

Maria Alice Mendes de Pina

**Melhoramento da microalga
Nannochloropsis oceanica para produção
de compostos de valor acrescentado**



Universidade do Algarve

Faculdade Ciências e Tecnologia

2022/2023

Maria Alice Mendes de Pina

**Melhoramento da microalga *Nannochloropsis oceanica*
para produção de compostos de valor acrescentado**

Mestrado em Biologia Marinha

Orientadores:

Prof. Dr. João Carlos Serafim Varela

Dra. Lisa Maylin Schüler



Universidade do Algarve
Faculdade Ciência e Tecnologia
2022/2023

Melhoramento da microalga *Nannochloropsis oceanica* para produção de compostos de valor acrescentado

Declaração de autoria de trabalho

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.

(Maria Alice Mendes de Pina)

Copyright Maria Alice Mendes de Pina

“A universidade do Algarve tem o direito, perpetuo e sem limite geográficos, de arquivar e publicitar através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua copia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Prefácio

O trabalho experimental apresentado nesta tese foi realizado no Laboratório do GreenCoLab, em parceria com o grupo de investigação Marbiotech (Centro de Ciências do Mar), sob a supervisão constante do Mestre Gabriel Bombo da Dra Lisa Schüler e do Prof. Dr. João Varela.

Agradecimentos

“Porque eu, o Senhor teu DEUS, te tomo pela tua mão direita; e te digo: não temas, eu te ajudarei.” ISAIAS 41:13

Obrigado, Pai, por me ter escutado nos momentos difíceis deste percurso, e por ter me abençoado sempre com a força de boa vontade.

A todos os que veem o Mar através dos laboratórios, agradeço a atitude e a determinação em continuar a fazer desta fonte, não apenas um bater das ondas, mas uma costa dividida por várias cadeias ricas de macro e micro-organismos, para aqueles que seguem com esta paixão, seguindo nossos passos.

Agradeço ao Greenolab e ao Marbiotech por me terem aceitado neste trabalho, disponibilizando todos os meios necessário à realização da minha dissertação

A cada um de vós: Sofia, MéliSSa, Bernardo, Rita Camacho, Tamára Santos, Vera, Britta, Eduardo Lucas, entre outros, um especial obrigado pela vossa disponibilidade em trabalhar comigo sempre que precisava, ensinando e despertando em mim uma vasta visão científica do Mar através do laboratório.

Gabriel Bombo e Inês Maia, para vocês os dois não tenho palavras. Representam o Salmo de Isaías 41:13. Foram o encorajamento deste percurso que não conhecia, a confiança de que um dia chegaria algum lugar, a porta aberta no qual fui acolhida com amor, independentemente do horário e do local onde se encontravam, pois, além de investigadores foram professores para mim. Que o vosso trajeto seja abençoado pela mesma graça. Acreditem, porque eu acreditei em vocês e cheguei aonde estou. Obrigada por tudo.

Aos meus orientadores, Professor Doutor João Varela e Doutora Lisa Schüler, um especial obrigado por me terem aceitado e ajudado durante todo o desenrolar do trabalho. Obrigada por tudo que fizeram.

Dedicatória

Dedico esta tese a todos que, por alguma razão, se sentem ignorados, discriminados, invisíveis, por motivo de comunicação e compreensão. A todos que foram e ainda são subtraídos, porque a mente de alguns ainda é vazia e pensam que ser inteligente é lhes entregar tudo sem nada perder.

Antigamente, ensinar era uma honra, agora, ensinar é um favor, não se deixem afetar pelos favores, que muitos ainda não sabem fazer ou mesmo o que é, agarrem nos vossos propósitos. Não deixem que os outros descrevam o percurso da vossa vida, sejam o arquiteto do vosso percurso, mesmo que este seja longo, e durante a vossa trajetória, não se envergonhem, aproveitem para escrever a vossa própria história. É bonito poder contar a nossa vida aos outros, é mau ser uma má referência na boca dos outros e ter um nome no papel.

Nós somos como somos e as dificuldades fazem parte da vida, no deserto seco e árido, com grandes tempestades, há sempre aqueles que resistem e sobrevivem porque a esperança é a última coisa a morrer e o pensamento deve ser que existe sempre alguém disponível para estender a mão.

*...“Maria passa na frente,
Pisa na cabeça da serpente
Interceda junto a Jesus,
Cruz Sagrada seja minha Luz”*

Padre Marcelo Rossi

Resumo

Nas últimas décadas, tem-se assistido, da parte da comunidade científica, a um interesse acrescido no melhoramento da capacidade de produção das microalgas e da extração de compostos com valor acrescido, tendo em vista aplicações no campo farmacêutico e alimentar. Este trabalho centrou-se na obtenção de novas estirpes mutantes de *Nannochloropsis oceanica* com uma melhorada capacidade para a produção do ácido eicosapentenóico (EPA), um ácido gordo polinsaturado ómega-3 . Para este efeito, são utilizadas habitualmente duas estratégias: fisiológicas ou genéticas. A primeira, utiliza a manipulação dos fatores abióticos, enquanto que na segunda, utiliza-se a mutagenese aleatória, em combinação com inibidores de vias metabólicas (por exemplo, nicotina), para se obterem estirpes mutantes de alto desempenho e capacidade de produção de carotenoides. Neste trabalho, pretendeu-se determinar o melhor meio de cultura e a melhor combinação de fatores abióticos de forma a potenciar um aumento na produtividade de EPA e carotenoides da microalga *Nannochloropsis oceanica*. Neste trabalho conclui-se que o meio a utilizar como meio de inoculação foi o Meio Algal Modificado (MAM) em relação ao qual a *N. oceanica* apresentou uma taxa de crescimento de 4,24 células.d⁻¹. Seguidamente, sujeitou-se esta microalga a várias condições de stress abióticos (diferentes concentrações de nutrientes, várias intensidades luminosas e temperaturas). Verificou-se que a espécie *N. oceanica* exibe uma elevada produtividade para o ácido eicosapentenóico (EPA) quando cultivada a 10x MAM, alcançando 9,43 mg EPA .L⁻¹.d⁻¹, sujeita a uma alta intensidade luminosa foi produzido 9,40 mg EPA .L⁻¹.d⁻¹ e com uma temperatura de 22°C uma concentração de EPA de 7,36 mg..L⁻¹.d⁻¹. Em relação à produção de carotenoides, o comportamento é inverso, tendo-se verificado que elevadas intensidades luminosas resultam numa baixa produtividade de EPA. Relativamente à obtenção de mutantes, recorreu-se ao processo de mutagenese aleatória (MA) com metanossulfonato de etilo (EMS) a várias concentrações. Obteve-se crescimento em placa apenas quando utilizada a menor concentração de EMS (250 Mm) com a nicotina como agente inibidor de vias metabólicas. Conclui-se que a para a produção de EPA as melhores condições de cultivo microalgal são uma elevada intensidade luminosa (110 μmol.m². s⁻¹), 22°C de temperatura com 10x meio MAM. Em relação à produção de carotenoides os melhores resultados foram alcançados com uma intensidade luminosa de 50 μmol.m². s⁻¹, 30°C de temperatura e com 10x meio MAM.

Conclui-se ainda que concentrações superiores a 250 μM de EMS são letais para *N. oceanica*.

Palavras-chaves: *Nannochloropsis oceanica*; Ácidos Gordos Polinsaturados (PUFA); Carotenoides; Mutação aleatória; Inibidores metabólicos, fatores abióticos

Abstract

In recent decades, there has been a growing interest in improving microalgae production and extracting high-value compounds for pharmaceutical and food applications. This study focused on developing new mutant strains of *Nannochloropsis oceanica* with enhanced eicosapentaenoic acid (EPA) production, an omega-3 (ω -3) polyunsaturated fatty acid. Two strategies are commonly used to improve microalgae production: physiological and genetic. The first strategy involves the manipulation of abiotic factors. In contrast, the second strategy uses random mutagenesis and metabolic pathway inhibitors (e.g., nicotine) to obtain high-performance mutant strains with enhanced carotenoid production. This study determined the best culture medium and combination of abiotic factors to increase the productivity of EPA and carotenoids in *Nannochloropsis oceanica*. The results showed that the best culture medium for *N. oceanica* was Modified Algal Medium (MAM), which resulted in a growth rate of 4.24 cells.d⁻¹. The microalga was then subjected to various abiotic stress conditions (different nutrient concentrations, light intensities, and temperatures). It was found that *N. oceanica* exhibited high productivity for EPA when cultured at 10x MAM, reaching 9.43 mg EPA.L⁻¹.d⁻¹. When subjected to high light intensity, 9.40 mg EPA.L⁻¹.d⁻¹ was produced, and at a temperature of 22°C, the EPA concentration was 7.36 mg.L⁻¹.d⁻¹. The opposite was observed in carotenoid production, with high light intensities resulting in low EPA productivity. Regarding the development of mutants, the random mutagenesis (MA) process was used with ethyl methanesulfonate (EMS) at various concentrations. Growth on plates was only observed when the lowest EMS concentration (250 Mm) was combined with nicotine as a metabolic pathway inhibitor.

In conclusion, the best conditions for EPA production are a high light intensity (110 μ mol.m².s⁻¹), 22°C temperature, and 10x MAM medium. The best results were obtained for carotenoid production with a light intensity of 50 μ mol.m².s⁻¹, 30°C temperature, and 10x MAM medium. It was also concluded that concentrations of EMS above 250 μ M are lethal to *N. oceanica*.

Keywords: *Nannochloropsis oceanica*, EPA, carotenoids, mutagenesis, abiotic factors

Índice

Resumo	5
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Abreviaturas.....	13
1. Introdução.....	1
1.1. Microalgas.....	1
1.1.1 Produção de microalgas.....	2
1.1.2 Aplicação nutricional das microalgas.....	3
1.2 Melhoramento da produtividade	5
1.2.1 Fatores abióticos	6
1.2.2 Mutagénese aleatória (MA).....	13
1.3 Espécies pertencentes ao género <i>Nannochloropsis</i>	17
1.3.1 <i>Nannochloropsis oceanica</i>	17
2. Objetivos.....	20
3. Materiais e métodos.....	21
3.1 Preparação dos meios de cultura líquidos	22
3.2 Crescimento de <i>N. oceanica</i> sob diferentes fatores abióticos.....	23
3.2.1 Taxa de crescimento	24
3.3 Análise do perfil e produtividade dos ácidos gordos	27
3.4 Ensaio de extração de pigmentos	28
3.5 Mutagénese aleatória química e seleção de mutantes.....	29
3.5.1 Ensaio de viabilidade celular com inibidores metabólicos.....	29
3.5.2 Mutagénese aleatória	30
3.6 Estatística	31
4.1 Crescimento de <i>N. oceanica</i> em diferentes meios de cultura	32
4.2 Crescimento de <i>N. oceanica</i> sob diferentes fatores abióticos.....	34
4.2.1 Retas de calibração	34
4.2.2 Nutrientes.....	35
4.2.3 Intensidade luminosa	39
4.2.4 Temperatura.....	43
4.3 Efeitos dos fatores abióticos na produção de compostos de valor acrescentado	46
4.3.1 Perfil e produtividade dos ácidos gordos.....	46
4.3.2 Pigmentos	52
4.4 Ensaio de viabilidade celular com inibidores metabólicos.....	55

4.4 Mutagênese aleatória.....	56
5. Discussão	58
5.1 Crescimento de <i>N. oceanica</i> em diferentes meios de cultura	59
5.2 Crescimento de <i>N. oceanica</i> sob diferentes fatores abióticos.....	60
5.2.1 Nutrientes.....	60
5.2.2 Intensidade luminosa	62
5.2.3 Temperatura.....	63
5.3 Efeitos dos fatores abióticos na produção de compostos de valor acrescentado	65
5.3.1 Perfil e produtividade dos ácidos gordos.....	65
5.3.2 Pigmentos	67
5.4 Discussão geral	68
6. Conclusões.....	71
Bibliografia.....	72
Anexos	81
Anexo 1 - Inóculos de <i>Nannochloropsis oceanica</i> a diferentes meios de cultura	81
Anexo 2 - Resultados da experiência com <i>N. oceanica</i> a diferentes intensidades luminosas (altas e ou baixas).....	82
Anexo 3 - Extração dos Ácidos gordos da <i>N. oceanica</i> após um período (8 dias) de stress abiótico.	83
Anexo 4 - Extração de pigmentos	84

Lista de Figuras

Figura 1. *Nannochloropsis oceanica*: fotografia obtida durante uma observação microscópica que permite observar uma coloração alaranjada indicadora da presença de carotenoide.

Figura 2. Ilustração de contagem celular, utilizando uma câmara de Neubauer, e um microscópio ótico ligado a um ecrã durante uma contagem celular.

Figura 3. Biomassa de *N. oceanica* filtrada, para determinação do peso seco.

Figura 4. Curva de crescimento de *N. oceanica* com diferentes meios de cultura. Meio Guillard's ou F/2 (quadrado, roxo-claro); meio Algal ou MAM (diamante, preto) e meio Nutribloom (triângulo, verde)

Figura 5. a) Reta de calibração determinado com base na densidade ótica e na contagem celular; **b)** Reta de calibração determinado com base densidade ótica e peso seco.

Figura 6. Culturas em triplicado de *N. oceanica* em frascos de 800 mL, enriquecidos com diferentes concentrações de nutrientes, mas submetidos à mesma intensidade luminosa ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (22°C), onde (T0) representa o primeiro dia e (T8) o último dia da cultura.

Figura 7. Ensaio de crescimento de *N. oceanica* com diferentes concentrações de nutrientes, cultivadas a 22°C e a uma intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **a)** contagem celular, **b)** peso seco, **c)** concentração de nitratos no meio de cultura e **d)** pH foram medido durante toda a experiência. Foram usados triplicados ($n=3$) em frascos de 800 ml. Os meios de cultura testados em termos das diferentes concentrações de micro- e macronutrientes no qual 1x representa 4 mL de nitratos, 4 mL M de fosfatos e 0.08M de ferro, 5x representa 8mL de nitratos, 8mL de fosfatos e 0.8 mL de ferro e 10x representa 16 mL de nitratos, 16 mL de fosfatos e 0.16 mL de ferro.

Figura 8. Cultura de *N. oceanica*, representando as duas experiências com intensidades luminosas diferentes: $100 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ representa a intensidade luminosa padrão, 50 e $250 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensidades luminosas baixa e média, respetivamente; 600 e $1200 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$, altas intensidades luminosas.

Figura 9. a) Representação gráfica do crescimento celular a todas as intensidades luminosas testadas a uma concentração de nutrientes de 5x (MAM 5x) e a uma temperatura de 22°C para o crescimento laboratorial da *N. oceanica* a 50 (verde), 110 (azul escuro), 250 (cinza), 600 (preto) e 1200 (azul claro) $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$; **b)** produção de

biomassa obtida a várias intensidades luminosas (baixas, médias e altas); **c**) consumo de nitratos e **d**) variação do pH.

Figura 10. Culturas de *N. oceanica* a diferentes temperaturas, recorrendo ao uso de uma câmara climática para crescer as células às temperaturas de 15°C e 30°C. As culturas a 22°C foram crescidas à temperatura ambiente. As culturas de *N. oceanica* foram inoculadas em MAM 5x a uma intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 11. Curva de crescimento de *N. oceanica* a diferentes temperaturas em termos **a**) contagem celular, **b**) peso seco, **c**) concentração de nitratos no meio de cultura e **d**) pH.

Figura 12. Conteúdo de pigmentos de *N. oceanica* em condições padrão e sob stress abiótico, nomeadamente quantidade de clorofila *a* (a) e conteúdo de carotenóides (b).

Figura 13. Exemplos de microplacas utilizados durante a experiência de viabilidade celular para determinação da concentração sub-letal ou letal para a estirpe selvagem de *N. oceanica*. Cada microplaca foi subdividida em 4 setores de 6 poços. Zero (0) representa o controlo das amostras selvagens e os restantes sectores de 6 poços estão devidamente identificados com os inibidores (cerulenina, difenilamina, nicotina e norflurazon) e respetivas concentrações testadas.

Figura 14. Viabilidade celular esperada após a realização de mutagénese aleatória com etilmetanosulfonato.

Figura 15. a) Mutantes de *N. oceanica* obtidos após a realização do ensaio da viabilidade metabólica a várias concentrações de inibidores e b) divisão da placa para o crescimento isolado de estirpes de mutantes de *N. oceanica*.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produtividades relativas de diferentes espécies de *Nannochloropsis* sob diferentes fatores abióticos.

Tabela 2. Processos de mutagênese aleatória e resultados obtidos nas diversas estirpes pertencentes ao gênero *Nannochloropsis*

Tabela 3. Hierarquia taxonômica da *N. oceanica*, classificação científica de acordo com Zanella & Vianello (2020).

Tabela 4. Composição química dos meios (F/2) Guillard & Ryther (1962) e meio de cultura modificado Algal (MAM) (Pereira et al., 2009) utilizados no teste para determinação do melhor meio de cultura.

Tabela 5. Concentrações de inibidores utilizados no ensaio de inibição das vias metabólicas.

Tabela 6. Parâmetros de crescimento de *N. oceanica* nos três meios de cultura testados: Meio Guillard's (F/2), Meio Algal Modificado 1000x (MAM) e Meio Nutribloom (NB).

Tabela 7. Parâmetros de crescimento da *N. oceanica* a nível da biomassa, inoculadas com diferentes concentrações de nutrientes (MAM 1x, 5x e 10x) mantendo constante a intensidade luminosa ($110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e a temperatura (22°C).

Tabela 8. Produtividade e taxa de crescimento da *N. oceanica* a nível das várias intensidades luminosas testadas em meio MAM 5x e a uma temperatura de 22°C .

Tabela 9. A produtividade e taxa de crescimento *N. oceanica*, testada a base da influência da temperatura (diferentes temperaturas), com a mesma concentração de nutrientes (5x) e a mesma intensidade luminosa ($110\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

Tabela 10. Perfil de ácidos gordos obtidos da biomassa da *N. oceanica* em termos percentuais do conteúdo, tendo em conta os vários fatores abióticos utilizados durante a experiência. A média das amostras ($\langle x \rangle$) e o desvio padrão(s) estão representados. n.d. - Ácidos gordos não detetados; SFA - Ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - ácidos gordos polinsaturados.

Tabela 11. Produtividade de ácido ecosapentaenóico (EPA), ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) de *N. oceanica* sob diversas condições de stress abiótico. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas, baseadas no teste de *t*-Student.

Tabela 12. Produtividade de compostos clorofila *a* e carotenoides da *N. oceanica* obtidos durante a experiência com os vários fatores abióticos testados.

Abreviaturas

ω -3 - Ómega 3

μ - Taxa de crescimento específico

ARA - Ácido Araquidónico (*Arachidonic acid*)

ASW - Água Artificial Salgada (*Artificial Salt Water*)

ATP- Adenosina Trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

BHT - Butilhidroxitolueno (*Butylated hydroxytoluene*)

CC - Concentração celular

CCMAR - Centro de Ciências do Mar

CEC - 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato

Chl a - clorofila *a*

Chl b - clorofila *b*

CO₂ - Dióxido de Carbono

D_f- Fator de diluição (*Dilution factor*)

DHA - Ácido docosahexaenóico (*Docosahexaenoic acid*)

DNA - Acido Nucleico Difosfato (*DeoxyriboNucleic Acid*)

EMS - Metanossulfonato de Etilo (*Ethyl MethaneSulfonate*)

ENU - Nitrosourea de Etilo (*N-ethyl-N-nitrosourea*)

EPA - Ácido eicosapentenóico (*Eicosapentaenoic acid*)

F/2 - Meio de Cultura Guillard's

FA - Ácido Gordo (*Fatty Acid*)

FAME - Ester Metílico de Ácidos Gordo (*Fatty Acid Methyl Esters*)

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (*Gas chromatography–mass spectrometry*)

HCl - Ácido clorídrico

HLPC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*)

LED - Diodo emissor de luz

MA - Mutagénese aleatória

MAM - Meio Algal Modificado

MNU - *N*-metilo-*N*-nitrosourea

MNNG/NTG - Nitrosoguanidina

MUFA - Ácido Gordo Monoinsaturado (*MonoUnsaturated Fatty Acids*)
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NB - Meio de Cultura Nutribloom
n.d – não detetado
O₂ - Oxigénio
OD - Densidade Ótica
PUFA - Ácido gordo polinsaturado (*PolyUnsaturated Fatty Acid*)
PS - Peso Seco
PTFE- Politetrafluoretileno (*Polytetrafluoroethylene*)
ROS – espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)
Rpm - Rotação por minuto
SCar - Carotenoides Secundários (*Secondary Carotenoids*)
SFA - Ácido Gordo Saturado (*Saturated Fatty Acids*)
SW - Água Salgada (*Salt Water*)
TA - Temperatura Ambiente
TAG - Triacilglicerol
TCar - Total de carotenoides
TFA - Total de ácidos gordos
UFC - Unidades de formadoras de colónias
UV – Ultravioleta

1. Introdução

As microalgas têm vindo a ser objeto da atenção da comunidade científica há várias décadas, por serem consideradas como potenciais fábricas de produção de ácidos gordos e carotenoides de valor acrescentado com diversas aplicações industriais. Apesar do reconhecimento do potencial das microalgas, atualmente existem aspetos a explorar devido às singularidades apresentadas por cada espécie de microalgas, tornando necessário desenvolver processos de cultura e extração de produtos de alto valor comercial desejados.

Assim, devido ao seu rápido crescimento e alta produtividade em termos de biomassa e bioprodutos, as microalgas do género *Nannochloropsis* são de particular interesse em diversas indústrias por possuírem uma capacidade única de produzir ácidos gordos polinsaturados ω -3, em especial o ácido eicosapenténico (EPA) e carotenoides. No entanto, existem lacunas em diversos processos, nomeadamente o modo de cultivo, colheita de biomassa, aumento na produtividade de bioprodutos e desenvolvimento de processos rentáveis de extração de óleos ricos em EPA e outros bioprodutos.

1.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que apresentam uma grande biodiversidade devido à sua grande capacidade de adaptação a habitats variados, como ambientes aquáticos (marinhos e água doce) ou incrustações em solos (Chisti, 2004), ou presentes em ambientes extremos (Cardozo *et al.*, 2007; Wijffels, 2007). Estes microrganismos constituem um grupo heterogéneo de organismos unicelulares, organizados em colónias ou em filamentos, com diversos padrões e colorações, devido aos seus pigmentos fotossintéticos (Olaizola, 2003).

As microalgas são algas microscópicas, procariotas ou eucariotas e apresentam uma elevada diversidade morfológica (Hoek *et al.*, 1995; McHugh, 2003). As microalgas procariotas pertencem ao filo Cianobactéria, enquanto as eucariotas estão incluídas principalmente nas classes Bacilariophyceae (diatomáceas), Eustigmatophyceae (por exemplo, *Nannochloropsis*), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (coccolitoforídeos) e Cryptophyceae (criptomonas), para além das Prasinophyceae e Chlorophyceae.

São produtores primários com capacidades de converter o dióxido de carbono (CO₂) e a luz em várias fontes de energias, através do processo de fotossíntese. A utilização do processo de fotossíntese faz com que estes microrganismos se tornem capazes de produzir proteínas, lípidos, polissacáridos e hidrocarbonetos (Chisti, 2007).

Microrganismos de fácil cultivo, podem ser cultivadas em sistemas abertos (tanques abertos, lagoas ou lagos extensos), ou cultivadas em sistemas fechados (fotobiorreatores). A escolha do sistema adequado depende das características biológicas da microalga e do produto metabólico de interesse para o estudo (Luche *et al.*, 2019). As microalgas apresentam as vantagens no seu cultivo quando comparadas com as plantas superiores, destacando-se a sua elevada taxa de crescimento com elevada produção de biomassa, sem necessitarem de terrenos aráveis que são necessários para cultivares de plantas superiores, podendo ser cultivadas todo o ano, em água salgada ou mesmo em águas residuais (Fu *et al.*, 2019). Mesmo que estudos revelem existir mais de 50.000 espécies de microalgas, apenas ~30 espécies estão a ser exploradas e utilizadas no mundo científico e comercial devido à sua composição química e ao seu valor no mercado industrial (Fernandes & Cordeiro, 2021)

Nos últimos 50 anos, as microalgas têm sido objeto de vários estudos que visam explorar o seu potencial como fonte de produção de biomassa e vários bioprodutos de alto valor comercial, assim como usar as microalgas para outras aplicações, como no tratamento de águas residuais e produção de biocombustíveis. Nas últimas décadas, só em Portugal, a Universidade de Coimbra estudou cerca de 1000 espécies de microalgas e produziu cerca de 4000 estirpes de microalgas de água doce com produtos de valores acrescentado que podem ser aplicadas em diversas áreas como fonte de alimento, na indústria farmacêutica e cosmética. Apesar da produção de bioprodutos estar bem caracterizada a nível laboratorial, a sua transferência para o cultivo em grande escala ainda apresenta muitos desafios, tais como melhorar a produção de biomassa e respetivos produtos biotecnológicos e o desenvolvimento de bioreatores (Lu *et al.*, 2018; Vonshak, 2020).

1.1.1 Produção de microalgas

O cultivo de microalgas à escala industrial efetua-se mediante dois sistemas: o aberto (lagoas, lagos ou tanques) e fechados (fotobiorreatores). Os sistemas de cultura em lagoas são construídos em forma circular com uma coluna de água de 20-30 cm, sendo a

cultura constantemente misturada através de uma roda de pás. Neste sistema, a cultura está diretamente exposta ao meio ambiente e o controlo de parâmetros como pH, temperatura e nutrientes dissolvidos no meio é limitado. Estes sistemas são usados para o tratamento de águas residuais e produção de bioestimulantes para melhorar a produção agrícola. Por outro lado, a cultura em fotobiorreatores foi desenvolvida para a produção de espécies de microalgas emergentes e com necessidade no seu controlo de crescimento e produção.

A produção de microalgas a usar como fonte de alimento e obtenção de compostos de valor acrescido requerem um elevado grau de axenicidade, possibilitando o seu emprego nas indústrias de cosmética e farmacêutica (Wang B. *et al.*, 2012). As maiores taxas de produtividade areal foram alcançadas em fotobiorreatores verticais fechados, que chegam a produzir 150 toneladas.h⁻¹.ano⁻¹ e as mais baixas no sistema aberto em lagoas. No entanto, os custos de produção são consideravelmente muito mais elevados nos sistemas fechados devido aos custos de capital inicial e custos operacionais relacionados com, por exemplo, a utilização de eletricidade para ativar as bombas de circulação da cultura (AHoqani *et al.*, 2016; Sialve *et al.*, 2009).

1.1.2 Aplicação nutricional das microalgas

As microalgas são fontes naturais e sustentáveis de alimentos utilizados na aquacultura, como suplementos nutricionais, usados nas indústrias farmacêuticas, na cosmética e na produção de combustível.

A aplicação mais comum das microalgas tem sido na aquacultura, como alimento das fases larvares e juvenis de moluscos, crustáceos e peixes. Muitas espécies aquáticas (salmão, trutas, lagostas e carpas) também necessitam de suplementos de carotenoides fornecidos pelas microalgas para garantir a sua coloração muscular característica (Baker & Gunther, 2004; Fidalgo *et al.*, 1998). Para tais aplicações, a biomassa de microalgas é usada diretamente (viva ou em concentrados) nos sistemas de produção; no entanto, a indústria de rações está atualmente a procurar implementar as microalgas como possível macro-ingrediente ou como suplemento alimentar a incorporar nas dietas.

A biomassa microalgal é introduzida no mercado de alimentos como alimento natural, como corante ou como suplemento saudável capaz de melhorar os produtos alimentícios convencionais. Atualmente já se encontra incorporado em vários produtos alimentares disponíveis em vários países (empregues em bares, na produção de macarrão

e de biscoitos). Atualmente considerados como “Novel Food”, são consideradas como o alimento do futuro (Schüler *et al.*, 2021).

1.1.2.1 Ácidos gordos polinsaturados (PUFA)

Os ácidos gordos podem ser classificados em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (PUFA). Estas são moléculas bioativas importantes e pertencem a duas famílias: ω -3 e ω -6, com a sua primeira ligação dupla no átomo de carbono número 3 ou 6, respetivamente, e contando da extremidade metilo dos ácidos gordos.

O ácido eicosapenténico (EPA - $C_{20}H_{30}O_2$) e o ácido docosahexenóico (DHA - $C_{22}H_{32}O_2$) são os PUFAs ω -3 mais importantes e que mostram efeitos positivos significativos na prevenção de doenças cardíacas, na atividade anti-inflamatória, no desenvolvimento cerebral, na saúde da visão e pelo seu valor nutricional (Ma *et al.*; 2016). Os ácidos gordos ω -3 polinsaturados podem ser obtidos através da produção de microalgas ou extraídos a partir do óleo de vários peixes (bacalhau, arenque, anchova e sardinha). No entanto, a sua obtenção suscitou o interesse da comunidade científica, tornando-se alvo de investigação, visando otimizar a sua produção a partir da cultura de microalgas, evitando a sua contaminação quando extraído a partir dos peixes e reduzindo, dessa forma, a pressão exercida sobre os stocks de pesca. A sua aplicação principal reside nas áreas da medicina e farmacêutica, usados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, na oncologia, na nutrição infantil e no desenvolvimento cerebral (Derner *et al.*, 2006, Sun *et al.*, 2018, Zuo, 2019).

Pelo fato de o organismo humano não possuir a capacidade de produzir PUFA de longa cadeia de uma forma eficiente. O aumento da ingestão do ácido gordo do tipo ω -3 e ω -6 na dieta é importante por serem alguns deles essenciais à saúde humana (por ex., ácidos linoleicos e alfa-linoleico), e por consequência o consumo destes produtos assumiu uma importância acrescida.

1.1.2.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis compostos por um esqueleto hidrofóbico isoprenoide de 40 carbonos e podem ser classificados, pela ausência ou presença de grupos oxigenados, em carotenos (licopeno e β -caroteno) e xantofilas (luteína

e violaxantina), respetivamente. Devido às suas características químicas, nomeadamente as suas ligações duplas conjugadas, os carotenóides apresentam cores diferentes que vão do amarelo ao vermelho. Existem em um elevado número de pigmentos produzidos por microalgas, cada um com capacidades e funções diferentes.

Os carotenoides têm papel importante nas microalgas fotossintéticas porque participam no processo de transferência de energia e funcionam como filtros quando existe um excesso de radiação incidente (função fotoprotetora) (Novoveská, *et al.*, 2019). Além disso, os carotenoides desempenham funções vitais na saúde humana, podendo reduzir o risco de doenças crónicas como tumores ou doenças cardiovasculares. Estes efeitos positivos estão relacionados com as suas capacidades antioxidantes, protegendo as células e tecidos dos efeitos nocivos. Estas características tornam os carotenoides como uma matéria-prima essencial às indústrias farmacêuticas e cosméticas, assim como na sua utilização como suplementos alimentares.

A violaxantina que é um dos principais carotenoides produzido por microalgas do género *Nannochloropsis*, apesar da sua quantidade variar entre as diferentes espécies, o seu conteúdo é, em geral, superior ao apresentado pelas microalgas verdes (Nwoba *et al.*, 2020; Hallmann 2007., Lui *et al.*, 2021a; Ruiz *et al.*, 2016). A violaxantina é um excelente agente fotoprotetor, exibindo propriedades antioxidantes e inibindo a hemólise induzida por H₂O₂ e por peroxidação lipídica. Também tem sido relatado que a violaxantina possui um efeito anti-inflamatório e impede a proliferação de células tumorais nos seres humanos (Park *et al.*, 2021). Ainda existem estudos que demonstraram o efeito protetor da violaxantina, evitando lesões na pele induzidas por radiação ultravioleta (UV) B, justificando assim o seu interesse na indústria cosmética; no entanto, apesar do interesse dos vários setores industriais na aplicação da violaxantina, o seu rendimento produtivo é crucial para marcar a viabilidade comercial de um produto derivado de microalgas. Assim, até ao momento, têm sido feitos vários esforços para alterar os processos de cultivo de microalgas de modo a aumentar a produção de violaxantina pela *Nannochloropsis* (Park *et al.*, 2021).

1.2 Melhoramento da produtividade

A biossíntese de PUFA e carotenoides pode ser manipulada através de dois tipos de métodos que alteram o metabolismo das células. Tal pode ser conseguido através da mutagénese aleatória ou devido a alterações de fatores abióticos. A mutagénese aleatória

atua na genética enquanto as alterações metabólicas através dos fatores abióticos são fisiológicas. Os fatores abióticos quando manipulados conduzem ao stress que pode ser através de estímulos químicos (aumento/escassez de nutrientes) ou físico (aumento da temperatura). Estes dois fatores atuando em conjunto ou separados, podem conduzir a uma alteração na produção dos ácidos gordos e carotenoides das microalgas (Praveenkumar *et al.*, 2012).

1.2.1 Fatores abióticos

As microalgas têm uma capacidade de adaptação natural e até mesmo em condições ambientais adversas. O estudo das influências dos fatores abióticos é importante, para cultura de qualquer espécie de microalga. A descoberta de como, e até que ponto os fatores abióticos podem influenciar o crescimento sem prejudicar a sobrevivência da microalga desperta um grande interesse. As microalgas conseguem desenvolver mecanismos de sobrevivências que incluem mudanças na sua composição física e bioquímica mediante as alterações que podem surgir no ambiente natural ou podem ser induzidos num ambiente laboratorial. As mudanças controladas em ambiente laboratorial podem ter impactos positivos, como o aumento de 60% em termos de biomassa e no total em teor lipídico até 47%, como é o caso de algumas espécies de *Nannochloropsis* e *Dunaliella* (Pal *et al.*, 2011; Takagi *et al.*, 2006), quando manipulados determinados fatores abióticos como a temperatura e a intensidade luminosa.

Nas microalgas marinhas, é importante avaliar a influência de diversos parâmetros no crescimento e na composição dos pigmentos, a fim de os integrar com as condições que otimizam a produção de PUFA, EPA em particular. De acordo com a Tabela 1, Carneiro (2020), Ma *et al.*, (2016) e Simionato *et al.*, (2013) apresentam melhorias em estirpes de *Nannochloropsis* para EPA.

1.2.1.1 Nutrientes

O crescimento e a multiplicação das microalgas devem-se em parte à disponibilidade de nutrientes. A ausência destes, conduz a uma diminuição da divisão celular ou mesmo um aumento na produção de lípidos e alteração no perfil de ácidos gordos (Praveenkumar *et al.*, 2012). Os compostos nutritivos mais importantes para o crescimento das microalgas são: macronutrientes (azoto e fosforo), ferro (Fe^{2+}) e metais vestigiais (Mg, Mo, B, K, Co, Zn e Mb). Estes compostos tanto em excesso como em

deficiência podem causar alterações na morfologia e na fisiologia por influenciarem o funcionamento das vias metabólicas (Mercer *et al.*, 2011).

O azoto é um dos elementos de maior importância para no crescimento das microalgas e indispensável para formação do DNA, proteínas e clorofila, entre outras funções no metabolismo. Por estimular ou inibir a produção de lípidos devido sua disponibilidade no meio, o aumento na quantidade deste composto leva à maior produção de PUFA, EPA em particular. O aumento destes produtos limita a disponibilidade de nitratos no meio devido ao seu consumo, mas também possui um efeito inibidor na concentração da biomassa (Daliry *et al.*, 2017). O azoto, quando consumido durante a fase exponencial, começa a entrar em depleção durante a fase estacionária. Nestas condições, a falta deste nutriente frequentemente leva a uma maior produção de triacilgliceróis (TAG) nas microalgas, apesar de outros nutrientes mostrarem também a capacidade de incentivarem a acumulação de lípidos nas células de microalgas (Hu *et al.*, 2008).

Segundo um trabalho científico desenvolvido por Schüler *et al.*, (2017), foi verificado existir uma suprarregulação da maioria dos componentes da biossíntese dos ácidos gordos e TAG durante a depleção de azoto no meio de cultura. À medida que as células crescem, aumenta a escassez de nutrientes no meio e ocorre um aumento da acumulação, particularmente nas membranas, de TAG que contém uma grande quantidade de SFA e MUFA. Estes ajudam a aumentar a disponibilidade de PUFA nas células e, em especial, de EPA em *Nannochloropsis gaditana*, onde o aumento da concentração de nutrientes aumentou a produtividade de EPA (Simionato 2013).

O fósforo é um nutriente essencial na produção de componentes celulares como fosfolípidos, DNA, RNA, NADPH e ATP que são importantes na transferência de energia, tradução de sinal e fotossíntese (Chu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012). As algas absorvem o fósforo principalmente a forma solúvel (dissolvida) - ortofosfato ou polifosfato. Em ambiente controlado a disponibilidade do fósforo se dá através de compostos como fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (Kim *et al.*, 2012). O fosfato dipotássico é acumulado no interior das células, sendo apenas utilizado quando o fósforo no meio é insuficiente para o crescimento da microalga (Chu *et al.*, 2013). A produção lipídica em forma de TAG é, em geral, aumentada em uma situação de depleção de fósforo (Chu *et al.*, 2013).

O ferro é um elemento muito importante no desenvolvimento das microalgas, já que participa em reações enzimáticas e na estrutura de moléculas dos citocromos,

responsáveis pela transferência de elétrons de um nível para outros durante o processo de fotossíntese para formar ATP e NADPH (Wojciechowski *et al.*, 2015).

1.2.1.2 Luz

A luz e o processo fotossintético são de extrema importância no crescimento das microalgas, tanto na produção de biomassa quanto de carotenoides e ácidos gordos (Cordero *et al.*, 2011; Ward & Sing, 2005). Os pigmentos fotossintéticos capturam a energia dos fótons e geram elétrons com elevado potencial redutor que são utilizados na produção de NADPH e ATP que reduzem o CO₂ a 3-fosfoglicerato no Ciclo de Calvin (Stryer *et al.*, 2002). Devido à sua importância, a variação na intensidade luminosa revela fortes ligações com a composição química dos pigmentos celulares e afeta a atividade fotossintética da microalga em cultivo (Joanne *et al.*, 2008; Havaux, 1996). Tem uma importância acrescida no processo de cultura fotoautotrófica porque em intensidades baixas o crescimento é limitado (fotolimitação) e altas intensidades causam danos celulares, levando à fotoinibição (Andersen 2013; Blankenship 2008; L. Barsanti e Gualtieri 2006).

A luz pode provir de uma fonte natural (solar) ou artificial (por exemplo, lâmpadas LED). Quando proveniente de fonte artificial, a luz tem um custo elevado, mas a sua vantagem é que garante um melhor controle da intensidade e qualidade luminosa, o que permite um crescimento mais reprodutível quando o cultivo de microalgas se dirige para a produção de componentes de alto valor (Blanken *et al.*, 2013; Schulze *et al.*, 2014). Para se ter um controle da intensidade luminosa, é necessário considerar fatores que podem interferir na incidência e penetração de luz na cultura, como: a concentração de células da microalga e a profundidade do sistema de cultivo. Assim, a escolha do sistema de cultivo adequado e a manutenção adequada do sistema são imprescindíveis para otimizar a eficiência fotossintética (Yousuf *et al.*; 2020).

O aumento da intensidade luminosa em determinadas espécies de microalgas como, por exemplo, *H. pluvialis* pode induzir um aumento de astaxantina (Del Campo *et al.*, 2004). Numa experiência realizada com *D. salina* onde a intensidade luminosa foi alterada de 100 para 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ houve um aumento na produção de carotenoides (em especial β -caroteno, astaxantina) e um aumento de 3.1% na biomassa (Lamers *et al.*, 2010). Em *Nannochloropsis gaditana* (Tabela 1), a intensidade luminosa de 1600 μmol .

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pode aumentar a produção de β -caroteno e violaxantina (Tabela 1; Camacho - Rodríguez *et al.*, 2015).

A baixa intensidade luminosa induz, em geral, a formação de lípidos polares que estão associados ao cloroplasto. Em contrapartida, pode ocorrer também um aumento significativo no teor total dos lípidos neutros, principalmente os TAG (Brown *et al.*, 1996; Khotimchenko e Yakovleva, 2005). A intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em *Nannochloropsis gaditana* (Tabela 1) aumenta a produção de EPA (Mitra, *et al.*, 2015a). Segundo Fabregas *et al.*, (2004), a saturação de ácidos gordos está relacionada com a alteração da intensidade luminosa. Em espécies de *Nannochloropsis*, existem estudos que revelaram que a percentagem de PUFA C20:5 ω 3 de cadeia longa é mais estável (cerca de 35% do total de ácidos gordos) em condições de luz consideradas ótimas: $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Porém, diminui três vezes sob uma intensidade de $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, embora haja um aumento na produtividade de MUFA (C14, C16:0 e C16: ω 7). Outras espécies estudadas de *Nannochloropsis*, como, por exemplo, a *N. salina*, revelam um crescimento a intensidades luminosas contínuas com valores compreendidos entre 250 - $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Sukenik, 1991; Wagenen *et al.*, 2012). Nestas espécies, os estudos revelaram que os PUFA são, em geral, incorporados na estrutura da membrana, mostrando, no entanto, que a alta intensidade luminosa altera a síntese de ácidos gordos. Nestas condições, as células de microalgas produzem mais ácidos gordos saturados e ácidos gordos monoinsaturados, componentes dos lípidos neutros que normalmente são armazenados em corpos lipídicos no citoplasma ou no estroma do cloroplasto (Orcutt e Patterson, 1974; Sukenik *et al.*, 1993).

Estudos efetuados por Spolaore e colegas (2006) mostram ainda que a *N. oculata* tem como intensidade luminosa ideal para crescimento a intensidade de $52 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Norsker, *et al.*, (2019) sugerem que uma intensidade luminosa contínua de $205 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para uma cultura de *Nannochloropsis oceanica* crescida em fotobiorreatores corresponde ao máximo de luz sustentável. A intensidades luminosas maiores, as culturas tornam-se, porém, progressivamente mais instáveis.. A intensidade luminosa foi outro fator examinado para a cultura da *N. oceanica*, uma vez que o seu papel é indispensável no processo de fotossíntese a assimilação de carbono nesta espécie (Li *et al.*, 2009).

1.2.1.3 Temperatura

A temperatura é um fator abiótico considerado crucial no crescimento de microrganismos, influencia consideravelmente as reações metabólicas e fisiológicas.

Como resposta às alterações térmicas, os comportamentos das microalgas podem alterar-se, e afetar a produção de lípidos de membrana. Este processo de resposta térmica dos lípidos das membranas, evita que haja uma lise celular, e pode ser aplicado para melhorar a aclimação fisiológica (Challabathula *et al.*, 2018). A temperatura ideal para algumas espécies de *Nannochloropsis* (por exemplo, *N. salina*) é cerca de 26°C. A temperaturas mais elevadas, tal como 35°C, elas já apresentam um crescimento menos eficiente, embora possuam uma capacidade de autorregular a sua composição lipídica e a sua inclusão em estruturas membranares. Nesta microalga, os ácidos gordos aumentam na mesma proporção que a taxa de crescimento de *N. salina*, diminuindo o conteúdo em EPA com o aumento da temperatura (Van Wageningen, 2012).

Espécies como a haptófito *Tisochrysis lutea* conseguem tolerar temperaturas elevadas, tal como 35°C (Picardo, 2012). Normalmente, a estas temperaturas, poderá ocorrer uma alteração da expressão de enzimas para manter a fotossíntese estável sem causar morte da microalga ou alterar a morfologia das células. No entanto, em situações de baixas temperaturas (<16°C) ocorre redução do crescimento celular e potencial formação de células de resistência (Zeng *et al.*, 2011). Alguns estudos revelaram que o aumento da temperatura para algumas espécies, como é o caso da *Nannochloropsis salina*, a produção de lípidos aumenta com o aumento da temperatura para 30°C, dando origem a uma produtividade de biomassa de 0.431 g.L⁻¹.dia⁻¹. Porém, a 15°C, esta produtividade para 0.311 g.L⁻¹.dia⁻¹ (Boussiba *et al.*, 1987; Fakhry *et al.*, 2015).

A temperatura ainda possui grande influência na produção de carotenoides nas células de microalgas. Estudos efetuados mostraram que temperaturas altas ou baixas podem resultar em uma acumulação de carotenoides, dependendo das espécies das microalgas testadas. Um possível mecanismo corresponde a stress fotooxidativo causado pelo aumento da temperatura (Tripathi *et al.*, 2002). Em microalgas, como a *D. salina*, o aumento da temperatura leva à acumulação de luteína (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005), ao contrário do que acontece com as outras espécies de *Dunaliella* em que baixas temperaturas aumentam os níveis de α -caroteno e β -caroteno (Gomez e Gonzalez, 2005). No entanto, a temperaturas entre 20-33°C, em *Muriellopsis* sp. e *S. almeriensis*, a acumulação de luteína é afetada especialmente durante a fase exponencial (Del campo *et*

al., 2007). Para espécies como a *N. salina* e *N. oceanica*, entre outras, estudos realizados com temperaturas com valores compreendidos entre 13-33°C revelaram efeitos na produtividade de carotenoides e de EPA (Chua *et. al.*, 2020; Van Wageningen, 2012).

Estudos realizados com diferentes microalgas indicam que a temperatura ótima de crescimento varia consoante a espécie a ser estudada. O controlo deste fator abiótico num sistema de cultivo aberto possui um custo elevado, pois estes sistemas são sensíveis às condições térmicas do meio ambiente, podendo sofrer sobreaquecimento, o que conduz à evaporação do meio de cultura, levando a alterações da composição lipídica das células de microalgas. Em sistemas fechados de cultivo (fotobiorreatores), o controlo da temperatura torna-se mais fácil, já que o reator pode ser colocado em um ambiente controlado (Pragya *et al.*, 2013).

Tabela 1. Produtividades relativas de diferentes espécies de *Nannochloropsis* sob diferentes fatores abióticos.

Espécie	Compostos alvo	Fatores abióticos	Aumento relativo de produtividade	Referências
<i>N. gaditana</i>	EPA	Saturado de nutriente	6- vezes	Simionato <i>et al.</i> , 2013
<i>N. gaditana</i>	Violaxantina, astaxantina e zeaxantina	Saturado de nutriente	1.4- vezes	Simionato <i>et al.</i> , 2013
<i>N. gaditana</i>	β -caroteno violaxantina	Alta luminosidade 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	4- vezes	Camacho-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
<i>N. gaditana</i>	EPA	Baixa luminosidade 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.3- vezes	Mitra <i>et al.</i> , 2015a
<i>N. oceanica</i>	EPA	Saturado de nutriente	6- vezes	Meng <i>et al.</i> , 2015
<i>N. oceanica</i>	Violaxantina, zeaxantina β -caroteno	Saturado de nutriente	10- vezes	Solovchenko <i>et al.</i> , 2014
<i>N. oceanica</i>	EPA	Saturado de nutriente	2- vezes	Solovchenko <i>et al.</i> , 2014
<i>N. oceanica</i>	EPA	Baixa luminosidade 170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.7- vezes	Pal <i>et al.</i> , 2013
<i>N. oculata</i>	EPA	Baixa luminosidade 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	3- vezes	Ma <i>et al.</i> , 2016
<i>N. oculata</i>	EPA	Saturado de nutriente	5- vezes	Vooren <i>et al.</i> , 2012
<i>N. oculata</i>	EPA	Saturado de nutriente	1.2- vezes	Huang <i>et al.</i> , 2013
<i>N. salina</i>	EPA	Saturado de nutriente	6.5- vezes	Hoffmann <i>et al.</i> , 2010
<i>N. salina</i>	EPA	Baixa luminosidade 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2- vezes	Van Wageningen <i>et al.</i> , 2012
<i>N. salina</i>	EPA	13°C to 33°C	3- vezes	Van Wageningen <i>et al.</i> , 2012
<i>N. salina</i>	EPA	17°C to 25°C, 14 dias	1.4- vezes	Hoffmann <i>et al.</i> , 2010
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2- vezes	Pal <i>et al.</i> , 2011
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.3- vezes	Pal <i>et al.</i> , 2011
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	Saturado de nutriente	2- vezes	Griffiths <i>et al.</i> , 2012
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10°C, 4 dias	4- vezes	Mitra <i>et al.</i> , 2015b
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	Saturado de nutriente	5- vezes	Bondioli <i>et al.</i> , 2012
<i>N. oceanica</i>	EPA	Baixa temperatura 15 a 30C	1.4- vezes	Chua <i>et al.</i> , 2020
<i>N. oceanica</i>	Violaxantina, zeaxantina, β -caroteno	Baixa temperatura 15 a 30C	2- vezes	Chua <i>et al.</i> ; 2020
<i>N. oceanica</i>	β -caroteno, violaxantina	-----	2- vezes	Wang and Jia <i>et al.</i> , 2020
<i>N. oceanica</i>	Zeaxantina	Alta luminosidade 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.6- vezes	Wang and Jia <i>et al.</i> , 2020
<i>N. oceanica</i>	EPA	Baixa temperatura 18 a 28°C	1.4- vezes	Carneiro <i>et al.</i> , 2020
<i>N. salina</i>	EPA	Baixa temperatura 5 a 25°C	1.2- vezes	Gill <i>et al.</i> , 2018
<i>N. oculata</i>	EPA	Saturado de nutriente	17- vezes	Gharat <i>et al.</i> , 2018

1.2.2 Mutagénese aleatória (MA)

A mutagénese aleatória (MA) é uma outra ferramenta muito importante para obtenção de espécies de microalgas com melhores capacidade de produtividade porque, para além da fácil e rápida obtenção de resultados, também é um método relativamente económico para gerar valor acrescentado. Serve para induzir alterações aleatórias nos genomas das microalgas, sem adição de material genético exterior ao organismo. Quando a MA é bem-sucedida, os mutantes obtidos não só podem ser mais robustos a fatores abióticos e a contaminantes, como também poderão apresentar uma produtividade de biomassa ou da biomolécula de interesse superiores à da estirpe selvagem.

A MA pode ser efetuada por dois processos: físicos ou químicos. Em processos de mutagénese física, recorre-se ao uso de radiação (radiação UV, raios X, radiação gama, e feixes de iões pesados); em processos químicos, utiliza-se o metanossulfonato de etilo (EMS), nitrosoguanidina (NTG, MNNG), nitrosourea de etilo (ENU) e a *N*-metilo-*N*-nitrosourea (MNU) (Yi *et al.*, 2015). A exposição das células ao EMS e à radiação UV são os métodos mais utilizados para mutagenizar células (Trovão *et al.*, 2022). A EMS cria mutações pontuais por alquilação de bases de DNA, em especial na guanina, enquanto a radiação UV provoca a formação de dímeros de pirimidina, resultando em danos ou lesões no DNA, que provocam mutações durante o processo replicativo.

No final do processo de mutagénese, a estirpe resultante é rastreada para verificar se o fenótipo é o desejado. De seguida, aplicam-se protocolos específicos, como a inibição de vias metabólicas-alvo mediante o emprego de vários compostos químicos para testar a resistência da estirpe. As obtenções de estirpes com fenótipos desejados representam um desafio nos processos de mutação aleatória porque as células precisam de ser rastreadas num curto espaço de tempo, durante o qual milhares de células precisam de ser selecionadas segundo o fenótipo desejado.

1.2.2.1 Mutagénese aleatoria nas espécies do género *Nannochloropsis*

Num estudo que envolveu a espécie *N. oculata* e se utilizou o MNU como agente mutagénico, o resultado obtido foi um aumento na produção de EPA (Tabela 2; Chaturvedi, *et al.*, 2004). Outra experiência com a *N. oculata* ST-6, utilizou o EMS como agente mutagénico e o resultado desta experiência demonstrou o aumento na produção de

EPA (Chaturvedi, *et al.*, 2006). Outro estudo realizado com a *N. oceanica* em que se aplicou uma irradiação com raios gama como agente mutagénico demonstrou que é possível obter um aumento na produção de violaxantina a partir da geração de estirpes mutantes (Park *et al.*, 2021). A MA tem demonstrado ser um método eficaz para desenvolver estirpes de microalgas mutadas que exibem as propriedades desejadas para produzir as quantidades de bioprodutos que satisfaçam as exigências das diversas áreas industriais. A MA com a EMS demonstra que é possível aumentar substancialmente a eficácia fotossintética com aumento da produtividade de biomassa quando comparado com a eficácia exibida pela estirpe selvagem.

Tabela 2. Processos de mutagênese aleatória e resultados obtidos nas diversas estirpes pertencentes ao gênero *Nannochloropsis*

Estirpe	Agente mutagênico	Concentração celular (Células/ml)	Tempo de exposição (min)	Ambiente	Recuperação	Procedimento de seleção	Resultado	Referências
<i>Nannochloropsis sp.</i>	EMS	107	60	Escuro	Durante a noite no escuro	FACS	Mutantes apresentam produção de FA aumentada em 4x	Doan <i>et al.</i> , 2012
<i>N. oculata</i>	MNU	5x10 ⁶	60 ou 90	MNU 5 mM com agitação lenta	Lavar 3x com SW	Meio sólido com quizalofop a 75 µM	Mutantes resistentes a herbicidas com níveis aumentados de EPA	Chaturvediet <i>al.</i> , 2004
<i>N. oculata</i> ST-6	EMS	-	60	EMS 100 mM	Lavar 3x com SW estéril	Cerulenina e Eritromicina	Aumento do conteúdo de EPA	Chaturvedi, Fujita <i>et al.</i> , 2006
<i>N. oculata</i> em água doce	UV a 354 nm	1x10 ⁵	120	10 cm de distância	-	Quizalofop- <i>p</i> -etil a 900 µM	Aumento do conteúdo de lípidos	Moha-Leon, <i>et al.</i> , 2019
<i>N. oceanica</i> MET1	Irradiação de iões pesados	1,5x10 ⁷	-	Células irradiadas por iões de carbono em doses diferentes (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 Gy	Durante a noite no escuro	Meio de ágar	Taxa de crescimento aumentada e aumento do conteúdo de TAG	Ma <i>et al.</i> , 2013
<i>N. oceanica</i>	Irradiação com raios gama	Meio exponencial	-	Intervalo de 100 a 1000 Gy	-	Colônias amarelas repicadas em placas de ágar F2	Aumento da produção de violaxantina	Parquet <i>al.</i> , 2021
<i>N. oceanica</i>	EMS e NTG	10 ⁶	60	1 mol/L e 0,02 mol/L respectivamente	-	Coloração BODIPY 505/515	Maior teor de lípidos	Wang <i>et al.</i> , 2016

<i>N. salina</i>	EMS e UV	1x10 ⁸	Vários tempos de exposição ao EMS (30, 90 e 240 min); Exposição aos UV durante 5, 10,30,60,120,180 e 240 s	Exposição ao EMS no escuro e à TA (0,24; 0,42 e 0,63 mol/L)	EMS inativado com tiosulfato de sódio	FACS	Aumento de produtividade	Beacham <i>et al.</i> , 2015
<i>N. gaditana</i>	EMS e UV	1x10 ⁸	120 no escuro	EMS nas concentrações 0,75%; 1,5%; 2% e 2,5%	Mantido durante a noite sob luz fraca	Selecionados mutantes verdes-claro, estirpes com taxa de absorção a 680/730 nm reduzidas ou no mínimo 25% e com fluorescência aumentada quando submetidas a vermelho do Nilo	Produção de lípidos melhorada	Cecchin <i>et al.</i> , 2020
<i>N. gaditana</i>	Mutagénesse por inserção	5x10 ⁹	-	-	Meio de F2N agar com zeocina	Rastreio FACS com BODYP 505/515	Aumento do crescimento e produção de lípidos	Ryu <i>et al.</i> , 2015
<i>N. gaditana</i>	EMS	2x10 ⁷	0	No escuro, à TA (EMS 70mM com agitação suave)	Lavado 4x com meio F/2 estéril	Placas de agar	Atividade fotossintética melhorada	Perin <i>et al.</i> , 2015

Mutagénesse aleatória química e física, procedimentos e resultados. BODIPY 505/515 (corante fluorescente verde-brilhante lipofílico para detecção de lípidos em microalgas); EMS (metanossulfonato de etilo); EPA (ácido eicosapentenoico); FACS (triagem de células ativadas por fluorescência); F2N (meio Guillard nutriente); MNU (N-metilo-N-nitrosourea); UV (radiação ultravioleta); NTG (nitrosoguanidina); Quizalofop-*p*-etilico (herbicida, inibidor da acetil CoA carboxilase); SW (água do mar); TA (temperatura ambiente); TAG (triacilglicerol).

1.3 Espécies pertencentes ao género *Nannochloropsis*

As espécies das microalgas do género *Nannochloropsis* pertencem a um grupo taxonómico que faz parte do clade *Stramenopiles*, superfilo *Heterokonta*, filo *Ochrophyta*, classe *Eustigmatophyceae*, ordem *Eustigmatales* e família *Monodopsidaceae*. O género *Nannochloropsis* foi descrito pela primeira vez por Hibberd em 1981 (Roggiero *et al.*, 2015).

As espécies de microalgas pertencentes ao género *Nannochloropsis* são microalgas unicelulares, que diferem das restantes por possuírem apenas clorofila *a*, não havendo qualquer evidência da ocorrência neste género das clorofilas *b* e *c*, apesar da sua relativa proximidade filogenética com as diatomáceas. Existem seis espécies devidamente identificadas; quatro são marinhas (*N. granulata*, *N. oculata*, *N. salina*, *N. oceanica* e *N. gaditana*) e uma, a *N. limnetica*, que pode surgir em ambientes de água doce ou água salobra (Suda *et al.*, 2002; Fawley *et al.*, 2015; Al-Hoqani *et al.*, 2016). Todas apresentam elevada capacidade de produção lipídica, essencial para a produção de biocombustíveis e produção de PUFA com várias aplicações industriais (Van Vooren *et al.*, 2012, Olofsson *et al.*, 2014; Al-Hoqani *et al.*, 2017).

1.3.1 *Nannochloropsis oceanica*

Esta espécie de microalga utilizada no estudo foi fornecida pela empresa Allmicroalgae Natural Products S.A. A *N. oceanica* (Figura 1) é uma espécie de microalga pertencente à classe *Eustigmatophyceae*, cuja taxonomia está representada na Tabela 3. Esta estirpe é conhecida como sendo oleaginosa, isto é, rica em lípidos.

Tabela 3. Hierarquia taxonómica da *N. oceanica*, classificação científica de acordo com Zanella & Vianello (2020).

Táxon	Nomenclatura
Reino	Chromista
Superfilo	Heterokonta
Filo	Ochrophyta
Classe	<i>Eustigmatophyceae</i>
Ordem	<i>Eustigmatales</i>
Família	<i>Monodopsidaceae</i>
Género	<i>Nannochloropsis</i>
Espécie	<i>Nannochloropsis oceanica</i>

Todas as microalgas do género *Nannochloropsis* possuem uma elevada quantidade de ácidos gordos na sua composição química que pode variar entre de 11% a 39% do seu peso seco, de acordo com as condições de cultivo. Desta forma esta espécie de microalga tem sido usada como suplemento alimentar devido à sua produção de EPA. Devido ao seu tamanho (2-5µm) e a boa composição nutricional, o género *Nannochloropsis* tornou-se numa das microalgas mais utilizadas na aquacultura a nível mundial (Martins *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2018; Ashour *et al.*, 2019)

A *N. oceanica* é um produtor primário com capacidades de converter o dióxido de carbono (CO₂) e a luz em várias fontes de energia, através do processo de fotossíntese. A utilização do processo de fotossíntese faz com que estes microrganismos se tornem capazes de produzir proteínas, lípidos, polissacáridos e hidrocarbonetos (Chisti, 2007). Têm a capacidade de acumular uma grande concentração de pigmentos como astaxantina, zeaxantina e cataxantina (Cecchin *et al.*, 2020). Possuem grande interesse industrial porque são de crescimento rápido e têm a capacidade de sintetizar grandes quantidades de TAG e ácidos polinsaturados de alto valor, que podem atingir até 65 a 70% do seu peso seco total (Xin *et al.*, 2017). A *N. oceanica* é uma espécie de alga com elevado grau de importância devido à sua composição e ultimamente tem sido utilizado como fonte de alimento para rotíferos e larvas de peixes cultivadas na aquacultura (Chaturvedi & Fujita, 2006). Esta espécie de microalga cresce a uma temperatura de 22°C, com intensidade luminosa de fotões de 100 µmol m⁻² s⁻¹.

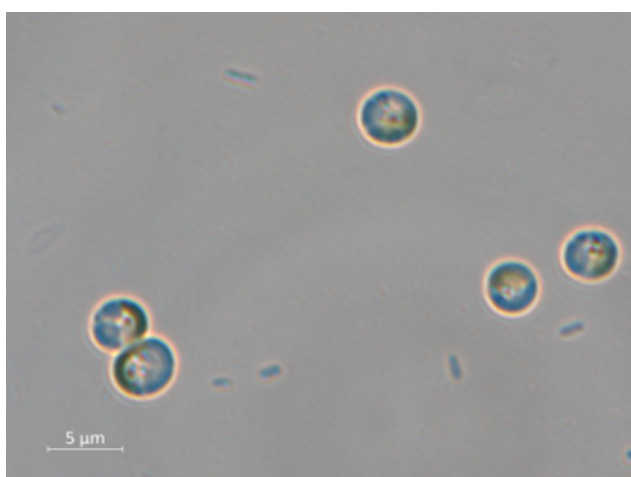


Figura 1. *Nannochloropsis oceanica*: fotografia obtida durante uma observação microscópica que permite observar uma coloração alaranjada indicadora da presença de carotenoide.

Neste trabalho pretende-se contribuir no melhoramento da microalga *Nannochloropsis oceanica* para produção de compostos de valor acrescentado, recorrendo a metodologias conhecidas: (I) melhoramento da produtividade utilizando diferentes fatores abióticos: nutrientes, intensidade luminosa e temperatura e (II) a mutagénese química aleatória associada à inibição de vias metabólicas através de antibióticos e herbicidas e seleção de colónias visivelmente observáveis nas placas. A expectativa desta experiência consiste em obter condições otimizadas de cultivo aumento de metabolitos e/ou uma nova estirpe de microalga de *Nannochloropsis oceanica* capaz de produzir maior quantidade e melhor qualidade de ácidos gordos polinsaturados e carotenoides, que podem ser aplicadas nas várias indústrias de interesse principalmente na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética

2. Objetivos

A presente dissertação associa-se ao projeto de investigação PERFORMALGAE que visa otimizar condições de cultivo e desenvolver estirpes de microalgas que demonstrem uma maior e melhor produção de compostos de valor acrescentado. Neste estudo, utilizar-se-á a microalga *Nannochloropsis oceanica* com o objetivo principal a melhorar a produção de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e carotenoides. Para este fim, os efeitos das alterações dos fatores abióticos como a concentração dos compostos nutricionais, intensidade luminosa, e a temperatura, serão estudados para aumentar a produtividade de EPA, uma PUFA de *N. oceanica* de alto valor comercial. Por outro lado, uma abordagem genética para selecionar estirpes melhoradas da *N. oceanica* será estudado utilizando a mutagenese aleatória com metanossulfonato de etilo (EMS), seguido por uma triagem com vários inibidores de vias biossintéticas dos metabolitos alvo.

Deste modo, os objetivos específicos da presente tese são os seguintes:

- Correlacionar parâmetros do crescimento como contagem de células e peso seco com densidade ótica;
- Determinar o melhor meio para o crescimento da *N. oceanica*;
- Determinar a concentração letal para a estirpe selvagem dos inibidores de vias metabólicas.

3. Materiais e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório da GreenCoLab em parceria com o Laboratório da Marbiotech (CCMAR) da Universidade do Algarve no período que decorreu entre 21/12/2021 e 31/07/2022 e cujo desenvolvimento compreendeu duas etapas, sendo a primeira etapa subdividida em vários processos e a segunda etapa subdividida em dois processos. A primeira etapa teve como objetivo determinar as melhores condições de cultura em meio laboratorial para produzir metabolitos de valor acrescentado para a microalga *N. oceanica* e a segunda etapa consistiu no processamento da mutagénesse aleatória conjugada com a inibição das vias metabólicas como meio de selecionar mutantes com fenótipos melhorados. Para a realização deste trabalho, todos os materiais utilizados nas experiências foram lavados e autoclavados (120°C durante 2h30) e colocadas na câmara de fluxo e exposto à luz UV durante 20 min para esterilização do material antes da realização de qualquer experiência.

A primeira etapa foi dividida em 7 partes:

- i) Ensaios para determinar o melhor meio;
- ii) Ensaios para determinar o melhor crescimento da *N. oceanica* utilizando diferentes fatores abióticos;
- iii) Determinação dos parâmetros da taxa de crescimento da *N. oceanica*;
- iv) Determinação da concentração dos nitratos;
- v) Análise da variação do pH;
- vi) Determinação do peso seco;
- vii) Análise Bioquímica;

Segunda etapa:

- i) Mutagénesse aleatória
- ii) Seleção dos inibidores de vias metabólicas
- iii) Seleção de estirpes mutantes

3.1 Preparação dos meios de cultura líquidos

Para a realização da experiência sob condições autotróficas foram preparados três meios de cultura líquidos, com o objetivo de determinar qual melhor meio para cultura da *Nannochloropsis oceanica* em ambiente laboratorial. Foi testado o meio Algal descrito por Fábregas *et al.*, (1984), composto por três soluções: micronutrientes; macronutrientes e ferro, cuja concentração foi modificada por Pereira (Pereira *et al.*, 2016) sendo este designado por MAM. Outro meio testado foi o meio F/2 (Guillard *et al.*, 1962), descrito na Tabela 4 e finalmente o meio Nutribloom, um meio comercial fornecido pela Necton, S.A.

Inoculou-se 10% da microalga *N. oceanica* em três tubos de Erlenmeyer diferentes, juntando-se a cada tubo 45 mL de água salgada autoclavada até perfazer um volume final de 50 mL. De seguida, a cada tubo de Erlenmeyer adicionou-se 50 µL do meio a testar (F/2, MAM e Nutribloom). As culturas foram expostas a uma intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ à temperatura de 22°C, por um período de 5 dias. A determinação do melhor meio foi monitorizada por contagem celular.

Tabela 4. Composição química dos meios (F/2) Guillard & Ryther (1962) e meio de cultura modificado Algal (MAM) (Pereira *et al.*, 2009) utilizados no teste para determinação do melhor meio de cultura.

Composição química do meio Algal modificado concentrado 1000x		
	Componentes	Concentração (mM)
Micronutrientes	EDTA-Na	6.4
	ZnCl ₂	1
	ZnSO 4H ₂ O	1
	MnCl ₂ 4H ₂ O	1
	Na ₂ MoO ₂ 2H ₂ O	0.1
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.1
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1
	MgSO ₄ 7H ₂ O	2
Macronutrientes	NaNO ₃	2
	KH ₂ PO ₄	100

Ferro	FeCl ₃ 6H ₂ O	20
	EDTA-Na	20
Composição química do meio F/2		
Solução A: Nitrato e Fosfato	Componentes	Concentração (200mL)
	NaNO ₃	15.0 g
	Na ₂ H ₂ PO ₄ 2H ₂ O	1.13g
Outros elementos (solução 10x concentrada)	NaEDTA	8.32
	FeCl ₃ 6H ₂ O	6.30g
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.02
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.044
	MnCl ₂ 6H ₂ O	0.02
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.36
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.012
Solução C: mistura de vitaminas (1000 mL)	vitamina B ₁₂	0,0005g
	Biotina	0,0005g
	Tiamina e HCL (Vitamina B ₁)	0,1g

3.2 Crescimento de *N. oceanica* sob diferentes fatores abióticos

Para os ensaios de crescimento de *N. oceanica* foram utilizados frascos de 800 mL de volume útil. Todos os frascos estiveram sob condições de arejamento com ar filtrado com filtros de nylon de 0,22 µm.

A partir da cultura de stock em meio MAM a uma salinidade de 33 ppt, retirou-se 10% de cultura de *N. oceanica* para um biorreator com 720 mL de água salgada com uma salinidade de 33 ppt autoclavada para perfazer o volume final de 800 mL transferidos para garrafas de 1 litro (1 L). As culturas foram submetidas sucessivamente a condições diferentes, começando com:

1ª Ensaio – Ensaios de crescimento com MAM a diferentes concentrações (1x, 5x e 10x):

O meio de cultura MAM com a concentração de 1x correspondeu a um meio com 2 mM nitratos e 2 mM de fosfatos, enquanto a concentração de MAM 5x a concentração de nitratos foi aumentada para 10 mM de nitrato e a dos fosfatos foi reduzida para 1 mM. Finalmente, o meio MAM a 10x conteve 20 mM de nitratos e 2 mM de fosfatos. Em todos os meios, a concentração de ferro foi mantida a 0.8 mM.

2º Ensaio – Determinação da melhor intensidade luminosa entre as seguintes intensidades: 50, 110, 250, 600, 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Neste ensaio, utilizou-se o MAM à concentração em que resultou numa produtividade mais elevada no ensaio anterior.

3º Ensaio – Exposição a temperaturas diferentes, nomeadamente 15, 22 e 30°C às melhores condições determinadas nos ensaios anteriores.

O crescimento foi monitorizado durante 8 dias mediante a determinação da densidade ótica (OD), contagem celular, determinação do peso seco, análise de nitratos e medição do pH para cada um dos triplicados. A determinação de nitratos do meio foi realizada a partir de 0,25 ml de sobrenadante recolhido e tratado com 9,3 mL de NaCl e 0,2 ml de HCl. A absorvância desta solução foi medida a dois comprimentos de onda: 220 nm e 275 nm.

3.2.1 Taxa de crescimento

A taxa de crescimento da cultura foi determinada a partir da leitura da densidade ótica da amostra a 2 comprimentos de onda (540 nm e 750 nm), na contagem de células efetuada na câmara de contagem de Neubauer (Figura 2) e através do peso seco. Para a determinação da concentração celular ($\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$) utilizou-se a microscopia ótica em câmaras de Neubauer com contagens efetuadas nos campos centrais da câmara. As amostras foram diluídas de formas a facilitar as contagens e o número de células tinham de estar compreendidas entre 30 e 300. Para calcular a concentração celular utilizou-se a fórmula de Thronsen (1995):

$$N (\text{células} \cdot \text{mL}^{-1}) = N^{\circ} \text{ de células} \times D_f \times 10^3 / V \quad [1]$$

em que o N° representa o número de células contadas na câmara de Neubauer, D_f equivale ao fator de diluição e V corresponde ao volume filtrado.

A taxa específica de crescimento celular por dia pode ser determinada através da equação (Vonshak *et al.*, 2020):

$$\mu(CC) = \ln (CC_t - CC_0) / T_t - T_0 \quad (2)$$

$$\mu(X) = \ln (X_t - X_0) / T_t - T_0 \quad (3)$$

em que o μ representa a taxa de crescimento, CC_0 o é a concentração celular ou de biomassa no primeiro dia do crescimento exponencial, CC_t é a concentração celular ou de biomassa no último dia do crescimento da fase exponencial, $T_0 - T_t$ é o período de duração da fase exponencial.

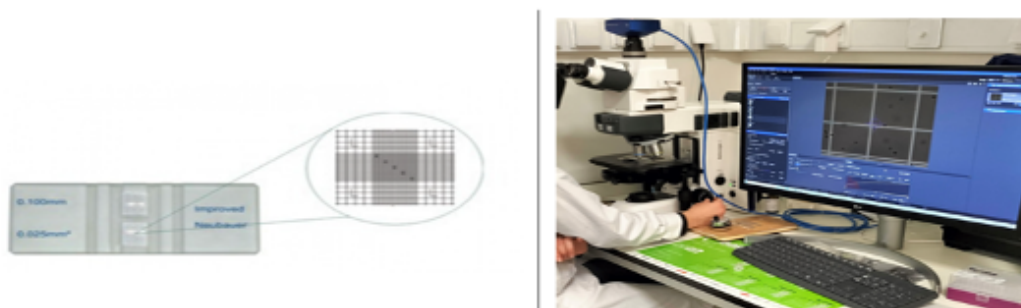


Figura 2. Ilustração de contagem celular, utilizando uma câmara de Neubauer, e um microscópio óptico ligado a um ecrã durante uma contagem celular.

Os filtros de vidro com porosidade de $0.7 \mu\text{m}$ previamente identificados foram lavados com 4 mL de formato de amónia a 10%, para eliminar impurezas eventualmente presentes. Após este processo, os filtros foram colocados em estufa a 60°C por um período de 24h para secagem. Subsequentemente, os filtros foram colocados num dissecador durante 15 min para eliminar toda a humidade, antes de se iniciar a pesagem para determinar o peso seco inicial dos filtros (Figura 3). Em seguida, filtrou-se 8.5 mL da

amostra e repetiu-se o procedimento de lavagem com formato de amónia a 10%. Finalmente levou-se a biomassa recolhida por filtração e lavada a secar em estufa a 60°C durante 24h. Após a recolha dos filtros com as amostras filtradas, estes foram colocadas num dessecador por um período de 15 min à temperatura ambiente (TA) e depois efetuou-se a pesagem dos filtros para determinação do peso seco.

Para determinar o peso seco, teve-se o cuidado de pesar os filtros antes de filtrar a amostra, i.e., o peso seco inicial (PSi). Depois de filtrada a amostra e levada a secar, determinou-se o peso final do filtro, i.e., o peso seco final (PSf), sendo V o volume da amostra. Para obter o peso seco (PS), utilizou-se a seguinte fórmula (Bombo *et al.*, 2023):

$$PS \text{ (g. L}^{-1}\text{)} = (PS_f - PS_i) / V \quad (4)$$

A produtividade foi calculada tendo em consideração a taxa de crescimento durante a fase exponencial e o tempo de duplicação celular. Para este cálculo, utilizou-se os valores onde se obteve a maior concentração celular e menor concentração celular e o tempo em que demorou este período. Para a determinação da produtividade utilizou-se a fórmula (Bombo *et al.*, 2023):

$$X_p \text{ (g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}\text{)} = (X_t - X_0) / T_t \quad (5)$$

em que a X_p corresponde à produtividade, X_t é a concentração máxima da biomassa ao tempo t , X_0 corresponde à concentração inicial da biomassa, e o T_t representa o tempo em que se atingiu a concentração mais elevada da biomassa.

A produtividade específica máxima dos compostos clorofila e carotenoides foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Compostos} = C_{\text{cmax}} / X_{\text{tmax}} \times T_{\text{cmax}} \quad (6)$$

em que o C_{cmax} representa a concentração máxima da clorofila ou carotenoides, X_{tmax} é a biomassa do composto em análise quando a concentração é máxima e T_{max} é o tempo no qual se regista a concentração máxima do composto a analisar.



Figura 3. Biomassa de *N. oceanica* filtrada, para determinação do peso seco.

A determinação da reta de calibração de PS, DO e CC permitiu determinar valores de dados específicos em experiências posteriormente realizadas, nomeadamente intensidade luminosa e ensaios com diferentes temperaturas.

3.3 Análise do perfil e produtividade dos ácidos gordos

A extração e conversão das amostras para Ester Metílico de Ácidos Gordo (FAME), realizou-se seguindo o protocolo de Folch *et al.*, (1957) e Lepage e Roy (1984), com modificações descritas por Pereira *et al.*, (2012). Resumidamente, as amostras de biomassa liofilizada foram pesadas 10 a 20 mg a qual se adicionou esferas de vidro até perfazer 0.5 mL. Após este processo adicionou-se um 1 mL de metanol/acetil clorido (20:1 v/v), e de seguida levou-se a biomassa a um aparelho dispersor onde as amostras foram tratadas durante 3 min a uma velocidade de 30 Hz. Para finalizar este processo, todos os conteúdos de cada tubo foram transferidos para um frasco de derivação, sendo cada tubo lavado com 0.5 mL de metanol/cloreto de acetilo (20:1 v/v) e este conteúdo foi adicionado ao conteúdo do frasco de derivação.

A cada frasco de derivação, adicionou-se 1 mL de *n*-hexano, sendo, em seguida, colocados em banho-maria a 70 °C por um período de 60 min, onde a mistura foi submetida ao processo de derivação. Passado este tempo as amostras foram retiradas do banho-maria e colocadas em gelo durante 10 min e transferidas para tubos de

centrifugação, onde se adicionou 1 mL de água destilada e 4 mL de *n*-hexano e homogeneizado num vórtex à velocidade máxima durante 30 segundos. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 5 min à TA, repetido por duas vezes. A água da fase orgânica foi extraída com a adição de sulfato de sódio anidro, os extratos foram filtrados (0.22 µm PTFE de filtro) e evaporados sob um fluxo suave de gás de azoto. Depois adicionou-se 0.5 mL de hexano grau HLPC (processo repetido duas vezes) e armazenado até análise por cromatografia de gás e espectrometria de massa (GC-MS).

Os FAME foram analisados através do cromatógrafo de gás Bruker, associado a um sistema de espectrofotometria de massa (Bruker SCION 456-GC, SCION TQ MS) equipado com uma coluna capilar ZB-5MS (30 x 0,25 mm de diâmetro interno com uma espessura de 0,25 µm; Phenomenex), sendo o hélio o gás transportador (1 mL.min⁻¹). A temperatura foi definida para: 1 min a 60°C, 30°C min⁻¹ a 120°C, 4°C min⁻¹ a 250°C, e 20°C min⁻¹ a 300°C com a injeção de 300°C no modo splitless. Para a identificação da FAME, utilizou-se um padrão FAME Mix Supelco®37 (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) para preparar as diferentes curvas de calibração. Os resultados foram expressos em percentagem total dos ácidos gordos (%TFA).

3.4 Ensaios de extração de pigmentos

Para extração e análise de pigmentos foi utilizado o método de Lichtenthaler & Wellburn (1983) adaptado por Schuler *et. al.* (2021). Pesaram-se entre 5 a 10 mg da biomassa das amostras obtidas dos inóculos no qual se adicionou 0.5 mL de esferas de vidro com diâmetros entre 425 e 600 µm e uma esfera de tungstênio. Após isto, adicionou-se 1 mL MeOH a 100% contendo 0.03% butilhidroxitolueno (BHT), levando esta solução para um processo de disrupção celular com um moinho de bolas Retsch MM 400 a uma velocidade de 30Hz durante 3 min. Após este processo, centrifugou-se a solução durante 5 min usando um segundo passo de disrupção celular com esferas de vidro. Após a recuperação do sobrenadante, a biomassa remanescente foi re-extraída até que o sobrenadante e o pellet se tornassem incolores. Os extratos foram secos sob um fluxo suave de azoto, ressuspensos em metanol e filtrados (filtro PTFE de 0.22 µm). Os

conteúdos dos pigmentos de clorofila *a* e *b* foram determinados espectrofotometricamente utilizando as fórmulas adaptada por Schüler *et al.*, (2021):

$$\text{Chl } a = 15.65 A_{666} - 7.34 A_{653} \quad (6)$$

$$\text{Chl } b = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666} \quad (7)$$

$$\text{TCar} = (1000A_{470} - 2.86\text{Chl } a - 129.2 \text{ Chl } b) / 245 \quad (8)$$

em que Chl *a* representa o conteúdo de clorofila *a* e a Chl *b* o conteúdo de clorofila *b* em mg/g, o TCar representa o total de carotenoides nas mesmas unidades e o A_{xxx} representa a absorvância no comprimento de onda *xxx*.

3.5 Mutagênese aleatória química e seleção de mutantes

3.5.1 Ensaio de viabilidade celular com inibidores metabólicos

Para o ensaio de viabilidade celular com inibidores metabólicos utilizaram-se as concentrações indicadas na Tabela 5. Para o efeito, 2 mL de agar contendo Nutribloom e os inibidores foram adicionados a cada poço da microplaca de 24 poços. Após solidificação, foram adicionados 0,1 mL de cultura em crescimento exponencial, sendo distribuídas por um total de 8 microplacas. Estas foram incubadas em ambiente luminoso em câmara climatizada a uma intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a 22°C durante 9 dias. As placas foram inspecionadas visualmente para determinar a inibição do crescimento em comparação com o controlo.

Tabela 5. Concentrações de inibidores utilizados no ensaio de inibição das vias metabólicas.

Inibidores	Concentrações (μM)							
	0,0	0,5	1	2,5	3	5	7,5	10
Cerulina	0,0	0,5	1	2,5	3	5	7,5	10
Defenilamina	0,0	5	10	15	25	50	75	100
Norflurazon	0,0	0,5	1	2,5	3	5	7,5	10
Nicotina	0,0	250	500	1000	3000	4000	5000	6000

3.5.2 Mutagénese aleatória

As suspensões de 1 mL de microalgas em fase de crescimento exponencial foram submetidas a mutagénese aleatória por exposição a metanossulfonato de etilo (EMS) a várias concentrações: 0, 250, 500 e 1000 mM. Esta exposição foi realizada durante 1 h no escuro à TA com agitação a 140 rpm. Para parar o processo de mutagénese, foi adicionado 1 mL de tiosulfato de sódio a 10% a cada amostra. Após a adição do tiosulfato de sódio os tubos foram centrifugados a 3000 g durante 3 min, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, lavou-se o pellet três vezes com água destilada e descartou-se o sobrenadante. De seguida, a ressuspensão das microalgas foi realizada em 1 mL de água salgada enriquecida com Nutribloom, sendo aquelas mantidas no escuro durante 24 horas, à T.A. e agitação a 140 rpm para evitar a fotoreparação de DNA. A realização de diluições sucessivas das microalgas foram realizadas em seguida e plaqueadas em placas de água artificial salgada (ASW) com ágar enriquecido com Nutribloom em quadruplicado e posteriormente incubadas à temperatura de 23 ± 2 °C a uma intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ para crescimento fotoautotrófico até se verificar o aparecimento de colónias individualizadas. A taxa de viabilidade celular foi determinada mediante a contagem de colónias formadas nas placas de Petri. O número de colónias do controlo correspondeu aos 100% de células viáveis e as restantes foram calculados com referência ao controlo de modo a obter a concentração mais adequada de EMS.

3.5.3 Seleção de mutantes com inibidores de vias metabólicas

Para mutagenizar a microalga alvo, usou-se EMS, em placas previamente preparadas enriquecidas com meio adequado (ASW + Nutribloom + inibidor de vias metabólicas). As concentrações dos inibidores das vias metabólicas foram de 4 mM de nicotina, $15 \mu\text{M}$ de norflurazon e $50 \mu\text{M}$ de defenilamina e $60 \mu\text{M}$ de cerulenina. Este ensaio foi realizado em quadruplicado. Em seguida, procedeu-se à seleção de colónias com diferentes fenótipos para detetar mutantes gerados após o processo de mutagénese

aleatória. Colônias resistentes aos inibidores das vias metabólicas a diferentes concentrações foram consideradas como possíveis mutantes. Uma vez que o surgimento de colônias levou algum tempo, este processo durou aproximadamente 45 dias. Nesta experiência, as colônias isoladas foram obtidas apenas a partir de placas com 250 mM de nicotina.

3.6 Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão destes de cada replicado ($X \pm DP$), aplicando o teste qui-quadrado e/ou t-student. Para análise de pigmentos utilizou-se o teste ANOVA-Tukey considerando o nível de significância com α igual a 5%.

4. Resultados

4.1 Crescimento de *N. oceanica* em diferentes meios de cultura

Três meios de cultura (F/2, MAM e Nutribloom [NB]) foram testados com o objetivo de determinar qual o melhor meio de cultura para o crescimento de *N. oceanica* em ambiente laboratorial (Figura 4).

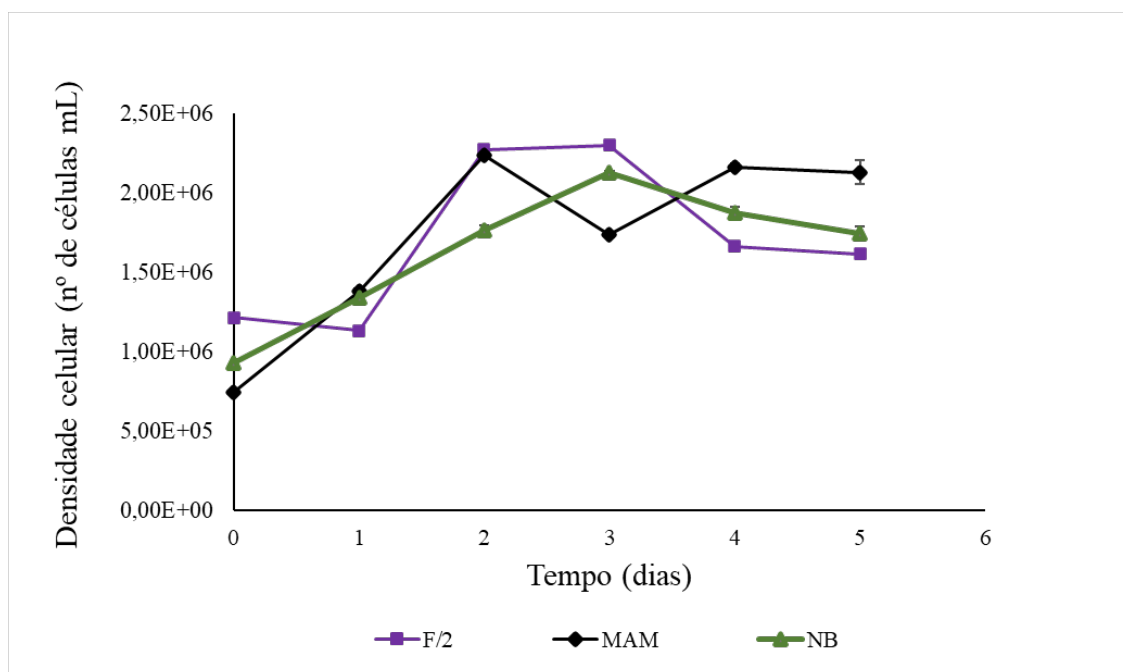


Figura 4. Curva de crescimento de *N. oceanica* com diferentes meios de cultura. Meio Guillard's ou F/2 (quadrado, roxo-claro); meio Algal ou MAM (diamante, preto) e meio Nutribloom (triângulo, verde).

Pode-se observar que a cultura inoculada com F/2 apresentou uma fase de latência com uma duração de 24 h, possivelmente devido a uma adaptação ao meio de cultura por parte das células (fase lag). Em seguida, as células entraram na fase exponencial cujo tempo de duração foi cerca de 48h, seguido de um declínio no crescimento celular que antecedeu a fase estacionária.

Ao contrário do que aconteceu com o meio F/2, nos meios MAM e NB não se observou qualquer fase de latência. As culturas inoculadas nestes dois meios entraram logo na fase exponencial. No meio MAM, a fase exponencial teve uma duração de 48 h e no meio NB a fase exponencial demorou 72 h. No meio MAM, registou-se um declínio e uma ligeira recuperação no crescimento celular, superando o crescimento celular das culturas nos outros meios.

Segundo os dados da Tabela 6, o crescimento celular máximo (de $2,31 \times 10^5$ células. mL⁻¹) foi alcançado pela *N. oceanica* com o meio MAM, com uma taxa de crescimento de 0,37 células. d⁻¹. Neste meio de cultura, a *N. oceanica* apresentou parâmetros de crescimento significativamente mais elevados ($p \leq 0.05$) em relação aos das amostras inoculadas no meio F/2 e NB. A amostra de *N. oceanica* inoculada no meio NB apresentou uma concentração celular e uma taxa de crescimento, respectivamente, de $1,36 \times 10^5$ células. mL⁻¹ e 0,20 células.d⁻¹. Estes valores demonstraram ser mais elevados ($p \leq 0.05$) que os de *N. oceanica* inoculada no meio F/2 ($6,71 \times 10^4$ células. mL⁻¹ e 0,16 células .d⁻¹). Mediante a análise dos dados da Tabela 6 e da Figura 4, MAM correspondeu ao meio de cultura mais favorável para o crescimento, tendo sendo este selecionado para a continuidade deste trabalho, tendo também em consideração que este se apresenta mais favorável a nível económico, por ser menos dispendioso de um ponto de vista industrial.

Tabela 6. Parâmetros de crescimento de *N. oceanica* nos três meios de cultura testados: Meio Guillard's (F/2), Meio Algal Modificado 1000x (MAM) e Meio Nutribloom (NB).

Meios de culturas			
	F/2	MAM	NB
CC _{max} células. mL ⁻¹	$6,71 \times 10^4$ ^c	$2,31 \times 10^5$ ^a	$1,36 \times 10^5$ ^b
μ (cc)	0,16 ^c	0,37 ^a	0,20 ^b

CC_{max} concentração celular máxima e μ (cc) taxa de crescimento específico celular por dia alcançado após a inoculação até o fim da fase exponencial, determinadas com os três meios testados durante o período de experiência. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas (teste *t*-Student).

4.2 Crescimento de *N. oceanica* sob diferentes fatores abióticos

4.2.1 Retas de calibração

As retas de calibração entre a densidade ótica (DO) e contagem celular (CC) e densidade ótica (DO) e peso seco (PS) foram determinadas para facilitar o trabalho na determinação destas variáveis (Figura 5). Estes parâmetros são específicos da espécie porque depende de vários fatores como por exemplo fase de crescimento, iluminação e composição bioquímica das células (Camacho-Rodríguez *et. al.*, 2015). O R^2 obtido da curva de calibração para este trabalho tem uma boa correlação com valores de 0.91 e 0.99 (Figura 5). Em seguida, estas retas de calibração foram utilizadas para determinar densidade celular e peso seco através da densidade ótica (Figura 5b).

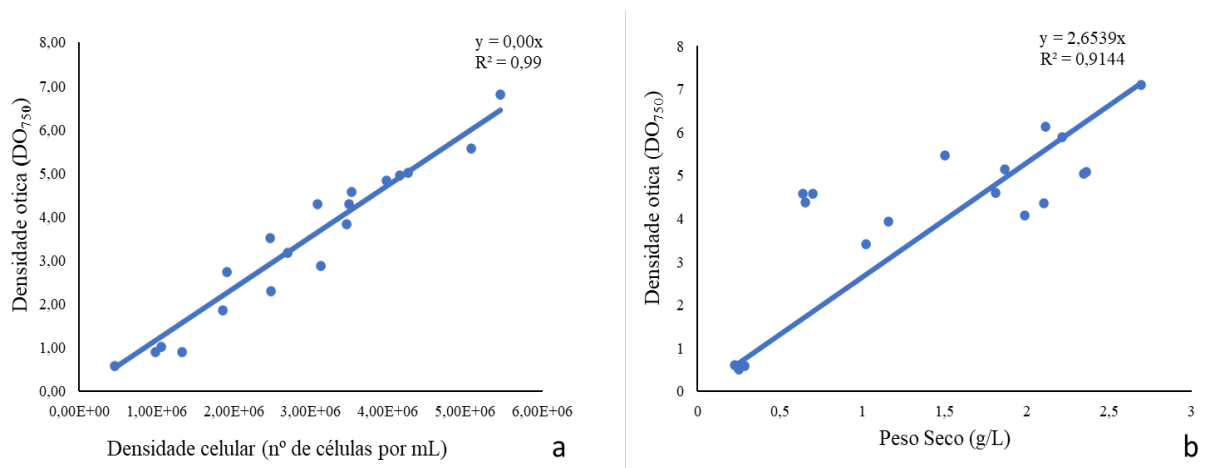


Figura 5. a) Reta de calibração determinado com base na densidade ótica e na contagem celular; **b)** Reta de calibração determinado com base densidade ótica e peso seco.

4.2.2 Nutrientes

As culturas foram cultivadas com três diferentes concentrações de MAM, nomeadamente 1x (controlo), 5x e 10x para aumentar as concentrações de nitratos, para 2, 10 e 20 mM de nitratos, respetivamente. Todas as culturas no primeiro dia (T0) do ensaio apresentaram uma cor amarela diluída, enquanto após oito dias de crescimento (T8) observou-se uma mudança na cor das culturas (Figura 6), especialmente notável nos triplicados inoculados com uma concentração MAM 1x, onde as culturas apresentaram uma cor amarela. Os outros triplicados (MAM 5x e 10x) apresentaram uma coloração verde-escura.

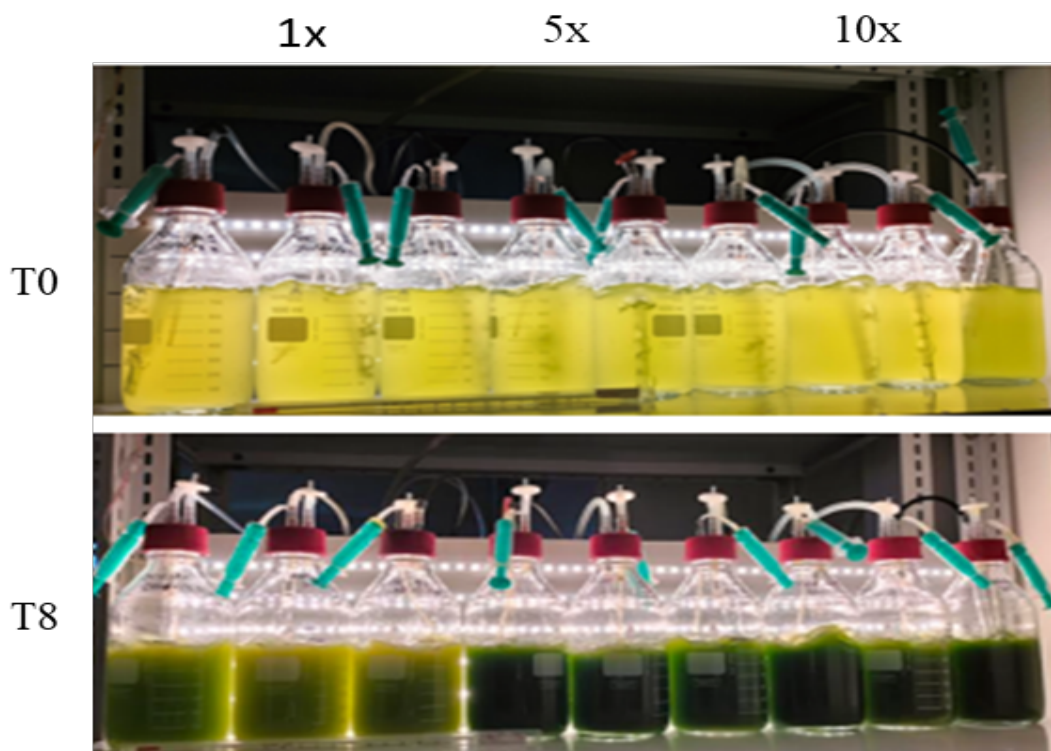


Figura 6. Culturas em triplicado de *N. oceanica* em frascos de 800 mL, enriquecidos com diferentes concentrações de nutrientes, mas submetidos à mesma intensidade luminosa ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e temperatura (22°C), onde (T0) representa o primeiro dia e (T8) o último dia da cultura.

A cultura do controlo (MAM 1x) entrou na fase exponencial a partir do primeiro dia e obteve a concentração celular de $4,73 \times 10^6$ células. mL^{-1} e peso seco máximo de $0,697 \text{ g.L}^{-1}$ no quarto dia (Figuras 7a e 7b; linha verde nas figuras).

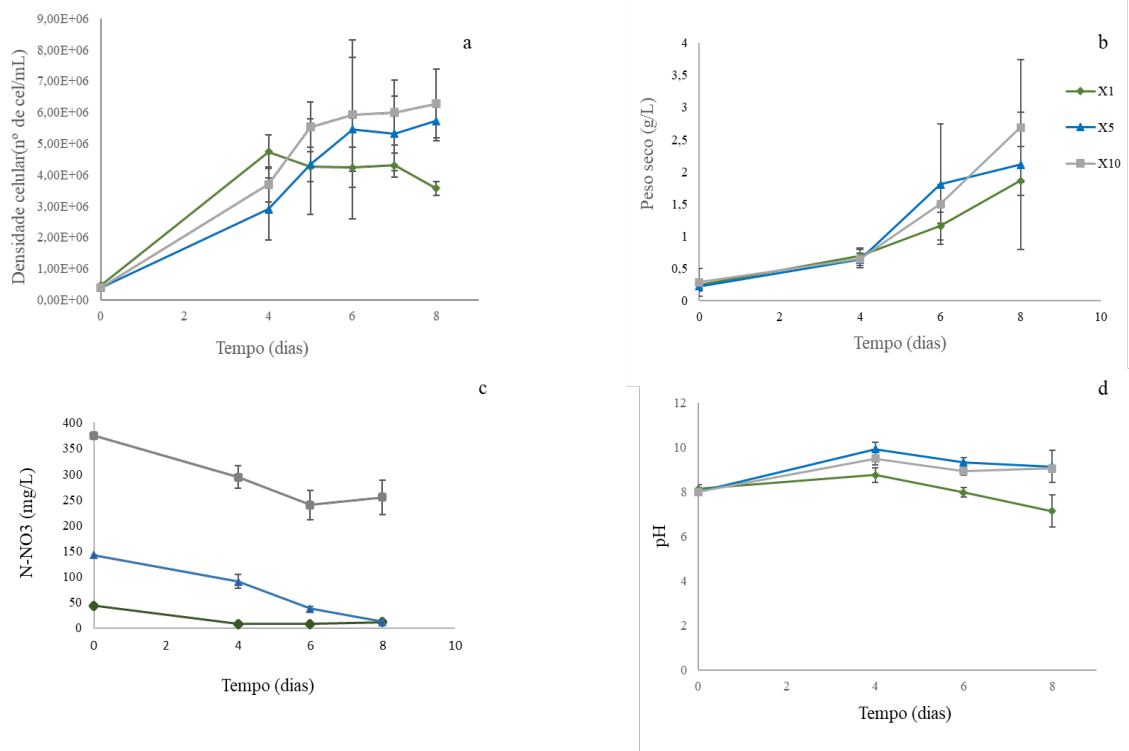


Figura 7. Ensaio de crescimento de *N. oceanica* com diferentes concentrações de nutrientes, cultivadas a 22°C e a uma intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **a)** contagem celular, **b)** peso seco, **c)** concentração de nitratos no meio de cultura e **d)** pH foram medido durante toda a experiência. Foram usados triplicados ($n=3$) em frascos de 800 ml. Os meios de cultura testados em termos das diferentes concentrações de micro- e macronutrientes no qual 1x representa 4 mL de nitratos, 4 mM de fosfatos e 0.08 M de ferro, 5x representa 8 mL de nitratos, 8 mL de fosfatos e 0.8 mL de ferro e 10x representa 16 mL de nitratos, 16 mL de fosfatos e 0.16 mL de ferro.

Após este período, deu-se o início da fase estacionária cujo período de duração foi de três dias e a produtividade média em termos de concentração celular foi de $1,95 \times 10^5$ células. mL^{-1} e o peso seco de $1,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao sexto dia. A partir do quarto dia, a concentração celular começou a decrescer, registrando no último dia uma concentração de $3,56 \times 10^6$ células. mL^{-1} e um peso seco de $1,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 7a e 7b). Quando se verificam os dados da concentração celular em meio MAM 5x (linha azul), a concentração celular da microalga *N. oceanica* obtida após 8 dias foi de $5,73 \times 10^6$ células. mL^{-1} e o valor de peso seco de $2,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figuras 7a e 7b). O crescimento da microalga testada nesta concentração de nutrientes (MAM 5x) quando comparado com a de MAM 1x apresenta uma diferença estatística significativa ($p < 0.005$). As análises

realizadas nos dados obtidos com a concentração MAM 10x (linha cinzenta) revelam uma concentração celular de $6,28 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e o peso seco de 2,69 g.L⁻¹ no dia 8 (Figuras 7 a e 7b). Ao compararmos a taxa de crescimento entre MAM 5x e MAM 10x, a diferença estatística foi significativa ($p < 0.01$). O valor do pH durante toda a experiência esteve compreendido entre 7 e 9. O valor mais baixo do pH foi registrado nos triplicados em meio MAM 1x (pH= 7,14) no último dia. Este decréscimo está relacionado com a diminuição no número de células da *N. oceanica* (Figura 7a e Tabela 7), presumivelmente causando um aumento na produção de CO₂ e aumentando desta forma a acidez do meio (Figura 7d). O valor pH das culturas crescidas em MAM 5x e MAM 10x manteve-se relativamente constante (pH=8±1), devido ao crescimento mais eficiente e à maior disponibilidade de nutrientes presentes nestes meios, facilitando desta forma a produção de O₂ e o consumo de CO₂, levando a um pH mais elevado (Figura 7d).

Tabela 7. Parâmetros de crescimento da *N. oceanica* a nível da biomassa, inoculadas com diferentes concentrações de nutrientes (MAM 1x, 5x e 10x) mantendo constante a intensidade luminosa (110 μmol.m⁻². s⁻¹) e a temperatura (22°C).

Concentração de Nutrientes Testados		1x	5x	10x
CC _{max}	células.mL ⁻¹	$3,88 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^4$ ^c	$6,67 \times 10^5 \pm 7,27 \times 10^4$ ^b	$7,36 \times 10^5 \pm 1,29 \times 10^5$ ^a
Produtividade	PS (g.L ⁻¹ . d ⁻¹)	$0,20 \pm 0,13$ ^b	$0,24 \pm 0,02$ ^b	$0,30 \pm 0,10$ ^a
	P _{CC} (células.mL ⁻¹ . d ⁻¹)	$1,07 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^5$ ^b	$8,47 \times 10^5 \pm 4,67 \times 10^5$ ^a	$7,36 \times 10^5 \pm 1,29 \times 10^5$ ^a

Taxa de crescimento máximo	μ (d ⁻¹)	3,82 ± 3,27 ^a	2,57 ± 2,47 ^a	1,95 ± 1,73 ^b
	X (d ⁻¹)	0,06 ^c	0,08 ^b	0,11 ^a

CC: concentração celular; PS: peso seco; P_{CC}: produtividade celular obtida desde a inoculação até a fase final da fase exponencial; e μ e X correspondem à taxa de crescimento em termos de concentração celular e peso seco, respectivamente, durante a fase exponencial, alcançadas com meio MAM 1x, 5x e 10x. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas (teste χ^2).

Comparando a produtividade das culturas em termos de peso seco, o melhor resultado foi obtido com a maior suplementação de nutrientes (MAM 10x) mas, verifica-se que não apresenta uma diferença estatística significativa comparando com a produtividade com o meio MAM 5x, onde este valor foi de 0,24 g.L⁻¹. d⁻¹ e a taxa de crescimento celular alcançado foi de 0,08 células. mL⁻¹. d⁻¹ (Tabela 7). Neste meio, a taxa de crescimento máximo foi de 2,57 células. mL⁻¹.d⁻¹ contra uma taxa de crescimento máximo de 3,82 células. mL⁻¹. d⁻¹ para MAM 1x.

As diferenças de produtividade celular e de biomassa são visíveis entre MAM 1x e MAM 5x, demonstrando que para MAM 5x as concentrações de nutrientes disponibilizados durante a experiência foram suficientes. No que diz respeito a MAM 10x, a taxa de crescimento máximo celular apresentou valores mais baixos que os de MAM a outras concentrações ($p \leq 0.05$). Aparentemente, os compostos adicionais fornecidos (MAM 10x) para o período de experiência escolhido e a intensidade luminosa atribuída não são adequados para esta concentração, limitando desta forma a produtividade e a taxa de crescimento. (Tabela 7; Figuras 7a, b, c).

Mediante o resultado obtido durante toda a experiência, escolheu-se o meio de cultura MAM 5x para a continuidade da experiência por este ser menos dispendioso e, por que quando comparado com os resultados obtidos com MAM 10x, não haver diferenças muito significativas em termos de produção de biomassa.

4.2.3 Intensidade luminosa

Neste ensaio, as culturas de *N. oceanica* foram cultivadas em MAM 5x à temperatura 22°C, mas sob intensidades luminosas diferentes (Figuras 8 e 9).

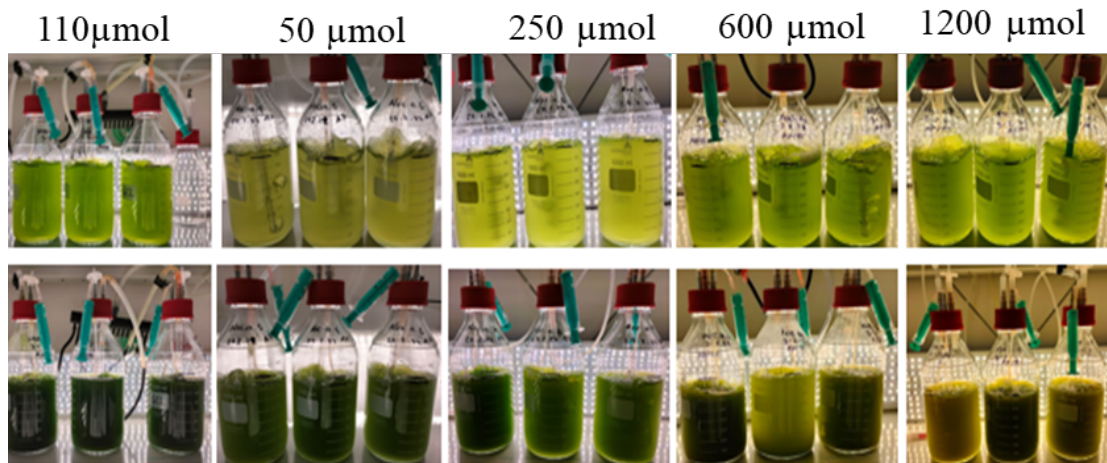


Figura 8. Cultura de *N. oceanica*, representando as duas experiências com intensidades luminosas diferentes: 100 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ representa a intensidade luminosa padrão, 50 e 250 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ intensidades luminosas baixa e média, respectivamente; 600 e 1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, altas intensidades luminosas.

Em T0, o primeiro dia da inoculação, as culturas independentemente da intensidade testada apresentavam uma cor verde, embora no último dia (T8) a cor dos triplicados a 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ apresentou um verde muito escuro. As culturas a 50 e 250 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ tinham uma cor verde-escuro, enquanto que as culturas a 600 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ apresentavam uma coloração verde-amarelada escura e a 1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ um verde-amarelado menos escuro.

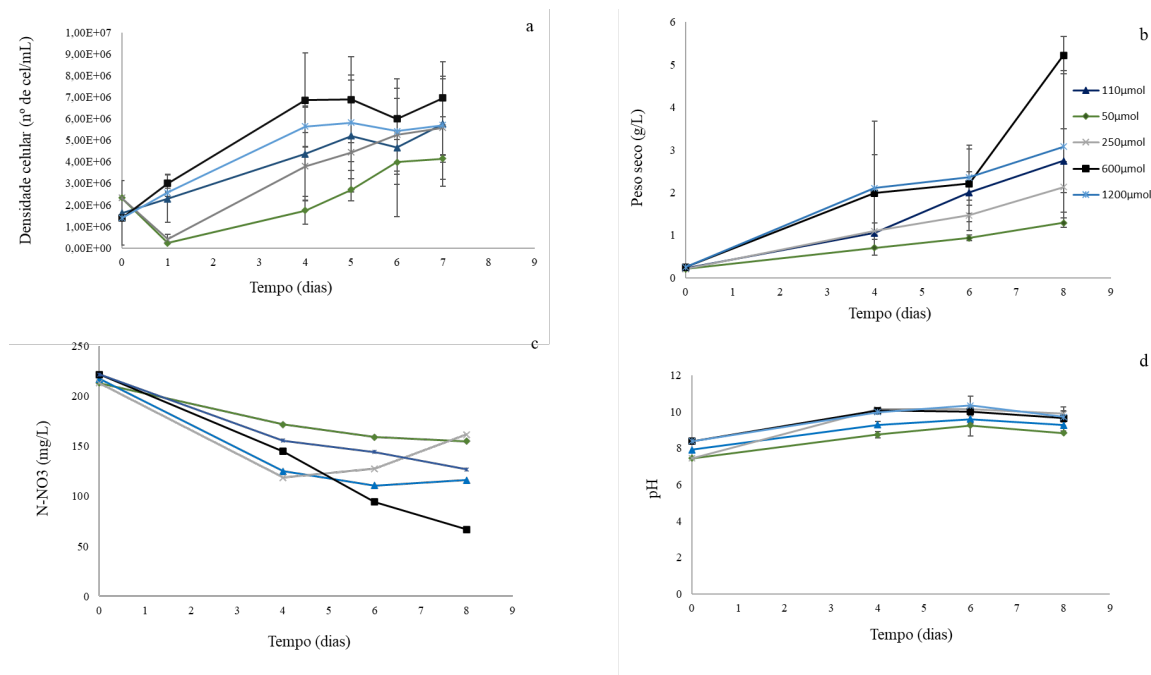


Figura 9. a) Representação gráfica do crescimento celular a todas as intensidades luminosas testadas a uma concentração de nutrientes de 5x (MAM 5x) e a uma temperatura de 22°C para o crescimento laboratorial da *N. oceanica* a 50 (verde), 110 (azul-escuro), 250 (cinza), 600 (preto) e 1200 (azul claro) $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; **b)** produção de biomassa obtida a várias intensidades luminosas (baixas, médias e altas); **c)** consumo de nitratos e **d)** variação do pH.

As observações macroscópicas das culturas depois do crescimento durante oito dias demonstraram culturas com uma cor verde-escura a intensidades luminosas mais baixas (50, 110, 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Porém, nas intensidades luminosas mais elevadas a cor das culturas mudou para amarelo-escuro (600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e amarelo menos escuro (1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Figura 8). Os inóculos testados a baixa intensidade luminosa (50 e 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) apresentaram uma fase de adaptação (fase lag) com uma duração de 24h. Após esta fase, os triplicados entraram em fase de crescimento exponencial, atingindo um número máximo de células de $4,15 \times 10^6$ células. mL^{-1} e um peso seco de $1,29 \text{ g.L}^{-1}$ para um intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a concentração máxima de células foi de $5,58 \times 10^6$ células. mL^{-1} e $2,12 \text{ g.L}^{-1}$ no último dia. As culturas à intensidade luminosa padrão entraram na fase exponencial logo após a inoculação, registando uma concentração celular máxima no último dia no valor de $5,76 \times 10^6$ células. mL^{-1} e o peso máximo de $2,74 \text{ g.L}^{-1}$. Para altas intensidades luminosas (600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$),

o máximo de concentração celular ($6,88 \times 10^6$ células. mL⁻¹) foi atingido ao quinto dia após a inoculação, chegando a verificar uma quebra e logo em seguida uma recuperação, ao contrário da intensidade luminosa máxima testada ($1200 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) onde a concentração de células máxima foi produzida ao quinto dia e o máximo de consumo de nitratos foi observado ao oitavo dia (Figuras 9a e 9c).

O pH das culturas estiveram entre 7,5 e 9,9. Esta variação pode estar relacionada com vários fatores abióticos e bióticos como a temperatura e a lise celular, respetivamente, levando a uma variação no consumo de nitratos que em certas circunstâncias aumentou consideravelmente.

No que se refere aos dados obtidos a altas e ou baixas intensidades luminosas quando comparamos os dados da taxa do crescimento em termos de biomassa obtida não se verifica diferenças significativas ($p \geq 0.1$) a 110 e $1200 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, demonstrando que a intensidade luminosa adequada para o cultivo da microalga para uma cultura de 800 mL de *N. oceanica* apresenta um largo intervalo em relação a esta condição. Porém, para altas intensidades luminosas, $600 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ parece corresponder a uma intensidade luminosa ideal para cultura de *N. oceanica* para o volume em estudo (Tabela 8). Ao analisar as taxas de crescimento e de produtividade para baixas intensidade luminosa o melhor resultado foi observado aos $110 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, verificando uma competitividade acentuada entre os 50 e $250 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$. Ao analisar os dados onde se verificou maior taxa de crescimento podemos concluir que os $110 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ correspondem a uma intensidade adequada para a continuidade deste trabalho porque a diferença nas taxas de crescimento é estatisticamente irrelevante quando comparado com a taxa de crescimento de culturas a $600 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ e por haver mais capacidade de crescimento celular aos $110 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ que aos $600 \mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ (Tabela 8 e Figura 9c).

Tabela 8. Produtividade e taxa de crescimento da *N. oceanica* a nível das várias intensidades luminosas testadas em meio MAM 5x e a uma temperatura de 22°C.

Intensidades luminosas testadas	Unidades	50 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$	110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$	110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$	250 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$	600 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$	1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$
CC _{max}	células.mL ⁻¹	2,27x10 ⁵ ±1,79x10 ⁴	4,16x10 ⁵ ±4,52x10 ³	5,45x10 ⁵ ±1,7x10 ^{5b}	3,99x10 ⁵ ±1,72x10 ⁵	6,96x10 ⁵ ±1,09x10 ^{5a}	5,38x10 ⁵ ±1,70x10 ^{5b}
Produtividade	PS (g.L ⁻¹ . d ⁻¹)	0,12±0,03 ^c	0,22±0,01 ^c	0,38±0,15 ^b	0,21±0,07 ^b	0,62±0,05 ^a	0,22±0,01 ^c
	P _{CC} (células.mL ⁻¹ . d ⁻¹)	5,58x10 ⁵ ± 1,84x10 ^{4c}	6,23x10 ⁵ ± 1,99x10 ^{5b}	6,81x10 ⁵ ± 5,69x10 ^{3a}	7,31x10 ⁵ ± 1,68x10 ^{5a}	7,96x10 ⁵ ± 1,25x10 ^{5a}	6,15x10 ⁵ ± 1,95x10 ^{5c}
Taxa de crescimento máximo	μ (d ⁻¹)	0,25 ^b	0,14±0,02 ^c	0,33 ^a	0,33 ^a	0,20 ^b	0,13 ^c
	X(d ⁻¹)	2,17±1,68 ^b	3,02±1,74 ^a	2,20±1,51 ^b	2,24±2,08 ^b	3,10±2,88 ^a	3,06±2,92 ^a

CC: concentração celular; PS: peso seco; P_{CC}: produtividade celular obtida desde a inoculação até a fase final da fase exponencial; μ e X correspondem à taxa de crescimento em termos de concentração celular e peso seco, respetivamente, durante a fase exponencial, obtidos durante a experiência com as várias intensidades luminosas. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas (teste *t*-Student).

4.2.4 Temperatura

Nesta seção os resultados apresentados, mostram qual a influência da temperatura e qual a temperatura ideal para a cultura da *N. oceanica* em ambiente laboratorial.

No início desta experiência (T0), todos os triplicados apresentavam uma cor verde menos concentrada e no final da experiência (T8) passaram a apresentar uma cor verde um pouco mais concentrada (Figura 10). A alteração da temperatura não teve qualquer influência na mudança da coloração da cultura.

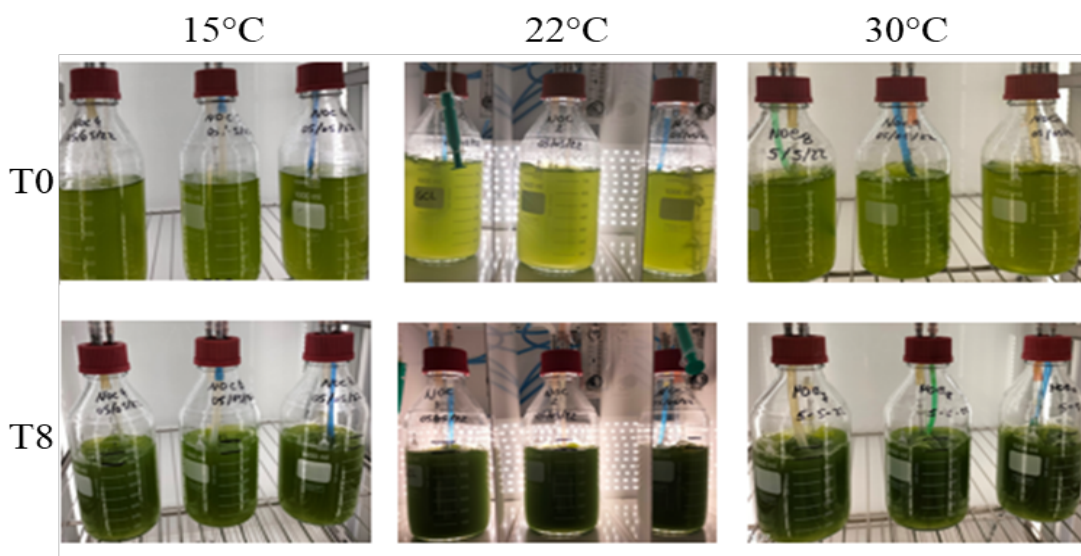


Figura 10. Culturas de *N. oceanica* a diferentes temperaturas, recorrendo ao uso de uma câmara climática para crescer as células às temperaturas de 15°C e 30°C. As culturas a 22°C foram crescidas à temperatura ambiente. As culturas de *N. oceanica* foram inoculadas em MAM 5x a uma intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nesse ensaio a concentração celular inicial era de $4,63 \times 10^5$ células. mL^{-1} para todas as temperaturas (15, 22 e 30°C) e todas as culturas entraram em crescimento exponencial logo no primeiro dia (Figura 11a). No último dia, as culturas obtiveram um crescimento celular final de concentração celular de $4,15 \times 10^6$ células. mL^{-1} e um valor final de peso seco de $1,87 \text{ g. L}^{-1}$ para 22°C, $3,97 \times 10^6$ células. mL^{-1} e $1,92 \text{ g. L}^{-1}$ para 15°C e aos 30°C $5,45 \times 10^6$ células. mL^{-1} e $2,57 \text{ g. L}^{-1}$ (Figuras 11a e 11b). O crescimento celular aos 30°C foi mais acentuado do que a outras temperaturas e com uma diferença estatística significativa ($p < 0.05$) e com um elevado consumo de nitratos (Figuras 11a, 11b e 11c). No que diz respeito ao pH, o valor mais elevado foi observado ao quarto dia a 22°C (pH 10), finalizando a experiência com valores de cerca 9. Este valor do pH esta dentro do

valor esperado para uma experiência onde a cultura esteve sempre em crescimento produzindo muito O₂ e consumindo muito CO₂.

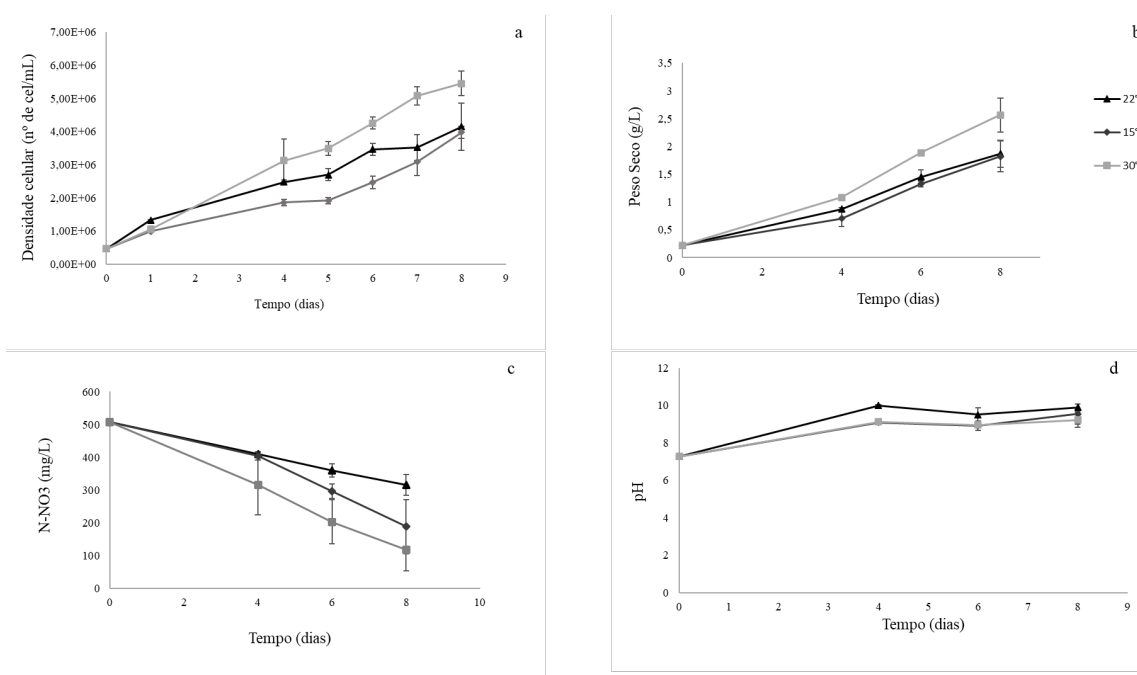


Figura 11. Curva de crescimento de *N. oceanica* a diferentes temperaturas em termos **a)** contagem celular, **b)** peso seco, **c)** concentração de nitratos no meio de cultura e **d)** pH.

Os dados da Tabela 9 confirmam a os dados visíveis nas curvas de crescimento (Figura 11a e 11b). Ao analisar as taxas de crescimento, confirma-se que 30°C é a temperatura à qual a *N. oceanica* cresce melhor. Os valores obtidos a nível de taxa de crescimento celular e da biomassa apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$), mas as diferenças de produtividade entre culturas crescidas a 15 e 22°C não foram significativas, principalmente no que respeita ao aumento de biomassa.

Tabela 9. A produtividade e taxa de crescimento *N. oceanica*, testada a base da influência da temperatura (diferentes temperaturas), com a mesma concentração de nutrientes (5x) e a mesma intensidade luminosa ($110\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$).

Temperaturas testadas	Unidades	15°C	22°C	30°C
CCmax	(células. mL ⁻¹)	4,61x10 ⁵ ±8,85x10 ⁴ b	4,39x10 ⁵ ±2,12x10 ⁴ b	6,24x10 ⁵ ±4,53x10 ^{4a}
Produtividade	PS (g.L ⁻¹ . d ⁻¹)	0,17±0,03 ^b	0,18±0,03 ^b	0,25±0,04 ^a
	P _{CC} (células. mL ⁻¹ d ⁻¹)	4,61x10 ⁵ ±8,85x10 ^{4b}	4,39x10 ⁵ ±2,12x10 ⁴ b	6,24x10 ⁵ ±4,53x10 ^{4a}
Taxa de crescimento	μ _{CC} (células. mL ⁻¹ . d ⁻¹)	1,89 ± 1,68 ^a	1,88 ± 1,51 ^a	1,93 ± 1,60 ^a
	X (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	0,04 ^b	0,04 ^b	0,08 ^a

CC: concentração celular; PS: peso seco; P_{CC}: produtividade celular obtida desde a inoculação até a fase final da fase exponencial; μ e X correspondem à taxa de crescimento em termos de concentração celular e peso seco, respectivamente, durante a fase exponencial, obtidos durante a experiência com as várias intensidades luminosas. Letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas (teste *t*-Student).

Analisando os dados do consumo de nitrato pode-se verificar que nesta experiência ainda se iniciou com uma certa quantidade de nitratos das experiências anteriores, pois logo no início da experiência a concentração de nitratos calculado era elevada, 36,25 mM. Porém, no fim da experiência, aos 22°C, a concentração de nitratos baixou para 22,49 mM aos 15°C foi de 13,44 mM e aos 30°C a concentração de nitratos diminuiu para 8,46 mM. As diferenças estatísticas entre as concentrações de nitratos das culturas a diferentes temperaturas são significativas ($p < 0.05$) (Figura 11c). Uma vez que

aos 30°C foi a temperatura onde se deu a maior taxa de crescimento (Tabela 9), tal foi refletido num consumo de nitratos mais elevado (Figura 11c).

Durante as experiências com fatores abióticos, conclui-se que para a cultura de *N. oceanica* em ambiente laboratorial, a melhor concentração de nutrientes testada foi a de MAM 10x, mas escolheu-se para a continuidade da experiência a concentração 5x porque a diferença no crescimento entre as duas concentrações não foi muito significativa e as culturas em meio MAM 5x apresentaram uma produtividade no valor de 0,24 g. L⁻¹ é menos dispendiosa (Tabela 7). A intensidade luminosa a 110 μmol m². s⁻¹ revelou-se ser a melhor intensidade luminosa, em taxa de crescimento, pois é onde se verifica um crescimento exponencial das células até ao último dia de experiência, apresentando um valor de taxa de crescimento celular de 3,02 d⁻¹ e a produtividade a nível de biomassa no valor de 0,31 g. L⁻¹. d⁻¹ obtida nesta intensidade luminosa (Tabela 8). Também constatamos que aos 30°C é a temperatura ideal para a concentração celular da *N. oceanica*, porque a esta temperatura todos os dados analisados tiveram um balanço positivo, chegando a alcançar uma taxa de crescimento celular no valor 1,93 d⁻¹ e uma produtividade de biomassa em 0,25 g. L⁻¹. d⁻¹ (Tabela 9).

4.3 Efeitos dos fatores abióticos na produção de compostos de valor acrescentado

4.3.1 Perfil e produtividade dos ácidos gordos

O perfil dos ácidos gordos da *N. oceanica* é composto por ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), sendo o ácido eicosapentenoico (EPA) o mais abundante no grupo das PUFA (Tabela 10). No grupo dos SFA, o mais abundante correspondeu ao ácido palmítico (C16:0) e nos MUFA, o ácido gordo mais abundante foi o ácido palmitoleico (C16:1).

Tabela 10. Perfil de ácidos gordos obtidos da biomassa da *N. oceanica* em termos percentuais do conteúdo, tendo em conta os vários fatores abióticos utilizados durante a experiência. A média das amostras (<x>) e o desvio padrão(s) estão representados. n.d. - Ácidos gordos não detetados; SFA - Ácidos gordos saturados; MUFA - ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - ácidos gordos polinsaturados.

	NUTRIENTE-T0	NUTRIENTES - T8			LUZ- alta - T0	LUZ-alta - T8			LUZ-baixa - T0	LUZ-baixa - T8			TEMPERATURA - T0	TEMPERATURA - T8		
	<x> ± s	<x> ± s			<x> ± s	<x> ± s			<x> ± s	<x> ± s			<x> ± s	<x> ± s		
		2 x	5x	10 x	--	110 µmol	600 µmol	1200 µmol	---	50 µmol	110 µmol	250 µmol	--	15°C	22°C	30°C
SFA																
C12:0	1,08 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,97 ± 0,09	1,08 ± 0,10	0,94 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,63 ± 0,10	0,56 ± 0,01	0,85 ± 0,00	0,53 ± 0,17	0,58 ± 0,09	0,65 ± 0,15	100 ± 0	0,93 ± 0,05	1,09 ± 0,29	0,98 ± 0,01
C14:0	7,11 ± 0,00	6,89 ± 0,69	6,04 ± 0,51	5,58 ± 0,34	4,84 ± 0,00	6,89 ± 0,69	7,23 ± 0,35	8,26 ± 0,72	4,59 ± 0,00	4,83 ± 0,09	5,18 ± 0,17	5,41 ± 0,84	nd	5,75 ± 0,09	4,12 ± 0,06	6,87 ± 0,01
C15:0	0,96 ± 0,00	0,59 ± 0,01	0,63 ± 0,04	0,52 ± 0,03	0,76 ± 0,00	0,59 ± 0,01	0,65 ± 0,11	0,35 ± 0,43	0,58 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,39 ± 0,00	0,29 ± 0,12	nd	0,49 ± 0,01	1,56 ± 1,59	0,62 ± 0,01
C16:0	35,96 ± 0,00	38,05 ± 0,87	21,9 ± 3,00	18,47 ± 0,35	17,84 ± 0,00	38,05 ± 0,87	39,32 ± 4,46	39,67 ± 1,41	19,58 ± 0,00	18,59 ± 0,28	17,87 ± 0,29	19,67 ± 5,84	nd	22,29 ± 0,38	14,22 ± 0,65	26,26 ± 1,30
C17:0	0,55 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,41 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,40 ± 0,09	0,51 ± 0,04	0,26 ± 0,31	0,46 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,45 ± 0,10	nd	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,20	0,5 ± 0,02
C18:0	1,42 ± 0,00	0,88 ± 0,11	0,78 ± 0,09	0,56 ± 0,01	0,90 ± 0,00	0,88 ± 0,11	0,67 ± 0,73	2,17 ± 0,31	1,01 ± 0,00	0,45 ± 0,09	0,39 ± 0,06	0,33 ± 0,08	nd	0,78 ± 0,12	0,76 ± 0,11	0,71 ± 0,32
Σ	47,08 ± 0,00	47,14 ± 1,73	30,71 ± 3,75	26,5 ± 0,85	25,68 ± 0,00	33,16 ± 6,00	49,01 ± 5,78	51,26 ± 3,19	27,07 ± 0,00	25,09 ± 0,63	24,71 ± 0,64	26,80 ± 7,14	100 ± 00	30,74 ± 0,65	22,26 ± 2,91	35,94 ± 1,66
MUFA																
C14:1	0,44 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,47 ± 0,00	0,20 ± 0,06	0,16 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,42 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,29 ± 0,07	nd	0,23 ± 0,19	0,46 ± 0,18	0,26 ± 0,01
C16:1	25,12 ± 0,00	30,39 ± 0,33	23,5 ± 1,84	23,78 ± 0,63	22,18 ± 0,00	15,36 ± 12,85	23,05 ± 2,34	23,43 ± 2,39	25,35 ± 0,00	25,02 ± 0,43	24,84 ± 0,46	20,85 ± 5,35	nd	21,33 ± 0,79	23,72 ± 0,03	24,2 ± 0,16
C17:1	0,66 ± 0,00	0,24 ± 0,04	0,76 ± 0,07	0,69 ± 0,04	1,13 ± 0,00	0,98 ± 0,30	0,28 ± 0,02	0,14 ± 0,14	1,03 ± 0,00	0,80 ± 0,16	0,87 ± 0,02	0,39 ± 0,02	nd	0,87 ± 0,08	0,58 ± 0,05	0,84 ± 0,01
C18:1	6,3 ± 0,00	5,55 ± 0,44	4,01 ± 0,67	2,99 ± 0,09	3,43 ± 0,00	3,38 ± 0,92	4,39 ± 0,10	2,89 ± 2,43	3,22 ± 0,00	2,06 ± 0,02	1,87 ± 0,09	3,74 ± 1,06	nd	4,31 ± 0,26	2,52 ± 0,46	2,68 ± 0,24
C18:1	0,73 ± 0,00	0,53 ± 0,09	1,39 ± 0,19	4,05 ± 0,92	2,39 ± 0,00	0,50 ± 0,17	2,16 ± 0,43	4,57 ± 4,39	9,19 ± 0,00	3,98 ± 0,40	2,41 ± 0,37	2,41 ± 0,61	nd	2,29 ± 0,25	3,77 ± 0,98	1,87 ± 0,01
Σ	33,24 ± 0,00	36,83 ± 0,91	29,93 ± 2,79	31,76 ± 1,62	29,61 ± 0,00	24,61 ± 16,84	30,04 ± 5,78	31,11 ± 9,38	39,19 ± 0,00	32,21 ± 0,88	30,33 ± 0,97	27,68 ± 7,12	nd	29,02 ± 1,58	31,05 ± 1,69	29,85 ± 0,43
PUFA																
C18:2	2,38 ± 0,00	0,98 ± 0,19	4,09 ± 0,26	4,02 ± 1,29	3,94 ± 0,00	3,26 ± 2,52	1,80 ± 1,36	1,22 ± 1,66	4,01 ± 0,00	3,77 ± 0,06	2,88 ± 2,12	13,89 ± 16,03	nd	4,34 ± 0,42	2,97 ± 0,18	4,01 ± 0,05
C18:3	0,88 ± 0,00	0,25 ± 0,04	0,46 ± 0,08	0,57 ± 0,04	0,92 ± 0,00	0,42 ± 0,08	1,11 ± 0,71	0,60 ± 0,54	0,75 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,38 ± 0,06	nd	0,45 ± 0,06	0,69 ± 0,11	0,49 ± 0,01
C20:3	0,66 ± 0,00	0,35 ± 0,07	0,39 ± 0,09	0,55 ± 0,04	0,60 ± 0,00	0,28 ± 0,19	0,20 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,55 ± 0,25	0,77 ± 0,04	0,42 ± 0,08	nd	0,55 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,48 ± 0,01
C20:4	3,81 ± 0,00	3,19 ± 0,76	10,27 ± 2,04	8,57 ± 1,79	4,53 ± 0,00	3,31 ± 1,02	3,42 ± 2,74	3,10 ± 1,62	2,09 ± 0,00	5,82 ± 0,26	4,45 ± 1,99	3,37 ± 0,55	nd	3,83 ± 0,48	5,84 ± 0,02	6,15 ± 0,09
C20:5	11,94 ± 0,00	11,26 ± 0,65	24,15 ± 0,9	28,03 ± 3,78	34,72 ± 0,00	34,96 ± 7,32	14,41 ± 1,70	12,56 ± 1,09	26,62 ± 0,00	32,02 ± 0,28	36,16 ± 2,33	27,45 ± 1,36	nd	31,08 ± 0,67	36,37 ± 1,04	23,06 ± 1,18
Σ	19,67 ± 0,00	16,03 ± 1,71	39,36 ± 3,39	41,74 ± 6,95	44,71 ± 0,00	42,23 ± 11,13	20,94 ± 6,56	17,63 ± 4,93	33,73 ± 0,00	42,70 ± 0,86	44,96 ± 6,49	45,51 ± 18,07	nd	40,24 ± 1,58	46,69 ± 1,36	34,21 ± 1,33

Com as experiências com as várias concentrações dos nutrientes testados, pode-se verificar que os conteúdos iniciais de SFA, MUFA e PUFA foram de 47,08%, 33,24% e 19,67%, respectivamente (Tabela 10). Porém, ao finalizar a otimização do meio de cultura, as percentagens finais apresentaram variações consideráveis para cada grupo de ácidos gordos. Nas células em meio MAM 1x, os conteúdos de SFA mantiveram-se estáveis. Porém, em meios mais ricos, MAM 5x e MAM 10 x, estes baixaram significativamente ($p \leq 0.05$). Em relação ao conteúdo em PUFA, a biomassa da *N. oceanica* crescida em meio MAM 5x e MAM 10x apresentou um aumento de duas vezes, alcançando conteúdos de 39,3 e 41,7% em ácidos gordos totais (AGT), quando comparado com os valores no início iniciais, enquanto o valor de PUFA em meio MAM 1x não apresentou diferenças significativas. Com intensidades luminosas (alta ou baixa), foi possível verificar que a luz não teve a mesma influência em termos percentuais dos ácidos gordos. No início da experiência a altas intensidades luminosas (110, 600 e 1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$), *N. oceanica* apresentou valores de SFA, MUFA e PUFA de 25,68%, 29,61% e 44,71% de AGT, respectivamente. Aqui, o conteúdo de PUFA obtido foi elevado. Contudo, no final da experiência, a 600 e 1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ verificou-se uma diminuição acentuada significativa para 20,94 e 17,63% de AGT, ($p \leq 0.05$) em relação ao conteúdo produzido aos 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$. Para baixas intensidades luminosas, o conteúdo de PUFA produzido no primeiro dia de cultura foi de 33,73% AGT, mas após oito dias de cultura houve um aumento para 42,70, 44,96 e 45,51%, para intensidades de 50, 110 e 250 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ ($p \leq 0.05$) respectivamente. Em relação à temperatura, não foi possível determinar o conteúdo em PUFA no primeiro dia de inoculação devido à perda de amostras. Para a biomassa crescida às temperaturas 15 e 22 °C, o conteúdo de PUFA obtido após oito dias foi de 40,24 e 46,69 % de AGT, respectivamente. No entanto, *N. oceanica* cultivada a 30°C apresentou um valor significativamente mais baixo (34,21%) (Tabela 10). Tendo em conta os conteúdos em ácidos gordos, estes suportam a escolha do meio MAM 5x, a intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ e da temperatura de 22°C como sendo os fatores abióticos ótimos para a cultura de *N. oceanica* em ambiente laboratorial, uma vez que a melhor produtividade de EPA (C20:5) foi alcançada nestas condições (Tabela 11).

Tabela 11. Produtividade de ácido ecosapentaenóico (EPA), ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ($\text{mg. L}^{-1}. \text{d}^{-1}$) de *N. oceanica* sob diversas condições de stress abiótico. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas, baseadas no teste de *t*-Student.

Produtividade	EPA	SFA	MUFA	PUFA
MAM				
1x	2,62±0,15 ^b	10,96±0,17 ^a	8,10±0,19 ^b	3,73±0,27 ^b
5x	6,37±0,24 ^a	8,56±0,86 ^a	7,89±0,39 ^b	10,68±0,77 ^a
10x	9,43±1,27 ^a	8,91±0,28 ^a	10,38±0,07 ^a	14,04±0,20 ^a
Intensidades luminosas				
110 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	14,29±2,9 ^{9a}	13,55±2,37 ^b	10,06±4,08 ^a	17,26±1,95 ^a
600 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	9,40±1,11 ^a	31,98±2,79 ^a	19,60±1,50 ^a	13,67±4,15 ^a
1200 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	4,83±0,42 ^b	19,74±0,98 ^b	11,98±1,61 ^a	6,79±0,63 ^a
110 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	8,68±0,56 ^a	5,93±0,15 ^a	7,28±0,22 ^a	10,79±0,37 ^a
50 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	4,48±0,04 ^b	3,51±0,05 ^b	4,51±0,04 ^b	5,98±0,08 ^b
250 ($\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$)	6,31±0,31 ^a	6,17±1,59 ^a	6,37±1,63 ^a	10,47±3,22 ^a
Temperatura				
15°C	6,14±0,13 ^a	6,07±0,08 ^b	5,73±0,23 ^b	7,95±0,26 ^a
22°C	7,36±0,21 ^a	4,51±0,14 ^c	6,29±0,14 ^b	9,45±0,028 ^a
30°C	6,43±0,33 ^a	10,02±0,28 ^a	8,32±0,03 ^a	9,59 ±0,32 ^a

Verificou-se que a maior produtividade de EPA (C20:5) foi obtida na experiência de otimização do meio MAM, obtida após crescimento em meio MAM 10x (foi de 9,43

mg. L⁻¹. d⁻¹), sem diferenças significativas quando comparado com MAM 5x (6,37 mg. L⁻¹. d⁻¹).

Durante a realização da experiência com as várias intensidades luminosas, foi possível verificar uma maior produtividade de EPA quando exposta a intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, atingindo 14,29 mg. L⁻¹. d⁻¹. Na segunda experiência a baixas intensidades luminosas, a intensidade luminosa padrão (110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$) resultou numa maior produtividade de EPA, havendo uma quebra acentuada na produtividade a baixas intensidades luminosas, 50 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, com um valor de 4,48 mg. L⁻¹. d⁻¹. Isto pode estar associado ao processo de adaptação a intensidades luminosas mais baixas. Este processo de adaptação pode ser justificado com a nova inoculação de *N. oceanica*, como já foi referido anteriormente, pois a cultura é inoculada a partir da cultura anterior do qual se observa uma maior taxa de crescimento. Relativamente à experiência com diferentes temperaturas, a temperatura padrão (22°C) resultou numa produtividade de 7,36 mg. L⁻¹. d⁻¹, mas não apresenta diferenças significativas quando se compara com o valor de EPA obtido aos 30°C ($p \leq 0.05$). Assim, para uma produtividade máxima de EPA requer-se um meio de cultura com elevado nível de nutrientes à intensidade luminosa padrão e a uma temperatura de 22°C (Tabela 11). Além disso, pode-se observar que, à medida que se aumenta a concentração de nutrientes, existe uma influência na produtividade dos diferentes grupos de ácidos gordos. Durante a experiência com diferentes concentrações de nutrientes, pode verificar-se que, com o aumento da concentração, a produtividade obtida a nível de PUFA também aumentou ($p \leq 0.05$).

Na experiência com altas intensidades luminosas, a maior produtividade de PUFA foi registada a 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, mas sem diferenças significativas com o valor obtido a uma intensidade luminosa a 600 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ ($p \geq 0.05$). A esta mesma intensidade, SFA foi o grupo com maior produtividade alcançada ($p \leq 0.05$) em relação às produtividades obtidas a outras intensidades luminosas (Tabela 12).

Na segunda experiência com intensidade luminosas, não houve diferenças significativas na produtividade dos três grupos de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA) quando expostos a 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ e 250 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Contudo, ao comparar com valores obtidos a 50 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ a diferença estatística já é significativa ($p \leq 0.05$), e estes dados podem ser confirmados com o crescimento celular a 50 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ que precisou de um período de adaptação (Figura 9).

Segundo os dados da Tabela 11, pode-se observar que a maior produtividade dos diferentes grupos de ácidos gordos foi observada aos 30°C, que é a temperatura que

segundo o gráfico do crescimento celular (Figura 11a) foi a temperatura onde o crescimento das células foi mais acentuado. Contudo, a produtividade de PUFA obtida não apresenta diferenças significativas entre os 22°C e os 30°C.

Tendo em conta a produtividade de PUFA, estes apresentaram uma maior concentração quando *N. oceanica* foi crescida numa elevada concentração de nutrientes (MAM 10x), onde também se registou melhor crescimento celular, com intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$, e com uma temperatura de 30°C.

4.3.2 Pigmentos

Para este trabalho, utilizou-se culturas de *N. oceanica* submetidas a diferentes condições abióticas (variação na concentração de nutrientes, intensidade luminosa e temperatura), a fim de verificar qual a influência que cada fator tem sobre a produtividade dos carotenoides (Figura 12).

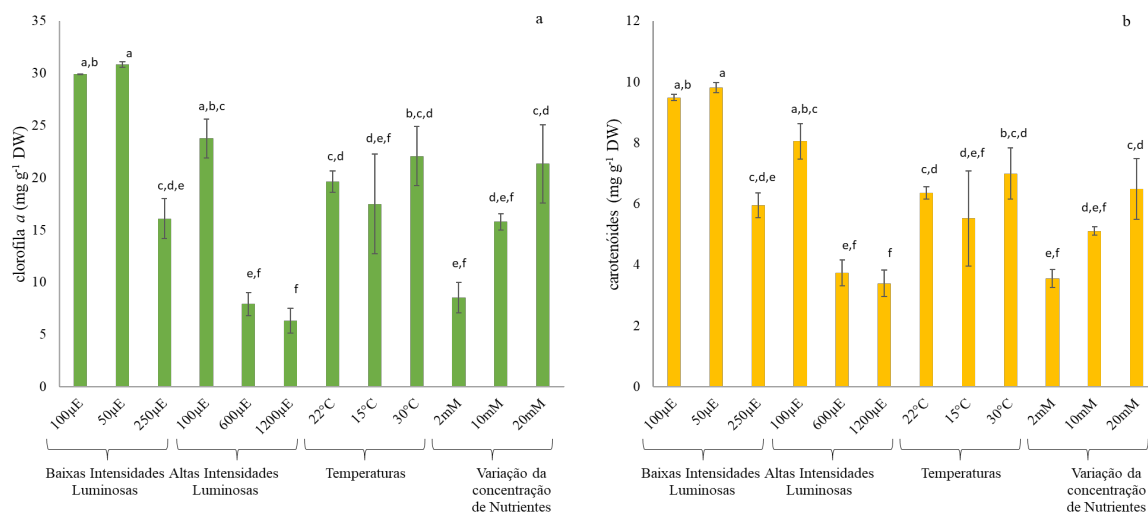


Figura 12. Conteúdo de pigmentos de *N. oceanica* em condições padrão e sob stress abiótico, nomeadamente quantidade de clorofila *a* (a) e conteúdo de carotenoides (b).

Segundo os dados analisados, *N. oceanica* cultivada em MAM 10x (20mM) apresentou um elevado conteúdo de pigmentos (clorofila *a* e carotenoides), apresentando uma diferença estatística significativa ($p \leq 0.05$) em comparação com os meios MAM 1x (2mM) e MAM 5x (10mM). Para este meio (MAM 10x), o conteúdo de clorofila *a* foi de 21,36 g⁻¹ PS e de carotenoides foi de 6.49 g⁻¹ PS, enquanto no meio MAM 1x foi de 8.55 g⁻¹ PS para a clorofila *a* e de 3.55 g⁻¹ PS para o conteúdo em carotenoides. Em meio MAM 5x, obteve-se 15.19 g⁻¹ PS em clorofila *a* e 5.12 g⁻¹ PS em carotenoides. A diferença nos conteúdos de pigmentos obtidos é estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando comparado com as outras produções nas outras concentrações, mas esta diferença a nível de produção de carotenoides entre os meios MAM 5x e 10x não é significativa perante os custos adicionais do meio MAM 10x para a cultura de *N. oceanica*. Na sequência desta análise, pode dizer-se que houve um ligeiro aumento da produção de carotenoides em meio MAM 5x do que em meio MAM 10x, embora haja uma sobreposição das barras de erros em relação a estes dois valores. Na segunda experiência, com altas intensidades luminosas (110, 600 e 1200 μmol.m².s⁻¹), aos 110 μmol.m².s⁻¹ houve maior produção de

clorofila *a* e carotenoides relativamente a outras intensidades luminosas. Na intensidade luminosa padrão, o conteúdo em clorofila *a* e carotenoides correspondeu a 23,77 g⁻¹ PS e 8,06 g⁻¹PS, respectivamente. A 600 μmol.m². s⁻¹, a clorofila *a* atingiu 7,93 g⁻¹ PS e os carotenoides, 3,74 g⁻¹. Já a 1200 μmol.m². s⁻¹, o valor final total de cada pimento foi de 6,35 e 3,39 g⁻¹ PS, respectivamente. Os valores obtidos na produção de carotenoides e clorofila *a* aos 110 μmol.m². s⁻¹ revelam diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$). Segundo os dados analisados com intensidades luminosas elevadas (600 e 1200 μmol.m². s⁻¹), altas intensidades luminosas não são excelentes fatores abióticos para produção de carotenoides. Para a segunda experiência com baixas intensidades luminosas (50, 110 e 250 μmol.m². s⁻¹) o valor da produção de clorofila *a* e de carotenoides obtidos a 50 e a 110 μmol.m². s⁻¹ não apresentam diferenças estatísticas, mas se compararmos estes valores com os obtidos a 50 μmol.m². s⁻¹ (clorofila *a* 30,9 g⁻¹ e carotenoides 9,82 g⁻¹) e a 110 μmol.m². s⁻¹ (29,9 g⁻¹ PS e 9,49 g⁻¹PS) com os de 250 μmol.m². s⁻¹ (clorofila *a* 16,10 g⁻¹ PS e carotenoides 5,96 g⁻¹PS) verifica-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$).

Na última experiência onde a temperatura (15, 22 e 30°C) foi o fator em teste, o valor mais alto para os pigmentos obtidos foram clorofila *a* (22,09 g⁻¹ PS) e carotenoides (6,99 g⁻¹ PS) aos 30°C e os valores mais baixos foram observados aos 15°C (17,51 g⁻¹ PS em clorofila *a* e 5,53 g⁻¹PS em carotenoides). Nos dados analisados em relação ao ensaio de otimização da temperatura as diferenças estatísticas observadas entre os valores obtidos para clorofila *a* são significativas ($p < 0.05$). Já a mesma conclusão não pode ser feita em relação à produção de carotenoides, uma vez que entre 22 e 30°C a produção de carotenoides não apresenta diferenças estatísticas significativas, mas aos 15°C a produção de carotenoides apresenta uma diferença estatística significativa ($p < 0.05$). Nas temperaturas testadas, 30°C revela ser a temperatura ideal para a produção de pigmentos, especialmente carotenoides (Figura 12).

Tabela 12. Produtividade de compostos clorofila *a* e carotenoides da *N. oceanica* obtidos durante a experiência com os vários fatores abióticos testados

Produtividade de metabolitos alvo	Clorofila <i>a</i> (g.d ⁻¹)	Carotenoides (g.d ⁻¹)
MAM		
1x	1,07±0,47 ^c	0,81 ±0,12 ^a
5x	1,97±0,10 ^b	0,64±0,02 ^b
10x	2,67±0,47 ^a	0,44±0,04 ^c
Intensidades luminosas		
50 μmol.m². s⁻¹	3,86±0,03 ^a	1,23±0,02 ^a
110 μmol.m². s⁻¹	3,74±0,00 ^b	1,19±0,01 ^b
250 μmol.m². s⁻¹	2,01±0,24 ^c	0,75±0,05 ^c
110 μmol.m². s⁻¹	2,97±0,23 ^a	1,01±0,07 ^a
600 μmol.m². s⁻¹	0,99±0,14 ^b	0,47±0,05 ^b
1200 μmol.m². s⁻¹	0,79±0,15 ^c	0,42±0,05 ^c
Temperatura		
15°C	2,19±0,13 ^b	0,69±0,19 ^b
22°C	2,45±0,35 ^a	0,80±0,03 ^a
30°C	2,76±0,36 ^a	0,87±0,10 ^a

Diferentes letras representam diferenças estatísticas (ANOVA, $p < 0,05$).

Segundo os dados da Tabela 12, em relação aos diferentes meios MAM testados, houve maior acumulação de carotenoides a baixa concentração de nutrientes do que em meios ricos em nutrientes (MAM 10x). Esta diferença estatística é significativa ($p \leq 0,05$). A mesma análise não é aplicável em relação aos valores obtidos para a clorofila, para a qual houve maior produção a elevadas concentrações de nutrientes em comparação com os valores verificados a baixas concentrações, apresentando diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$). Ao analisar a produtividade dos pigmentos obtidos após a exposição da *N. oceanica* a altas e baixas intensidades luminosas pode verificar-se que o melhor resultado obtido foi a 50 μmol.m². s⁻¹ tanto para a clorofila *a* e carotenoides, apresentando diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$). Em relação às temperaturas

testadas, o melhor resultado foi alcançado aos 30°C com uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado com os valores obtidos a 15°C (Tabela 12).

4.4 Ensaios de viabilidade celular com inibidores metabólicos

O ensaio de viabilidade celular com inibidores metabólicos tem como objetivo determinar quais os inibidores (cerulenina, defenilamina, nicotina e norflurazon) e a que concentração eles são sub-letais ou letais para a estirpe selvagem de modo a determinar a menor concentração de cada inibidor para selecionar estirpes mutantes com fenótipos melhorados. Esta estratégia baseou-se no fato que estirpes resistentes ao inibidor metabólico deverão apresentar vias biossintéticas mais ativas para um dado metabolito alvo de interesse. Durante a realização desta experiência, todos os inibidores apresentam no canto superior esquerdo o poço de controlo, que permite determinar qual é a concentração letal para a estirpe selvagem de *N. oceanica* (Figura 13).

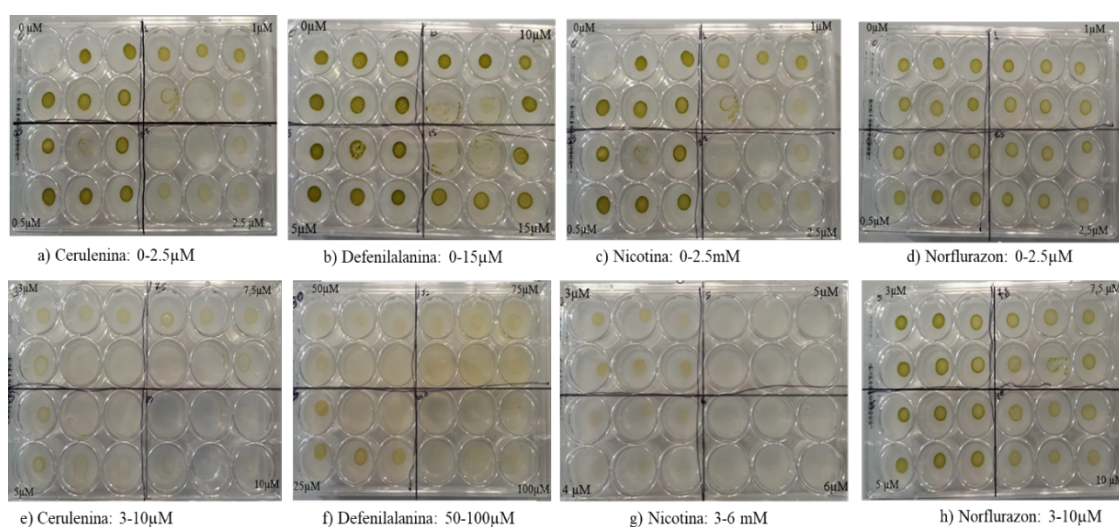


Figura 13. Exemplos de microplacas utilizados durante a experiência de viabilidade celular para determinação da concentração sub-letal ou letal para a estirpe selvagem de *N. oceanica*. Cada microplaca foi subdividida em 4 setores de 6 poços. Zero (0) representa o controlo das amostras selvagens e os restantes sectores de 6 poços estão devidamente identificados com os inibidores (cerulenina, difenilamina, nicotina e norflurazon) e respetivas concentrações testadas.

Perante a Figura 13 (a, b, c, d), é possível observar no canto superior esquerdo o controlo das amostras selvagem, onde se obteve o crescimento considerado como 100%

da estirpe selvagem (0 μM). O resultado apresentado pela cerulenina mostra que este inibidor na concentração compreendida entre 0,5 - 2,5 μM não é letal para a amostra em análise, mas perante determinados poços surgem dúvidas na análise de resultados de poços nestas concentrações no qual não apresentam resultados (Figura 13a). A partir de 2,5 μM a 10 μM a cerulenina apresenta um efeito letal (Figura 13e). O resultado apresentado pela difenilamina (DPA), a concentrações compreendida entre 5-25 μM , não apresenta capacidades letais apesar de alguns poços não apresentarem resultados conclusivos, e isto pode ser relacionado com erros cometidos durante a elaboração do trabalho. Por outro lado, concentrações de DPA acima de 25 μM apresentam um efeito letal sobre *N. oceanica* (Figura 13b, f). Ao analisar o resultado de teste realizado com a nicotina, as concentrações compreendidas entre 0,25 e 3 mM não foram letais para a amostra em teste, mas concentrações compreendidas entre 4-6 mM mostraram-se letais para *N. oceanica*. O norflurazon foi um outro inibidor analisado de entre os quais todas as concentrações (2,5-15 μM) testadas apresentam resultados positivos. pelo que as concentrações testadas foram consideradas não letais para a microalga em análise (Figura 13d, h).

4.4 Mutagénese aleatória

Para otimizar o processo de mutagénese aleatória (MA), três concentrações de EMS foram utilizadas. O controlo (0 mM) que serviu de referência (100% em relação à estirpe selvagem), e concentrações de EMS a 250, 500 e 1000 mM para realização do processo de mutagénese aleatória (Figura 14).

Perante análise dos dados obtidos após a realização do ensaio de mutagénese aleatória com a *N. oceanica*, não foi possível a contagem no controlo (0mM) porque as amostras estavam muito concentradas, impossibilitando o processo (Figura 15). Para facilitar a identificação de unidades de colónias formadas no controlo recorreu-se ao valor da densidade ótica referente a 6.44×10^{-5} células por mL, o qual foi utilizado como controlo de 100% de sobrevivência. Após a recorrência do método de rastreio para contagem das colónias formadas no controlo, o resultado obtido após um longo período de espera, as colónias formadas no controlo estavam totalmente contaminadas, como se pode verificar através da Figura 15b, em que podemos ver que as amostras plaqueadas estavam muito densas e difíceis de analisar.

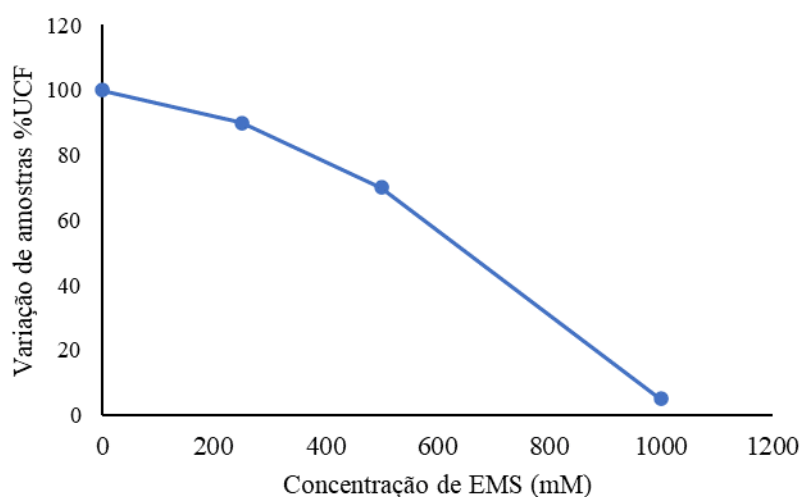


Figura 14. Viabilidade celular esperada após a realização de mutagênese aleatória com etilmetanosulfonato.

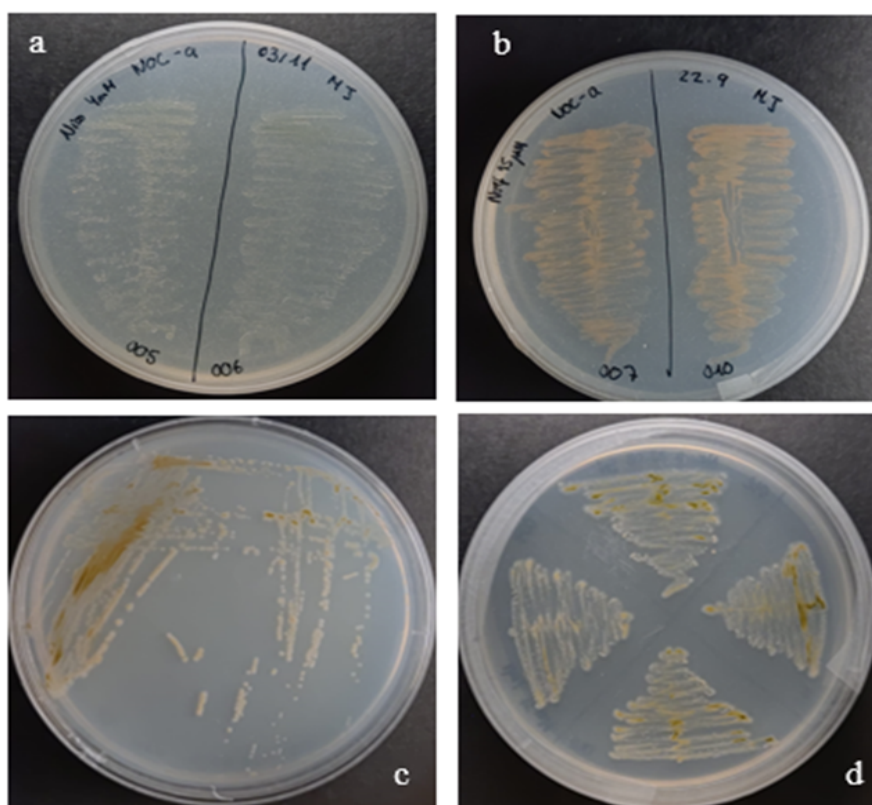


Figura 15. a) Mutantes de *N. oceanica* obtidos após a realização do ensaio da viabilidade metabólica a várias concentrações de inibidores e b) divisão da placa para o crescimento isolado de estirpes de mutantes de *N. oceanica*.

Para concentrações de EMS a 250, 500 e 1000 mM que foram utilizadas para a experiência com a mutagênese, apenas se obteve resultado com a concentração de 250 mM de EMS (Figura 15a). O resultado obtido para a concentração de 250 mM de EMS, apresentou o valor máximo de 3×10^5 unidades de formadoras de colónias (UFC) que equivale a 46,58 % de viabilidade e o número mínimo obtido foi de 2×10^6 UFC que equivale a uma viabilidade de 33,33%. Nas concentrações 500 e 1000 mM EMS, não se observou qualquer crescimento, o que significa que estas concentrações de EMS são elevadas para a realização de mutagênese aleatória para a *N. oceanica*.

5. Discussão

A avaliação do crescimento, teor de lípidos e a composição de ácidos gordos identificados e revelaram alterações no conteúdo de PUFA, especialmente em EPA, que aumentaram consideravelmente quando *N. salina* foi sujeita a uma experiência com elevada concentração de nutrientes, a baixa intensidade luminosa e a temperaturas baixas e ou altas, realçando a capacidade desta espécie na adaptação a várias temperaturas (Hoffmann 2010; Van Wageningen 2012). Durante a realização deste trabalho, pode-se observar que a produtividade de EPA aumentou com o aumento da concentração dos nutrientes, e estes dados estão de acordo com os resultados da experiência de Solovchenko (2015), enquanto trabalhava com a *N. oceanica*, verificando a influência dos nutrientes na produtividade de PUFA. A exposição da *N. oceanica* a elevadas concentrações de nutrientes e a baixas intensidades luminosas levou a um aumento de 1,8 vezes na produtividade de EPA, um valor que se aproxima do reportado para *N. oceanica* (Pal, 2013). Muitos outros autores concluíram que experiências com espécies de *Nannochloropsis* a baixas intensidades luminosas levam ao aumento de EPA (Ma, 2016; Van Wageningen, 2012). Em comparação com os resultados obtidos neste trabalho, foi observado que *Nannochloropsis oceanica* teve maior produção de EPA em condição de $110 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 22°C com 10x meio MAM atingindo uma concentração de 20mM de nitratos e fosfatos, apresentando uma concentração final de EPA de $14,29 \pm 2,99 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Em relação ao desenvolvimento de prioridades em futuras investigações deve-se obter um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo lipídico e o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas genéticas mais estáveis e robustas para *Nannochloropsis* para permitir que este organismo tenha um maior acúmulo

de ácidos gordos de alto valor comercial. Nos resultados obtidos a nível laboratorial, as influências dos fatores abióticos revelaram uma grande interação entre a concentração dos nutrientes, a intensidade luminosa e a temperatura, como relatado na tabela 12, para aumento da produtividade de PUFA, em especial de EPA, e carotenoides, visto que a luz exerce um efeito positivo na produtividade de carotenoides. Porém, quando as células ficam expostas a elevadas intensidades de luz e a alta disponibilidade de nutrientes e elevada temperatura reduz o crescimento, o que sinaliza stress celular, causando mesmo a inibição da biossíntese dos metabolitos desejados, podendo chegar a danificar as células por excesso de luz, falta de nutrientes e choques térmicos (Avigad Vonshak *et al.*, 2020).

5.1 Crescimento de *N. oceanica* em diferentes meios de cultura

As microalgas e os seus metabolitos bioativos são de extrema importância para o ambiente e têm um enorme potencial de aplicação em vários domínios, como sejam a biotecnologia, área da saúde, cosmética e alimentar. Dada a sua importância, vários estudos têm sido realizados no sentido de se perceber melhor os fatores que influenciam o seu crescimento e compostos bioquímicos em ambiente laboratorial (Leal *et al.*, 2022). Muitos meios são utilizados para a cultura das microalgas e no que se refere a cultura de espécies de *Nannochloropsis* os meios utilizados mais utilizados são meio Guillard e nas últimas décadas o meio Nutribloom (Necton SA) (ver seção 4.1.) e têm apresentados excelentes resultados.

Neste trabalho, para a determinação do melhor meio de cultura para a microalga *N. oceanica*, utilizou-se três meios a fim de analisar qual o mais adequado para o cultivo da microalga em estudo a nível laboratorial. A utilização deste três tipo de meio deve-se ao fato de todos estes meios serem ricos em micro- e macronutrientes que favorecem um excelente crescimento da microalga *N. oceanica* neste tipo de ambiente.

De entre os meios testados, verificou-se que o meio MAM favorece o melhor crescimento e a melhor produtividade da *N. oceanica*, apesar de diferença obtida na taxa de crescimento e na produtividade entre o meio MAM e o meio F/2 (Guillard, 1962) não ter sido particularmente significativa. Com base nisto, concluiu-se que, em ambiente laboratorial, o meio MAM (Pereira *et al.*, 2009) é o meio mais apropriado para o cultivo desta microalga, que apresentou uma taxa de crescimento de $0,37 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Este crescimento pode ser justificado com o fato do meio MAM ser o meio que apresenta a melhor composição nutricional para o crescimento desta microalga (*N. oceanica*) nas

condições testadas (ambiente laboratorial). A maioria dos estudos com espécies de *Nannochloropsis* as investigações foram realizadas utilizando meio F/2 como meio de cultivo, e isto pode estar relacionado com o facto de culturas destas espécies serem realizadas em grandes quantidades ou pelo facto de os nutrientes serem adequado para o crescimento favorável da espécie em produção (Vonshak, *et al.*, 2020).

A determinação do melhor meio de cultura foi o primeiro passo fundamental para a execução do trabalho, isto é, para a determinação da relevância dos restantes fatores abióticos. Após a determinação do melhor meio de cultura, procedeu-se à avaliação da influência que os fatores abióticos (nutrientes, luz, temperatura) exercem sobre a taxa de crescimento, a produtividade e a produção de determinados compostos das microalgas, especialmente *N. oceanica*.

5.2 Crescimento de *N. oceanica* sob diferentes fatores abióticos

5.2.1 Nutrientes

Os fatores abióticos e a sua influência no crescimento e na produtividade de compostos bioquímicos das microalgas têm sido objeto de um grande esforço de investigação, com o propósito de se determinar a combinação adequada, que permita obter cada vez melhores desempenhos em termos de crescimento e produtividade da microalga de interesse.

A concentração dos nutrientes afeta tanto a velocidade de crescimento, como a composição química dos microrganismos. Alguns investigadores mostraram a influência que a concentração de azoto exerce na composição e crescimento de algumas espécies de microalgas, em especial *Nannochloropsis*. A escassez deste nutriente num determinado meio de cultura influencia a produtividade de determinados compostos essenciais, como por exemplo o EPA, que é muito importante na saúde (Bongiovani, *et al.*, 2020). A disponibilidade de nutrientes para o crescimento celular deve ser combinada com outros fatores como a luz e a temperatura para verificar qual destes fatores possuem maior influência não só no crescimento, mas também na melhoria da produção de PUFA, especialmente na produtividade de EPA e carotenoides.

Neste trabalho (secção 4.2.2), chegou-se a resultados semelhantes aos reportados por Meng (2015), quando este investigador referiu que o aumento da concentração de nutrientes (azoto) aumenta a produtividade de EPA (Tabela 1). Este resultado foi

analisado ao comparar os dados obtidos neste trabalho (Tabela 12) em relação à produtividade de EPA obtida nos triplicados com concentrações de nutrientes diferentes. Mesmo quando se analisou o crescimento específico de acordo com a disponibilidade dos nutrientes dispensados para cada triplicado da *N. oceanica*, durante o período de experiência escolhido (Tabela 12), a produtividade de EPA aumentou com a concentração de nutrientes, passando de 2,62 mg. L⁻¹. d⁻¹ para 6,37 mg. L⁻¹. d⁻¹ que, por sua vez, aumentou para 9,43 mg. g⁻¹. L⁻¹ após a otimização final (Tabela 11). Observou-se igualmente um aumento na produção de PUFA (Tabela 12).

O crescimento celular apresentado na Figura 7a, mostra que MAM a 5x permite obter um excelente resultado, tanto a nível de produção de biomassa, como no consumo de nitratos. Ao contrário do que seria de esperar, células em MAM 10x não apresentaram uma taxa de crescimento proporcionalmente superior à de 5x. Isto fica a dever-se ao fato de que, para a concentração de 10x, as células apresentarem uma elevada densidade no meio, o que não permitia uma adequada penetração da radiação luminosa, ou seja a intensidade luminosa utilizada para esta concentração de nutriente não foi suficiente para um crescimento proporcional da *N. oceanica*. No entanto, esta concentração é favorável a um crescimento por um período de experiência mais alargado, como se pode constatar pela Figura 7c. Além disso, o consumo de nitratos em MAM 10x é inferior ao de meios a outras concentrações, porque os níveis de nutrientes são elevados. Nestas condições, a luz e o tempo disponibilizados tornam-se fatores limitantes. Em estudos realizados com *N. oculata*, em 2018, por Gharat e seus colaboradores, provaram a importância do consumo de azoto na produtividade de EPA, numa experiência onde conseguiram aumentar a produtividade de EPA 17x (Tabela 1). Com base neste estudo podemos concluir que existe uma relação direta na disponibilidade de nutriente com a produtividade de EPA, tal como alguns investigadores concluíram (Simionato, 2013; Meng, 2015; Vooren, 2012; Hoffmann, 2010) entre outros (Tabela 1).

Investigadores como Solovchenko (2014), durante a realização de um trabalho com a *N. oceanica*, referiu que a uma elevada concentração de nutrientes aumenta a produtividade de carotenoides, em particular a violaxantina, zeaxantina e β -caroteno. Durante a realização deste trabalho, verificou-se que com o aumento da concentração de nutrientes aumentou a produção de carotenoides passando de 3,55 mg. g⁻¹ a 5,12 mg. g⁻¹ e 16,49 mg. g⁻¹ em MAM 1x, 5x e 10x, respetivamente, por outras palavras, entre a concentração MAM 1x e 5x houve um aumento de 1,6 vezes e de 1,4 vezes entre MAM 5x e 10x. Estes resultados estão em conformidade com os reportados por Simionato

(2013), que alcançou também um aumento da produtividade de carotenoides durante os seus estudos.

5.2.2 Intensidade luminosa

Após a determinação do melhor meio e da melhor concentração de nutrientes, procedeu-se ao estudo da influência da intensidade luminosa no crescimento celular da *N. oceanica*. Para este efeito foram realizadas uma série de ensaios em que se manteve a concentração de nutrientes e a temperatura constante e se varia a intensidade da luz incidente da cultura. Foram utilizados valores de 50, 110 (padrão), 250, 600 e 1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Através das análises dos resultados (Figura 11a) é possível verificar que existem quebras no crescimento celular para baixos valores de intensidade luminosa (50 e 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Estas quebras podem ter-se ficado a dever a erros no processo de contagem ou mesmo devido a alguma variação em um dos outros fatores abióticos, como por exemplo, concentração CO_2 , pH, temperatura ou mesmo uma adaptação à nova intensidade luminosa (Costa *et al.*, 2002). Uma outra possível explicação para esta quebra de crescimento, relaciona-se com o método de inoculação das microalgas para estudos de baixa intensidade de iluminação, pois a cultura da microalga *N. oceanica* pode ser influenciada pelo inóculo na obtenção de uma melhor taxa de crescimento celular. Com efeito, conforme descrito na seção 4.2.3, as culturas, para baixas intensidades, foram inoculadas a partir de uma amostra retirada da cultura sujeita ao maior valor de iluminação, o que, possivelmente, implica um período de adaptação da cultura às novas condições de iluminação, facto que se traduziu numa quebra de taxa de crescimento nas primeiras 24 horas da experiência (Figura 11a).

Em 2012 realizou-se um trabalho com objetivo de analisar a capacidade de produtividade de EPA da *Nannochloropsis* a uma intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e verificou-se um aumento de 4x em 4 dias na produtividade de EPA (Mitra, 2015). Neste trabalho, a intensidade luminosa mais baixa testada foi 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e a produtividade alcançada a esta intensidade luminosa foi de 5,16 $\text{mg}.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em 8 dias e a 110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alcançou-se 10.47 $\text{mg}.\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o aumento de EPA com o aumento da intensidade luminosa foi em dobro para o mesmo período, mas a medida que se aumenta a intensidade luminosa a produtividade de EPA diminui, registando um valor de EPA a

250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de 7,27mg. $\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de 9,40 mg. $\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a 1200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ um valor de EPA de 4,82 mg. $\text{g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, estas quebras na produtividade de EPA podem ser comparadas com as pesquisas que os investigadores têm realizados sobre as diferentes intensidades luminosas exercem no crescimento e na produção de PUFA sobre as diferentes espécies de *Nannochloropsis* (Mitra, 2015; Van Wageningen, 2012; Pal, 2013; Ma, 2016) tabela 1. O resultado alcançado neste trabalho mostra que a combinação dos fatores é importante para a produtividade de PUFA e de carotenoides e esta conclusão chegou um grupo de investigadores enquanto quando perceberam que mesmo pertencendo a mesma classe as espécie possuem diferentes capacidades de resposta quando sujeitas à determinadas situações de stress (Vonshak *et al.*, 2020).

5.2.3 Temperatura

Foram realizados ensaios para determinar a dependência da taxa de crescimento com a temperatura (secção 4.2.4). Das três temperaturas testadas, 15 °C, 22°C e 30 °C, a maior taxa de crescimento foi obtida para a temperatura mais elevada (Tabela 9). Este resultado está de acordo com os publicados na literatura (Van Wageningen *et al.*, 2012), no qual realça a capacidade da microalga *N. salina* de suportar temperaturas até 35°C, sendo conhecido que esta microalga se adapta com facilidade a temperaturas elevadas, mantendo, no entanto, os níveis de crescimento inalterados chegando a produzir EPA 33°C 3x mais do que esperado (Tabela 1). Durante a realização deste trabalho com a *N. oceanica* que obtivemos a taxa de crescimento de 1,93 células. mL^{-1} aos 30°C mais elevado por dia tabela 9, mas a produtividade de EPA 15°C foi de 7,07 mg. $\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, aos 22°C foi de 8,50 mg. $\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e de 7,4 mg. $\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ aos 30°C e isto está de acordo com o trabalho realizado por Chua *et. al.*, (2020) que realça o aumento na produtividade de EPA no valor de 1.4 x, este mesmo valor no aumento de EPA foi observado entre os 15°C e 22°C. Este mesmo valor no aumento da produtividade de EPA foi observado nos estudos realizados em 2020 com a *N. Oceanica* (Carneiro, 2020) (Tabela 1).

Em 2018, grupos de investigadores ao realizarem pesquisas com *N. salina* conseguiram um aumento na produtividade de EPA de 1.2x fortalecendo as investigações anteriores sobre a capacidade desta espécie conseguir crescer em ambientes extremos, pois a experiência foi realizada a temperatura compreendidas entre 5°C - 25°C (Gill *et. al.*, 2018; Wang and Jia, 2020) durante o desenvolvimento dos seus estudos concluiu que é possível aumentar até 2x a produtividade dos pigmentos de carotenoides nas

temperaturas compreendidas entre 15°C e 30°C (Tabela 1). Perante a análise dos dados obtidos deste trabalho realizado com a mesma espécie de microalga o aumento na produtividade dos pigmentos de carotenoides obtidos foi de 1.7x. esta diferença pode estar relacionada com o fato de estes investigadores terem utilizados intensidades luminosas diferentes, concentrações de nutrientes diferentes ou mesmo meio de cultura diferente para a realização do trabalho. Em 2014, durante uma pesquisa realizada por Solovchenko (2014) com *N. oceanica*, cujo objetivo foi analisar a habilidade desta microalga na produtividade de pigmentos de carotenoides sob a influencia de elevada concentração de nutrientes, este investigador conseguiu provar que esta microalga quando favorecida com concentrações de nutrientes é capaz de aumentar a produtividade de pigmentos de carotenoides até em 10x (Tabela 1), neste trabalho não se obteve o mesmo resultado, e isto pode dever ao fato da experiencia ter ocorrido em um ambiente laboratorial e a quantidade, de *N. oceanica*, a luz e o período, a temperatura utilizado para a cultura ser inferior ao que o Solovchenko utilizou durante o seu período em que decorreu a sua experiência.

Além da *N. oceanica*, uma nova outra espécie de *Nannochloropsis* foi avaliada a fim de sondar a sua capacidade de produtividade de pigmentos de carotenoides sob as mesmas condições (elevada concentração de nutrientes) e verificou-se que a *N. gaditana* aumentou 1.4x a sua produtividade Simionato (2013). Neste trabalho sob as mesmas condições verificou-se um aumento de 1.4x quando comparamos os dados obtidos entre a concentração 5x e 10x, mas chegou-se a observar um aumento de 3x quando aumentou a concentração de 2x para 10x com a *N. oceanica*, praticamente o mesmo resultado que Wang e Jia (2020) que conseguiu um aumento em 2x (Tabela 1) esta diferença pode dever ao fato da concentração de nutrientes testado durante a nossa experiência ser mais elevada que a concentração utilizada por Wang e Jia (2020) durante a elaboração do trabalho deles ou mesmo o meio de cultura ser diferente.

A influência da luz na produtividade dos carotenoides têm apresentados resultados muito positivos, e com o desenvolvimento de determinados trabalhos por alguns cientistas, estes chegaram a ver que é possível produzir determinados tipos de carotenoides a intensidade luminosas elevadas $500 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $1600 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ entre 1.6x até 4x (Wang e Jia, 2020; Camacho-Rodriguez, 2015) (Tabela 1). Ao analisar os resultados dos dados obtidos durante a realização deste trabalho, pode-se verificar que houve menor produção de carotenoides a elevadas intensidades luminosas que nas baixas intensidades luminosas e isto pode estar relacionada com outros fatores como por

exemplo a temperatura que ajuda em muito a produção de carotenoides (Boussiba *et al.*, 1987; Fakhry *et al.*, 2015).

5.3 Efeitos dos fatores abióticos na produção de compostos de valor acrescentado

5.3.1 Perfil e produtividade dos ácidos gordos

A produtividade dos ácidos gordos, é umas capacidades proeminentes das plantas, animais como das microalgas. O interesse dos investigadores na pesquisa da microalga com capacidades de produzir EPA eicosapentanoico (20:5n-3) em grandes quantidades, um dos ácidos gordos do grupo de ω 3-PUFAs em particular, é devido a sua aplicação saúde, cosmética, alimentação, vem aumentando cada vez mais a sua relevância, pois o corpo em se não o produz, e são muito muito influentes no tratamento de determinados tipos de doenças como por exemplo diabetes, doenças degenerativas, trombose etc (Camacho-Rodríguez, 2015; Hu & Gao, 2003; Wagenen *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2012). O EPA não é o único ω 3 produzido dentro dos PUFAs, também temos o ácido docosahexaenoico (DHA ou 20:5n-3), e ambos tem a mesma função na saúde (Silva *et al.*, 2012). Neste trabalho com a *N. oceanica*, o objetivo foi melhorar a produtividade dos ácidos gordos, em especial os EPA, enfatizando a influência dos fatores abióticos na cultura de microalga de interesse.

Durante o ensaio com as várias concentrações de nutrientes, 2 x, 5x e 10x, foram observadas alterações na produção dos vários grupos de ácidos gordos, entre o dia zero e o último dia de ensaio. Para a concentração 2x, temos mais produção de SAF e de MUFA, tanto no dia zero e no oitavo dia. Isto mostra que a diminuição na quantidade de nutrientes não afeta a produção destes dois grupos de ácidos gordos.

Relativamente à produção de PUFA, verifica-se que esta apresenta um baixo valor a 2x e um elevado valor para as concentrações 5x e 10x, sendo que, entre estas duas, existe uma grande diferença na produção de PUFA especialmente no último dia. Este aumento na produção de PUFA, a estas concentrações, pode estar relacionada com o fato de a disponibilidade de nutrientes ser superior no volume final da cultura, tornando, desta forma, a cultura muito densa e impedindo a penetração da luz, levando conseqüentemente a um aumento de produção de EPA, e isto está associado ao fato de não haver necessidade

de produção de TAG, o resultado deste trabalho está de acordo com o trabalho realizado por (Meng, 2015; Simionato, 2003; Solovchenko, 2014). Em 2013, Ferreira, *et al.*, (2013) realizou trabalhos com microalgas com objetivo de otimizar a produção de ácidos gordos essenciais, aonde se mostra que a combinação de vários fatores abióticos (luz, CO₂, nutrientes) tem influência na produção de PUFA, especialmente EPA. Apesar de haver uma grande produtividade de EPA a 10x, esta poderia ter sido maior se o tempo de experiência para esta concentração fosse mais longo. Para a concentração de 5x, a produção PUFA foi de 4,92 mg. L⁻¹ e de 10x foi 5,22 mg. L⁻¹ mais elevada devido a disponibilidade de nutrientes ser superior à de 2x que foi de 2,00 mg. L⁻¹ favorecendo o crescimento da *N. oceanica* e a produção de PUFA, uma diferença significativa ($p < 0,05$) logo a produção de um dos ácidos mais importantes gerados dentro deste grupo em especial de EPA, foi excelente nas concentrações de nutrientes mais elevadas, isto mesmo podemos constatar através da Figura 6c. Este resultado está de acordo com o trabalho realizado por (Ferreira, *et al.*, 2012) enquanto investigava a produção de EPA em culturas autotróficas.

A produção de PUFAs a elevadas intensidades diminuíram, e isto pode estar relacionado com stress causado pela elevada radiação luminosa levando as culturas expostas a 600 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ 2,62 mg. L⁻¹ e a 1200 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ 2,20 mg.L⁻¹ a produzir ácidos gordos insaturados sob condições de stress utilizando estes ácidos para se protegerem de um possível processo de fotoinibição que pode causar danos celulares. Para experiências com baixas intensidades luminosas pode-se analisar um processo inverso, um elevado aumento da produtividade do EPA, e a produção de PUFA aumentou 50 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ foi de 5,34 mg. L⁻¹ e a 250 $\mu\text{mol.m}^2. \text{s}^{-1}$ foi de 5,69 mg. L⁻¹ e mesmos resultados obtiverem alguns investigadores (Ma, 2016; Pal, 2011). Esta inversão no processo de produtividade do EPA devido à irradiância luminosa como já foi mencionado os ácidos gordos insaturados não foram produzidos pode estar relacionada ao fato de nesta segunda parte de experiência com a luz a microalga em estudo não nenhum gasto de energia para a produção de moléculas fotoprotetoras.

Para as temperaturas testadas a produção de PUFA na temperatura 22°C padrão foi mais elevada 5,84 mg. L⁻¹, aos 15°C foi de 5,03 mg. L⁻¹ e aos 30°C 4,28 mg. L⁻¹. Para as temperaturas extremas (baixa e altas) utilizadas neste trabalho a produção de PUFA a baixa temperatura foi mais elevada e esta diferença é significativa ($p < 0,05$), este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Van Wagenen (2012) quando refere que a

elevadas temperaturas a *N. Salina* produz mais ácidos palmitoléico para se proteger de possíveis danos estruturais, diminuindo desta forma a produção de EPA e de PUFA.

5.3.2 Pigmentos

Determinados trabalhos realçam produção de carotenoide como uma incógnita, pelo fato de não estar bem explícito qual o fator que exerce maior influência na produtividade deste pigmento. Alguns investigadores, através de estudos realizados com determinadas espécies de *Nannochloropsis gaditana* e *N. oceanica* mostraram que o aumento da concentração nutrientes, aumenta também a produtividade a nível de carotenoides (Simionato, 2013; Solovchenko, 2014). Segundo os resultados obtidos durante as experiências realizadas com as várias concentrações de nutrientes, seção 4.14 pode-se constatar que o aumento da concentração de nutrientes exerce uma grande influência na produtividade dos carotenoides e clorofilas, especificamente carotenoides.

A temperatura exerce um papel importante no acúmulo de carotenoide. Estudos mostram uma combinação entre a luz e a temperatura que melhoram a produtividade dos carotenoides, mas este processo ainda não é bem conhecido, uma vez que alta temperatura induz o acúmulo de luteína, mas não tem nenhum efeito sobre o β -caroteno (Wagenen *et al.*; 2012).

É importante salientar que algumas espécies de algas verdes unicelulares acumulam grandes quantidades de carotenoides secundários (SCar), em condições pouco favoráveis, que estão envolvidos na fotossíntese e localizados fora dos tilacoides. Estas algas são cultivadas em escala industrial para produção de carotenoides com valor farmacológico. As especificidades da biossíntese de 2-Cmetil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (CEC), a sua indução e regulação sob a ação de vários fatores de stress, bem como a sua localização na célula e na fisiologia e os efeitos biológicos do acúmulo de grandes quantidades desses pigmentos são considerados (Sukenik, 1993). O autor deu uma atenção particular às relações entre a biossíntese de SCar e a biossíntese de lípidos neutros induzida por stress, bem como ao papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) como indutores e reguladores universais da biossíntese de SCar.

Durante este trabalho, a luz (alta e ou baixa) intensidade revela ser fator excelente para a produção de pigmentos de carotenoides e de clorofila *a*, houve uma ligeira diminuição na produção destes pigmentos nas altas intensidades 600 e 1200 $\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e a *N. oceanica* mostrou bem-adaptada a uma cultura laboratorial a intensidades

luminosas mais baixas do que a altas intensidades luminosas no sentido de produtividade destes pigmentos, apesar de ainda apresentar um bom resultado a altas intensidades luminosas, mas as diferenças nos valores obtidos a nível dos carotenoides entre baixas e altas intensidades luminosas são estatisticamente significativas. Estes dados alcançados foram semelhantes aos dados dos outros investigadores (Avigad Vonshak *et.al.*, 2020). Este processo na diminuição de produção justifica-se com o fato do excesso da luz estar a ser utilizado no ciclo de Calvin dissipando este excesso da radiação luminosa, com o objetivo de impedir a fotoinibição.

5.4 Discussão geral

Nos resultados obtidos a nível laboratorial, a influência dos fatores abióticos revelam uma grande interação entre a concentração dos nutrientes, a intensidade luminosa e a temperatura, para fornecer a melhor produtividade de PUFA, de EPA e de carotenoides. Estudos em condições parecidas (Solovchenko, 2014) (Tabela 1), revelam um aumento na produtividade de carotenoide, mas também os nutrientes podem inibir o crescimento das microalgas seja qual for a espécie quando a concentração não for adequada (Carvalho, *et al.*, 2005). É de salientar que as microalgas em especial a *N. oceanica* com alta eficiência fotossintética, e devido a estas capacidade representa um tipo de microalga com grande capacidade de converter dióxido de carbono em líquido de armazenamento, principalmente na forma de triacilglicerol (TAG) e ao ácido gordo polinsaturado de cadeia longa de ácidos ω -3 eicosapentanoico (EPA). A estes aspetos, o estudo de Ma, *et al.*, (2016) teve como objetivo fornecer uma visão geral da biologia e da biotecnologia potencial de *Nannochloropsis*, com ênfase na produção de ácidos gordos. Os autores concluíram que a produção de determinadas espécies de *Nannochloropsis* são rentáveis no que diz respeito a produção de EPA, em associação com as aplicações benéficas para o meio ambiente (tratamento de águas residuais e também para o meio ambiente como os de gases de combustão), a *Nannochloropsis* é uma espécie que exige um estudo colaborativo entre biólogos e engenheiro.

Dependendo da intensidade em estudo a luz pode ser um fator estressante ou limitante, pois quando a intensidade testada for muito elevada há uma probabilidade de fotoinibição como ocorreu durante a experiência com altas intensidades luminosas com os triplicados testados à $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Neste estudo, realizou-se experiências com ambas as intensidades luminosas (baixas e altas) e a taxa de crescimento. Pode-se dizer

que ambas as intensidades luminosas (altas e ou baixas) escolhidas para estas experiências, são intensidades luminosas no qual a intensidade luminosa definida como padrão revelou ser o ideal para o cultivo da *N. oceanica* $110 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, onde a produtividade e a taxa de crescimento celular foram ótimas (Tabela 13), a luz e tem um poder extraordinário que no diz respeito a produção de clorofilas e carotenoides que são essências para a defesa do stress -oxidativo (Li *et al.*, 2009). O resultado apresentado neste estudo a intensidade $1200 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mostra um declínio em teor de clorofila (mudança na cor verde para um tom amarelado) e segundo o investigador Slovochenko *et al.*, (2014) a relação entre clorofila e carotenoide é linear e de forma sincronizado. Na experiência com baixa intensidade luminosa observou-se ainda um aumento no consumo de nitrato que pode estar relacionado com a lise celular, ou mesmo devido ao uso do HCl utilizado durante o processo de medição de nitrato (Armstrong, 1963). para altas intensidades luminosas apesar de crescimento celular se verificar aos $600 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a melhor produtividade de PUFA e de EPA verifica-se a $110 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ tal como indica a tabela 1 onde mostra aumento na produtividade de carotenoides a altas intensidade luminosas e de EPA e baixas intensidades luminosa.

A melhor temperatura para o crescimento laboratorial para a *N. oceanica* foi determinada segundo a experiência realizada como 30°C . A diferença no crescimento da *N. oceanica* aos 30°C é estatisticamente significativa ($p \geq 0.1$), mas se o tempo da experiência fosse mais longa os 15°C teria melhor resultado que aos 22°C .

Entretanto a diferença no crescimento das células nas outras temperaturas testadas são irrelevantes. De salientar que, o avanço de microalgas para uso como matéria-prima na indústria farmacêutica, bio cosmética, aquacultura, depende da bioprospecção de nova estirpe e, da aplicação das técnicas clássicas de melhoria das estirpes para melhorar as características desejáveis. A este aspeto, o estudo de Beacham (2015) teve como objetivo demonstrar que esta abordagem, através do uso de novas linhagens de microalgas identificadas como *N. oceanica* e *N. oculata*, e outras espécies de *Nannochloropsis* podem melhorar a biomassa e os rendimentos de lipídicos. Neste contexto, a irradiação UV foi utilizada para gerar mutações aleatórias e as populações resultantes foram analisadas através da citometria de fluxo para quantificar a fluorescência lipídica enquanto enriquecia para variantes com alto teor de lipídicos usando classificação de células ativadas por fluorescência.

A triagem secundária foi realizada por meio de coloração de fluorescência *in situ* para identificar os únicos mutantes com maior produção de lipídios de cada estirpe. Esta

abordagem produziu um mutante (Tabela 2). O mutante de *N. oceanica* WS-1 resultante demonstrou apenas um aumento no crescimento, resultando em um aumento de produtividade de Violaxantina (Park *et al.*, 2021) no valor de 0.21 mg. L⁻¹. d⁻¹ no conteúdo de pigmentos de carotenoides.

As microalgas têm o potencial como matéria-prima química numa variedade de aplicações industriais, a *Nannochloropsis salina* foi sujeita a mutagenese EMS. A avaliação do crescimento, teor de lípidos e a composição de ácidos gordos mutantes identificados em estirpes demonstraram um conjunto de características alteradas, incluindo as alterações no conteúdo de PUFA.

Em relação à pesquisa e desenvolvimento como prioridades devem ser dadas ao melhor entendimento do mecanismo molecular para o metabolismo lipídico e o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas genéticas mais estáveis e robustas para *Nannochloropsis* para permitir que este organismo seja uma verdadeira fábrica de células para a produção de ácidos gordos.

O consumo de nitrato a 30°C é maior, podendo ser considerada como dobro se compararmos com o consumo do nitrato a temperatura ambiente. A 15° C e a 30°C a diferença no consumo de nitrato pode ser considerada de 15%, e a diferença entre os 15° C e 22° C a diferença pode ser considerada 55%.

A *N. oceanica* no que diz respeito ao valor do peso seco revelou maior taxa de crescimento aos 30°C com um nível de significância superior a ($p \geq 0.1$). nas outras temperaturas a diferença no crescimento da biomassa não é significativa.

A temperatura de 30°C revela-se como uma temperatura ideal para a cultura da microalga.

A variação do pH durante a experiência com a temperatura foi pouco significativa. A diferença estatística é irrelevante para as três temperaturas testadas (Figura 27). A experiência se iniciou com um pH aproximadamente 7, e ao analisar o pH final de todas as temperaturas testadas o valor está compreendido entre 9 ± 0.05 .

6. Conclusões

Tendo em consideração as análises realizadas na espécie *N. oceanica*, com o objetivo de melhorar produtividade de PUFA's e de carotenoides, conclui-se que é necessária uma combinação entre os fatores abióticos uma vez que, cada um destes fatores influenciam e exercem um elevado poder no crescimento a nível laboratorial.

Conclui-se que para uma melhor taxa de crescimento de *N. oceanica*, são necessários 5x de nutrientes, com uma intensidade luminosa de $110 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a uma temperatura de 30°C . A produtividade de PUFA's, em especial EPA, obteve melhores resultados com 10x de nutrientes, a $110 \mu\text{mol}$, a 22°C

É de salientar que a concentração de nutrientes a 10x é mais adequada para experiências de longa duração ou aumento da intensidade luminosa de modo a impedir a saturação da cultura de microalgas e assim a dissipação da luz o que acelera o crescimento celular.

Para melhor a obtenção de pigmentos, como os carotenoides, o melhor resultado obteve-se concentração de nutrientes de 10x, $50 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e 30°C . Em termos de produção de carotenoides muito ainda há que explorar para melhor compreender a como funciona a produtividade dos pigmentos, pois consoante as espécies de microalgas, as combinações dos fatores os pigmentos produzidos variam.

No que relaciona a MA, são ainda necessários alguns estudos com a espécie *N. oceanica*. Com base nos resultados pode-se concluir que para a continuidade deste trabalho, as concentrações utilizadas no processo de bloqueios das vias metabólicas, poderão vir a ser mais baixas, para obtenção de resultados positivos. As concentrações acima dos $250 \mu\text{M}$ são letais para o desenvolvimento de mutantes de *N. oceanica*, e os resultados obtidos aos 250 mM estão contaminadas é preciso mais tempos para a realização do processo de descontaminação da amostra antes da realização da MA.

Bibliografia

- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, 11(1), 1-10. Doi: 10.1127/pip/0065.
- Al-Hoqani, U., Young, R., & Purton, S. (2016). The biotechnological potential of *Nannochloropsis*. *Perspect. Phycol*, 4, 1-15.
- Alonso, D. L., Segura del Castillo, C. I., Grima, E. M., & Cohen, Z. (1996). First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricoratum* (bacillariophyceae) by induced mutagenesis 1. *Journal of phycology*, 32(2), 339-345.
- Alves, S. P., Mendonça, S. H., Silva, J. L., & Bessa, R. J. (2018). *Nannochloropsis oceanica*, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants. *Scientific reports*, 8(1), 10269.
- Armstrong, F. A. J. (1963). Determination of Nitrate in Water Ultraviolet Spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 35(9), 1292-1294.
- Ashour, M., Elshobary, M. E., El-Shenody, R., Kamil, A. W., & Abomohra, A. E. F. (2019). Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and Bioenergy*, 120, 439-447.
- Baker, R., & Günther, C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 484-488.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2022). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Beacham, T. A., Bradley, C., White, D. A., Bond, P., & Ali, S. T. (2014). Lipid productivity and cell wall ultrastructure of six strains of *Nannochloropsis*: Implications for biofuel production and downstream processing. *Algal Research*, 6, 64-69.
- Beacham, T. A., Macia, V. M., Rooks, P., White, D. A., & Ali, S. T. (2015). Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis. *Biotechnology reports*, 7, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.05.007>.
- Blanken T (2013) Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res.* 2 (4), 333–340.
- Bombo, G., Cristofoli, N. L., Santos, T. F., Schüller, L., Maia, I. B., Pereira, H., Barreira, L., & Varela, J. (2023). *Dunaliella viridis* TAV01: A Halotolerant, Protein-Rich Microalga from the Algarve Coast. *Applied Sciences*, 13(4), 2146. <https://doi.org/10.3390/app13042146>.
- Bongiovani, N., Popovich, C. A., Martínez, A. M., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2020). Biorefinery approach from *Nannochloropsis oceanica* CCALA 978: neutral lipid and carotenoid co-production under nitrate or phosphate deprivation. *BioEnergy research*, 13, 518-529. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10045-2>.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., & Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, 12(1), 37-47.

- Brock T. (2009). Brock's Biology of Microorganisms, 12th ed.; Pearson Benjamin Cummings Press: San Francisco, CA, USA.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360-369.
- Camacho-Rodríguez, J., Céron-García, C.M., Fernández-Sevilla, J.M.; Molina-Grima, E., (2015). The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. *Algal Research* *11*. 63-73.
- Carneiro, M.; Cicchi, B.; Maia, I.B.; Pereira, H.; Zittelli, G.C.; Varela, J.; Malcata, F.X. & Torzillo, G. (2020). Effect of temperature on growth, photosynthesis, and biochemical composition of *Nannochloropsis oceanica*, grown outdoors in tubular photobioreactors. *Algal Res.*, *49*, 101923.
- Carvalho, A. P., & Malcata, F. X. (2005). Optimization of ω -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO₂ and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine biotechnology*, *7*, 381-388.
- Cecchin, M., Berteotti, S., Paltrinieri, S., Vigliante, I., Iadarola, B., Giovannone, B., Maffei, M.E., Delledonne, M., & Ballottari, M. (2020). Improved lipid productivity in *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen-replete conditions by selection of pale green mutants. *Biotechnology for biofuels*, *13*(1), 1-14.
- Challabathula, D., Zhang, Q., & Bartels, D. (2018). Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. *Journal of plant physiology*, *227*, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.002>.
- Chaturvedi, R., Uppalapati, S. R., Alamsjah, M. A., & Fujita, Y. (2004). Isolation of quizalofop-resistant mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) with high eicosapentaenoic acid following N-methyl-N-nitrosourea-induced random mutagenesis. *Journal of applied phycology*, *16*(2), 135-144.
- Chaturvedi, R., & Fujita, Y. (2006). Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. *Phycological Research*, *54*(3), 208-219.
- Chaturvedi, R., Uppalapati, S. R., Alamsjah, M. A., & Fujita, Y. (2004). Isolation of quizalofop-resistant mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) with high eicosapentaenoic acid following N-methyl-N-nitrosourea-induced random mutagenesis. *Journal of applied phycology*, *16*(2), 135-144.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* *25*(3), 294-306
- Christaki R., Bonos E., Florou-Paneri P., (2015)., Innovative microalgae pigments as functional ingredients in nutrition. In: *Handbook of Marine Microalgae*. (pp 233-243). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00014-5>.
- Chu, F. F., Chu, P. N., Cai, P. J., Li, W. W., Lam, P. K., & Zeng, R. J. (2013). Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Bioresource technology*, *134*, 341-346.
- Chua, E. T., Dal'Molin, C., Thomas-Hall, S., Netzel, M. E., Netzel, G., & Schenk, P. M. (2020). Cold and dark treatments induce omega-3 fatty acid and carotenoid production in *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Research*, *51*, 102059.
- Cordero, B. F., Couso, I., León, R., Rodríguez, H. & Vargas, M. A. (2011). Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella*

- zofingiensis*. Appl. Biotechnol. Microbiol. 91, 341–351. doi: 10.1007/s00253-011-3262.
- Daliry, S.; Hallaji Sani, A., Roshandeh, J. M., Nouri., & Golzary, A. (2017). Investigation of Optimal condition for *Chorella vulgaris* microalgae growth Global J. Environ. Sci. Manage 3(2), 217-230. <https://doi.org/10.22.034/gjesm.2017.03.02.010>.
- Del Campo, J. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. A., Rivas, J. & Guerrero, M. G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). App. Biotechnol. Microbiol. 64, 848–854. doi: 10.1007/s00253-003-1510-5.
- Derner, R., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S., & Fett, R., (2006). Microalgas, produtos e aplicações. Ciências Rural, 36(6), 1959-1967.
- Dhanya B., Sowmya G., Jeslin J., Chamunsdeeswari M., & Verma ML (2020) Algal Biotechnology: A Sustainable Route For Omega-3 Fatty Acid Production. in: Biotechnology for Food, Health and High value products. pp 125-145. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_4.
- Doan, T. T. Y., & Obbard, J. P. (2012). Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. Algal Research, 1(1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.001>.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. Trends in Food Science & Technology, 16(9), 389-406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>.
- Eliáš, M.; Amaral, R., Fawley, K.P.; Fawley, M.W., Němcová, Y., Neustupa, J., Přibyl, P., J.M. Archibald, A.G.B. Simpson, C.H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D.J. Chapman, & J.O. Corliss, (2017). Eustigmatophyceae. In Handbook of the Protists, (Cham: Springer International Publishing), pp. 1-39.
- Fábregas J, Maseda A, Domínguez A, Otero A, (2004) The cell composition of *Nannochloropsis* sp. Changes under different irradiances in semicontinuous culture, World J. Microbiol. Biotechnol. 20, 31–35.
- Fakhry, E. M., & El Maghraby, D. M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. Botanical studies, 56(1), 1-8.
- Fawley, M.W., Jameson, I., & Fawley, K.P. (2015). The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. Phycologia 54 (5), 545-552.
- Ferreira P S; Soares-Souza L & Costa V A J (2013). Microalgae: an alternative source to obtain essential fatty acids. Revista de Ciência Agrária, 36 (3): 275-287
- Fernandes, T., & Cordeiro, N. (2021). Microalgae as sustainable biofactories to produce high-value lipids: Biodiversity, exploitation, and biotechnological applications. Marine Drugs, 19 (10), 573. <http://doi.org/10.3390/md19100573>.
- Fidalgo, J.; Cid, A., Torres, E., Sukenik, A. & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture, 166(1-2), 105-116.
- Fulbright, S.P., Chisholm, S., & Reardon, K.F. (2016). Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*. Algal Research 20, 70-76.

- Fu, W., Nelson, D. R., Mystikou, A., Daakour, S., & Salehi-Ashtiani, K. (2019). Advances in microalgal research and engineering development. *Current opinion in biotechnology*, 59, 157-164.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press; USA.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9- cis beta caroteno and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 115 (1), 81-90. Doi:10.1016/j.jbiotec2004.07.010
- Gill, S. S., Willette, S., Dungan, B., Jarvis, J. M., Schaub, T., VanLeeuwen, D. M., ... & Holguin, F. O. (2018). Suboptimal temperature acclimation affects Kennedy pathway gene expression, lipidome and metabolite profile of *Nannochloropsis salina* during PUFA enriched TAG synthesis. *Marine drugs*, 16(11), 425.
- Guillard RRL, Ryther JH (1962). Studies of marine planktonic diatoms - *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239
- Guarnieri, M.T., Nag, A., Smolinski, S.L., Darzins, A. Seibert, M., & Pienkos, P.T. (2011). Examination of Triacylglycerol Biosynthetic pathways via de Novo Transcriptomic and Proteomic Analyses in unsequenced Microalga. *Plos ONE*. 6 (10), e25851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025851>
- Gnanavel, V., Roopan, S. M., & Rajeshkumar, S. (2019). Aquaculture: An overview of chemical ecology of seaweeds (food species) in natural products. *Aquaculture*, 507, 1-6.
- Grobbelaar, U., Algal nutrition: Mineral nutrition. In: Richmond, A. (2004). (editor). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology*. New York: Blackwell Publishing Ltd, P. 97-115.
- Hoffmann, M, Marxen, K, Schulz, R & Vanselow, H, K, (2010) TFA and EPA Productivities of *Nannochloropsis salina* Influenced by Temperature and Nitrate Stimuli in Turbidostatic Controlled Experiments. *Mar Drugs*, 8 (9), 2526-2545. doi: 10.3390/md8092526.
- Hulatt, C.J., Wijffels, R.H., Bolla, S., & Kiron, V. (2017). Production of fatty acids and protein by *Nannochloropsis* in flat plate photobioreactors. *PLOS ONE* 12 (1): e0170440, 1-17.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirard, M., Posewitz M. & Darzins, Al., (2008). Microalgal Triacylglycerol as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant Journal*. 54 (4). 621- 639.
- Joanne M. Willye; Linda M. Sherwood; Christopher J. Woolverton. Prescott; Harley & Klein's (2008). *Microbiology*, volume 356. McGraw-Hill, 7th edition.
- Jones, S. B., Zhu, Y., Anderson, D. B., Hallen, R. T., Elliott, D. C., Schmidt, A. J., Kinchin, C. (2014). Process design and economics for the conversion of algal biomass to hydrocarbons: whole algae hydrothermal liquefaction and upgrading (No. PNNL-23227). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).
- Kholany M; Coutinho P A J & Ventura M P S; (2022). Carotenoids Production from Microalgae: The Portuguese Scenario. *Molecules* 27, 2540. <http://doi.org/10.33.90/molecules27082540>
- Khotimchenko, S. V., & Yakovleva, I. M. (2005). Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66 (1), 73–79. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.10.024

- Leal, J. F., Bombo, G., Pereira, H., Vicente, B., Amorim, A., & Cristiano, M. L. (2022). Toxin Profile of Two *Gymnodinium Catenatum* Strains from Iberian Coastal Waters. *Toxins*, 14(11), 762.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., & Xu, J. (2014). Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *The Plant Cell*, 26(4), 1645-1665.
- Li, Z.-R.; Wakao, S.; Fischer, B.B. & Niyogi, K.K. (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 239–260.
- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 125398.
- Lourenco, S. O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K. P., & Aida, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41(2), 158-168.
- Lubián, M.L., Montero O., Moreno-Garrido, I., Huertas, E., Sobrino, C., del-González-V. M., & Parés, G., Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN, CSIC), Polígono Río S. Pedro s/n, 11510-Puerto Real, Cádiz, Spain.
- Luche, D.E.D., Gonçalves, B.C.M., Silva., (2019). Review of cultivation of microalgae: a sustainable alternative to treat effluents and reduce air pollution. *Biociencias Review*, vol.25, N. 1, p. 31-41.
- Ma, X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., & Chen, F., (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Marine Dugs*. 14 (4), 61
- Malerba, M. E., Connolly, S. R., & Heimann, K. (2016). Standard flow cytometry as a rapid and non-destructive proxy for cell nitrogen quota. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1085-1095.
- Martins, D.A.; Custodio, L.; Barreiro, L.; Pereira, H.; Ben-Hamadou, R.; Varela, J. & Abu-Salah, K.M. (2013) Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Mar. Drugs*, 11 (7), 2259–2281.
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2004). Photosynthesis in microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, A. Richmond, ed. (Blackwell Science Ltd), pp. 365-379. Vol. 577.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.doi: 10.3389/fmcb.00546.
- M. Havaux, (1996). Short-term responses of Photosystem I to heat stress. Induction of a PS II- independent electron transport through PS I fed by stromal components. *Photosynthesis Research*, 47(1):85–97.
- McBride, R.C., Lopez, S., Meenach, C., Burnett, M., Lee, P.A., Nohilly, F., and Behnke, C. (2014). Contamination management in low-cost open algae ponds for biofuels production. *Industrial Biotechnology* 10 (3), 221-227l.
- Meng, Y.-Y., Jiang, J.-P., Wang, H.-T., Cao, X.-P., Xue, S., Yang, Q., & Wang, W.-L. (2015). The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. *Bioresource Technology*, 179, 483–489.
- Mercer, P & Armenta, R.E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European journal of lipid science and technology*, 113(5), 539-547.

- Mitra, M., Patidar, S. K., George, B., Shah, F., & Mishra, S. (2015). A euryhaline *Nannochloropsis gaditana* with potential for nutraceutical (EPA) and biodiesel production. *Algal research*, 8, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.algal.02.006>.
- Müller P, Li P-X & Niyogi k. k (2001). Non photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiol.* 125 (4). 1558-1566
- Murakami, R.& Hashimoto, H. (2009). Unusual nuclear division in *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae, Heterokonta) which may ensure faithful transmission of secondary plastids. *Protist* 160 (1), 41-49.
- Novoveská, L., Ross, E. M., Stanley S. M., Pradelles, R., Wasiolek, V. & Sassi F-J., (2019). Microalgal Carotenoids: A review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Mar. Drugs* 2019, 17 (11), 640
- Norsker, H.N., Michiels, M, Slegers, P. M., Swinkels M.ALG., Barbosa M.J. & Wijffels R. H. (2019). Productivity of *Nannochloropsis oceanica* in an industrial closely spaced flat panel photobioreactor. *Algal Research* 43, 101632.
- Nwoba, E.G., Ogbonna, C.N., Ishika, T., Vadiveloo, A., (2020). Microalgal pigments: A Source of Natural Food Colors. In: *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. 81-123.
- Olaizola, M., (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test Tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20 (4-6) 459-466.
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. (2014). Combined effects of nitrogen concentration and seasonal changes on the production of lipids in *Nannochloropsis oculata*. *Marine drugs*, 12(4), 1891–1910.
- Park, S. B., Yun, J. H., Ryu, A. J., Yun, J., Kim, J. W., Lee, S., ... & Kim, H. S. (2021). Development of a novel *Nannochloropsis* strain with enhanced violaxanthin yield for large-scale production. *Microbial cell factories*, 20, 1-11. <http://doi.org/10.1186/s12934-021-015350>.
- Pal, D; Goldberg-khozin, I & Cohen, Z, (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1429-1441.
- Pereira, H. G. C. (2009). Desenvolvimento e otimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala (Doctoral dissertation).
- Pereira, H., Gangadhar, K. N., Schulze, P. S., Santos, T., De Sousa, C. B., Schueler, L. M., ... & Barreira, L. (2016). Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production. *Scientific reports*, 6(1), 35663.
- Pragya, N., Pandey, KK& Shoo, P (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 159-171.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M.A., Thajuddin, N. (2012). Influence of deprivations on Lipid accumulation in dominant indigenous microalga *Chorella* sp., Bum 11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*. 37, 60-67.
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., Boore, J.L. & Posewitz, M.C., (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. - *Nat commum* 3 (1),686.
- Richmond, A. (2003). Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 125-177.Reiton; K. I., Rainuzzo,

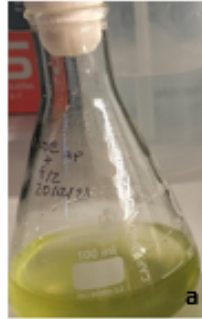
- J.R., Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and content of marine Microalgae. *Journal of Phycology*. 30 (6), 972-979.
- Rodolfi, L.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. (. 2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng*, 102 (1), 100–112.
- Rodríguez-Camacho, J., García-Cerón, M.C; Sevilla-Fernández, J.M.; & Grima-Molina, E. (2015) The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. *Algal Research* 11, 63-73.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., & Kirk, P.M. (2015). A higher-level classification of all living organisms. *PLOS ONE* 10 (4): e0119248, 1-60.
- Saini, R.K., & Keum Y.S., (2018)., Omega-3 and Omega-6 polyunsaturated fatty acid: Dietary sources, metabolism, and significance - a review. *Life Sci.*, 203., 255267.
- Schüler, L. M., Schulze, P. S., Pereira, H., Barreira, L., León, R., & Varela, J. (2017). Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae. *Algal research*, 25, 263-273.
- Schüler, L., Greque de Morais, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., & Varela, J. (2020). Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants with Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (May), 469.
- Schüler, L. M., Bombo, G., Duarte, P., Santos, T. F., Maia, I. B., Pinheiro, F., Marques, J., Jacinto, R., Schulze, P.S., Pereira, H., Barreira, L., & Varela, J. C. (2021). Carotenoid biosynthetic gene expression, pigment and n-3 fatty acid contents in carotenoid-rich *Tetraselmis striata* CTP4 strains under heat stress combined with high light. *Bioresource Technology*, 337, 125385.
- Schulze, P.S., Barreiro, L., Pereira, H., Perales, A.J., & Varela, J.C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) Applied to microalgal production. *Trends Biotechnol*, 32 (8), 547-551
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*. 27 (4), 277-286.
- Silva, J. D. A. P., Trindade, E. B. S. D. M., Fabre, M. E. D. S., Menegotto, V. M., Gevaerd, S., Buss, Z. D. S., & Frode, T. S. (2012). Fish oil supplement alters markers of inflammatory and nutritional status in colorectal cancer patients. *Nutrition and cancer*, 64(2), 267-273.
- Simionato, D., Block, M.A, La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes De Novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eucaryotic cell* 12 (5), 665-676.
- Spolaore, P., Joannis-cassan, C., Duran, E., Isambert, A., (2006). Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101 (2), 87-96.
- Solovchenko, A., Lukyanov, A., Solovchenko, O., Didi-Cohen, S., Boussiba, S., & Khozin-Goldberg, I. (2014). Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica*

- CCALA 804. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 635-644.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food chemistry research developments*, 75-112.
- Somerville, C. (1995). Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United of America*. 92 (14), 6215-6218.
- Stryer, L., Berg, J. & Tymoczko, J., (2002). *Biochemistry* 5th ed., New York: HW Freeman.
- Suda, S., Atsumi, M., & Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycology* 41 (3), 273-279.
- Sukenik, A., Zmora, O., & Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117(3-4), 313-326. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90328-V](http://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90328-V).
- Sun, M.-X., Geng, L.-J., Ren, X.-J., Hao, N., Chen, K.-Q., & Huang, H., (2018). Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. *Bioresour. Technol.*, 250., 868-876
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs* 13 (10), 6152-6209. <https://doi.org/10.3390/md13106152>.
- Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacyl glyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosco. Bioeng.* 101 (3), 223-226. doi:10.1263/jbb101.223.
- Tripathi, U., Sarada, R., & Ravishankar, G. (2002). Effect of culture conditions on growth of green alga *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiol. Plant.* 24, 323–329. doi: 10.1007/s11738-002-0058-9
- Trovão M, Schüler M L, Machado A, Bombo G, Navalho S, Barros A, Pereira H, Silva J, Freitas F, & Varela J, (2022). Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Stain Improvement towards Industrial Production. *Mar. Drugs* 20 (7), 440. [http//doi.org/10.3390/md20070440](http://doi.org/10.3390/md20070440).
- Vadiveloo, A., Moheimani, N.R., Cosgrove, J.J., Parlevliet, D., & Bahri, P.A. (2017). Effects of different light spectra on the growth, productivity and photosynthesis of two acclimated strains of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Applied Phycology* 29, 1765-1774.
- Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., & Huesemann, M. (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5(3), 731-740.
- Vanvooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., & Peltier et al., Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124, pp.421-32. 10.1016/j.biortech.2012.08.009. hal-00788607.
- Vieira Costa, J. A., Colla, L. M., Filho, P. D., Kabke, K., & Weber, A. (2002). Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 603-607.

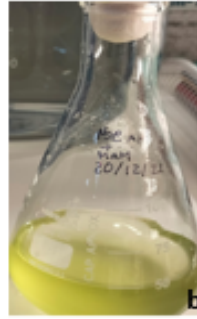
- Vonshak, A., Torzillo, G. (2004). Environmental stress physiology. In Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, A. Richmond, ed. (Blackwell Science Ltd), pp. 57-82.
- Vonshak, A., Novoplansky, N., Benavides, A.M.S., Torzillo, G., Beardall, J., & Palacios Y.M., (2020). Photosynthetic Characterization of two *Nannochloropsis* species and its relevance to outdoor cultivation. *Journal of applied Phycology*, 32, 909-22 <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01985-5>.
- Wagenen V J, Miller W T, Hobbs S; Hook P, Crowe B & Huesemann M, (2012). Effects of Light and Temperature on Fatty Acid production in *Nannochloropsis salina* *Energies*, 5 (3), 731-740; doi: 103390/en5030731.
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology advances*, 30(4), 904-912.
- Wang, B., & Jia, J. (2020). Photoprotection mechanisms of *Nannochloropsis oceanica* in response to light stress. *Algal Research*, 46, 101784.
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Proc. Biochem.* 40 (12), 3627–3652. doi: 10.1016/j.procbio.2005.02.020
- Weissman, J., Radaelli, G. (2015). Systems and methods for maintaining the dominance of Vonshak, A., Novoplansky, N., Benavides, A.M.S., Torzillo G., John Beardall
- Zeng, X., Danquah, M., Chen, X., & Lu, Y., (2011). Microalgae bioengineering from CO₂ fixation of biofuel production *Renewable and sustainable Energy Reviews*, 15, 3252-3260.
- Wensel, P., Helms, G., Hiscox, B., Davis, W. C., Kirchhoff, H., Bule, M., & Chen, S. (2014). Isolation, characterization, and validation of oleaginous, multi-trophic, and haloalkaline-tolerant microalgae for two-stage cultivation. *Algal Research*, 4, 2-11.
- Werpy, T., & Petersen, G. (2004). Top value added chemicals from biomass: volume I—results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (No. DOE/GO-102004-1992). National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States).
- Wojciechowski J M; Straube A; Cavalcante P K Me; Miranda E F (2013). Isolamento e cultivo de microalgas. DOI:10.13140/2.1.3353.3767.
- Xin, Y., Lu, Y., Lee, Y. Y., Wei, L., Jia, J., Wang, Q., & Xu, J. (2017). Producing designer oils in industrial microalgae by rational modulation of co-evolving type-2 diacylglycerol acyltransferases. *Molecular plant*, 10(12), 1523-1539.
- Yamaguchi, S., Kawada, Y., Yuge, H., Tanaka, K., & Imamura, S. (2017). Development of new carbon resources: production of important chemicals from algal residue. *Scientific Reports*, 7(1), 855.
- Yew, G. Y., Lee, S. Y., Show, P. L., Tao, Y., Law, C. L., Nguyen, T. T. C., & Chang, J. S. (2019). Recent advances in algae biodiesel production: from upstream cultivation to downstream processing. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100227.
- Yousuf, A. (2020). Fundamentals of microalgae cultivation. In *Microalgae cultivation for biofuels production* (pp. 1-9). Academic Press.
- Zhou, Y., Liu, L., Li, M., & Hu, C. (2022). Algal biomass valorisation to high-value chemicals and bioproducts: Recent advances, opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 344, 126371. The mechanisms of oil synthesis in microalgae. *Plant Cell*, 26 (4), 1645–1665.

Anexos

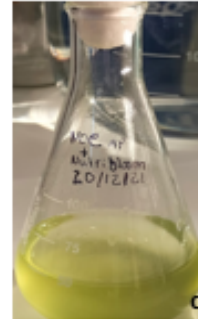
Anexo 1 - Inóculos de *Nannochloropsis oceanica* a diferentes meios de cultura



Meio Guillard's/ F/2



Meio Algal/MAM



Meio Nutribloom

$110\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ e a 22°C , 5 dias.

Anexo 2 - Resultados da experiência com *N. oceanica* a diferentes intensidades luminosas (altas e ou baixas)

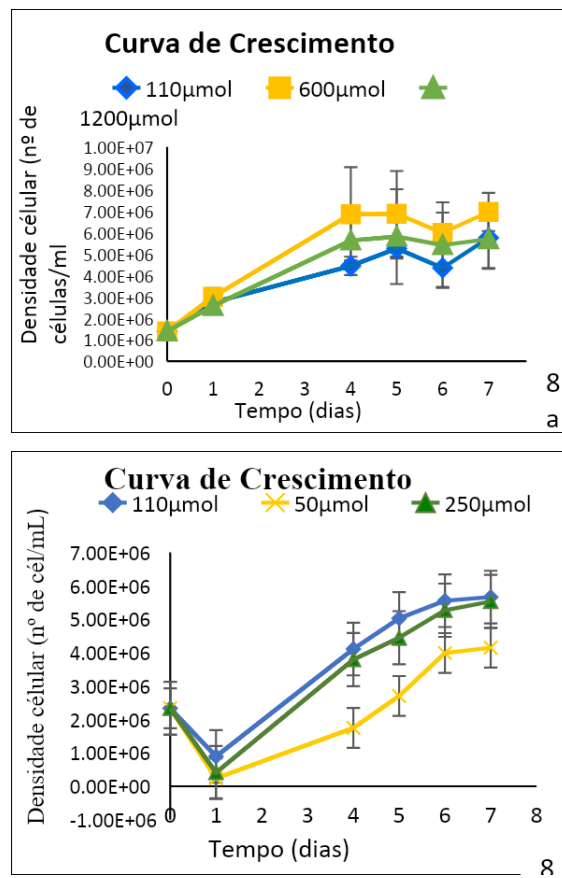


Figura 8 a, 8b- Curva de crescimento relativa a contagem celular na experiência com altas e baixas intensidades luminosas testadas numa experiência laboratorial com a *N. oceanica*.

Anexo 3 - Extração dos Ácidos gordos da *N. oceanica* após um período (8 dias) de stress abiótico.

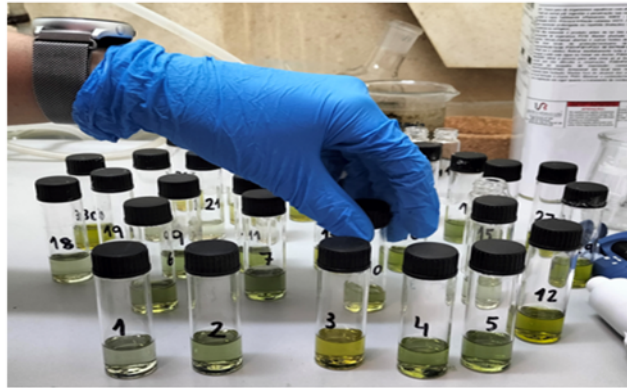
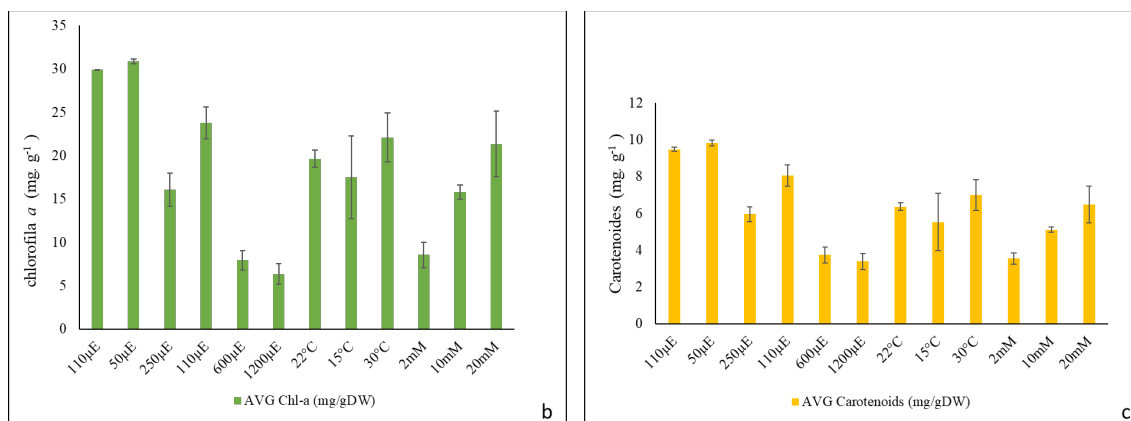


Imagem de extração de ácidos gordos da amostra de *N. oceanica* durante o período em que se realizou as experiências com os fatores abióticos.

Anexo 4 - Extração de pigmentos



Graf. **b**) mostra a quantidade de clorofila a (g^{-1}) obtida durante toda experiência realizada (várias concentrações de nutrientes, altas e baixas intensidades luminosas e nas várias temperaturas) durante o tempo em que demorou para cada experiência. Graf **c**) conteúdo de carotenoide alcançado pela *N. oceanica* durante toda experiência (nutrientes, intensidades luminosas e temperatura).

A diferença entre os dois gráficos é que nas altas intensidades luminosas houve mais produção de carotenoides que da clorofila a , e isto justifica pelo fato dos carotenoides terem a capacidade fotoprotetoras quando a existe um processo de excitação da clorofila a como é o caso nesta experiência de altas intensidades luminosas (os carotenoides impedem a foto-oxidação em determinadas situações).