batch heterotrophic cultivation. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 1, p. 284–291, 2017.

FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1–12, jan. 2007.

FETTERMAN, J. W.; ZDANOWICZ, M. M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 13, p. 1169 LP – 1179, 1 jul. 2009.

FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses: Effects on kinetic and nutritional parameters. **Bioresource Technology**, v. 244, n. May, p. 338–344, 2017.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; D’ORAZIO, N. Marine Carotenoids against Oxidative Stress: Effects on Human Health. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6226–6246, 30 out. 2015.

GAO, F.; LI, C.; YANG, Z.-H.; ZENG, G.-M.; FENG, L.-J.; LIU, J.; LIU, M.; CAI, H. Continuous

microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 55–61, jul. 2016.

GAO, K.; GUAN, W.; HELBLING, E. W. Effects of solar ultraviolet radiation on photosynthesis of the marine red tide alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 2, p. 140–148, 2007.

GARBAYO, I.; VIÑAL, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 629–634, 2003.

GARCÍA-SEGOVIA, P.; PAGÁN-MORENO, M. J.; LARA, I. F.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Effect of microalgae incorporation on physicochemical and textural properties in wheat bread formulation. **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 5, p. 437–447, 2017.

GEORGE, B.; PANCH, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - a potential strain for bio-fuel production. **Bioresource technology**, v. 171, p. 367–74, 2014.

GOLZARI, M. H.; HOSSEINI, S.; KOOHDANI, F.; YARAGHI, A. A. S.; JAVANBAKHT, M. H.; MOHAMMADZADEH-HONARVAR, N.; DJALALI, M. The effect of eicosapentaenoic acid on the serum levels and enzymatic activity of paraoxonase 1 in the patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Medica Iranica**, v. 55, n. 8, p. 486–495, 2017.

GÓMEZ, P. I.; GONZÁLEZ, M. A. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) cultivated under laboratory conditions. **Biological Research**, v. 38, n. 2–3, p. 151–162, 2005.

GONÇALVES, C. F.; MENEGOL, T.; RECH, R. Biochemical composition of green microalgae *Pseudoneochloris marina* grown under different temperature and light conditions. **Bioanalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101032, 2019.

GRANELLA, S. J.; BECHLIN, T. R.; CHRIST, D.; ZANARDI, B.; REGO, J. M.; MACHADO COELHO, S. R. Improvement of heat & mass transfer with added ozone into drying air on corn-soy. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 12, n. 4, p. 427–434, 2019.

GROBBELAAR, J. U. **Inorganic Algal Nutrition Handbook of Microalgal Culture**: Wiley Online Books., 12 abr. 2013. .

GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Ed.). **Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings --- 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport**. Boston, MA: Springer US, 1975. p. 29–60.

GÜRLEK, C.; YARKENT, Ç.; KÖSE, A.; TUĞCU, B.; GEBELOĞLU, I. K.; ÖNCEL, S.; ELIBOL, M. Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. **Health and Technology**, v. 10, n. 1, p. 111–117, 2020.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037–1047, abr. 2010.

HENRARD, A. A.; MARTINS, G.; ROSA, D.; MORAES, L.; GREQUE DE MORAIS, M.; VIEIRA COSTA, J. A. The cultivation of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture media and stirring setting. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 21, p. 1431–1439, 2015.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. del P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26–38, set. 2015.

HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 360–364, nov. 2015.

HIGGINS, B. T.; VANDERGHEYNST, J. S. Effects of *Escherichia coli* on mixotrophic growth of *Chlorella minutissima* and production of biofuel precursors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

HO, S.-H.; CHAN, M.-C.; LIU, C.-C.; CHEN, C.-Y.; LEE, W.-L.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource technology**, v. 152, p. 275–82, jan. 2014.

HOSSEINIZAND, H.; SOKHANSANJ, S.; LIM, C. J. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. **Drying Technology**, v. 36, n. 9, p. 1049–1060, 2018.

HU, C.-C.; LIN, J.-T.; LU, F.-J.; CHOU, F.-P.; YANG, D.-J. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 439–446, jul. 2008.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 114–122.

HUSS, V. A. R.; SCHARPF, T. K.; KESSLER, E. Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. **Archives of Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 512–514, 1989.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Unit operations in food engineering**. Boca Raton: CRC

Press, 2003.

JENA, U.; VAIDYANATHAN, N.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Evaluation of microalgae cultivation using recovered aqueous co-product from thermochemical liquefaction of algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3380–3387, 2011.

JOO, D. S.; CHO, M. G.; LEE, J. S.; PARK, J. H.; KWAK, J. K.; HAN, Y. H.; BUCHOLZ, R. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 5, p. 567–576, 2001.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters : collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 75, n. 3, p. 488–506, 1992.

JUNG, J.-H.; SIRISUK, P.; RA, C. H.; KIM, J.-M.; JEONG, G.-T.; KIM, S.-K. Effects of green LED light and three stresses on biomass and lipid accumulation with two-phase culture of microalgae. **Process Biochemistry**, v. 77, p. 93–99, 2019.

KAMOSHITA, M.; TODA, E.; OSADA, H.; NARIMATSU, T.; KOBAYASHI, S.; TSUBOTA, K.; OZAWA, Y. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–10, 2016.

KARPAGAM, R.; PREETI, R.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 253–257, 2015.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 134–143, 2008.

KITAJIMA, K.; HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 6, p. 857–865, 2003.

KOCHEM, L. H.; DA FRÉ, N. C.; REDAELLI, C.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Characterization of a novel flat-panel airlift photobioreactor with an internal heat exchanger. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 1, p. 59–64, jan. 2014.

KOCHERT, G. Quantitation of the macromolecular components of microalgae. In: HELLEBUST, J. A.; CRAIGIE, J. S. (Ed.). **Handbook of Phycological Methods**. London: Cambridge Press, University, 1978. p. 189–195.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, out. 2014.

KOO, E.; NEURINGER, M.; SANGIOVANNI, J. P. Macular xanthophylls, lipoprotein-related genes,

and age-related macular degeneration. **The American journal of clinical nutrition**, n. Supplement 1, p. 336S–46S, jul. 2014.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review. v. 21, p. 377–397, 2004.

KUMAR, V.; NANDA, M.; KUMAR, S.; CHAUHAN, P. K. The effects of ultraviolet radiation on growth, biomass, lipid accumulation and biodiesel properties of microalgae. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 40, n. 7, p. 787–793, 2018.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal Research**, v. 41, n. June, p. 101566, 2019.

LAGE-PINTO, F.; BERNINI, E.; DE OLIVEIRA, J. G.; VITÓRIA, A. P. Photosynthetic analyses of two native Atlantic Forest species in regenerative understory of eucalyptus plantation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 2, p. 95–106, 2012.

LAI, J. W. S.; LIM, P. E.; WONG, C. Y.; PHANG, S. M.; BEARDALL, J. Photosynthetic response and DNA mutation of tropical, temperate and polar *Chlorella* under short-term UVR stress. **Polar Science**, v. 20, n. May 2018, p. 35–44, 2019.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 191, p. 263–268, 2012.

LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 21–27, 2012.

LAMERS, P. P.; VAN DE LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 638–648, 12 mar. 2010.

LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, n. 8, p. 885–891, 2005.

LAVELLI, V.; ZANONI, B.; ZANIBONI, A. Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1705–1711, 2007.

LEACH, G.; OLIVEIRA, G.; MORAIS, R. Production of a carotenoid-rich product by alginate entrapment and fluid-bed drying of *Dunaliella salina*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 298–302, 1998.

LI, D.; WANG, L.; ZHAO, Q.; WEI, W.; SUN, Y. Improving high carbon dioxide tolerance and

carbon dioxide fixation capability of *Chlorella* sp. by adaptive laboratory evolution. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 269–275, 2015a.

LI, J.; LIU, Y.; CHENG, J. J.; MOS, M.; DAROCH, M. Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 588–596, 14 fev. 2015b.

LI, R.; CHEN, R.; LIU, W.; QIN, C.; HAN, J. Preparation of enteric-coated microcapsules of astaxanthin oleoresin by complex coacervation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 7, p. 674–681, 2018.

LI, Y.; HAN, F.; XU, H.; MU, J.; CHEN, D.; FENG, B.; ZENG, H. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresource Technology**, v. 174, p. 24–32, 2014.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629–636, 2008a.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629–636, 2008b.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815–820, 8 ago. 2008c.

LI, Z. S.; YUAN, H. L.; YANG, J. S.; LI, B. Z. Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9128–9134, 2011.

LIANG, Y.; BEARDALL, J.; HERAUD, P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, n. 3, p. 161–172, 2006.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Handbook of Food Analytical Chemistry**, v. 2–2, p. 171–178, nov. 2005.

LIU, J.; LIU, D.; LIU, J. J.; ZHAO, C.; YAO, S.; HONG, L. Blocking the Nav1.5 channel using eicosapentaenoic acid reduces migration and proliferation of ovarian cancer cells. **International**

Journal of Oncology, v. 53, n. 2, p. 855–865, 2018.

LIU, S.; ZHAO, Y.; LIU, L.; AO, X.; MA, L.; WU, M.; MA, F. Improving Cell Growth and Lipid Accumulation in Green Microalgae *Chlorella* sp. via UV Irradiation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3507–3518, 2015.

LIU, Z.; YAN, H.; WANG, K.; KUANG, T.; ZHANG, J.; GUI, L.; AN, X.; CHANG, W. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. **Nature**, v. 428, p. 287–292, 2004.

LJUBIC, A.; JACOBSEN, C.; HOLDT, S. L.; JAKOBSEN, J. Microalgae *Nannochloropsis oceanica* as a future new natural source of vitamin D3. **Food Chemistry**, v. 320, n. February, p. 126627, 2020.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. [s.l.] RiMa São Carlos, 2006. v. 606

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1 nov. 1951.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. de; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. August 2017, p. 270–276, 2018.

MA, R.; XIE, Y.; ZHAO, X.; CHEN, J.; HO, S.-H. Enhancing lutein productivity of *Chlamydomonas* sp. via high-intensity light exposure with corresponding carotenogenic genes expression profiles. **Bioresource Technology**, v. 275, n. November 2018, p. 416–420, 2018.

MA, Z.; HELBLING, E. W.; LI, W.; VILLAFANE, V. E.; GAO, K. Motility and photosynthetic responses of the green microalga *Tetraselmis subcordiformis* to visible and UV light levels. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1613–1621, 8 dez. 2012.

MACFIE, S. M.; WELBOURN, P. M. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 413–419, 2000.

MAKI, K. C.; YURKO-MAURO, K.; DICKLIN, M. R.; SCHILD, A. L.; GEOHAS, J. G. A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 91, n. 4, p. 141–8, out. 2014.

MANDELLI, F.; MIRANDA, V. S.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Identification of Carotenoids with High Antioxidant Capacity Produced by Extremophile Microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781–1790, 2012.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A

review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013.

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados Ômega-3 e Ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MARTÍNEZ-DELGADO, A. A.; KHANDUAL, S.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. **Food Chemistry**, v. 225, p. 23–30, 2017.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

MATOS, J.; CARDOSO, C.; BANDARRA, N. M.; AFONSO, C. Microalgae as healthy ingredients for functional food: A review. **Food and Function**, v. 8, n. 8, p. 2672–2685, 2017.

MCQUISTAN, T. J.; SIMONICH, M. T.; PRATT, M. M.; PEREIRA, C. B.; HENDRICKS, J. D.; DASHWOOD, R. H.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S. Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 341–352, 2012.

MENEGOL, T.; DIPRAT, A. B.; RODRIGUES, E.; RECH, R. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 28–37, 2017.

MOLINO, A.; IOVINE, A.; CASELLA, P.; MEHARIYA, S.; CHIANESE, S.; CERBONE, A.; RIMAURO, J.; MUSMARRA, D. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 1–21, 2018.

MOREIRA, S. M.; MOREIRA-SANTOS, M.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 135–141, 3 jan. 2006.

MORYA, S.; AERON, G. Immobilization and microencapsulation. **Journal of Advanced Research in Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 1–4, 2017.

MUJUMDAR, A. S.; LAW, C. L. Drying Technology: Trends and Applications in Postharvest Processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 6, p. 843–852, 2010.

MULDERS, K. J. M.; JANSSEN, J. H.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in

nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. **Algal Research**, v. 6, p. 8–16, out. 2014.

NAS-IOM. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: National Academies Press, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **All-trans-beta-carotene**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54603957>>. Acesso em: 18 fev. 2019a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Chlorophyll**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12085802>>. Acesso em: 18 fev. 2019b.

NORSKER, N.-H.; BARBOSA, M. J.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Microalgal production — A close look at the economics. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 24–27, 2011.

OLIVEIRA, E. G.; DUARTE, J. H.; MORAES, K.; CREXI, V. T.; PINTO, L. A. A. Optimisation of *Spirulina platensis* convective drying: Evaluation of phycocyanin loss and lipid oxidation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 8, p. 1572–1578, 2010.

OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1297–1303, 2009.

PANDA, B.; JAIN, P.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 11, p. 1296–1301, 2006.

PARREIDT, T. S.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 1–38, 2018.

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Revisión Microencapsulación con alginato en alimentos . Técnicas y aplicaciones Microencapsulation in alginate for food . Technologies and applications. v. 3, n. 1, p. 130–151, 2012.

PATTERSON, A. C.; CHALIL, A.; ARISTIZABAL HENAO, J. J.; STREIT, I. T.; STARK, K. D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid blood biomarkers increase linearly in men and women after tightly controlled intakes of 0.25, 0.5, and 1 g/d of EPA + DHA. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, 20 out. 2015.

PEREIRA, F. M.; LOURES, C. C. A.; AMARAL, M. S.; GOMES, F. M.; PEDRO, G. A.; MACHADO, M. A. G.; REIS, C. E. R.; SILVA, M. B. Evaluation of fatty acids production by *Chlorella minutissima* in batch bubble-column photobioreactor. **Fuel**, v. 230, n. April, p. 155–162, 2018.

PERRINE, Z.; NEGI, S.; SAYRE, R. T. Optimization of photosynthetic light energy utilization by

microalgae. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 134–142, 2012.

PESO-ECHARRI, P.; FRONTELA-SASETA, C.; SANTAELLA-PASCUAL, M.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABDEL, I.; ROS-BERRUEZO, G.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C. Sodium alginate as feed additive in cultured sea bream (*Sparus aurata*): Does it modify the quality of the flesh? **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 699–705, 2012.

PHADWAL, K.; SINGH, P. . Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 1, p. 55–58, 2003.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSELL, I. Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 104, n. 1, p. 19–31, 21 jan. 1998.

PILTZ, B.; MELKONIAN, M. Immobilized microalgae for nutrient recovery from source-separated human urine. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 421–429, 2018.

PINTO, E.; CARVALHO, A. P.; CARDOZO, K. H. M.; MALCATA, F. X.; ANJOS, F. M. dos; COLEPICCOLO, P. Effects of heavy metals and light levels on the biosynthesis of carotenoids and fatty acids in the macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 349–354, abr. 2011.

PRASETYANINGRUM, A.; DJAENI, M. Drying *Spirulina* with Foam Mat Drying at Medium Temperature. **International Journal of Science and Engineering**, v. 3, n. 2, p. 1–4, 2012.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311–319, 2001.

REDAELLI, C. **Estudo da produção de lipídeos e carotenoides por *Chlorella minutissima* em fotobiorreator**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

RIAL, D.; MURADO, M. A.; MENDUIÑA, A.; FUCIÑOS, P.; GONZÁLEZ, P.; MIRÓN, J.; VÁZQUEZ, J. A. Effects of spill-treating agents on growth kinetics of marine microalgae. **Journal of hazardous materials**, v. 263 Pt 2, p. 374–81, 15 dez. 2013.

RICHARDS, R. G.; MULLINS, B. J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, p. 59–67, 2013.

RIOS, A. D. O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 343–350, 2009.

ROBERT, R.; IYER, P. Isolation and optimization of PHB (poly-B-hydroxybutyrate) from *Pseudoneochloris marina*. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 10, n. 5, p. 32580–32586, 2019.

- ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 195–201, 2009.
- ROBINSON, P. K.; GOULDING, K. H.; MAK, A. L.; TREVAN, M. D. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 12, p. 729–733, 1986.
- RODRIGUES, D. B.; FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial waste. **Food Research International**, v. 65, p. 144–148, 1 nov. 2014. **Food Research International**, v. 65, p. 144–148, 1 nov. 2014.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2103–2111, 2012.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. p. 100, 2008.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H. T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 445–463, 2008.
- RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010.
- RYCKEBOSCH, E.; MUYLEAERT, K.; EECKHOUT, M.; RUYSSSEN, T.; FOUBERT, I. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11063–11069, 2011.
- SAFAFAR, H.; LANGVAD, S.; MØLLER, P.; JACOBSEN, C. Storage Conditions Affect Oxidative Stability and Nutritional Composition of Freeze-Dried *Nannochloropsis salina*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 12, p. 1–10, 2017.
- SAFAFAR, H.; WAGENEN, J. Van; MØLLER, P.; JACOBSEN, C. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7339–7356, 2015.
- SANTOCONO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; FEDELI, D.; FALCIONI, G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 1–10, 2007.

- SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B. de; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216–220, 2016.
- SAYRE, R. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. **BioScience**, v. 60, n. 9, p. 722–727, 1 out. 2010.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica - Volume 2**. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgar Bluger LTDA, 2001.
- SETO, A.; WANG, H. L.; HESSELTINE, C. W. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 5, p. 892–894, 1984.
- SFORZA, E.; SIMIONATO, D.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; MOROSINOTTO, T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.
- SHARONI, Y.; LINNEWIEL-HERMONI, K.; KHANIN, M.; SALMAN, H.; VEPRIK, A.; DANILENKO, M.; LEVY, J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 2, p. 259–269, fev. 2012.
- SHEKARABI, S. P. H.; MEHRGAN, M. S.; RAZI, N.; SABZI, S. Biochemical composition and fatty acid profile of the marine microalga *isochrysis galbana* dried with different methods. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 3, p. 521–524, 2019.
- SHI, X.; WU, Z.; CHEN, F. Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 8, p. 763–768, ago. 2006.
- SHILTON, N. Drying | Chemical Changes. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L.; FINGLAS, P. (Ed.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. second ed. Oxford: Academic Press, 2003. p. 1947–1950.
- SHONTE, T. T.; DUODU, K. G.; DE KOCK, H. L. Effect of drying methods on chemical composition and antioxidant activity of underutilized stinging nettle leaves. **Heliyon**, v. 6, n. 5, 2020.
- SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 255–260, 2010.
- SILVA, N. C.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. Analysis of the use of a non-conventional rotary drum for dehydration of microalga *Spirulina platensis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 2020.

- SIMOPOULOS, A. P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1–17, 2016.
- SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 499–508, 2018.
- SINGH, P.; KUMARI, S.; GULDHE, A.; MISRA, R.; RAWAT, I.; BUX, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1–16, mar. 2016.
- SINGH, R.; PALIWAL, C.; NESAMMA, A. A.; NARULA, A.; JUTUR, P. P. Nutrient Deprivation Mobilizes the Production of Unique Tocopherols as a Stress-Promoting Response in a New Indigenous Isolate *Monoraphidium* sp. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. October, p. 1–13, 2020.
- SINGH, R.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, D. V.; SINGH, J. S.; SINGH, D. P. Photosynthetic performance, nutrient status and lipid yield of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum humicola* under UV-B exposure. **Current Research in Biotechnology**, v. 1, p. 65–77, 2019.
- SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172–215, jun. 2013.
- SMALL, D. P.; HÜNER, N. P. A.; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. **Bioelectromagnetics**, v. 33, n. 4, p. 298–308, 2012.
- SOEHNGE, H.; OUHTIT, A.; ANANTHASWAMY, H. N. MECHANISMS OF INDUCTION OF SKIN CANCER BY UV RADIATION. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 538–551, 1997.
- SOO, C. L.; CHEN, C. A.; BOJO, O.; HII, Y. S. Feasibility of Marine Microalgae Immobilization in Alginate Bead for Marine Water Treatment: Bead Stability, Cell Growth, and Ammonia Removal. **International Journal of Polymer Science**, v. 2017, 2017.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.
- SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; BOONSAWANG, P.; PRASERTSAN, P. Immobilized Oleaginous Microalgae as Effective Two-Phase Purify Unit for Biogas and Anaerobic Digester Effluent Coupling with Lipid Production. **Bioresource Technology**, v. 281, n. January, p. 149–157, 2019.
- STRAMARKOU, M.; PAPADAKI, S.; KYRIAKOPOULOU, K.; KROKIDA, M. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 6, p. 2947–2960, 2017.

- SUN, X. M.; REN, L. J.; BI, Z. Q.; JI, X. J.; ZHAO, Q. Y.; HUANG, H. Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium* sp. under high salinity stress to alleviate oxidative damage and improve lipid biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 267, n. 30, p. 438–444, 2018.
- SYDNEY, T.; MARSHALL-THOMPSON, J. A.; KAPOORE, R. V.; VAIDYANATHAN, S.; PANDHAL, J.; FAIRCLOUGH, J. P. A. **The effect of high-intensity ultraviolet light to elicit microalgal cell lysis and enhance lipid extraction** *Metabolites*, 2018. .
- Taelman, S. E.; DE MEESTER, S.; ROEF, L.; MICHIELS, M.; DEWULF, J. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. **Bioresource technology**, v. 150, p. 513–22, dez. 2013.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 36–39, 1 abr. 2003.
- TANG, H.; ABUNASSER, N.; GARCIA, M. E. D.; CHEN, M.; SIMON NG, K. Y.; SALLEY, S. O. Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3324–3330, 2011.
- TJAHJONO, A. E.; HAYAMA, Y.; KAKIZONO, T.; TERADA, Y.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 133–138, 1994.
- TRIPATHI, U.; RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 419–426, 2002.
- TUR, J. a.; BIBILONI, M. M.; SUREDA, a.; PONS, a. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. S2, p. S23–S52, 2012.
- TYAGI, R.; KUMAR, A.; TYAGI, M.; JHA, P.; D KUMAR, H.; SINHA, R.; HÄDER, D. Protective role of certain chemicals against UV-B-induced damage in the nitrogen-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum*. **Journal of basic microbiology**, v. 43, p. 137–147, 1 maio 2003.
- VARGAS, P. O.; PEREIRA, N. R.; GUIMARÃES, A. O.; WALDMAN, W. R.; PEREIRA, V. R. Shrinkage and deformation during convective drying of calcium alginate. **Lwt**, v. 97, p. 213–222, 2018.
- VAZ, B. da S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de. CO₂ biofixation by the cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the green alga *Chlorella fusca* LEB 111 grown using gas effluents and solid residues of thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.
- VAZ, B. da S.; MOREIRA, J. B.; MORAIS, M. G. de; COSTA, J. A. V. Microalgae as a new source

of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, 2016.

VIGANI, M.; PARISI, C.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; BARBOSA, M. J.; SIJTSMA, L.; PLOEG, M.; ENZING, C. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. **Trends in Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 81–92, 2015.

VISWANATHAN, T.; MANI, S.; DAS, K. C.; CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A. Drying characteristics of a microalgae consortium developed for biofuels production. **Transactions of the ASABE**, v. 54, n. 6, p. 2245–2252, 2012.

WANG, Q.; HOU, Y.; MIAO, J.; LI, G. Effect of UV-B radiation on the growth and antioxidant enzymes of Antarctic sea ice microalgae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 6, p. 1097–1102, 6 nov. 2009.

WATANABE, S.; HIMIZU, A.; LEWIS, L. A.; FLOYD, G. L.; FUERST, P. A. *Pseudoneochloris marina* (Chlorophyta), a new coccoid Ulvophyceae alga, and its phylogenetic position inferred from morphological and molecular data. **Journal of Phycology**, v. 36, n. 3, p. 596–604, 2000.

WULFF, A.; WANGBERG, S.; SUNDBACK, K.; NILSSON, C.; C, G. J.; UNDERWOOD, G. J. C. Community growing on a Effects of UVB radiation on a marine microphytobenthic nutrient under different conditions Sten-Ake. **Limnology**, v. 45, n. 5, p. 1144–1152, 2011.

YEN, H. W.; SUN, C. H.; MA, T. W. The comparison of lutein production by *scenedesmus* sp. in the autotrophic and the mixotrophic cultivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 353–361, 2011.

YODKAEW, P.; CHINDAPAN, N.; DEVAHASTIN, S. Influences of Superheated Steam Roasting and Water Activity Control as Oxidation Mitigation Methods on Physicochemical Properties, Lipid Oxidation, and Free Fatty Acids Compositions of Roasted Rice. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 1, p. 69–79, 2017.

ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M. Differential response of growth, photosynthesis, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 3, p. 466–474, 2009.

ZHANG, X.; TANG, X.; ZHOU, B.; HU, S.; WANG, Y. Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 469, p. 27–35, 2015.

ZHANG, X.; YIN, W.; QI, Y.; LI, X.; ZHANG, W.; HE, G. Microencapsulation of astaxanthin in alginate using modified emulsion technology: Preparation, characterization, and cytostatic activity. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 95, n. 3, p. 412–419, 2017.

ZHANG, Y.-M.; CHEN, H.; HE, C.-L.; WANG, Q. Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69225, 16 jul. 2013.

ZHANG, Y.; ZHU, X.; HUANG, T.; CHEN, L.; LIU, Y.; LI, Q.; SONG, J.; MA, S.; ZHANG, K.; YANG, B.; GUAN, F. β -Carotene synergistically enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on esophageal squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. **Toxicology Letters**, v. 261, p. 49–58, 2016.

ZHANG, Z. H.; PENG, H.; MA, H.; ZENG, X. A. Effect of inlet air drying temperatures on the physicochemical properties and antioxidant activity of whey protein isolate-kale leaves chlorophyll (WPI-CH) microcapsules. **Journal of Food Engineering**, v. 245, n. October 2018, p. 149–156, 2019.

ZHU, S.; HUANG, W.; XU, J.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 292–298, 2014.

APÊNDICES

Neste apêndice constam os resultados não apresentados nos artigos, abordando experimentos preliminares necessários para a condução e/ou otimização dos experimentos abordados nos tópicos 7 e 8.

O apêndice A aborda a viabilidade de cultivo de *C. minutissima* na forma imobilizada em esferas de alginato de cálcio, sendo realizado em fotobiorreatores de 500 mL, avaliando o efeito da concentração de nitrogênio na produção de pigmentos e na composição centesimal da biomassa. Sendo publicado na forma de trabalho completo nos Anais do **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA)**, em agosto de 2018. Este trabalho serviu como etapa preliminar para posterior condução dos experimentos em fotobiorreatores air-lift (2,4 L).

O Apêndice B traz resultados obtidos após a publicação do artigo sobre imobilização de *C. minutissima*, e compara a concentração de biomassa e o perfil de carotenoides obtidos em cultivos de *C. minutissima* na forma livre e imobilizada.

APÊNDICE A

***Chlorella minutissima* IMOBILIZADA EM ESFERAS DE ALGINATO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E NA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL**

Lenon Medeiros Buaer¹, Aline Rey Möller¹, Eliseu Rodrigues¹, Rosane Rech¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor para correspondências: lenonbauer@hotmail.com

RESUMO

As microalgas são ricas em compostos de alto valor econômico, no entanto, os custos de produção ainda são altos. Nesse contexto, destaca-se a aplicação da imobilização celular que apresenta vantagens econômicas sobre as células livres pela facilidade na etapa de colheita das algas, gerando um consumo menor de energia. Além disso, o estudo nutricional das microalgas ajuda a elucidar as melhores condições para estimular a síntese de compostos bioativos de interesse. Nesse trabalho imobilizamos células de *Chlorella minutissima* em esferas de alginato e avaliamos o efeito de diferentes níveis de nitrogênio (48 a 96 mg L⁻¹) sobre a produção de pigmentos, proteínas e lipídios. Os resultados indicam que o aumento da concentração de nitrogênio está diretamente relacionado ao aumento da síntese de clorofilas, carotenoides e também de proteínas na biomassa final, obtendo com a maior concentração de nitrogênio um aumento destes compostos de 2,4; 1,6 e 1,7 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Com isto, foi possível obter maiores concentrações de compostos de alto valor agregado, o que aliado a técnica de imobilização auxilia na redução dos custos de produção de microalgas.

Palavras-chave: carotenoides; clorofilas; imobilização; microalgas; pigmentos

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos fotossintéticos que apresentam uma biomassa rica em compostos bioativos, tais como, ácidos graxos essenciais, carotenoides, clorofilas, vitaminas e uma gama de compostos com elevado interesse biotecnológico (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Com isso sua biomassa tem sido utilizada na suplementação de alimentos (DRAAISMA et al., 2013), na indústria farmacêutica (MAKI et al., 2014) assim como na aquicultura (TAELMAN et al., 2013).

A colheita de biomassa de algas é uma preocupação significativa que precisa ser tratada adequadamente. Dependendo da espécie, densidade celular e condições de cultura, estima-se que a colheita de biomassa de algas contribua de 20 a 30% para o custo total de produção (DASSEY; THEEGALA, 2013). Comparado às células livres, células imobilizadas são mais facilmente colhidas pelo simples método de peneiramento sem alto consumo de energia (LAM; LEE, 2012). Relacionando os custos de material para imobilização com os custos de energia gastos na colheita de células livres, obtém-se uma economia de 90 % com a utilização de células imobilizadas, tornando a imobilização economicamente atraente para o cultivo de microalgas (DASSEY; THEEGALA, 2013; CHEIRSILP; THAWECHAI; PRASERTSAN, 2017). O método mais comum de imobilização é o aprisionamento em esferas de alginato de cálcio, o qual é atóxico e de alta transparência, ideal para cultivos de microalgas (LAM; LEE, 2012). O alginato é extraído da parede celular de algas marrons, é utilizado na indústria de alimentos como emulsificante, bem como na produção de fármacos.

Visando viabilizar a produção de microalgas e seus compostos bioativos e nutricionais, estudos sobre a nutrição de microalgas vem sendo realizados, permitindo avaliar sua influência no crescimento e na produtividade do fitoplâncton. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do nitrogênio na produção de pigmentos, proteínas e lipídios em cultivos de *C. minutissima* imobilizadas em esferas de alginato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste estudo foi utilizada a microalga *Chlorella minutissima*, pertencente ao banco de algas do Laboratório de Bioengenharia, ICTA/UFRGS. As células foram mantidas em frascos Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio de cultura f/2 a 20 °C sob um fotoperíodo

de 12/12 h (claro/escuro). Inóculos foram preparados usando 7,5 mL de microalgas inoculadas em 67,5 mL de meio f/2 em frascos Erlenmeyer (250 mL). Os frascos foram incubados em um agitador rotatório (28 °C, iluminação contínua de 5,8 klx) durante 7 dias.

2.2 IMOBILIZAÇÃO DE *C. minutissima* EM ESFERAS DE ALGINATO

A microalga foi imobilizada em esferas de gel de alginato de acordo com o procedimento modificado de Moreira et al., (2006), 75 mL de inóculo foram misturados a 75 mL de alginato de sódio 8 % (previamente autoclavado), produzindo uma solução alginato-alga 4 %. Através de uma bomba peristáltica, a solução foi gotejada em 400 mL de CaCl₂ 4 % sob agitação suave, formando as esferas de alginato de cálcio (diâmetro aproximado de 4 mm). As esferas foram mantidas sob imersão por 1 h para estabilização, lavadas com água destilada estéril e transferidas para os fotobiorreatores (FBRs).

2.3 CULTIVO DE *C. minutissima* IMOBILIZADA

Os cultivos foram realizados em FBRs com volume total de 500 mL, preenchidos com 150 mL de esferas e 300 mL de meio f/2 com diferentes concentrações de NaNO₃ (300, 400, 500 e 600 mg L⁻¹), que correspondem a 48 mg L⁻¹ (Controle), 64 mg L⁻¹, 80 mg L⁻¹ e 96 mg L⁻¹ de N-NO₃, respectivamente, a 25 ± 1 °C, vazão de 2 L min⁻¹ de ar comprimido e iluminação contínua de 18 klx, durante 11 dias. Os cultivos foram realizados em duplicata. No final do cultivo as esferas foram dissolvidas em citrato de sódio 3 %, a biomassa foi centrifugada (10000 × g, 10 min), congelada (-70 °C) e liofilizada (72 h) para posterior análise.

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E DOS PIGMENTOS

O consumo de nitrato foi determinado por espectrofotometria (410 nm) pelo método proposto por Cataldo et. al. (1975), correlacionando as absorbâncias com uma curva de N-NO₃. A concentração dos pigmentos foi realizada através do rompimento das esferas de alginato de cálcio. Dez esferas foram dissolvidas em 2 mL de citrato de sódio 3 % através de um agitador orbital durante 15 min, e centrifugadas (10000 × g, 10 min) para análise de pigmentos (MOREIRA et al., 2006). O teor de clorofila total (Chl *a* + Chl *b*) e carotenoides totais foi determinado por espectrofotometria a 664, 649 e 470 nm, mediante extração com etanol P.A. 95 %, segundo Lichtenthaler e Buschmann (2005). Para tal, utilizou-se as Equações 1, 2 e 3.

$$\text{Chl } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13,36 (\text{Abs}_{664}) - 5,19 (\text{Abs}_{649}) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 27,43 (\text{Abs}_{649}) - 8,12 (\text{Abs}_{664}) \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides totais (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{1000 (\text{Abs}_{470}) - 2,13 (\text{Chl } a) - 97,64 (\text{Chl } b)}{209} \quad (3)$$

2.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico proposto por Lowry et al., (1951). O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente pelo método adaptado proposto por Bligh e Dyer, (1959). Os dados foram submetidos à análise estatísticas de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$) e expressos na forma de massa de lipídeos ou proteínas por biomassa de algas seca (% , fração mássica).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam um aumento linear da concentração de clorofilas e carotenoides com o aumento da concentração de nitrogênio, até o sexto dia de cultivo, após esse período as concentrações foram limitadas pela concentração de nitrogênio no meio de cultivo. No oitavo dia de cultivo, a maior concentração de nitrogênio obteve uma concentração de clorofilas 2,4 vezes superior ao controle ($46 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$) (Figura 1a).

Os teores de clorofilas com 48 e $64 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3$ começaram a decair após o sexto dia, no mesmo período em que houve o consumo total de nitrogênio em ambas as condições (Figura 2). Enquanto que, com 80 e 96 mg L^{-1} a redução de clorofilas ocorreu a partir do oitavo dia, havendo consumo total de nitrogênio no mesmo período de tempo. Esse fato ocorre pois a ausência de nitrogênio infere diretamente na produção de clorofila, e conseqüentemente na concentração celular das microalgas (LI et al., 2008b; RIAL et al., 2013).

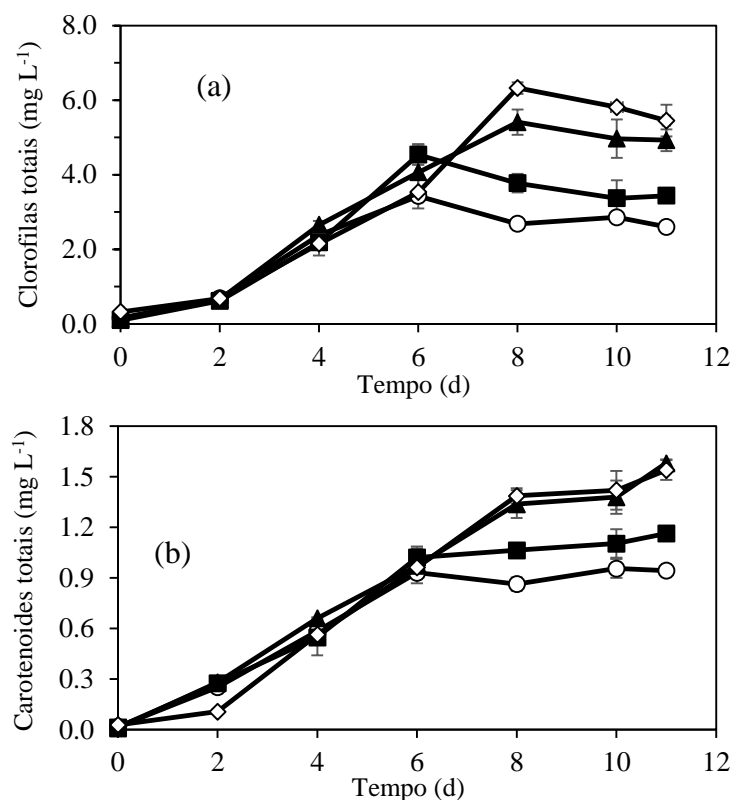


Figura 1 – Efeito do $N-NO_3$ na cinética de clorofilas totais (a) e carotenoides totais (b) em cultivos de *C. minutissima* imobilizadas em esferas de alginato. (○) 48 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (■) 64 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (▲) 80 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (◇) 96 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$.

As concentrações de nitrogênio de 80 $mg L^{-1}$ e 96 $mg L^{-1}$ também resultaram nos maiores teores de carotenoides totais na célula, $1,58 \pm 0,02 mg L^{-1}$ e $1,54 \pm 0,06 mg L^{-1}$, cerca de 1,7 e 1,6 vezes maior que o controle, respectivamente. Tais condições demonstram ser boas alternativas quando se almeja a produção deste pigmento em microalgas.

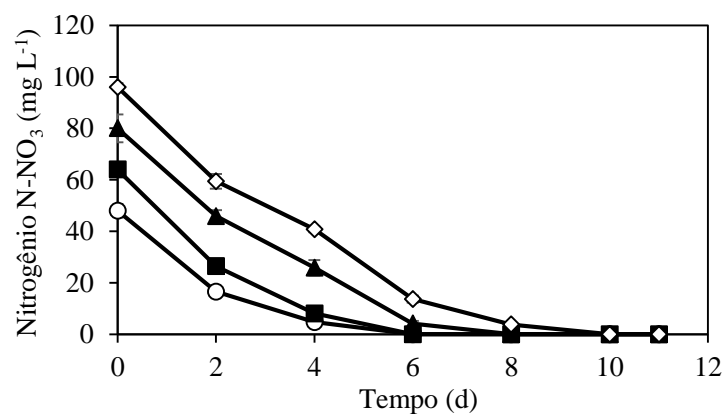


Figura 2 - Consumo de $N-NO_3$ de *C. minutissima* imobilizada cultivada sob diferentes concentrações de $NaNO_3$. (○) 48 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (■) 64 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (▲) 80 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$ (◇) 96 $mg L^{-1}$ $N-NO_3$.

Além do seu papel importante na fotossíntese microalgal, clorofilas e carotenoides apresentam alto valor de mercado, estes pigmentos, assim como outros corantes naturais, são mais seguros e saudáveis do que as alternativas sintéticas, o que é importante para as indústrias de alimentos, as quais vêm seguindo a tendência de oferecer alimentos mais naturais aos consumidores (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Além disto, sua aplicação como nutracêuticos vem ganhando atenção por apresentarem capacidade antioxidante (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011), desintoxicante, anti-inflamatórias e preventivas sobre o câncer (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; MCQUISTAN et al., 2012; SHARONI et al., 2012) e a degeneração macular (KOO; NEURINGER; SANGIOVANNI, 2014), o que estimula sua aplicação na indústria farmacêutica.

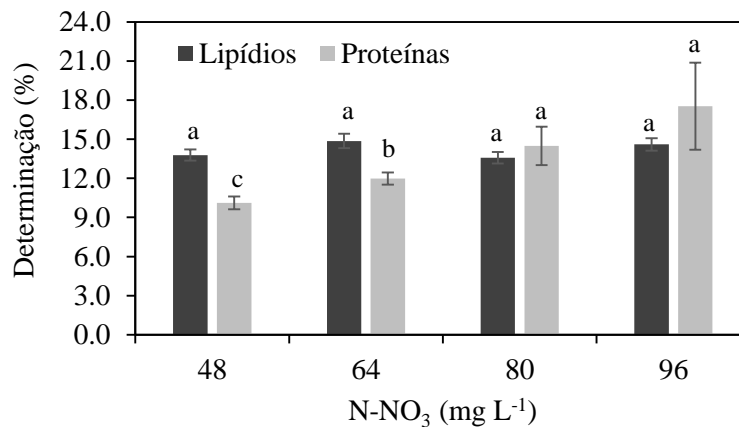


Figura 3 – Teor de proteínas e lipídios na biomassa de *C. minutissima* imobilizada cultivada com diferentes concentrações de N-NO₃. (○) 48 mg L⁻¹ N-NO₃ (■) 64 mg L⁻¹ N-NO₃ (▲) 80 mg L⁻¹ N-NO₃ (◇) 96 mg L⁻¹ N-NO₃. Letras iguais para o mesmo parâmetro indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teor de lipídios não foi afetado significativamente ($p \leq 0,05$) pela concentração de nitrogênio (Figura 3). No entanto o teor de proteínas na biomassa aumentou em 1,2 (64 mg L⁻¹), 1,4 (80 mg L⁻¹) e 1,7 vezes (96 mg L⁻¹) em relação ao controle (10,1 ± 0,5 %). Promovendo o enriquecimento proteico da biomassa *C. minutissima*. As microalgas acumulam nitrogênio intracelular na forma de uma variedade de compostos (aminoácidos, proteínas, RNA e pigmentos). Esses compostos servem como reservatório de armazenamento de nitrogênio a longo prazo, a perda de proteínas é geralmente resultado da falta de nitrogênio (DORTCH et al., 1984).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível constatar a influência do nitrogênio na concentração de pigmentos e proteínas, obtendo maiores concentrações destes compostos com o aumento de nitrogênio. Com isto, foi possível unir o enriquecimento nutricional da biomassa com a facilidade da etapa de colheita das células imobilizadas, sem envolver grandes quantidades de energia, agregando valor e reduzindo custo ao cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) pelo apoio financeiro.

5. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 163–173, 12 jan. 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, 1959.
- CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.
- CHEIRSILP, B.; THAWECHAI, T.; PRASERTSAN, P. Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 787–794, 2017.
- DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 241–245, 2013.
- DORTCH, Q.; CLAYTON, J. R.; THORESEN, S. S.; AHMED, S. I. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. **Marine Biology**, v. 81, n. 3, p. 237–250, 1984.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1–12, jan. 2007.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, out. 2014.
- KOO, E.; NEURINGER, M.; SANGIOVANNI, J. P. Macular xanthophylls, lipoprotein-related genes, and age-related macular degeneration. **The American journal of clinical nutrition**, n. Supplement 1, p. 336S–46S, jul. 2014.

- LAM, M. K.; LEE, K. T. Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 191, p. 263–268, 2012.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629–636, 2008.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Handbook of Food Analytical Chemistry**, v. 2–2, p. 171–178, nov. 2005.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1 nov. 1951.
- MAKI, K. C.; YURKO-MAURO, K.; DICKLIN, M. R.; SCHILD, A. L.; GEOHAS, J. G. A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 91, n. 4, p. 141–8, out. 2014.
- MCQUISTAN, T. J.; SIMONICH, M. T.; PRATT, M. M.; PEREIRA, C. B.; HENDRICKS, J. D.; DASHWOOD, R. H.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S. Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 341–352, 2012.
- MOREIRA, S. M.; MOREIRA-SANTOS, M.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 135–141, 3 jan. 2006.
- RIAL, D.; MURADO, M. A.; MENDUIÑA, A.; FUCIÑOS, P.; GONZÁLEZ, P.; MIRÓN, J.; VÁZQUEZ, J. A. Effects of spill-treating agents on growth kinetics of marine microalgae. **Journal of hazardous materials**, v. 263 Pt 2, p. 374–81, 15 dez. 2013.
- SHARONI, Y.; LINNEWIEL-HERMONI, K.; KHANIN, M.; SALMAN, H.; VEPRIK, A.; DANILENKO, M.; LEVY, J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 2, p. 259–269, fev. 2012.
- TAELMAN, S. E.; DE MEESTER, S.; ROEF, L.; MICHIELS, M.; DEWULF, J. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. **Bioresource technology**, v. 150, p. 513–22, dez. 2013.

APÊNDICE B

Comparativo entre o cultivo de células livres e imobilizadas de *C. minutissima* em relação a concentração de biomassa e o perfil de carotenoides. A concentração inicial de nitrogênio foi de 48 mg L⁻¹ N-NO₃.

Tabela 1 – Concentração de biomassa e perfil de carotenoides de *Chlorella minutissima* cultivada na forma livre e imobilizada com 48 mg L⁻¹ N-NO₃.

Carotenoides (mg g ⁻¹)	Célula livre	Célula Imobilizada
all- <i>trans</i> -violaxantina	0,45 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^b
<i>cis</i> -violaxanthin	0,36 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,05 ^a
13- <i>cis</i> -luteína	0,35 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,02 ^a
13'- <i>cis</i> -luteína	0,15 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,01 ^b
all- <i>trans</i> -luteína	3,11 ± 0,06 ^a	2,91 ± 0,16 ^a
all- <i>trans</i> -zeaxantina	0,53 ± 0,01 ^b	1,17 ± 0,06 ^a
<i>cis</i> -zeaxantina	0,09 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^b
15- <i>cis</i> -β-caroteno	0,10 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
all- <i>trans</i> -α-caroteno	0,92 ± 0,02 ^a	0,79 ± 0,04 ^b
13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,41 ± 0,01 ^a	0,35 ± 0,02 ^b
all- <i>trans</i> -β-caroteno	1,26 ± 0,05 ^a	1,25 ± 0,07 ^a
9- <i>cis</i> -β-caroteno	0,69 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,03 ^a
Carotenoides totais	8,43 ± 0,14 ^a	8,29 ± 0,31 ^a
Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	1,29 ± 0,06 ^a	1,36 ± 0,01 ^a

Os resultados representam os valores médios ± desvio padrão (em duplicata).

Letras diferentes na mesma linha correspondem a uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.