

Nicole Marques Costa

**MONITORIZAÇÃO DE PIGMENTOS NA
PRODUÇÃO DE MICROALGAS**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas

2023

Nicole Marques Costa

**MONITORIZAÇÃO DE PIGMENTOS
NA PRODUÇÃO DE MICROALGAS**

**Mestrado em Ciências Biomédicas –
Mecanismos de Doenças**

Orientador:

Prof. Dr. José Bragança

Co-orientador:

Dra. Mariana Carneiro



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas 2023

Declaração de autoria de trabalho

MONITORIZAÇÃO DE PIGMENTOS NA PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída,

Nicole Marques Costa

Copyright ©Nicole Marques Costa

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, acima de tudo, aos meus pais, Bárbara e Manuel, pois sem eles nunca tinha chegado tão longe. Apoiaram-me sempre, desde financeiramente como psicologicamente. Foram um apoio fundamental.

Ao meu companheiro Tomás, que sempre me deu apoio e acreditou que eu seria capaz e sempre me mostrou o melhor caminho a seguir.

Aos meus orientadores Mariana Carneiro e José Bragança, por me terem apoiado durante todo o processo, especialmente a minha orientadora Mariana Carneiro que me deu uma enorme ajuda na parte laboratorial e na construção do Relatório de Estágio.

À Necton S.A, pela experiência que consegui ter, aos seus trabalhadores, que foram excelentes colegas e amigos.

Um agradecimento especial á minha amiga Merve, uma amizade que construí no meu estágio na Necton S. A., que me deu uma enorme ajuda no relatório e principalmente na parte psicológica.

RESUMO

As microalgas e as cianobactérias representam um grupo de organismos fotossintéticos que são ricos em pigmentos, tais como a clorofila, carotenoides e ficobiliproteínas. Estes pigmentos, como por exemplo a fucoxantina, têm um elevado interesse no mercado da cosmética, nutracêutica e farmacêutica. A fucoxantina é um carotenoide (xantofila) que contém uma elevada procura devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiobesidade e antidiabética. A fucoxantina pode ser encontrada no meio natural em macro- e microalgas, mas a sua produção sintética não é viável por razões económicas. Devido à importância destes pigmentos, torna-se importante monitorizar a variação do conteúdo destes pigmentos na biomassa num contexto de produção industrial para melhorar a sua produtividade. A Necton S.A. é uma empresa produtora de microalgas inclusive de espécies que contêm um alto conteúdo de fucoxantina, como a *Tisochrysis lutea* (haptófita) e a *Phaeodactylum tricornutum* (diatomácea), que caracteriza as células com uma tonalidade acastanhada. Este relatório tem dois objetivos principais, primeiro testar um método de quantificação espectralométrica de fucoxantina, que será validado com uma quantificação standard por cromatografia líquida (HPLC), de forma a obter um método mais rápido de quantificação. Após a seleção do melhor método, o segundo objetivo foca-se na monitorização do conteúdo de fucoxantina das microalgas ao longo da produção em fotobioreatores tubulares elucidará o efeito dos diferentes fatores abióticos como a luz e a temperatura na produção deste pigmento. Estes objetivos ajudarão a otimizar a produtividade de fucoxantina e a maximizar a valorização da biomassa final.

Palavras-chave: Microalgas, Pigmentos, Fucoxantina, Espectrofotometria.

ABSTRACT

Microalgae and cyanobacteria represent a group of photosynthetic organisms that are rich in pigments, such as chlorophyll, carotenoids and phycobiliproteins. These pigments, such as fucoxanthin, are of great interest in the cosmetics, nutraceutical and pharmaceutical markets. Fucoxanthin is a carotenoid (xanthophyll) that is in high demand due to its anti-inflammatory, antioxidant, anti-obesity and anti-diabetic properties. Fucoxanthin can be found naturally in macro and microalgae, but its synthetic production is not viable for economic reasons. Due to the importance of these pigments, it is important to monitor the variation of these pigments content in the algal biomass in an industrial production context to improve its productivity. Necton S.A. is a company that produces microalgae, including species that contain a high content of fucoxanthin, such as *Tisochrysis lutea* (haptophyte) and *Phaeodactylum tricorutum* (diatom), which provides a brownish tone to the cells. This report has two main objectives, the first is to test a fucoxanthin spectrophotometric quantification method, which will be validated using liquid chromatography (HPLC) quantification results, in order to obtain a faster quantification method. After selecting the best method, the second objective focuses on the monitorization of the fucoxanthin content of microalgae throughout production in tubular photobioreactors will elucidate the effect of different abiotic factors, such as light and temperature on the production of this pigment. These objectives will help to improve fucoxanthin productivity and maximize the valorization of the final biomass.

Keywords: Microalgae, Pigments, Fucoxanthin, Spectrophotometry.

INDÍCE

I. INTRODUÇÃO	1
1. MICROALGAS E O SEU POTENCIAL.....	1
1.1. INDÚSTRIA ALIMENTAR.....	4
1.2. AQUACULTURA.....	5
1.3. INDÚSTRIA COSMÉTICA E FARMACÊUTICA.....	5
2. PIGMENTOS.....	6
2.1. FICOBILIPROTEÍNAS.....	7
2.2. CLOROFILAS.....	7
2.3. CAROTENÓIDES.....	8
3. FUCOXANTINA.....	10
3.1. MÉTODOS DE ANÁLISE DE PIGMENTOS.....	13
4. NECTON S.A.	16
4.1. SCALE-UP.....	16
5. OBJETIVO DO TRABALHO.....	18
II. MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Validar o método de medição por espectrofotometria com <i>Tisochrysis lutea</i>	19
1.1. Método de medição por espectrofotometria segundo Wang (2018).	20
1.2. Método de medição por espectrofotometria modificado.....	21
2. Monitorização dos pigmentos ao longo do processamento de <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	24
III. RESULTADOS	26
1. Validar o método de medição por espectrofotometria com <i>Tisochrysis lutea</i>	26
2. Variação dos pigmentos no processo de colheita em <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	32
IV. DISCUSSÃO	34
1. Validar o método de medição por espectrofotometria com <i>Tisochrysis lutea</i>	34
2. Variação dos pigmentos no processo de colheita em <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35
V. CONCLUSÃO	36
VI. CONTRIBUIÇÃO PESSOAL	37
BIBLIOGRAFIA	38

Índice de figuras

Figura 1 – Distribuição de organismos marinhos usados em aplicações farmacêuticas e alimentícias da biotecnologia marinha (Daniotti e Re 2021).

Figura 2 - Fotografias tiradas no microscópio das espécies *Phaeodactylum tricornutum* (1), *Tetraselmis chuii* (2), *Scenedesmus obliquus* (3) e *Koliella antarctica* (4).

Figura 3 – Esquema com as principais classes de microalgas e espécies, e os seus respetivos metabolitos e atividades biológicas associadas. Este esquema foi baseado em Vieira et al. 2020.

Figura 4 - Exemplos de xantofilas e de carotenos.

Figura 5 - Vantagens da utilização de pigmentos na saúde humana e na prevenção de doenças.

Figura 6 - Esquema que evidencia as diferentes bioatividades que o pigmento fucoxantina nos pode oferecer e as suas aplicações em diversas indústrias.

Figura 7 – Espectro de absorção da clorofila e carotenoides (Aboonajmi & Faridi, 2016)

Figura 8 - Comparação do método utilizando o espectrofotómetro e o método HPLC.

Figura 9 - Processo de *scale-up* utilizado na produção de microalgas na empresa Necton S.A.

Figura 10 – Fotografias dos equipamentos utilizados para fazer o processo scale-up e por fim a centrifugação. (a) Bubble column; (b) Green Walls/ flat pannel); (c) - Fotobiorreatores Tubulares; (d) Centrifugas.

Figura 11 e 12- Esquema do protocolo utilizado para validar o método de medição por espetofotometria com *Tisochrysis lutea*.

Figura 13 - Gráfico da reta de calibração entre a Densidade Ótica a 750 nm e o Peso Seco em g/L da espécie T. lutea.

Figura 14 - Esquema do protocolo modificado de medição por espetofotometria com um passo extra (passo 5) de centrifugação.

Figura 15 – Esquema do protocolo modificado de medição por espetofotometria com um passo extra (passo 4) de correção da turbidez no extrato ao subtrair o valor de 750 nm a cada absorvância.

Figura 16 - Esquema do protocolo modificado utilizado para validar o método de medição por espetofotometria com *Tisochrysis lutea* com a utilização de um valor teórico de absorvância a 750 nm (passo 1), a utilização de microbeads (passo 4), a utilização da

centrifugação antes de medir a DO (passo 9) e a correção da turbidez no extrato ao subtrair o valor de 750 nm a cada absorvância.

Figura 17 - Processo de colheita diária (Fotobiorreatores Tubulares, Green Walls, Depósito de Colheita e pasta de microalgas) para a quantificação de pigmentos.

Figura 18 - Gráfico da correlação da fucoxantina (% PS) das amostras entre HPLC e Wang, com outliers.

Figura 19 - Gráfico da correlação da fucoxantina (% PS) das amostras entre HPLC e Wang.

Figura 20 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado.

Figura 21 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads*).

Figura 22 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* e centrifuga).

Figura 23 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido).

Figura 24 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang modificado (*microbeads*+ centrifuga) e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido).

Figura 25 – Gráfico que representa a correlação entre a fucoxantina e as temperaturas mínimas, máximas e médias.

Figura 26 - Gráfico que representa Fucoxantia/Temperatura máxima.

Figura 27 – Amostras de cultura de *Tisochrysis lutea* depois da tentativa de homogeneização.

Índice de tabelas

Tabela 1 - que representa algumas espécies de microalgas e o respetivo conteúdo de fucoxantina (mg/g PS) (Lourenço-Lopes et al., 2021, Gao et al., 2020).

Tabela 2 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado).

Tabela 3- Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (microbeads)).

Tabela 4 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (microbeads e centrifuga)).

Tabela 5 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (microbeads + centrifuga + 750 corrigido)).

Tabela 6 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang modificado (microbeads + centrifuga) e Wang modificado (microbeads + centrifuga + 750 corrigido)).

Tabela 7 - Resultados da correlação de Pearson (r) entre a concentração de fucoxantina e as diferentes variáveis abióticas medidas.

Lista de acrónimos

DO - Densidade ótica

EPA - Ácido eicosapentaenóico

GWs - *Green Walls*

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

ICR - *Institute of Cancer Research*

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico

PS – Peso seco

PUFAs – *Polyunsaturated fatty acid* (ácidos gordos polinsaturados)

UV – Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

1. MICROALGAS E O SEU POTENCIAL

Os oceanos constituem cerca de 70% do planeta Terra e albergam mais do que 1 milhão de espécies macroscópicas (e.g., corais, algas, peixes) e cerca de 1 bilião de diferentes espécies de microrganismos (e.g., vírus, bactérias, microalgas, fungos) (Daniotti & Re, 2021). Pelo facto de cada região oceânica diferir em vários fatores, como por exemplo na temperatura, salinidade, luz solar, as espécies, conforme o meio em que vivem, vão desenvolver características que as tornam únicas, o que faz com que existam inúmeras espécies diferentes nos oceanos (Daniotti & Re, 2021; Rasmussen & Morrissey, 2007). Esta enorme variedade, causa um interesse na comunidade científica, que procura nestas mesmas espécies, uma diversidade de compostos naturais incentivando à pesquisa de novas substâncias bioativas extraídas destes organismos para fins industriais (Daniotti & Re, 2021). Na Figura 1 está representada a distribuição dos organismos marinhos utilizados em aplicações farmacêuticas e alimentícias da biotecnologia marinha (Daniotti & Re, 2021).

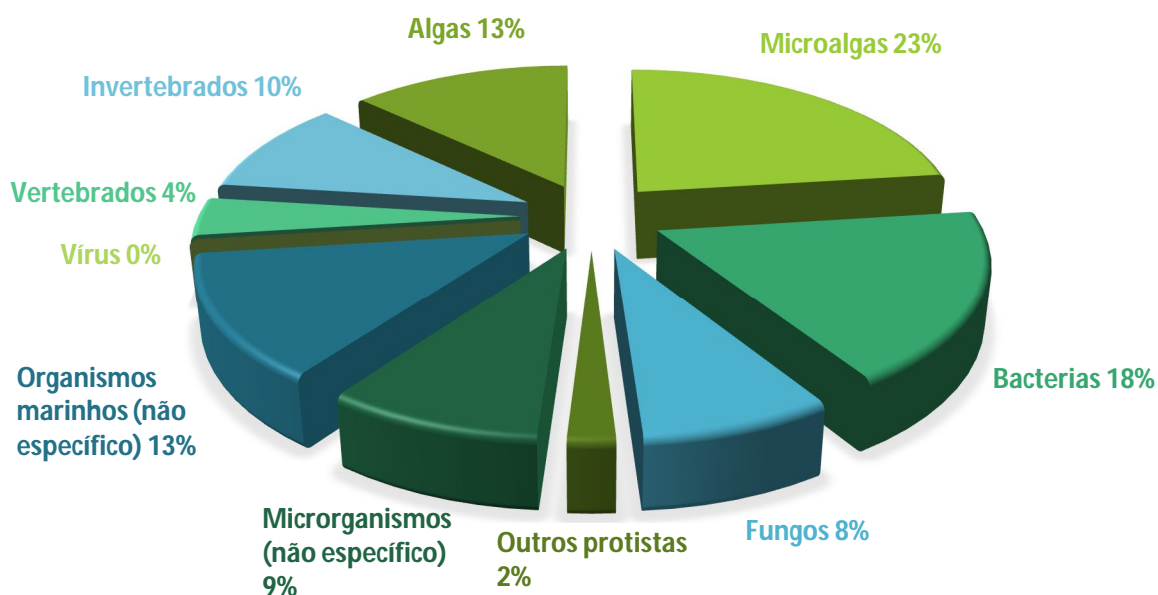


Figura 1 - Distribuição de organismos marinhos usados em aplicações farmacêuticas e alimentícias (Daniotti e Re 2021).

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres (Rizwan et al., 2018). Compreendem filós muito diversificados tais como as Clorofitas (e.g., *Tetraselmis chui*), Rodofitas (e.g., *Porphyridium cruentum*), Bacilariofitas (e.g., *Phaeodactylum tricornutum*) e Haptofitas (e.g., *Tisochrysis lutea*) entre outros (Pulz & Gross, 2004)(figura 2).

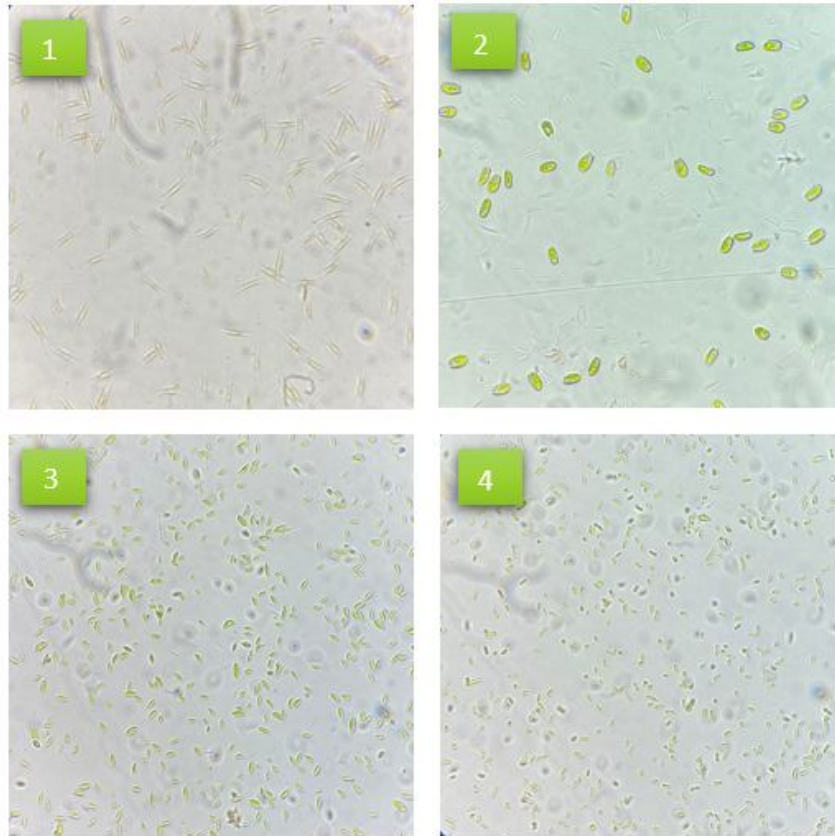


Figura 2 – Fotografias tiradas no microscópio das espécies *P. tricornutum* (1), *T. chuii* (2), *Scenedesmus obliquus* (3) e *Koliella antarctica* (4).

As microalgas são micro-organismos que utilizam a energia da luz para sintetizar vários compostos de carbono (autotróficos), como pigmentos, proteínas ou ácidos gordos, apesar de também poderem crescer em modo heterotrófico ou mixotrófico (Grobbelaar, 2004; Kay & Barton, 1991; Rasmussen & Morrissey, 2007; Tang et al., 2020; Yap & Chen, 2001). Vários destes compostos, tais como a fucoxantina e o ácido eicosapentaenóico (EPA), têm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, entre outras (Vieira et al.,

2020). Outro exemplo é a ficocianina que tem vindo a ser estudada devido às suas atividades antioxidante e anti-inflamatória além de potencializar o sistema imunológico (Morocho-Jácome et al., 2020). Estes microrganismos têm bastante interesse económico devido às suas propriedades anteriormente referidas e por terem interesse no campo da sustentabilidade, o que é extremamente relevante nos dias que decorrem. As microalgas são uma boa fonte de proteína pois contêm quantidades similares à quantidade de proteína que o leite, carne e os ovos têm. No caso da população vegetariana, o consumo de microalgas na sua alimentação é algo vantajoso visto que, por exemplo, a *Spirulina* contém cerca de 60-70% de proteína por matéria seca, enquanto o frango, por exemplo, contém cerca de 19-24% de proteína por matéria seca. A produção de proteína animal consome cerca de 100 vezes mais água do que a mesma quantidade de proteína na produção de origem vegetal. Além disso, as microalgas marinhas podem ser cultivadas quase sem a necessidade de utilização de água doce (Koyande et al., 2019). Tanto as matérias-primas necessária para obter os pigmentos como o seu custo de produção, ficam mais económicos utilizando fontes sintéticas do que fontes naturais. No entanto, existe uma enorme procura por pigmentos produzidos naturalmente, devido á sua maior segurança e sustentabilidade em relação aos produtos de origem sintética. Um exemplo é o da indústria alimentar na procura de corantes naturais (Koyande et al., 2019). O cultivo de microalgas não tem impacto negativo significativo na segurança alimentar ou nas cadeias alimentares, visto que o processo de cultivo não interfere no uso de terras aráveis ou férteis que são utilizadas na agricultura convencional. Adicionalmente, as microalgas são capazes de sobreviver em águas residuais, água salgada, e toleram uma ampla faixa de pH e temperaturas extremas (Tang et al., 2020). As microalgas, além disso, apresentam baixas exigências nutricionais e espaciais de cultivo. O cultivo de microalgas exige poucos nutrientes/requisitos, tais como a luz, fontes de carbono, azoto, fósforo e potássio, sem a necessidade de utilizar pesticidas ou herbicidas. Devido ao facto de as microalgas utilizarem dióxido de carbono como fonte de nutrientes, elas ajudam a reduzir o efeito de estufa e o aquecimento global (Tang et al., 2020). Os biocombustíveis são um bom exemplo do papel relevante que as microalgas têm em termos do reduzido impacto no meio ambiente (Rizwan et al., 2018). São também utilizadas em outros setores, tais como na nutrição humana e infantil – e.g., na formulação de leite –, como suplementos dietéticos (Rasmussen & Morrissey, 2007) –, nas rações para animais – aquacultura – e na produção de cosméticos, pigmentos, drogas antimicrobianas, antivirais, antibacterianas, anticancerígenas (Rizwan et al., 2018).

Como mostra a figura 3, as microalgas contêm uma enorme variedade de espécies que possuem diversos metabolitos e atividades biológicas. A diatomácea *P. tricornutum*, por exemplo, possui fucoxantina e EPA que têm o poder de melhorar a resistência à insulina, capacidade anti-inflamatória, entre outros (Vieira et al., 2020)

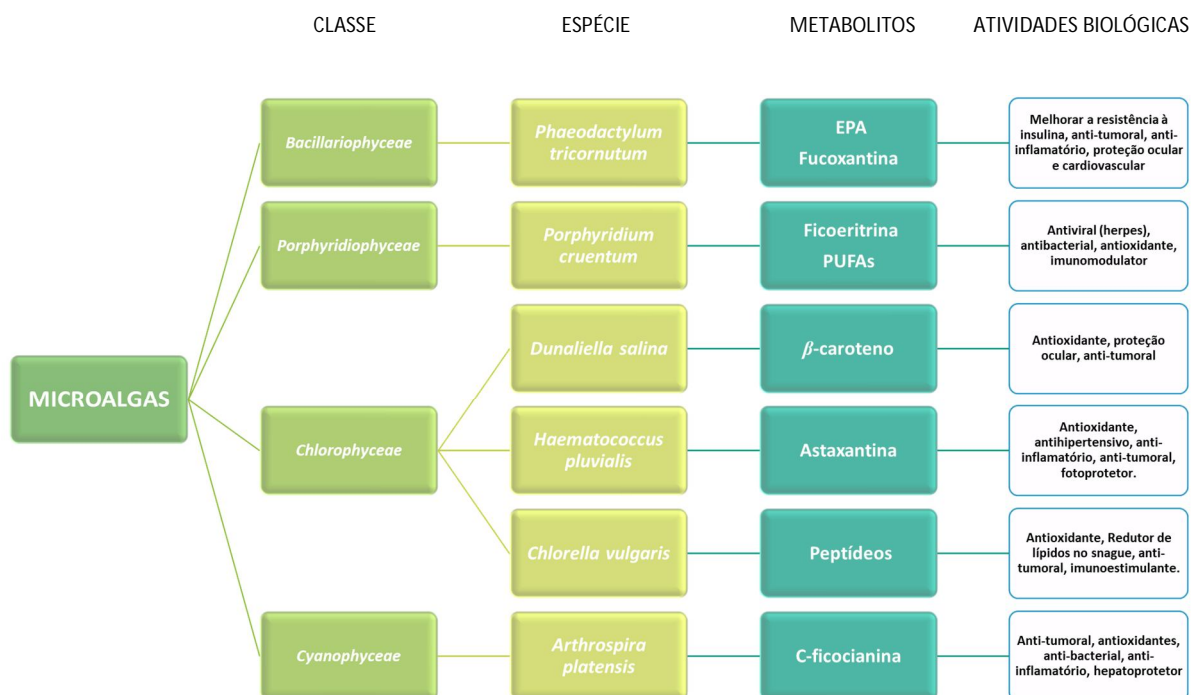


Figura 3 - Esquema com as principais classes de microalgas e espécies, e os seus respectivos metabolitos e atividades biológicas associadas. Este esquema foi baseado em Vieira et al. 2020.

1.1. INDÚSTRIA ALIMENTAR

O papel das microalgas na indústria alimentar é de interesse global, pois os compostos bioativos em que nelas se encontram são de extremo interesse. O consumo de biomassa de microalgas como alimento já é uma prática tradicional dos povos antigos dos países asiáticos e da América do Norte (Jacob-Lopes et al., 2019) . A sua biomassa possui uma melhor qualidade de proteínas quando comparadas com os cereais e vegetais, no entanto é inferior aos níveis de proteína animal, tais como o leite e a carne (Rizwan et al., 2018).

A *Spirulina* sp. é uma microalga que é cultivada com o objetivo principal de servir para alimento do ser humano visto que melhora o sistema imunológico, aumenta as bactérias do ácido láctico no trato gastrointestinal, é utilizada para o tratamento de várias outras doenças, tais como anemia, artrite, diabetes, cancro e doenças cardiovasculares. Assim como a *Spirulina* sp., a *Chlorella* sp. também é utilizada como fonte alimentar pois é rica em proteínas, carotenoides e vários tipos de vitaminas (Rizwan et al., 2018).

1.2. AQUACULTURA

Com o constante aumento da população e a procura de pescado, por sua vez, cada vez maior, a aquacultura parece ser uma boa opção para fazer face a este crescimento. As microalgas têm um papel importante na aquacultura, uma vez que podem servir para a constituição das rações dos animais pois possuem os nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência de larvas e animais adultos (Rizwan et al., 2018). A *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Phaeodactylum* sp., *Chaetoceros* sp., *Nannochloropsis* sp., *Skeletonema* sp. e *Thalassiosira* sp. são algumas das espécies de microalgas mais utilizadas para a alimentação de animais aquáticos (Rizwan et al., 2018). Para além de rações, as microalgas também são usadas para a coloração de salmonídeos cultivados, para a melhoria da qualidade do meio de cultura e para melhorar o sistema imunológico dos peixes (Chuntapa et al., 2003; Muller-feuga, 2000; Pulz & Gross, 2004).

1.3.INDÚSTRIA COSMÉTICA E FARMACÊUTICA

Um dos setores que mais beneficiam economicamente com as propriedades das microalgas é o setor da cosmética e farmacêutica. Tendencialmente, a nível mundial, a procura por produtos de fontes naturais, produtos ambientalmente sustentáveis, e produtos com o mínimo possível de compostos químicos na sua composição, têm cada vez mais adeptos (Wang et al., 2015). Atualmente, cerca de um terço dos produtos farmacêuticos mais vendidos são de origem natural (Watkins et al., 2015). A pele atua como a principal barreira protetora contra as agressões do exterior (perda de substâncias endógenas, fatores exógenos como a radiação UV, patógenos, poluição, entre outros). Os fatores exógenos geralmente estão associados a danos no ADN (Ácido

desoxirribonucleico), stress oxidativo, fotoenvelhecimento e carcinogénese (Ariede et al., 2017; Vinardell & Mitjans, 2015). De forma a combater esses mesmo fatores e as suas consequências na saúde humana e da própria pele, as microalgas parecem ter um papel vantajoso, pois os seus compostos bioativos podem ajudar no tratamento de alguns problemas dermatológicos, como a hiperpigmentação, fotoenvelhecimento, desidratação, foto-oxidação e também na proteção contra o cancro da pele (Hu et al., 2019; Wang et al., 2015).

2. PIGMENTOS

Os pigmentos são utilizados para uma vasta variedade de produtos incluindo produtos alimentares (corantes/aditivos), na aquacultura e em produtos farmacêuticos e nutracêuticos. Alguns dos recursos naturais de pigmentos são flores, frutos, vegetais, insetos e microrganismos fotossintéticos como as microalgas e cianobactérias (Koyande et al., 2019). Como foi referido, os pigmentos derivados das microalgas são um grupo de compostos que desempenham um papel importante durante o metabolismo fotossintético, sendo também responsáveis pela pigmentação da biomassa das microalgas (Morocho-Jácome et al., 2020; Wu et al., 2021). Têm como função captação de luz, transferência de energia, reação redox fotoquímica, bem como fotoproteção (Hardo Panintingjati Brotosudarmo et al., 2018). São substâncias químicas divididas em três grupos: carotenoides, clorofilas e ficobiliproteínas, e é com esses pigmentos que as microalgas captam energia luminosa para ser transformada em energia química – fotossíntese (Morocho-Jácome et al., 2020). Os pigmentos têm várias propriedades, que serão abordadas nos próximos tópicos. Os fatores abióticos (luz, temperatura, salinidade, pH, etc.) têm um grande peso no que toca ao conteúdo de pigmentos nas microalgas. A luz e a temperatura são os fatores mais importantes que afetam o seu conteúdo. Quando a densidade celular é elevada, a absorção de luz é dificultada devido ao sombreamento que as próprias células fazem umas às outras (Begum et al., 2016). A intensidade da luz desempenha um papel vital no controlo do acúmulo de β -caroteno nas células das algas e, posteriormente, no aumento da população de carotenoides de *D. salina*. A temperatura é, como já referido, um fator abiótico importante nas microalgas, que afeta os processos metabólicos e a composição bioquímica das células. A temperatura ideal para o crescimento das microalgas e a sua tolerância á mesma vai variar de espécie para espécie,

no entanto, mudança brusca da temperatura, irá fazer com que as microalgas entrem em stress (Begum et al., 2016). Outro fator abiótico não menos importante são os níveis de salinidade (Begum et al., 2016).

2.1.FICOBILIPROTEÍNAS

As ficobiliproteínas são uma família de proteínas características em cianobactérias, algas vermelhas, criptomonas e cianelas (Pagels et al., 2019). São formadas por ficobilinas ligadas a proteínas solúveis em água e são divididas em quatro tipos principais: ficoeritrina, ficocianina, ficoeritrocianina e aloficocianina (Morocho-Jácome et al., 2020; Pagels et al., 2019).

2.2. CLOROFILAS

As clorofilas são compostos bioativos valiosos divididos em cinco tipos diferentes de clorofilas: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* (Wu et al., 2021). As clorofilas podem ser extraídas da biomassa das microalgas e usadas na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, devido à sua alta pigmentação verde e propriedades antioxidantes e antimutagênicas (Halim et al., 2010; Morocho-Jácome et al., 2020). A clorofila *a* é o pigmento fotossintético primário mais abundante em todos os seres fotossintéticos. A clorofila *b* é encontrada nas espécies *Chlorophyta*, as clorofilas *c*, *d* e a clorofila *e*, podem ser encontradas nas diatomáceas (Wu et al., 2021).

Outros compostos importantes a considerar são as feofitinas. As feofitinas são formadas a partir da degradação da clorofila, quando esta perde o íon de magnésio que se encontra no centro do anel de porfirina. É necessário detetar a presença destes produtos visto que podem interferir na análise de quantificação, isto porque absorvem luz na mesma região do espectro da clorofila (Lorenzen, 1965). De forma a detetar a presença de feofitina, é necessário adicionar uma pequena quantidade de ácido clorídrico (HCL) diluído e deixar reagir.

2.3.CAROTENÓIDES

Existem mais de 1100 carotenoides diferentes na natureza (Wu et al., 2021). Apenas plantas, bactérias, fungos e algas podem sintetizar carotenoides, mas muitos animais os incorporam na sua dieta (Stahl & Sies, 2003; Wu et al., 2021). Os carotenóides estão divididos em xantofilas e carotenos (Morocho-Jácome et al., 2020). Enquanto os carotenos são compostos apenas por carbono e hidrogénio, as xantofilas também incluem oxigénio, tornando-as ligeiramente mais hidrofílicas que os carotenos (Thomas & Johnson, 2018). A astaxantina, luteína, cantaxantina, zeaxantina e fucoxantina são exemplos de xantofilas e o β -caroteno é um exemplo de carotenos (Morocho-Jácome et al., 2020; Wu et al., 2021). Para uma melhor compreensão, o esquema da figura 4 relata alguns exemplos de xantofilas e carotenos.

As espécies *Dunaliella salina* e *Dunaliella Bardawil* são fontes primárias relevantes de β -caroteno. A *D. salina* pode acumular grandes quantidades de β -caroteno, representando 12% do peso seco das células. As xantofilas astaxantina e cantaxantina são encontradas na espécie *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* (Wu et al., 2021).

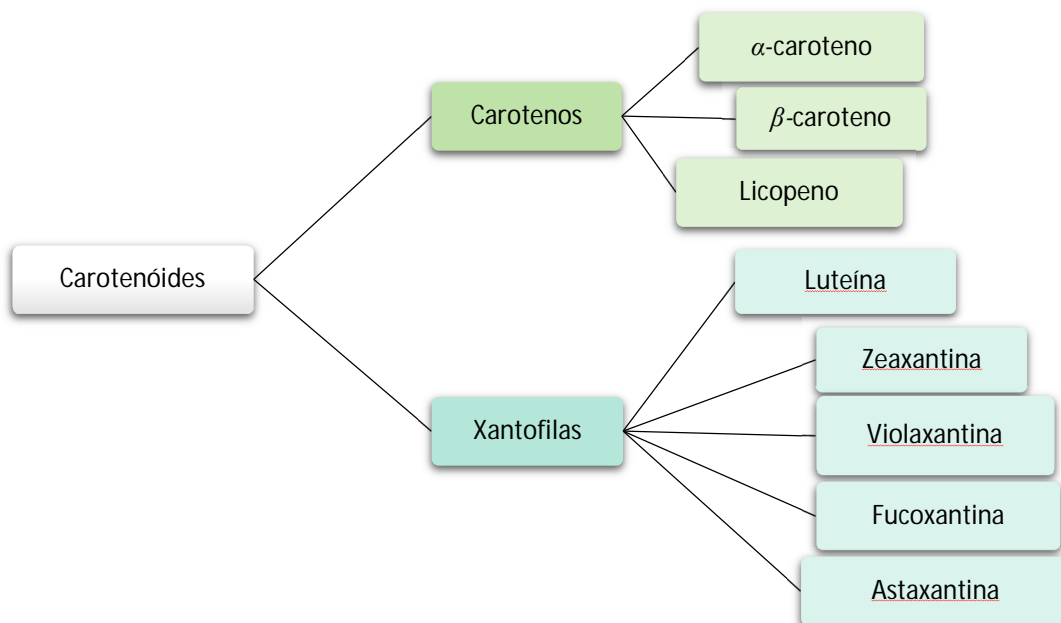


Figura 4 - Exemplos de xantofilas e de carotenos.

Os carotenoides desempenham um papel fundamental na saúde e nutrição humana, apoiando a melhoria do desempenho biológico através do uso de bioatividades de microalgas, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidiabéticas, entre outras (Mohamadnia et al., 2020). A figura 5 representa alguns exemplos das vantagens de utilizar pigmentos para a saúde humana para a prevenção de doenças.

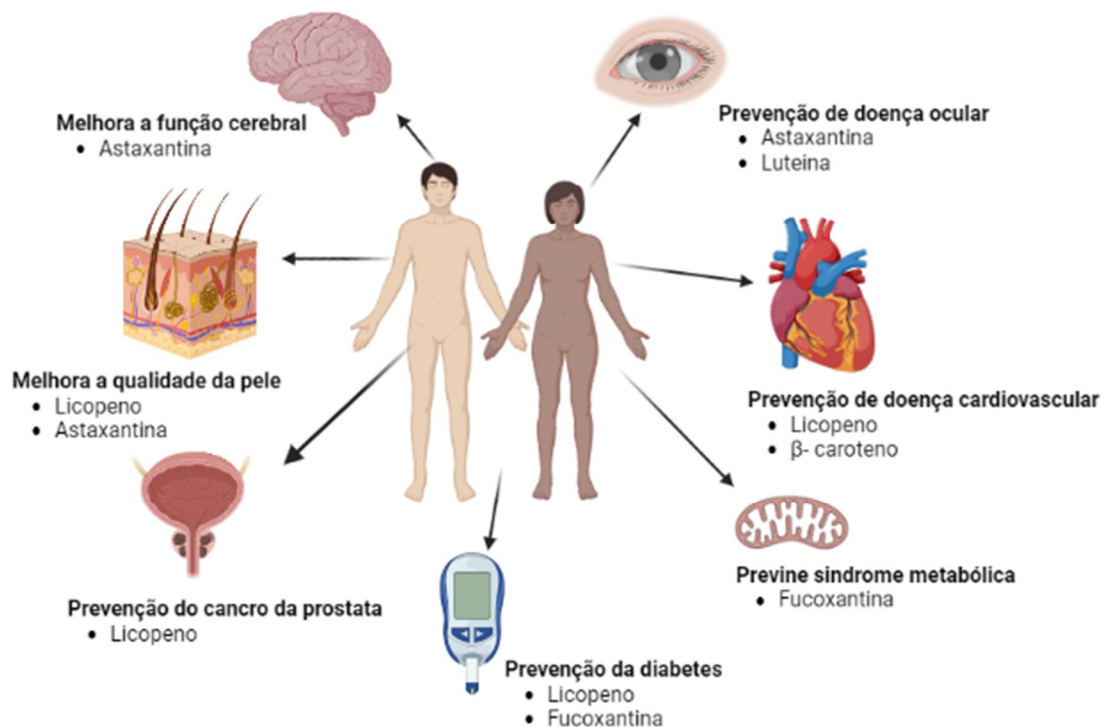


Figura 5 - Vantagens da utilização de pigmentos na saúde humana e na prevenção de doenças.

Vários estudos epidemiológicos com carotenoides revelaram que o aumento do consumo de uma dieta rica em carotenoides está correlacionado com uma diminuição do risco de obter vários distúrbios degenerativos tais como cancro, doenças cardiovasculares ou oftalmológicas (Stahl & Sies, 2003). Os efeitos preventivos têm sido associados à sua atividade antioxidante, protegendo células e tecidos do dano oxidativo (Stahl & Sies, 2003). A astaxantina, por exemplo, provocou um forte efeito anticancerígeno, o que pode reduzir o tamanho do cancro do fígado e de lesões tumorais dos pulmões, bem como um

efeito inibitório sobre o cancro de bexiga, cancro oral e cancro nas células do cólon (Wu et al., 2021) .

3. FUCOXANTINA

A fucoxantina é um pigmento natural que pertence à classe das xantofilas e é abundante em várias macroalgas e microalgas dos filos *Haptophyta* e *Heterokontophyta* que inclui as diatomáceas. As diatomáceas são microalgas unicelulares e exibem uma cor castanho-dourada característica devido a um alto conteúdo de fucoxantina que desempenham um papel importante no complexo de captação de luz dos fotossistemas (Bertrand, 2010). Existem vários exemplos de macroalgas como a *Undaria pinnatifida* (Wakame) e a *Laminaria japonica* (Kombu), e exemplos de microalgas, como a *P. tricornutum*, *T. lutea* e *Cylindrotheca closterium* que possuem um conteúdo significativo de fucoxantina (Bae et al., 2020; Lourenço-Lopes et al., 2020; Zhang et al., 2015). Este pigmento também pode ser obtido por via sintética, no entanto é muito mais dispendioso, por isso, a utilização de microalgas/macroalgas como fontes para extração de fucoxantina, é a forma mais viável (D’Orazio et al., 2012). A fucoxantina é considerada como um dos carotenoides naturais mais abundante, correspondendo a aproximadamente 10% da quantidade total de carotenoides na natureza (Liu et al., 2020). Na tabela 1 estão representados alguns exemplos de microalgas e a sua quantidade de fucoxantina (mg/g peso seco (PS)).

Tabela 1 - que representa algumas espécies de microalgas e o respetivo conteúdo de fucoxantina (mg/g PS) (Lourenço-Lopes et al., 2021; Gao et al., 2020).

Microalga	Fucoxantina (mg/g PS)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	4,24
<i>Tisochrysis lutea</i>	2,05 – 18,23
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0,07 – 54,40
<i>Odontella aurita</i>	18,47

Conseguimos reparar que a haptófito *T. lutea* e a diatomácea *P. tricornutum* contêm uma quantidade interessante de fucoxantina. A *P. tricornutum* é uma espécie que cresce em temperaturas baixas (10°C e 20°C) e a espécie *T. lutea* cresce com temperaturas mais elevadas (25°C e 35°C) (Pereira et al., 2021).

A fucoxantina é um pigmento com várias propriedades vantajosas, tais como bioatividades antioxidantes, antitumorais, antiobesidade, antidiabéticas, antimaláricas, neuroprotetoras, anti-hipertensivas, antiangiogénica, anti-inflamatória, além de efeitos protetores cardiovasculares e cerebrovasculares (Lourenço-Lopes et al., 2020, 2021; Zhang et al., 2015). As bioatividades e as aplicações deste pigmento estão representadas na figura 6. Portanto, a fucoxantina pode ser usada para fins medicinais e nutricionais de forma a prevenir e tratar doenças crónicas (Zhang et al., 2015).

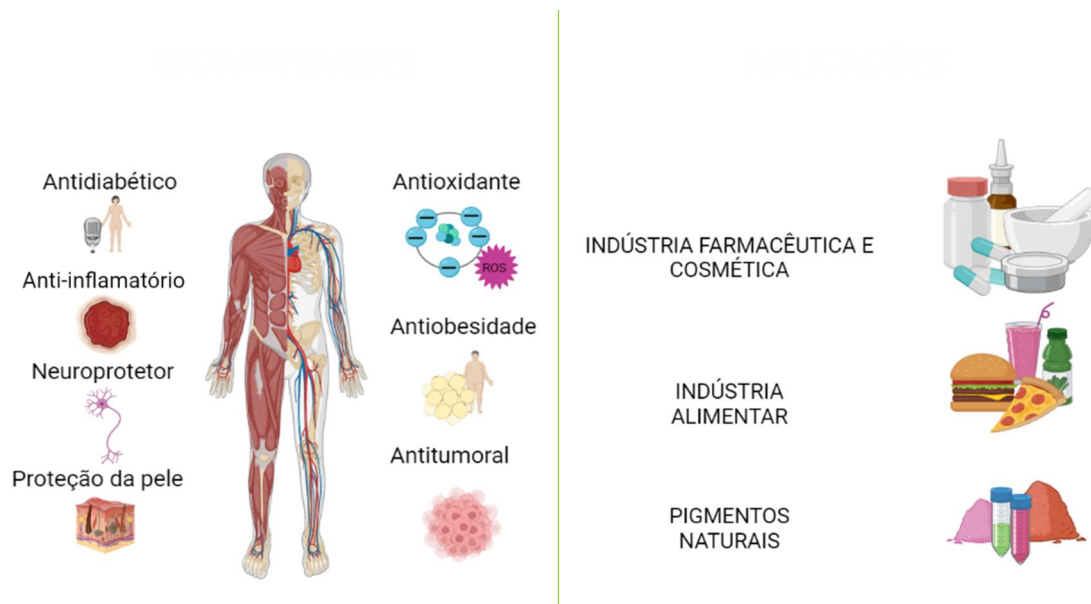


Figura 6 - Esquema que evidencia as diferentes bioatividades que o pigmento fucoxantina pode oferecer e as suas aplicações em diversas indústrias.

A fucoxantina é um ingrediente farmacêutico seguro, que apresenta níveis de toxicidade e efeitos colaterais mínimos o que é uma vantagem quando comparada com certos medicamentos para tratar doenças relacionadas com a inflamação (Liu et al., 2020; Zhang et al., 2015). A segurança da fucoxantina *in vivo* já foi avaliada por vários estudos, como por exemplo por Beppu et al., 2009, onde uma única administração oral de fucoxantina com a dose de 1000 ou 2000 mg/kg de peso corporal não provocou qualquer mortalidade e anormalidade em camundongos ICR. Por sua vez, a fucoxantina administrada por via

oral com a dose de 500 ou 1000 mg/kg de peso corporal por cerca de 30 dias não induziu alterações anormais nos tecidos, incluindo fígado, baço, rim e tecidos gonadais em camundongos ICR (Beppu et al., 2009). Portanto, ao que parece o consumo de fucoxantina é seguro, pelo menos nos modelos animais experimentais. A quantidade de fucoxantina em algas castanhas varia entre 0,07 e 54,40 mg/g de peso seco, como demonstra a tabela 1, que é uma quantidade relativamente pequena quando comparada com as doses de fucoxantina administrada aos animais nestes estudos mencionados anteriormente (Bae et al., 2020). Uma dose de 2000 mg de fucoxantina por kg de peso corporal em camundongos é equivalente a cerca de 162 mg por kg de peso corporal em humanos, o que pode ser difícil de atingir pelo consumo de algas marinhas ou suplementos dietéticos em humanos (Bae et al., 2020). Apesar da elevada quantidade de fucoxantina testada em roedores parecer ser segura, em humanos, essa avaliação é muito limitada (Bae et al., 2020). Num estudo feito por Ren et al., 2013, administraram em seres humanos 5 mg de fucoxantina por dia durante 35 dias e concluíram que esta mesma dose não induz nenhum efeito colateral adverso. Numa outra experiência feita com 4 grupos de mulheres obesas, que receberam um suplemento de fucoxantina durante 112 dias, três vezes ao dia, a 4 concentrações diferentes (1,6; 2,4; 4 ou 8 mg) também não foram registadas qualquer tipo de adversidades (Abidov et al., 2010). Existem também outros estudos já feitos para comprovar as vantagens dos compostos bioativos da fucoxantina. Foram testados os efeitos antiangiogénicos da fucoxantina utilizando cultura humana de células endoteliais da veia umbilical e utilizando o anel aórtico de ratinho. Com isto, Sugawara et al., 2006 descobriram que a fucoxantina pode suprimir significativamente a diferenciação de células progenitoras endoteliais em células endoteliais envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos, o que pode ser útil na prevenção de doenças relacionadas com angiogénese (como o cancro, psoríase e aterosclerose). São necessários mais ensaios clínicos para conseguir determinar se é seguro e quais os níveis de suplementação de fucoxantina que são eficazes no ser humano (Bae et al., 2020).

3.1.MÉTODOS DE ANÁLISE DE PIGMENTOS

A análise do conteúdo de pigmentos de uma amostra microalgal envolve um primeiro passo de extração. Esta extração requer a utilização de solventes como acetona, metanol ou etanol para pigmentos não polares – e.g., clorofilas – ou água para pigmentos hidrofílicos – e.g., ficobiliproteínas. Esta extração pode ser acompanhada, ou não, de uma ruptura celular física, através da utilização de micro-ondas, sonicação, homogeneizadores de alta-pressão, microesferas, ou outros equipamentos/materiais que ajudem a quebrar a parede celular das microalgas (Bley et al., 2014; Prasanna et al., 2007). Após obter este extrato de pigmentos concentrado existem tradicionalmente duas abordagens de quantificação possíveis, que se encontram descritas de seguida.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (*HPLC*) é o método qualitativo e quantitativo atualmente mais utilizado para a análise de pigmentos. O *HPLC* introduz uma pequena amostra (um extrato) numa fase móvel que transporta os analitos através de uma coluna preenchida com uma substância absorvente. Esses mesmos analitos são absorvidos e dissolvidos a diferentes taxas e separados à medida que atravessam a coluna. Por fim, os detetores registam um sinal proporcional à concentração do analito na fase móvel (Schieppati et al., 2021). No entanto este método é bastante dispendioso apesar de ser um método de alta precisão.

Existe outro método que também é utilizado para analisar pigmentos, que é o método por espectrofotometria. Cada substância absorve luz em comprimentos de onda característicos, sendo que a cor exibida representa os comprimentos de onda refletidos. Um espectro de absorção pode ser gerado medindo a absorbância num intervalo de comprimentos de onda tal como é demonstrado na Figura 7.

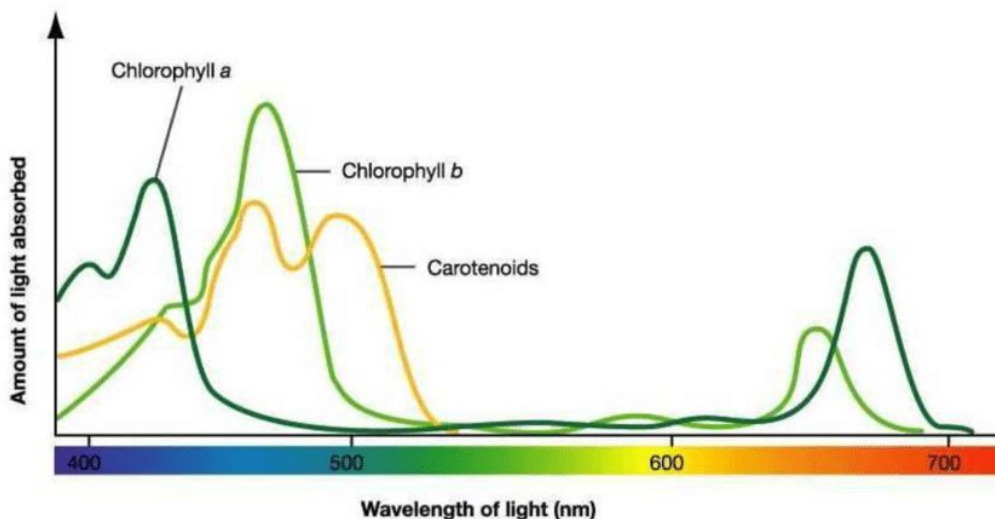


Figura 7 - Espectro de absorção da clorofila e carotenoides (Aboonajmi & Faridi, 2016).

Assim, é possível identificar o comprimento de onda no qual ocorre o/os máximo/s de absorção (λ max) de cada composto. As fórmulas estabelecidas por vários autores (Lichtenthaler & Wellburn, 1983; Ritchie, 2008; Wellburn & Lichtenthaler, 1984) usando a absorção máxima e os coeficientes de absorção específicos de cada pigmento (em função do solvente e mistura de pigmentos esperada na amostra) permitem estabelecer as suas concentrações individualmente.

O método utilizando o espectrofotómetro é um método que não requer tanto tempo e é mais económico em comparação com o método por *HPLC*. Como mostra a figura 8, o *HPLC* tem várias desvantagens, apesar de ser um método de alta precisão, quando comparado com o método por espectrofotometria – menos preciso (Wang et al., 2018).



Figura 8 - Comparação do método utilizando o espectrofotómetro e o método HPLC.

No entanto, segundo Louda e Monghkonsri (2006), ao compararem os resultados dos teores de clorofila entre o método de espectrofotometria e HPLC, concluíram que a avaliação pelo método utilizando o espectrofotómetro (utilizando as equações da UNESCO (1966) e de Jeffrey & Humphrey (1975)) deu ótimos resultados. Na ausência de diferenças muito significativas entre os dois métodos, o método de espectrofotometria é uma melhor opção uma vez que se torna muito menos dispendioso e mais rápido (Henriques et al., 2007).

Devido à importância de outros pigmentos como a fucoxantina, isto levou à procura de novas abordagens de quantificação espectrofotométrica para estes compostos. No estudo feito por Wang et al., (2018), desenvolveram um método por espectrofotometria para determinar a fucoxantina presente na diatomácea *P. tricornutum*, que contem um alto potencial económico devido ao seu elevado teor de fucoxantina e EPA. Visto que o conteúdo de fucoxantina é elevado nas diatomáceas, também foram utilizadas para este mesmo estudo as diatomáceas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira pseudonana*.

4. NECTON S.A.

Fundada em 1997 e sediada na Ria Formosa (Belamandil, Olhão), a Necton S.A. é uma empresa produtora de microalgas, sendo a empresa mais antiga da Europa em operação. A empresa produz mais de 30 estirpes diferentes de microalgas com um maior foco em espécies marinhas. A produção das microalgas baseia-se num processo de scale-up de pequenos volumes até chegar à escala industrial. Após atingir a concentração celular desejada nos fotobiorreatores segue-se uma colheita da biomassa e processamento para obter o produto final de concentrados de biomassa húmida ou seca. De seguida são detalhados estes processos.

4.1. SCALE-UP

O processo de *scale-up* está representado na figura 9. O *scale-up* começa com o cultivo isolado dos microrganismos numa placa de agar, de onde as células são repicadas para meio líquido com água salgada ou doce (consoante a microalga) e meio nutritivo (Nutribloom[®]). Quando a concentração celular se torna elevada, os volumes de cultivo são incrementados sequencialmente para um balão de 1 L e de 5 L.

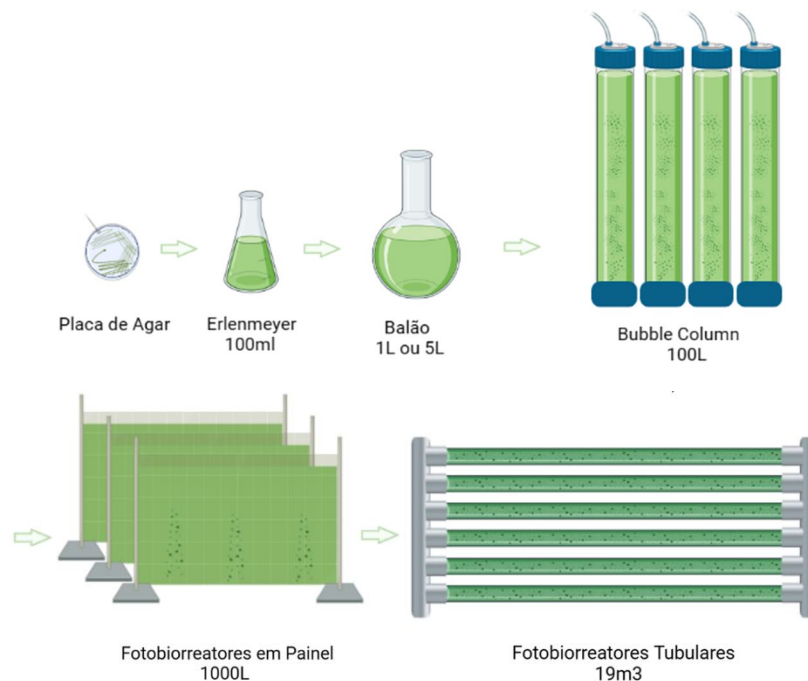


Figura 9 - Processo de *scale-up* utilizado na produção de microalgas na empresa Necton S.A.

Quando se atinge o volume e concentração celulares necessárias nos cultivos em balão, estes são usados para inocular as *bubble column* de 80 L (figura 10a). Todos estes processos até agora são realizados dentro do laboratório. O cultivo nas *bubble column* é então utilizado para inocular um fotobiorreator fechado em painel no exterior (1000 L) que está representado na figura 10b (a partir desta fase, todos os processos são efetuados no exterior). O cultivo fotobiorreator em painel será utilizado para inocular outros fotobiorreator em painel de 1000 L até atingir os 4000 L de cultivo. Por fim, são transferidos para os fotobiorreatores tubulares horizontais (figura 10c) de 19 m³.



Figura 10 – Fotografias dos equipamentos utilizados para fazer o processo *scale-up* e por fim a centrifugação. (a) *Bubble column*; (b) *Green Walls/ flat pannel*; (c) - Fotobiorreatores Tubulares; (d) Centrifugas.

Para monitorizar a evolução do crescimento e necessidades nutritivas do cultivo são feitas análises diárias no laboratório relacionadas com a densidade ótica (DO), o pH e a concentração de nitratos de cada reator. A densidade ótica (DO), também conhecida como

absorvância ou turbidez, é utilizada para uma medição mais rápida e não destrutiva da biomassa das culturas. Quando o feixe de luz é emitido na medição, utilizando o espectofotometro, através de uma suspensão de material particulado (neste caso amostras de cultura de microalgas), a diminuição na quantidade de luz transmitida em relação ao branco, inicialmente introduzido, é então o nosso valor de DO (Griffiths et al., 2011). O valor da DO é importante pois é com estes valores que é calculada a evolução da cultura. São também efetuadas diariamente observações ao microscópio de forma a averiguar possíveis contaminantes que podem estar presentes nas culturas.

Quando a concentração celular atinge o final da fase exponencial pode dar-se início ao processo seguinte, a colheita. As culturas são transferidas para um tanque de colheita e de seguida centrifugadas (figura 10d). Quando terminado este processo, a biomassa é empacotada e congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo ser vendida assim ou então ser ainda liofilizada.

5. OBJETIVO DO TRABALHO

Este estágio teve dois objetivos principais para contribuir para um melhor desempenho de processamento das microalgas com fucoxantina produzidas pela empresa Necton, tal como a *T. lutea* e a *P. tricornutum*. Para tal, o primeiro objetivo focou-se na avaliação e validação de um método espectrofotométrico desenvolvido recentemente para a determinação do conteúdo de fucoxantina em amostras de *T. lutea*. O segundo objetivo focou-se em monitorizar a variação da fucoxantina por espectrofotometria – utilizando o novo método validado para a fucoxantina – na produção de *P. tricornutum*. Esta informação vai permitir reconhecer alterações no conteúdo de fucoxantina de *P. tricornutum* em função dos fatores abióticos como radiação, temperatura, pH, concentração de nitratos e concentração de biomassa, e determinar se poderá haver espaço para melhorias em termos de conteúdo de fucoxantina na biomassa final.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Validar o método de medição por espectrofotometria com *Tisochrysis lutea*.

AMOSTRAS

De forma a validar o método espectrofotométrico de Wang et al. (2018), foram utilizadas 8 amostras liofilizadas e congeladas da espécie *T. lutea* produzidas pela Necton. A fucoxantina destas amostras foi previamente quantificada por *HPLC* no âmbito de outro estudo através do método descrito em Gao et al. (2020). Para a realização desta experiência foi necessário hidratar a amostra de cultura liofilizada ressuspensando aproximadamente 30 mg de amostra em 30 mL de solução salina (solução de 9 g/L de NaCl) como mostra o primeiro passo na figura 11, e de seguida a amostra foi homogeneizada num agitador *vortex* por alguns segundos (passo II). A amostra foi colocada a 4 °C e no escuro dentro do frigorífico para hidratar durante 10-15 minutos (passo III). Passado o tempo de espera, foi necessário ressuspender a amostra até que a cultura estivesse homogénea. Por fim, a amostra foi então repartida por 6 réplicas (passos V e VI) com a ajuda de uma micropipeta (neste caso, 4 mL de cultura em cada tubo de centrifuga), sobrando uma pequena quantidade que foi guardada para mais tarde ser utilizada (passo IV).

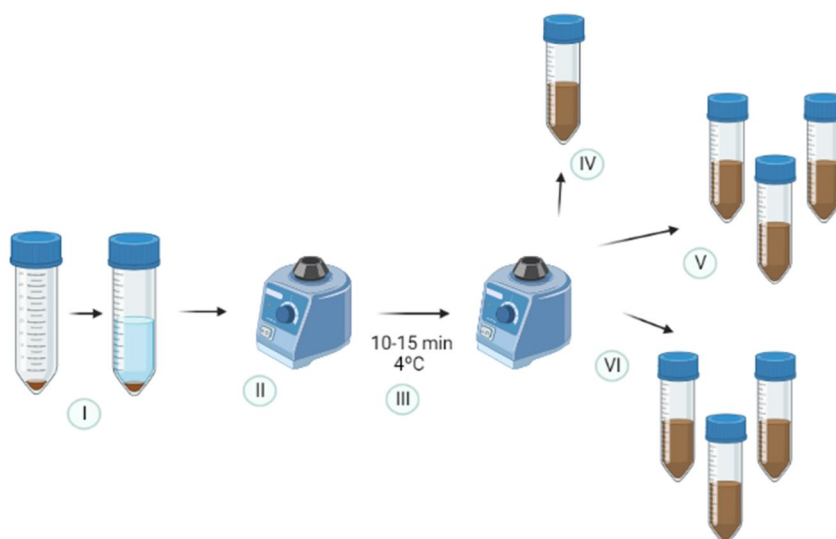


Figura 11 - Esquema da preparação das amostras utilizadas para validar o método de medição por espectrofotometria com *Tisochrysis lutea*.

1.1. Método de medição por espectrofotometria segundo Wang (2018).

De acordo com o método de medição de fucoxantina por espectrofotometria estabelecido por Wang (2018), a DO da cultura reidratada de *T. lutea* foi medida a 750 nm (passo I da Figura 12). Seguidamente, 4 mL da amostra foram centrifugados durante 10 minutos a 3.430 g para posteriormente se descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 4 mL do solvente de extração, neste caso etanol (passo III da Figura 12). A amostra foi homogeneizada no *vortex* por 20 segundos e seguidamente foi medida a absorvância a 445 nm e 663 nm.

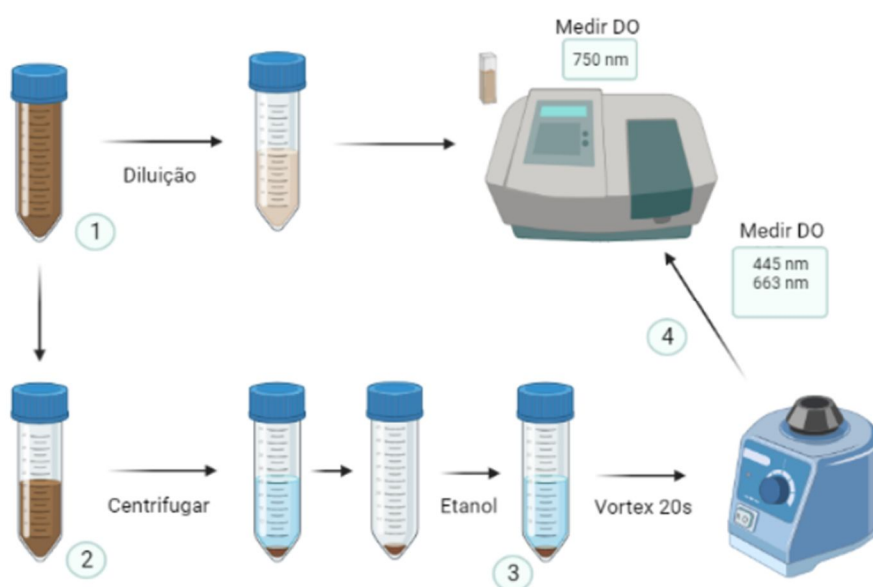


Figura 12- Esquema do protocolo estabelecido por Wang (2018).

Para obter a concentração final de fucoxantina foi utilizada a seguinte fórmula (1) (Li et al., 2018):

$$C_{fuc}' = 6.39 \times A_{445} - 5.18 \times A_{663} + 0.312 \times A_{750} - 5.27 \quad (1)$$

Onde a A_{663} corresponde à absorvância da clorofila *a*, A_{445} corresponde à absorvância da fucoxantina, por fim a A_{750} corresponde à absorvância da cultura de células.

1.2. Método de medição por espectrofotometria modificado.

Para avaliar o método utilizado por (Wang et al. (2018)), foram introduzidas algumas alternativas no protocolo de forma a avaliar se a precisão do método poderia ser melhorada. Estas alterações foram introduzidas de forma a tentar melhorar a correlação entre os valores de fucoxantina obtidos por espectrofotometria e por HPLC. Detalhes destas alterações estão descritas nos seguintes tópicos.

- Utilização de um valor teórico de absorvância a 750 nm a partir do valor conhecido de peso seco.

Para usar o valor teórico de absorvância a 750 nm foi feita uma reta de calibração entre a Densidade Ótica e o peso seco da espécie *T. lutea*. O valor de peso seco previamente determinado antes da análise foi testado uma vez que a ressuspensão desta alga não era comumente homogénea.

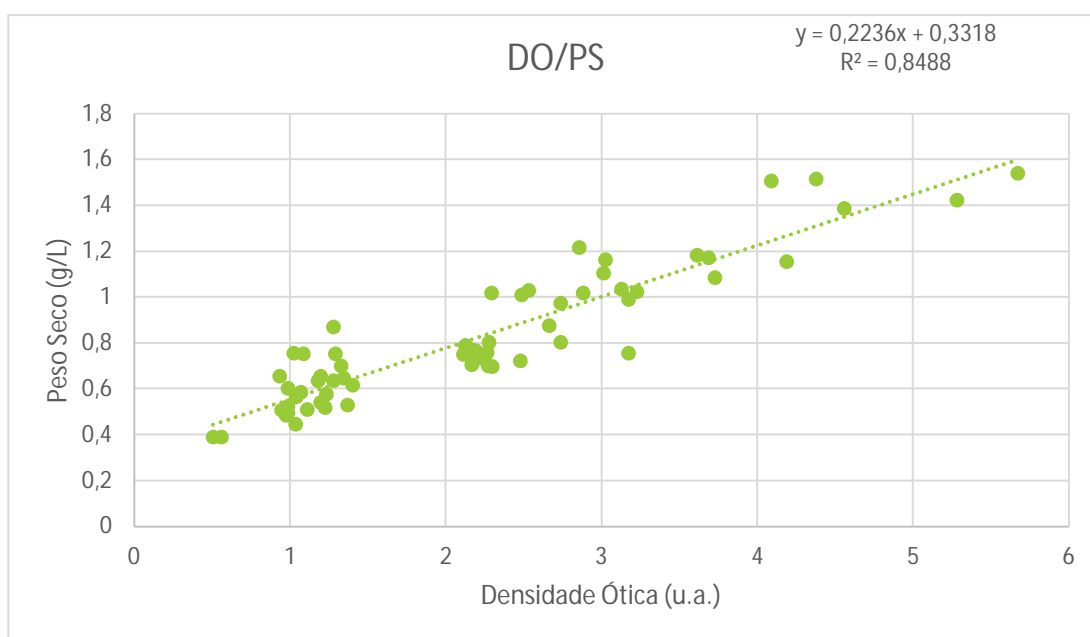


Figura 13 - Gráfico da reta de calibração entre a Densidade Ótica a 750 nm e o Peso Seco em g/L da espécie *T. lutea*.

- Centrifugação dos extratos antes de medir a DO de 445 nm e 663 nm para remover detritos da leitura;

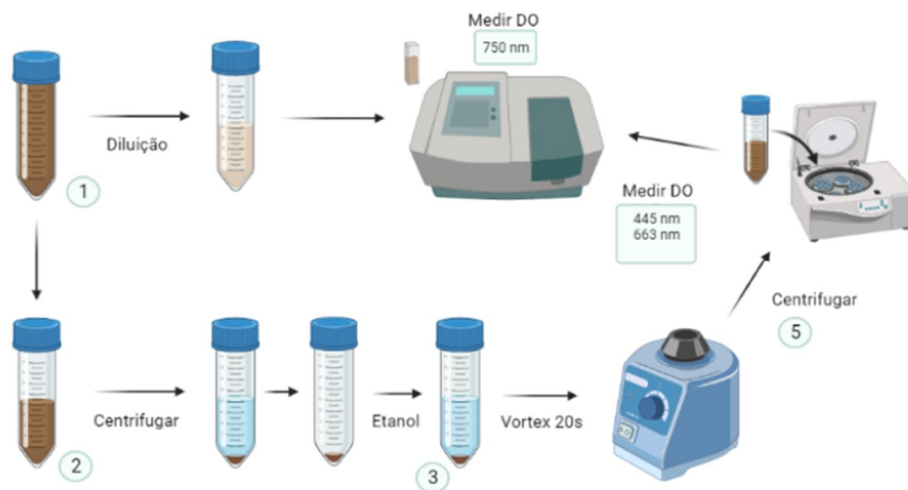


Figura 14- Esquema do protocolo modificado de medição por espectrofotometria com um passo extra (passo 5) de centrifugação.

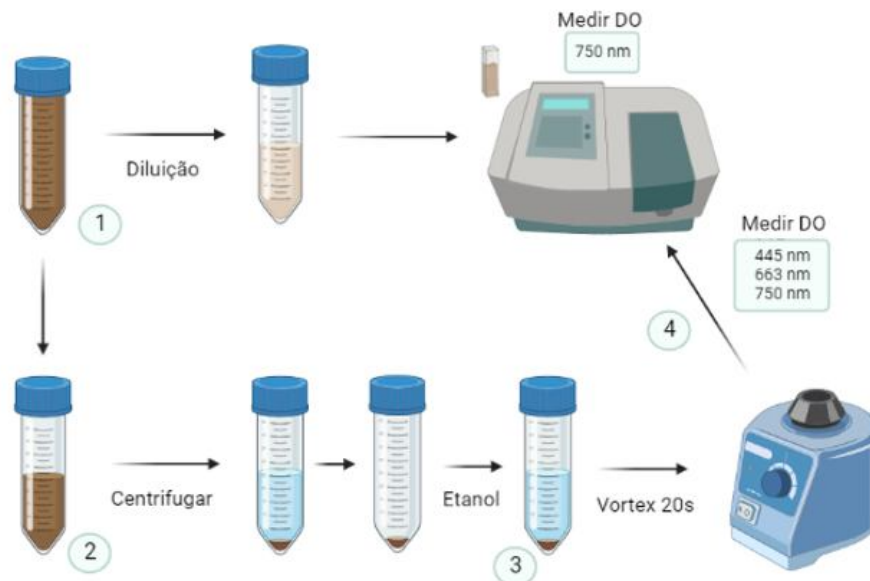


Figura 15- Esquema do protocolo modificado de medição por espectrofotometria com um passo extra (passo 4) de correção da turbidez no extrato ao subtrair o valor de 750 nm a cada absorvância.

- Utilização de *microbeads*;

Uma das variáveis usadas foi a utilização das *microbeads*. Para a realização deste método, baseado em Gao et al. (2020), foi introduzida a utilização de *microbeads* (passo 4) logo após ter sido colocado o etanol (passo 3), como foi feito no esquema da figura 16, seguidamente o tubo de centrifugar foi colocado no vortex durante alguns minutos e de seguida centrifugado durante 10 minutos a 3430 g. Concluído esses 10 minutos de centrifugação, foi recolhido o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur (passo 5), e colocado num novo tubo de centrifugar bem identificado (passo 8). Ao *pellet* e às *microbeads*, foi novamente adicionado os 4ml de etanol (passo 6) e foi repetido de novo o processo pelo menos 3 vezes, como se consegue observar na figura 16 (passo 7). Os tubos de centrifugar que coletaram todo o sobrenadante foram usados para quantificar a DO a 445nm, 663nm e 750nm diretamente (passo 10), como também depois de ser previamente centrifugado (passo 9), tal como aconteceu no esquema da figura 14.

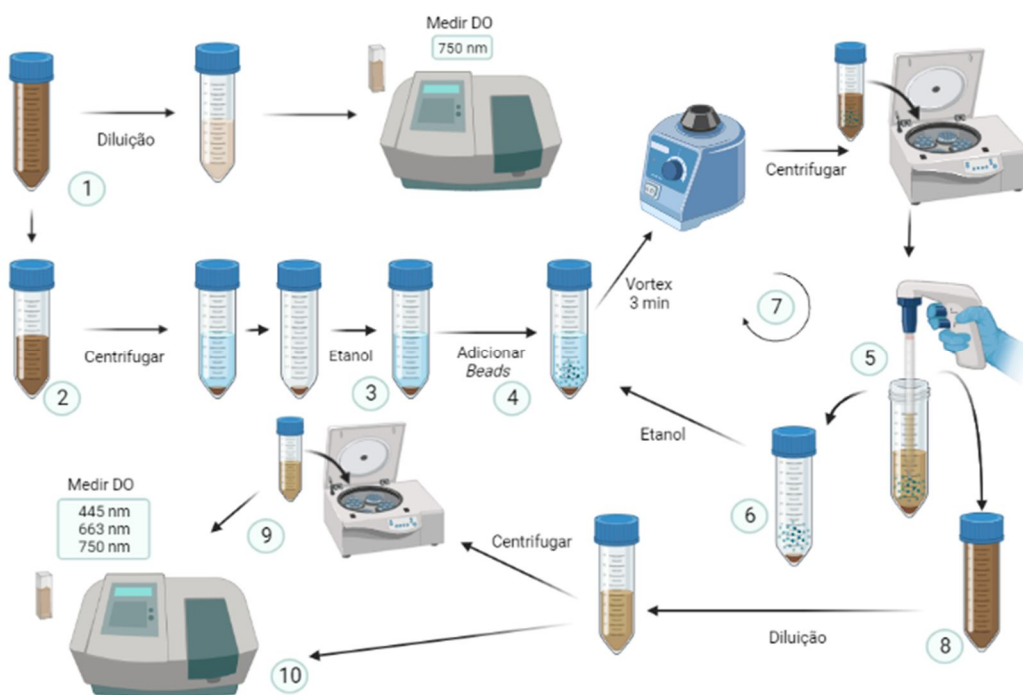


Figura 16- Esquema do protocolo modificado utilizado para validar o método de medição por espectrofotometria com *Tisochrysis lutea* com a utilização de um valor teórico de absorvância a 750 nm (passo 1), a utilização de microbeads (passo 4), a utilização da centrifugação antes de medir a DO (passo 9) e a correção da turbidez no extrato ao subtrair o valor de 750 nm a cada absorvância.

2. Monitorização dos pigmentos ao longo do processamento de *Phaeodactylum tricornutum*.

Para analisar a variação de pigmentos no processo de colheita da diatomácea *P. tricornutum* foi necessário fazer uma colheita diária dos Fotobioreatores Tubulares (4 ao todo), do Depósito de Colheita e da pasta de microalgas resultante do processo de centrifugação industrial. Ao todo foram colhidas amostras de 100 mL de cultura, que foram centrifugados e o *pellet* foi congelado a -18°C. Na figura 17 conseguimos conciliar a ideia do processo até agora falado.

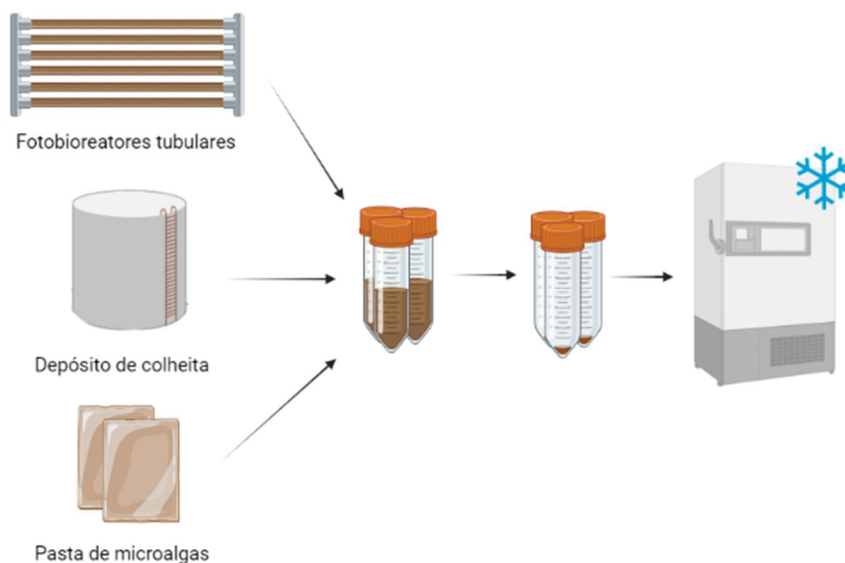


Figura 17 - Processo de colheita diária (Fotobioreatores Tubulares, *Green Walls*, Depósito de Colheita e pasta de microalgas) para a quantificação de pigmentos.

Este processo de amostragem foi repetido ao longo de várias semanas até obter uma amostragem representativa. Após este período, para medir os pigmentos (clorofila a e c, feofitina a carotenoides totais e fucoxantina) foi necessário descongelar as amostras, pesar cerca de 30 mg da amostra de cultura e colocar num novo tubo de centrifuga de 50ml para posteriormente ser adicionado 30ml de solução salina (9 g de NaCl por litro). Esta amostra foi homogeneizada no vortex, para depois, repartir a mesma em 3 réplicas. A partir deste ponto foi feita a quantificação dos pigmentos através do espectrofotómetro, pelo protocolo implementado na Necton S.A. e a quantificação da fucoxantina utilizando o método utilizado na primeira experiência e que deu melhores resultados, ou seja, utilizando a DO teórica, a centrifugação e as microbeads. As réplicas foram centrifugadas para descartar o sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionadas as *microbeads* e a solução de

extração (acetona 90%). Seguidamente, as amostras foram colocadas no vortex durante 2 minutos e após este processo, centrifugadas. O sobrenadante resultante do processo de centrifugação, é retirado (com a ajuda de uma micropipeta) e colocado num novo tubo, devidamente identificado e coberto com papel alumínio (é necessário que o tubo se mantenha frio). Este processo (*vortex*, centrifugação e retirada do sobrenadante para o tubo) deverá ser feito pelo menos 3 vezes, ou até a tonalidade do sobrenadante do tudo com as microbeads fique esbranquiçado. Após todo o processo, é necessária uma última centrifugação, neste caso do tubo onde foi colocado o sobrenadante. Após realizar a diluição adequada, procedeu-se à leitura dos valores de absorvância ($\lambda = 750, 664, 647, 630, 510$ e 480 nm). Para calcular a feofitina é necessário um passo adicional. É necessário separar 3 ml da amostra e adicionar uma solução de 0.1 N de HCl e fazer a leitura a $\lambda = 750$ e 665 nm. Por fim, com os dados obtidos, é necessário fazer os cálculos.

As seguintes equações são baseadas nos métodos standard descritos em Baird et al. (2017) e em Jeffrey & Humphrey (1975):

- $\text{Chl } a \text{ (mgmL)} = 11,85 A_{664} - 1,54 A_{647} - 0,08 A_{630}$
- $\text{Chl } b \text{ (mgmL)} = -5,43 A_{664} + 21,03 A_{647} - 2,66 A_{630}$
- $\text{Chl } c1+c2 \text{ (mgmL)} = -1,67 A_{664} - 7,6 A_{647} + 24,52 A_{630}$
- $\text{Carotenoides (mgmL)} = 7,6 A_{480} - 1,49 A_{510}$

Para a determinação da Feofitina a usam-se as equações também descritas em Baird et al. (2017) e em Lorenzen (1967):

- $\text{Chl } a \text{ (mgmL)} = 26,73(A_{664} - A_{665a})$
- $\text{Feofitina } a \text{ (mgmL)} = 26,73(1,7A_{665a} - A_{664})$

Onde 664b e 665a referem a absorvância do extrato antes e depois da acidificação, respetivamente.

III. RESULTADOS

1. Validar o método de medição por espectofotometria com *Tisochrysis lutea*.

Utilizando o Excel, foram reunidos todos os dados e feito o cálculo do peso seco das amostras. Na figura 18 e 19 está demonstrado um gráfico que representa a reta da correlação entre os valores de fucoxantina (% de PS) calculado por *HPLC* e os valores de fucoxantina (% de PS) obtido pelo método Wang, antes da remoção e após a remoção dos *outliers* respetivamente.

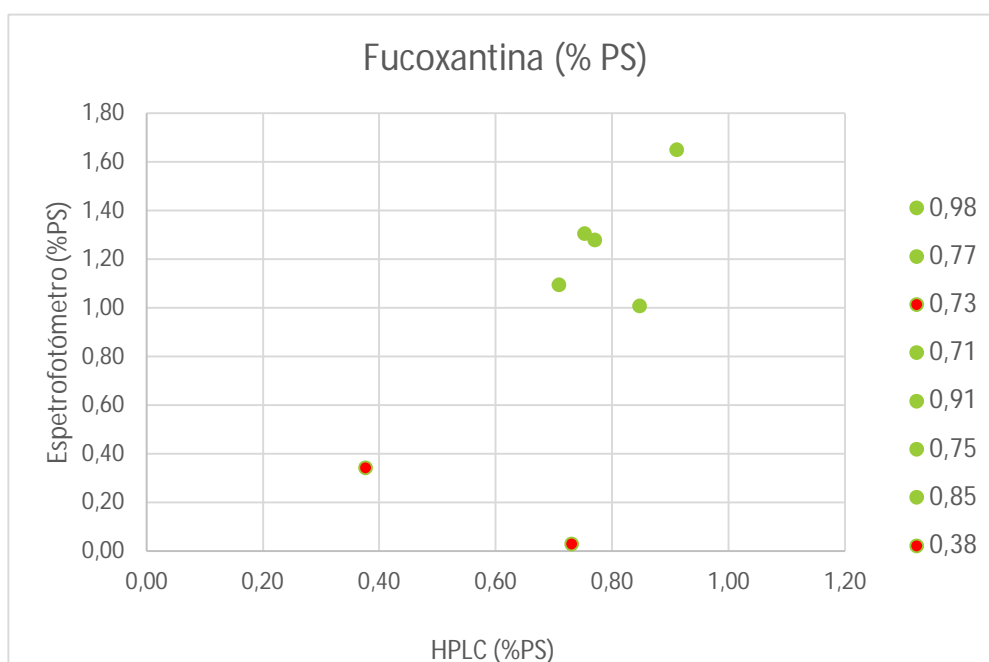


Figura 18 - Gráfico da correlação da fucoxantina (% PS) das amostras entre *HPLC* e Wang, com *outliers* a vermelho.

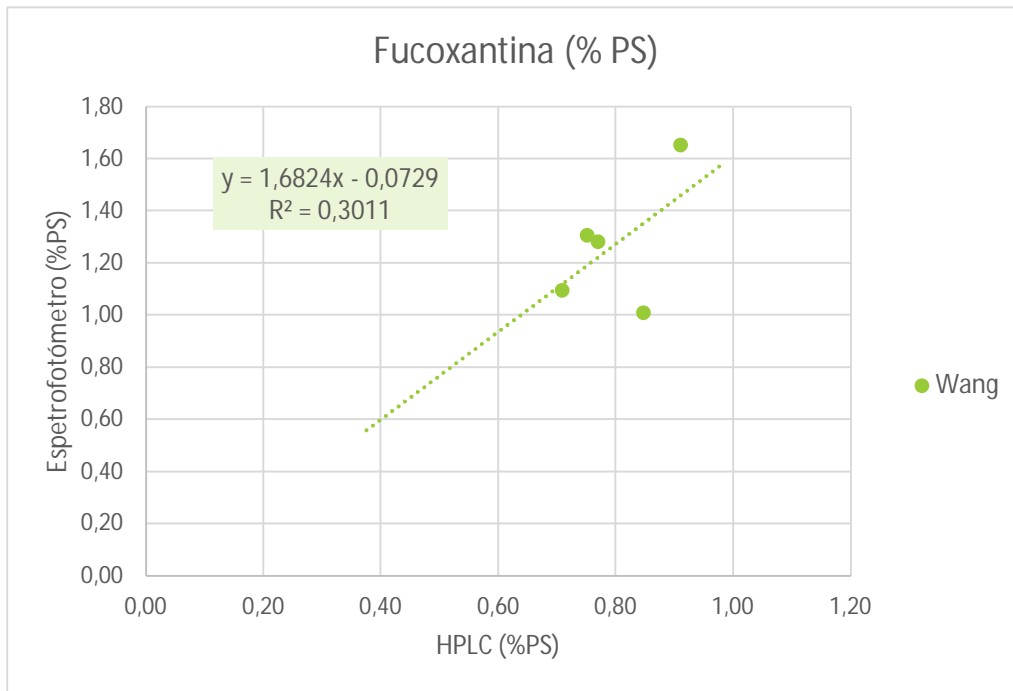


Figura 19 - Gráfico da correlação da fucoxantina (% PS) das amostras entre *HPLC* e Wang.

Foram testadas variáveis ao método do Wang et al. (2018), em que uma delas era substituir a DO real pela DO teórica. Na tabela 2, representa os pesos secos (após os *outliers*) das 5 amostras pelos métodos *HPLC*, Wang e Wang modificado (DO teórica). De forma a correlacionar estes valores, foi feito um gráfico (figura 20) em que demonstra a correlação entre todos os valores.

Tabela 2 - Peso seco das 5 amostras (*HPLC*, Wang e Wang modificado).

Amostras	<i>HPLC</i>	Wang	Modificado
B	0,77	1,28	1,37
D	0,71	1,10	1,16
E	0,91	1,65	1,69
F	0,75	1,31	1,36
G	0,85	1,01	1,07

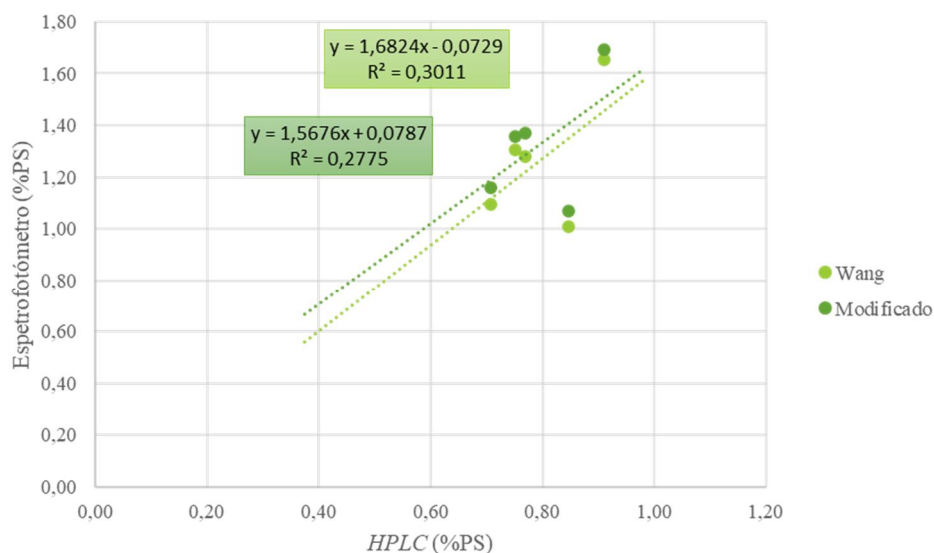


Figura 20 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado.

A tabela que se segue (tabela 3) estão representados os valores do peso seco da tabela 2 e os valores do peso seco do método Wang que foi modificado (DO teórica) com a junção de uma variável, que neste caso foi a adição das *microbeads*. A figura 21, demonstra num gráfico a correlação entre todos estes pesos secos.

Tabela 3 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads*)).

Amostras	HPLC	Wang	Modificado (<i>microbeads</i>)
B	0,77	1,28	0,88
D	0,71	1,10	1,01
E	0,91	1,65	1,12
F	0,75	1,31	1,12
G	0,85	1,01	1,47

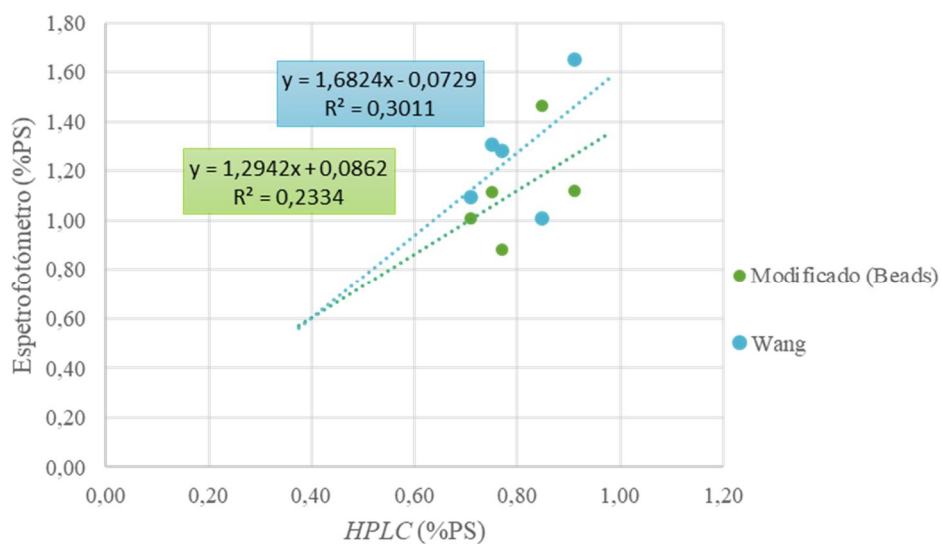


Figura 21 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads*).

A tabela 4 e a figura 22, representam ambas os valores dos pesos secos das amostras com a diferença que é acrescentado ao Wang modificado e com *microbeads*, a utilização da centrifugação. Na figura 22, o gráfico correlaciona esses mesmos valores.

Tabela 4 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* e centrifuga)).

Amostras	HPLC	Wang	Modificado (<i>microbeads</i> + Centrifuga)
B	0,77	1,28	1,154
D	0,71	1,10	1,167
E	0,91	1,65	1,437
F	0,75	1,31	1,273
G	0,85	1,01	1,490

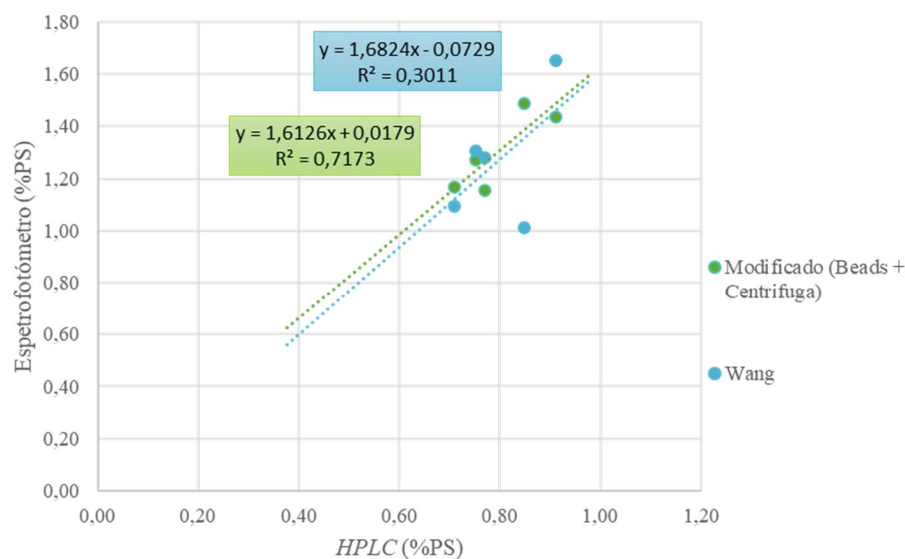


Figura 22 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* e centrifuga).

Novamente, é representado na tabela 5 e na figura 23 as amostras anteriores com a diferença que os valores dos pesos secos das 5 amostras do modificado com *microbeads* e mais centrifuga têm uma variável extra que neste caso é a adição da medição a 750nm (750 corrigido).

Tabela 5 - Peso seco das 5 amostras (HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido)).

Amostras	HPLC	Wang	Modificado (<i>microbeads</i> + Centrifuga + 750 corrigido)
B	0,77	1,28	1,148
D	0,71	1,10	1,167
E	0,91	1,65	1,437
F	0,75	1,31	1,272
G	0,85	1,01	1,490

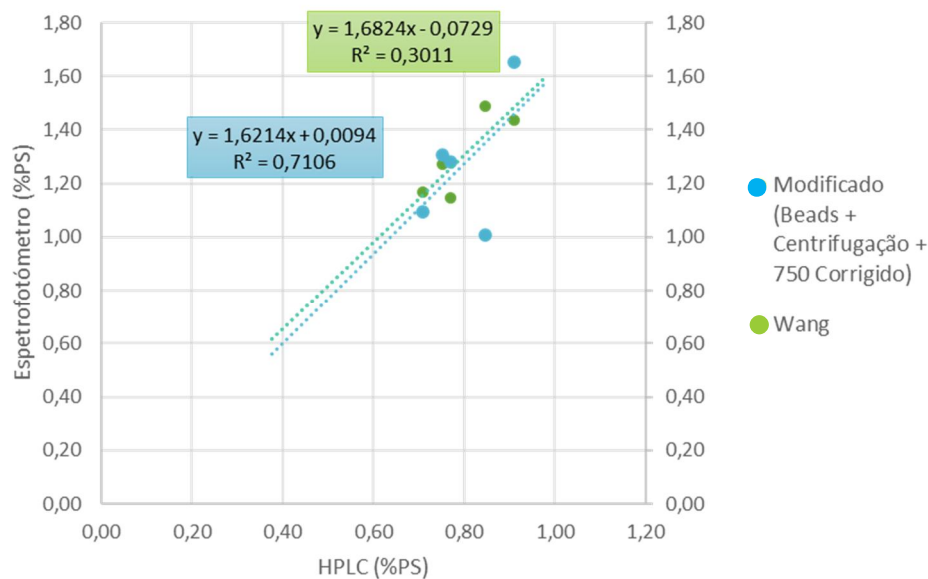


Figura 23 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido).

Por último, de forma a comparar as correlações que obtiveram melhores resultados nos gráficos anteriores, foi feito um novo gráfico (figura 24) que correlaciona o *HPLC* com o modificado (*microbeads* + centrifuga) e o modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido). Na tabela 6 estão representados os valores do peso seco das amostras usadas para o respetivo gráfico.

Tabela 6 - Peso seco das 5 amostras (*HPLC*, Wang modificado (*microbeads* + centrifuga) e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido)).

Amostras	<i>HPLC</i>	Modificado (<i>microbeads</i> + Centrifuga)	Modificado (<i>microbeads</i> + Centrifuga + 750 corrigido)
B	0,77	1,154	1,148
D	0,71	1,167	1,167
E	0,91	1,437	1,437
F	0,75	1,273	1,272
G	0,85	1,490	1,490

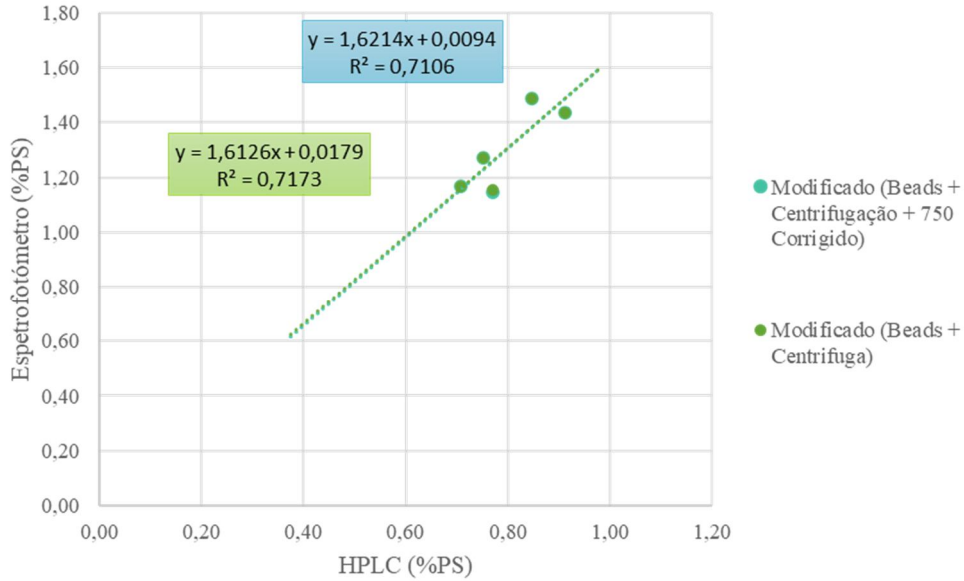


Figura 24 - Gráfico da correlação dos pesos secos das amostras entre HPLC, Wang modificado (*microbeads*+centrifuga) e Wang modificado (*microbeads* + centrifuga + 750 corrigido).

2. Variação dos pigmentos no processo de colheita em *Phaeodactylum tricorutum*.

De forma a perceber se existe alguma relação entre os parâmetros abióticos e o teor de fucoxantina das algas, foi analisada a relação entre os valores de fucoxantina e o pH, temperatura máxima, temperatura média, temperatura mínima, radiação máxima, DO, e concentração de nitratos no meio.

Com os dados obtidos ($n=20$) foi realizada uma análise de correlação de Pearson entre as diferentes variáveis e o conteúdo de fucoxantina (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da correlação de Pearson (r) entre a concentração de fucoxantina e as diferentes variáveis abióticas medidas.

	r	p
<i>pH</i>	-0.22	0.3626
<i>Tmax</i>	0.39	0.092
<i>Tmean</i>	0.22	0.3428
<i>Tmin</i>	0.3	0.1987
<i>Radmax</i>	0.15	0.5401
<i>DO</i>	0.61	0.0042
<i>NO3</i>	-0.13	0.5943

Nesta tabela foi então verificado que as relações mais fortes são entre a fucoxantina com a DO ($r=0,61$) e a fucoxantina com a temperatura máxima ($r=0,39$). Para retificar estas relações, foram analisados os gráficos das temperaturas máxima, média e mínima, em função da fucoxantina (figura 25), bem como da DO, também em função da fucoxantina.

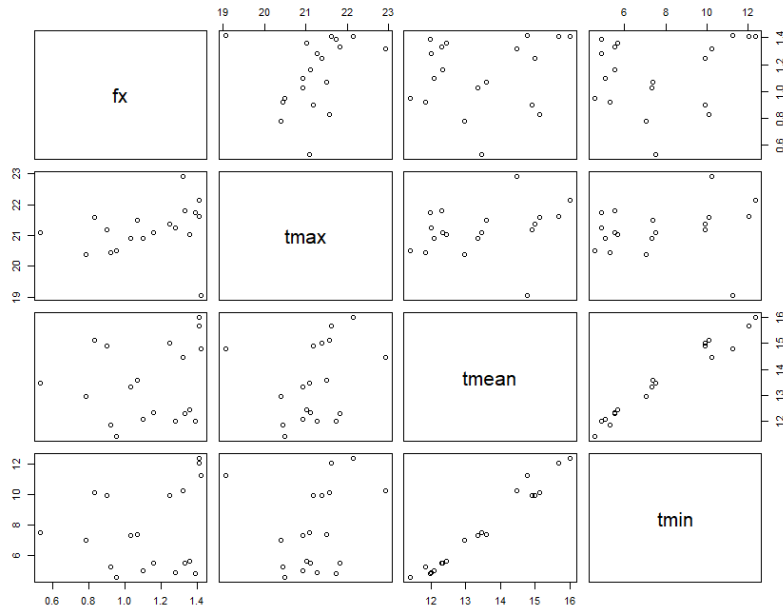


Figura 25 – Gráfico que representa a correlação entre a fucoxantina e as temperaturas mínimas, máximas e médias.

Após uma análise de dados pelo método boxplot, constou-se que existiam outliers a interferir com as correlações, por isso estes foram removidos da análise. Após nova análise, apenas a temperatura máxima apresentou uma correlação positiva e significativa ($p<0.05$) com o teor de fucoxantina (Figura 26).

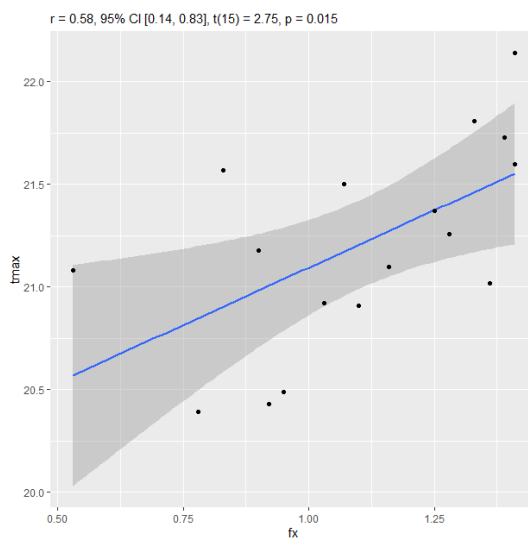


Figura 26- Gráfico que representa Fucoxantina/Temperatura máxima.

IV. DISCUSSÃO

1. Validar o método de medição por espectofotometria com *Tisochrysis lutea*.

Quando quantificadas as 5 amostras de *Tisochrysis lutea*, pelos métodos não modificado de Wang et al. (2018), retirando os *outliers* e feita a correlação com os dados obtidos por *HPLC* numa experiência anterior utilizando as mesmas amostras (tabela 2, figura 16), conseguimos entender que a correlação é bastante fraca ($R^2 = 0,3011$). De forma a tentar melhorar essa mesma correlação foram feitas alterações no protocolo do método de Wang et al. (2018), colocando algumas variáveis. A primeira variável foi a utilização da DO teórica da cultura inicial, o que piorou um pouco, sem grandes alterações significativas, a correlação com *HPLC* quando comparativamente ao método sem alguma alteração. No entanto foi de facto a melhor opção para ser utilizada para o resto da experiência visto que existiu alguns problemas com a homogeneização da cultura em questão, como conseguimos observar na figura 27 (o que atrapalhava a leitura) e porque as amostras eram liofilizadas (uma vez que no artigo não utilizam amostras liofilizadas).

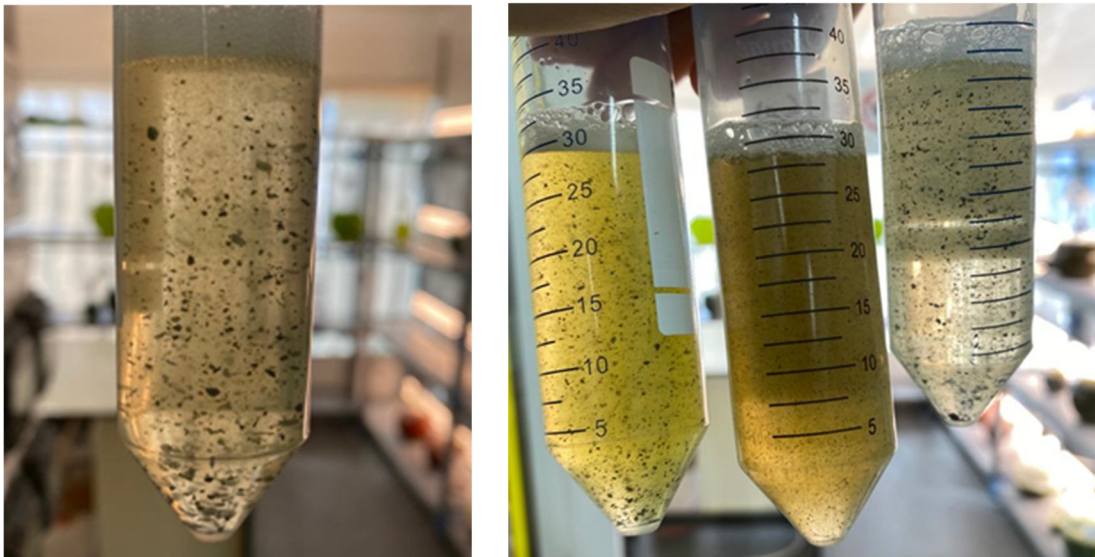


Figura 27 - Amostras de cultura de *Tisochrysis lutea* depois da tentativa de homogeneização.

Seguidamente a próxima variável analisada foi a introdução de *microbeads*. A diferença da correlação não foi significativa (um pouco pior do que a correlação do método não

modificado e do método *HPLC*). Com a adição da centrifugação aos *microbeads* da variável anterior, este conjunto de variáveis fez com que existisse uma melhoria acentuada na correlação com *HPLC*, de $R^2 = 0,3011$ (método não modificado) para $R^2 = 0,7173$ (DO teórica + *microbeads* + centrifugação). Por fim foi testada mais uma variável que foi fazer de novo uma leitura a 750 nm da amostra depois do processo de extração, no entanto não parece ter existido nenhuma melhoria, antes pelo contrário, os valores ficaram um pouco piores, o que poderá querer dizer que como a equação proposta pelo método não modificado de Wang et al. (2018) já inclui uma correção pela DO da cultura e uma correção adicional pode ser excessiva.

2. Variação dos pigmentos no processo de colheita em *Phaeodactylum tricornutum*.

Após a correlação de Pearson feita com todos os dados, notou-se que as relações mais fortes eram entre a fucoxantina e a temperatura máxima ($r=0,39$) assim como a fucoxantina e a DO540 ($r=0,61$), com uma significância de $p < 0,1$ e $p > 0,05$ respetivamente. No entanto foram retirados os *outliers*, o que fez com que os resultados ficassem alterados.

No gráfico da figura 26, está representado o gráfico final da fucoxantina/temperatura máxima. Neste gráfico podemos reparar que o valor de r é 0,58 e o $p < 0,05$ o que significa que existe uma relação positiva entre o aumento da temperatura máxima e o conteúdo de fucoxantina na biomassa de microalgas de *Phaeodactylum tricornutum*, no entanto, não significa que o aumento de temperatura máxima cause o aumento do conteúdo de fucoxantina, apenas indica a relação entre estas duas variáveis

De forma a entender mais um pouco a relação da fucoxantina com a temperatura, no gráfico da figura 25, mostra que não existe clareza nas relações entre as variantes. Segundo Beuzenberg, et al (2017) indica que os níveis de luz baixa, leva ao aumento de fucoxantina, o que seria interessante aprofundar mais esta pesquisa em microalgas cultivadas no exterior.

V. CONCLUSÃO

Relativamente á primeira experiência, podemos concluir que a alteração de colocar as variáveis *microbeads* e centrifugação feita no protocolo do método de (Wang et al., 2018) foi mais vantajosa demonstrando uma correlação mais elevada do que no método não modificado. Parece ser uma boa alternativa ao HPLC, no entanto este estudo foi feito com poucas amostras o que não é suficiente para validar com êxito o método por espectrofotometria testada na experiência. Na segunda experiência constatou-se que existe uma relação positiva entre o aumento da temperatura máxima e o conteúdo de fucoxantina na biomassa de microalgas (*Phaeodactylum tricornutum*), no entanto esta relação não quer dizer que uma variável cause a outra. De forma a ter mais conclusões sobre estes dados, seriam necessários mais estudos em que fosse possível ter um intervalo de temperaturas maior, uma vez que os intervalos de temperatura avaliados foram muito curtos (entre 22,4 °C e 22,1 °C).

VI. CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

O estágio na empresa Necton S.A. teve um impacto positivo no meu desenvolvimento enquanto pessoa e profissionalmente. Esta experiência foi enriquecedora para os meus conhecimentos na área das microalgas, na experiência prática em laboratório, etc. Ajudei em várias tarefas tais como: o empacotamento da biomassa de microalgas, montagem de GWs, nas leituras matinais das DOs, na limpeza do laboratório, utilizando a autoclave, entre outras atividades. Foram 6 meses ao todo que me ajudaram a ter a noção de como uma empresa funciona, da quantidade de tarefas e responsabilidades que uma empresa desta grandeza acarreta. Este estágio teve como objetivo concluir o meu grau de mestre em Ciências Biomédicas e Mecanismos de Doenças, frequentado na Universidade do Algarve. Fiz boas amizades e conheci pessoas maravilhosas, que são os colegas ideais para qualquer emprego. Devido ao facto da empresa Necton S.A. receber vários estagiários e trabalhadores de vários pontos do mundo, foi necessário comunicar muitas vezes através da língua inglesa, o que me fez melhorar muito o meu nível de inglês e melhorar a minha confiança em comunicar usando esta língua. Foi uma boa experiência no geral e que me faz recordar boas memórias.

BIBLIOGRAFIA

- Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., & Grachev, S. (2010). The effects of Xanthigen™ In the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(1), 72–81. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01132.x>
- Aboonajmi, M., & Faridi, H. (2016). *Nondestructive quality assessment of Agro-food products. September.*
- Ariede, M. B., Candido, T. M., Jacome, A. L. M., Velasco, M. V. R., de Carvalho, J. C. M., & Baby, A. R. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research*, 25(January), 483–487. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>
- Bae, M., Kim, M. B., Park, Y. K., & Lee, J. Y. (2020). Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
- Baird, R. B., Eaton, A. D., & Rice, E. W. (Eds.). (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater (23rd ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Beppu, F., Niwano, Y., Tsukui, T., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2009). Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *Journal of Toxicological Sciences*, 34(5), 501–510. <https://doi.org/10.2131/jts.34.501>
- Bertrand, M. (2010). Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 89–102. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9589-x>
- Beuzenberg, V., Goodwin, E., Puddick, J., Romanazzi, D., Adams, S., Packer, M. (2017) Optimising conditions for growth and xanthophyll production in continuous culture of *Tisochrysis lutea* using photobioreactor arrays and central composite design experiments. *New Zealand journal of botany*, vol. 55, no. 1, 64–78. <http://dx.doi.org/10.1080/0028825X.2016.1238398>
- Bley, T., Zeng, A. P., Pavlov, A., Reardon, K. F., & Gu, M. B. (2014). Engineering in Life Sciences Editors. *Engineering in Life Sciences*, 14(1), 2–3. <https://doi.org/10.1002/elsc.201470014>
- Chuntapa, B., Powtongsook, S., & Menasveta, P. (2003). Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220(1–4), 355–366. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00428-3)

- Daniotti, S., & Re, I. (2021). Marine biotechnology: Challenges and development market trends for the enhancement of biotic resources in industrial pharmaceutical and food applications. a statistical analysis of scientific literature and business models. *Marine Drugs*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/md19020061>
- D'Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., De Girolamo, M., Ficoneri, C., & Riccioni, G. (2012). Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine Drugs*, 10(3), 604–616. <https://doi.org/10.3390/md10030604>
- Gao, F., Teles (Cabanelas, ITD), I., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Process optimization of fucoxanthin production with *Tisochrysis lutea*. *Bioresource Technology*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123894>
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>
- Grobbelaar, J. U. (2004). Algal biotechnology: Real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, 70(1), 140–144. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30274-X](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30274-X)
- Halim, R., Hosikian, A., Lim, S., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>
- Hardo Panintingjati Brotosudarmo, T., Limantara, L., Dwi Chandra, R., & Heriyanto. (2018). Chloroplast Pigments: Structure, Function, Assembly and Characterization. *Plant Growth and Regulation - Alterations to Sustain Unfavorable Conditions*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75672>
- Henriques, M., Silva, a, & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, July 2014, 586–593.
- Hu, F., Liu, W., Yan, L., Kong, F., & Wei, K. (2019). Optimization and characterization of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with astaxanthin and evaluation of anti-photodamage effect in vitro. *Royal Society Open Science*, 6(10). <https://doi.org/10.1098/rsos.191184>
- Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.003>
- Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(2), 191–194. [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)30778-3)

- J. Louda, P. Monghkosri, Florida Atlantic University, (2006), http://www.aoml.noaa.gov/ocd/sferpm/louda/louda_chl_compare.html, Cited 20 Out 2006
- Kay, R. A., & Barton, L. L. (1991). Microalgae as Food and Supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(6), 555–573. <https://doi.org/10.1080/10408399109527556>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Liu, M., Li, W., Chen, Y., Wan, X., & Wang, J. (2020). Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sciences*, 255(March). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117850>
- Lorenzen, C. J. (1967). Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12(2), 343–346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends in Food Science and Technology*, 117(March), 163–181. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.012>
- Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081113>
- Mohamadnia, S., Tavakoli, O., Faramarzi, M. A., & Shamsollahi, Z. (2020). Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea*: A review of recent developments. In *Aquaculture* (Vol. 516). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734637>
- Morocho-Jácome, A. L., Ruscinc, N., Martinez, R. M., de Carvalho, J. C. M., Santos de Almeida, T., Rosado, C., Costa, J. G., Velasco, M. V. R., & Baby, A. R. (2020). (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9513–9522. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10936-x>
- Muller-feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J Appl Phycol Publication-497.Pdf*, 12, 527–534.
- OECD (2016). *The Ocean Economy in 2030*. Paris: OECD Publishing.

- OECD Marine biotechnology. Definitions, Infrastructures and Directions for Innovation; OECD Publishing: Paris, France, 2017; Volume 43.
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Pereira, H., Sá, M., Maia, I., Rodrigues, A., Teles, I., Wijffels, R. H., Navalho, J., & Barbosa, M. (2021). Fucoxanthin production from *Tisochrysis lutea* and *Phaeodactylum tricornutum* at industrial scale. *Algal Research*, 56(May). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102322>
- Prasanna, R., Sood, A., Suresh, A., Nayak, S., & Kaushik, B. D. (2007). Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Botanica Hungarica*, 49(1–2), 131–156. <https://doi.org/10.1556/ABot.49.2007.1-2.14>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52(06), 237–292. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52005-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52005-4)
- Ren, R., Azuma, Y., Ojima, T., Hashimoto, T., Mizuno, M., Nishitani, Y., Yoshida, M., Azuma, T., & Kanazawa, K. (2013). Modulation of platelet aggregation-related eicosanoid production by dietary F-fucoxanthin from brown alga *Laminaria japonica* in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 110(5), 880–890. <https://doi.org/10.1017/S000711451200606X>
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115–126. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92(November 2017), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Schieppati, D., Patience, N. A., Campisi, S., & Patience, G. S. (2021). Experimental methods in chemical engineering: High performance liquid chromatography—HPLC. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(8), 1663–1682. <https://doi.org/10.1002/cjce.24050>
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M., & Hirata, T. (2006). Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9805–9810.
<https://doi.org/10.1021/jf062204q>
- Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Chew, K. W., Tao, Y., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. *Bioresource Technology*, 304, 122997.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122997>
- Thomas, S. E., & Johnson, E. J. (2018). Xanthophylls. *Advances in Nutrition*, 9(2), 160–162. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx005>
- UNESCO, Rep. SCOR/UNESCO WG 17, UNESCO, Paris, Monogr Oceanogr Methodol, 1, 11 (1966).
- Vieira, M. V., Pastrana, L. M., & Fuciños, P. (2020). Microalgae Encapsulation Systems for Food, Pharmaceutical and Cosmetics Applications. *Marine Drugs*, 18(12).
<https://doi.org/10.3390/md18120644>
- Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2015). Nanocarriers for delivery of antioxidants on the skin. *Cosmetics*, 2(4), 342–354. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2040342>
- Wang, L. J., Fan, Y., Parsons, R. L., Hu, G. R., & Zhang, P. Y., Li, F. (2018). A rapid method for the determination of fucoxanthin in diatom. *Marine Drugs*, 16(1), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/md16010033>
- Wang, H. M. D., Chen, C. C., Huynh, P., & Chang, J. S. (2015). Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology*, 184(December), 355–362.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>
- Watkins, R., Wu, L., Zhang, C., Davis, R. M., & Xu, B. (2015). Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 6055–6074. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92162>
- Wellburn, A. R., & Lichtenthaler, H. (1984). Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. *Advances in Photosynthesis Research*, II, 9–12. https://doi.org/10.1007/978-94-017-6368-4_3
- Wu, J., Gu, X., Yang, D., Xu, S., Wang, S., Chen, X., & Wang, Z. (2021). Bioactive substances and potentiality of marine microalgae. *Food Science and Nutrition*, 9(9), 5279–5292. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2471>
- Yap, C. Y., & Chen, F. (2001). Polyunsaturated Fatty Acids: Biological Significance, Biosynthesis, and Production by Microalgae and Microalgae-Like Organisms. *Algae and Their Biotechnological Potential*, 2(0), 1–32. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9835-4_1
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., & Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/723515>