



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**INCORPORAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE AÇAÍ E MICROALGAS EM
NANOFIBRAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS**

CLEBER KLASENER DA SILVA

MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**INCORPORAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS DE AÇAÍ E MICROALGAS EM
NANOFIBRAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS**

CLEBER KLASENER DA SILVA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título
de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

MICHELE GREQUE DE MORAIS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2020

Ficha Catalográfica

S586i Silva, Cleber Klasener da.
Incorporação de biocompostos de açaí e microalgas em nanofibras com potencial para aplicação em embalagens / Cleber Klasener da Silva. – 2020.
151f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Michele Greque de Moraes.

1. Antocianinas 2. Biopolímeros 3. Clorofila 4. *Electrospinning*
5. Fontes de Carbono 6. Sensor de pH I. Moraes, Michele Greque de
II. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

Tese defendida por Cleber Klasener da Silva e aprovada em 26 de maio de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Profa. Dra. Michele Greque Moraes - FURG



Prof. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



. Dra. Juliana Botelho Moreira – FURG



Dra. Etiele Greque de Moraes – Universidade do Algarve



Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho – UNIPAMPA

Dedico esta tese aqueles que me apoiaram incondicionalmente durante todo tempo aqui dedicado, meus pais Celso e Liane, meus irmãos Carlos e Tathiana e minha esposa Carina.
Também a todos que acreditam e lutam pela educação, ciência e respeito ao próximo

AGRADECIMENTOS

Deus, por me fortalecer com sabedoria.

Minha família (onde incluo pessoas do coração), pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos Igor, Adriano, Suelen, Ana Luiza, Juliana, Bruna, Marco, Dani, Ana Maria e Ana Paula por todo suporte técnico, ou simplesmente amizade compartilhada durante minha caminhada.

Aos colegas dos laboratórios LEB/MiBi.

A todos os integrantes do Centro de Biotecnologia da Universidade de Bielefeld.

Professor Olaf Kruse e sua família.

Professor Jorge, pelas oportunidades e ensinamentos.

Professora Michele Greque de Moraes, pela orientação e dedicação.

A banca examinadora, pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço também a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a formação do profissional.

Universidade Federal do Rio Grande e professores do PPGECA, pelos auxílios e ensinamentos.

Todos os Laboratórios da Escola de Química e Alimentos (FURG) por todo o auxílio na concretização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho

“As palavras têm o poder de ferir e de
sara. Quando elas são boas, têm o
poder de mudar o mundo.”

Buda

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1 - Design dos experimentos realizados com modificações no meio de cultivo.....	79
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 – Micrografia, diâmetro médio e frequência de distribuição de diâmetros das nanofibras produzidas com policaprolactona (PCL) e polietileno óxido (PEO) e extrato de açaí (EA).....	105
Tabela 2 - Propriedades térmicas das fibras produzidas com policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO) e extrato de açaí (EA): temperatura de fusão (T_f), Entalpia (H), temperatura inicia de degradação (T_{id}), Temperatura de degradação máxima (T_{dm}) e temperatura final de degradação (T_{fd}).....	106
Tabela 3 - Indicadores de variação de cor das fibras ultrafinas produzidas com policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO) e extrato de açaí (EA) submetidos a diferentes valores de pH.....	110

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Estrutura química de cianidina-3-glicoídeo.....	44
Figura 2 - Esquema produção nanofibras poliméricas pela técnica de <i>electrospinning</i>	50

ARTIGO 1

Figura 1 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada com (a) 3 % de CO₂ na presença de luz (□) ou ausência de luz (■); (b) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (*); (d) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (*)......

63

Figura 2 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada com (a) 3 % de CO₂ na presença de luz (□) ou ausência de luz (■); (b) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (*); (d) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (*)......

64

Figura 3 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou CO₂ atmosférico (□); (b) 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 666 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 333 mg L⁻¹ de xilose (+), 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 666 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 333 mg L⁻¹ de glicose (+) e 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de glicose (*)......

66

Figura 4 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou CO₂ atmosférico (□); (b) 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 666 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 333 mg L⁻¹ de xilose (+), 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 666 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 333 mg L⁻¹ de glicose (+) e 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de glicose (*)......

67

Figura 5 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose (Δ); (b) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de

arabionose (●), 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ); (c) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose + 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose + 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose + 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose + 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ).....68

Figura 6 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose (Δ); (b) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de arabionose (●), 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ); (c) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose + 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose + 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose + 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose + 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ).....69

Figura 7 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada com CO₂ atmosférico (■), 1000 mg L⁻¹ de xilose (●) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (▲); concentração de clorofila quando cultivada com CO₂ atmosférico (□), 1000 mg L⁻¹ de xilose (○) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (Δ) e concentração de carotenoides totais quando cultivada com CO₂ atmosférico (+), 1000 mg L⁻¹ de xilose (x) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (*);.....70

Figura 8 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada com CO₂ atmosférico (■), 1000 mg L⁻¹ de xilose (●) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (▲); concentração de clorofila quando cultivada com CO₂ atmosférico (□), 1000 mg L⁻¹ de xilose (○) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (Δ) e concentração de carotenoides totais quando cultivada com CO₂ atmosférico (+), 1000 mg L⁻¹ de xilose (x) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (*);.....71

ARTIGO 2

Figura 1 - Crescimento celular de *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema PSII de *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio controle (*), meio BG-11 (x), TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (■), TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (●) e TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (▲), TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (□), TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (○) e TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (Δ).....82

Figura 2 – Concentração de clorofila em *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e concentração de carotenoides em *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio controle (*), meio BG-11 (x), meio TAP + 100 mL L⁻¹ xilose com 100 % N (■), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (●), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (▲), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (□), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (○) e meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (Δ).....86

Figura 3 – Incremento em lipídios neutros para *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e incremento de PHAs em *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio TAP + 100 mL L⁻¹ xilose com 100 % N (■), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (●), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (▲), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (□), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (○) e meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (Δ).....89

ARTIGO 3

Figura 1 - Imagens da coloração da amostra e dos espectros UV-Vis de soluções de EA em diferentes valores de pH.....103

Figura 2 - Ângulo de contato das fibras produzidas com 11 % PCL (a), 7:2:3 % PCL:PEO:EA, respectivamente e (b) demais ensaios (c).....107

Figura 3 - Fibras ultra finas em diferentes valores de pH: Ensaio com 4:2 % m v⁻¹ de PCL:PEO, (a) antes, (b) durante e (c) após entrar em contato com tampões; Ensaio com 7:2 % m v⁻¹ de PCL:PEO, (d) antes, (e) durante e (f) após entrar em contato com tampões.....109

ARTIGO 4

Figura 1 – Extratos de açaí e *Spirulina* em tampões pH 1 – pH 9.....123

Figura 2 – Variação de cor dos extratos de açaí (a), *Chlorella* (b), *Spirulina* sp. LEB 18 (c), Açaí + *Spirulina* sp. LEB 18 1:1 (d) e Açaí + *Spirulina* sp. LEB 18 2:1 (e) expostos à diferentes pHs.....124

Figura 3 – Diferença total de cor (a) e cromaticidade dos sensores de pH com açaí (b), *Spirulina* sp. LEB 18 (c), açaí+*Spirulina* sp. LEB 18 (1:1) (d), açaí+*Spirulina* sp. LEB 18 (2:1) (e) *Chlorella* (f).....125

Figura 4 - Variação do valor de ΔE (%) do sensor quando em contato com pectina, ácido ascórbico, EDTA, gelatina, nitrato de sódio, ácido láctico, ácido acético, goma arábica ou hidróxido de amônio.....128

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
CAPÍTULO II	33
3 REVISÃO DA LITERATURA	35
3.1 MICROALGAS	35
3.1.1 <i>Spirulina</i>	36
3.1.2 <i>Chlorella</i>	36
3.1.3 <i>Chlamydomonas</i>	37
3.2 MODOS DE OPERAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	38
3.2.1 Requerimento nutricional	38
3.3 BIOPRODUTOS DE ORIGEM MICROALGAL	40
3.3.1 Lipídios	41
3.3.2 Pigmentos.....	42
3.4 AÇAÍ	43
3.5 EMBALAGENS ATIVAS E INTELIGENTES.....	45
3.6 SENSORES DE pH PARA EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS.....	46
3.7 NANOFIBRAS.....	47
3.8 <i>ELECTROSPINNING</i>	50
3.9 POLÍMEROS	52
CAPÍTULO III.....	54
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	55
ARTIGO 1	57
CRESCIMENTO DE <i>CHLAMYDOMONAS KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> CULTIVADAS COM CO ₂ (C1), PENTOSE (C5) E GLICOSE (C6) COM FONTES DE CARBONO.....	57
RESUMO.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO.....	60
2.2 CRESCIMENTO DE <i>CHLAMYDOMONAS KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> EM REGIME AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO.....	61
2.3 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CO ₂ NO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>CHLAMYDOMONAS</i> <i>KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i>	61
2.4 CULTIVO DE <i>CHLAMYDOMONAS KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> EM REATOR TIPO ALGEM	61
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL EM REGIME AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO	62

3.2	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CO ₂ NO CRESCIMENTO CELULAR DE <i>CHLAMYDOMONAS KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i>	65
3.3	CULTIVO DE <i>CHLAMYDOMONAS KOMMA</i> E <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> EM REATORES DE MAIOR ESCALA.....	70
4	CONCLUSÃO	71
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ARTIGO 2.....		75
ACÚMULO DE LIPÍDIOS NEUTROS ESTIMULADO EM MICROALGAS CULTIVADAS COM XILOSE.....		75
RESUMO		76
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1	MICRO-ORGANISMOS E SELEÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO	78
2.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO	78
2.3	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	79
2.3.1	Determinação de pigmentos e Eficiência fotoquímica do PSII	79
2.3.2	Determinação de lipídios neutros totais por fluorescência.....	80
2.3.3	Análise quantitativa de poli-hidroxialcanoatos (PHA) por fluorescência.....	80
2.3.4	Identificação dos PHAs produzidos pelas cepas.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1	CRESCIMENTO CELULAR E EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA	81
3.2	PIGMENTOS.....	84
3.3	PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS NEUTROS	88
4	CONCLUSÃO	91
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ARTIGO 3.....		96
INOVADORES SENSORES DE pH DESENVOLVIDOS A PARTIR DE FIBRAS ULTRAFINAS CONTENDO EXTRATO DE AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEA</i>).....		96
RESUMO		97
1	INTRODUÇÃO	98
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1	PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE AÇAÍ E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS	99
2.2	MUDANÇA DE COR DO EA	100
2.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	100
2.4	VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	100
2.5	PROCESSO DE ELECTROSPINNING.....	100
2.6	MORFOLOGIA DAS FIBRAS PRODUZIDAS	101
2.7	PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FIBRAS PRODUZIDAS	101
2.8	MOLHABILIDADE DAS FIBRAS	101
2.9	VARIAÇÃO DA COR DA FIBRA EM FUNÇÃO DO pH.....	102
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	102
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102

3.1	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MUDANÇA DE COR DO EA	102
3.2	PRODUÇÃO DE FIBRAS ULTRAFINAS DE PCL E PEO CONTENDO EA	103
3.3	PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FIBRAS	105
3.4	MOLHABILIDADE DAS FIBRAS	107
3.5	RESPOSTA DAS FIBRAS À VARIAÇÃO DO PH.....	107
4	CONCLUSÃO.....	112
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
ARTIGO 4		116
RESUMO.....		117
1	INTRODUÇÃO.....	118
2	MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E <i>SPIRULINA</i>	119
2.2	ALTERAÇÕES DE COR DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E <i>SPIRULINA</i>	119
2.3	DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS	120
2.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SENSOR	120
2.5	VARIAÇÃO DE COR DOS SENSORES EM FUNÇÃO DO PH	120
2.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SENSOR.....	121
2.7	INFLUÊNCIA DE ADITIVOS ALIMENTARES NA RESPOSTA COLORIMÉTRICA DO SENSOR 121	
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	122
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
3.1	ALTERAÇÕES DE COR DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E MICROALGAS E CARACTERIZAÇÃO ESPECTRAL	122
3.2	VARIAÇÃO DE COR DOS SENSORES PRODUZIDOS EM FUNÇÃO DO PH	124
3.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SENSOR	126
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SENSOR.....	127
3.5	INFLUÊNCIA DE ADITIVOS ALIMENTARES NA RESPOSTA COLORIMÉTRICA DO SENSOR 127	
4	CONCLUSÃO.....	129
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
CAPÍTULO IV.....		133
5	CONCLUSÃO GERAL.....	134
CAPÍTULO V		135
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

CAPÍTULO I

Resumo geral, Abstract geral, Introdução geral e Objetivos.

RESUMO

O crescimento da população mundial eleva a demanda por bens de consumo e alimentos, por consequência o impacto ambiental oriundo da atividade industrial. Dessa forma se faz necessário encontrar alternativas sustentáveis para as atividades produtivas. Nesse contexto duas áreas podem ser destacadas: a biotecnologia e a nanotecnologia. Dentro dos processos biotecnológicos pode-se utilizar micro-organismos fotossintetizantes com as microalgas para obtenção de compostos de interesse como corantes, lipídios e proteínas. Esses compostos podem ser aplicados em nanoestruturas como nanofibras, aliando-se assim as duas áreas. Isso permite o desenvolvimento de materiais que auxiliam a conservação de alimentos, reduzindo o desperdício, e por consequência, a demanda por recursos naturais. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de biocompostos e crescimento de microalgas cultivadas em diferentes fontes de carbono e desenvolver nanofibras poliméricas contendo extratos pigmentados de açaí e microalgas utilizando a técnica de *electrospinning*. Na etapa de estudo com as microalgas, primeiramente foram avaliados regimes de cultivo e fontes de carbono para o crescimento de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri*. *C. komma* demonstrou melhor crescimento em regime mixotrófico, combinando 3 % (m v⁻¹) de CO₂ e 1000 mg L⁻¹ de xilose, enquanto *P. kessleri* obteve maior crescimento em regime mixotrófico utilizando 5000 mg L⁻¹ de glicose combinada com 3 % (m v⁻¹) de CO₂. Em um segundo momento, foi avaliada a produção de biomassa, lipídios e pigmentos por *C. komma*, *P. kessleri*, *C. fusca* e *Spirulina* sp. LEB 18 cultivadas com xilose e modificações na concentração de nitrogênio no meio de cultura. Ao combinar xilose e privação de nitrogênio no meio, ocorreu incremento máximo em lipídios neutros de 89 % para *C. fusca*, 580 % para *C. komma*, 4424 % para *P. kessleri* e 8131 % para *Spirulina* sp. LEB 18. A segunda etapa, que consistiu em aplicar os pigmentos de açaí e microalgas como indicadores em nanofibras, dando origem ao sensor colorimétrico também foi dividida em dois momentos. Primeiramente, foram definidas as condições de produção das nanofibras compostas por policaprolactona (PCL), poli-óxido de polietileno (PEO) e extrato de açaí. As fibras produzidas apresentaram diâmetro médio de 1635 nm e diferença de cor total (ΔE) superior a 5, valor que corresponde a capacidade humana de diferenciação de cores. Em seguida foi desenvolvido um sensor com adição de extratos microalgal e de açaí. O novo sensor produzido apresentou diâmetro médio de fibras de 860 nm e capacidade de variação de cor frente a variações de pH perceptíveis a pessoas não treinada ($\Delta E > 5$). As fibras contendo 3 % de extrato de açaí e 1,5 % de extrato microalgal respondem rapidamente a variação de pH do meio, variando sua cor de vermelho em pH ácido a cinza em pHs básicos. Por fim, foi avaliado o comportamento do sensor ao entrar em contato com aditivos alimentares. Dentre esses, destacam-se positivamente a pectina e a gelatina que elevaram a resposta do sensor em até 600 % e, negativamente goma arábica, hidróxido de amônio e ácido ascórbico que reduziram a eficácia do sensor em até 90 %. Espera-se com este trabalho, ter contribuído com a comunidade acadêmica via produção intelectual e sociedade pela criação de dispositivo capaz de informar a população sobre a qualidade de alimentos.

Palavras-chave: Antocianinas. Biopolímeros. Clorofila. *Electrospinning*. Fontes de carbono. Sensor de pH.

ABSTRACT

The growth of the world population raises the demand for food, and as a result, the initial environmental impact of industrial activity. Thus, it is necessary to find sustainable alternatives for productive activities. In this context, two areas stand out: biotechnology and nanotechnology. Biotechnological processes can use photosynthetic microorganisms, as microalgae, to produce compounds of interest such as dyes, lipids, and proteins. These compounds can be applied to nanostructures such as nanofibers, combining the two areas and allowing the development of materials that help, for example, in food conservation, reducing waste, and consequently, the demand for natural resources. In this context, the present study aimed to evaluate the production of biocomposites and microalgae grown using different carbon sources and to develop polymeric nanofibers containing pigmented extracts of açai and microalgae using the electrospinning technique. In the microalgae study stage, the first part was the cultivation conditions and carbon sources for the growth of *Chlamydomonas komma* and *Parachlorella kessleri*. *C. komma* showed better growth in mixotrophic cultivation, combining 3 % (w v⁻¹) of CO₂ and 1000 mg L⁻¹ of xylose, while *P. kessleri* obtained higher growth in mixotrophic cultivation using 5000 mg L⁻¹ of glucose combined with 3% (w v⁻¹) of CO₂. In a second step, the production of biomass, lipids, and pigments by *C. komma*, *P. kessleri*, *C. fusca*, and *Spirulina* sp. LEB 18 grown with xylose and changes in nitrogen concentration in the culture medium. When combining xylose and nitrogen deprivation in the medium, there was a maximum increase in neutral lipids of 89 % for *C. fusca*, 580 % for *C. komma*, 4424 % for *P. kessleri* and 8131 % for *Spirulina* sp. LEB 18. The second stage, which consisted of applying the açai and microalgae pigments as indicators in nanofibers, giving rise to the colorimetric sensor, was also divided into two moments. First, the conditions to produce nanofibers composed of polycaprolactone (PCL), polyethylene polyoxide (PEO), and açai extract were defined. The fibers produced had an average diameter of 1635 nm and a total color difference (ΔE) of the colorimetric response greater than 5, a value that corresponds to the human ability to differentiate colors. Then a sensor was developed with the addition of microalgal and açai extracts. The new sensor produced had an average fiber diameter of 860 nm, and the ability to vary color in the face of pH variations noticeable to untrained people ($\Delta E > 5$). The fibers containing 3% of açai extract and 1.5% of microalgal extract respond quickly to the pH variation of the medium, varying its color from red in acidic pH to gray in basic pH. Finally, the behavior of the sensor when in contact with food additives was evaluated. Among these, pectin and gelatin stand out positively, which increased the sensor's response by up to 600%, and negatively, gum arabic, ammonium hydroxide and ascorbic acid, which reduced the sensor's efficiency by up to 90%.

Key words: Anthocyanins. Biopolymers. Chlorophyll. Electrospinning. Carbon sources. pH sensor.

1 INTRODUÇÃO

Há indícios de que em 2050, a população mundial seja de aproximadamente 9,7 bilhões de pessoas, 30 % a mais do que o cenário atual. Isso corresponde ao dobro do número de pessoas que o planeta consegue suprir sustentavelmente (NADATHUR; WANASUNDARA; SCANLIN, 2017). Com isso, o melhor aproveitamento de recursos naturais, bem como a implantação de estratégias para elevar a conservação desses recursos devem ser cada vez mais explorados visando atender a demanda por alimentos e energia.

A elevação da demanda causada pelo aumento acentuado na população, gera a necessidade de novas tecnologias que atendam a todos. Isso eleva também a geração de resíduos. Por esses motivos, diferentes nações têm se unido para buscar alternativas, aliando aumento de produção e redução nas emissões de resíduos. Como exemplos podem ser citadas a Cúpula da Terra no Rio de Janeiro em 1992, assinatura do Protocolo de Quioto (1997), Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (2005) e Conferência do Clima em Madri - Espanha (COP 25, 2019).

O Brasil, por meio de seus representantes, buscava elevar a participação do país em eventos dessa magnitude. Durante a 22ª Conferência das Partes sobre Mudança do Clima (COP 22), em Marrakesh no Marrocos, o Brasil ao manifestar sua participação no controle dos gases de efeito apresentou uma das metas mais ambiciosas: reduzir em 37 % as emissões até 2025, com indicativo de chegar a 43 % em 2030, quando comparada a registros de 2005 (COP 22 Brasil, 2016). Infelizmente, a mudança de postura demonstrada pelo poder federal a partir de 2018 coloca o país em um estado de emergência. Essas mudanças só reforçam o papel das instituições de pesquisa com o meio ambiente e gerações futuras, para que busquem soluções aos problemas ambientais.

Nesse contexto, as microalgas são de interesse em diversas redes de pesquisa, pois apresentam potencial de substituição de produtos do petróleo, como polímeros (SILVA; COSTA; DE MORAIS, 2018) e combustíveis (DALMASNETO et al., 2014). Esses micro-organismos são capazes de sintetizar compostos de alto valor agregado, como biopeptídeos (GONÇALVES et al., 2017), ácidos graxos (ZIENKIEWICZ et al., 2016), compostos fenólicos e pigmentos (BEGUM et al., 2016), que podem ser utilizados pela indústria de alimentos ou de fármacos. Além disso, as microalgas são capazes de biofixar CO₂ (GE et al., 2017; MIYAKE; ERATA; ASADA, 1996; MORAIS; COSTA, 2007) e utilizar substratos alternativos para o crescimento, como resíduos lignocelulósicos (BLIFERNEZ-KLASSEN et al., 2012; FREITAS et al., 2017b).

O carbono é um dos principais nutrientes requeridos para o crescimento microalgal. Entre as fontes alternativas, pode-se considerar o uso do CO₂ emitido a partir da queima de combustíveis fósseis, o que minimiza os problemas causados pela emissão desse gás, como o aquecimento global (MORAIS; COSTA, 2007; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016). As microalgas são organismos fotossintéticos que apresentam requerimento nutricional relativamente simples quando comparadas as demais fontes de biomassa. Entre as principais características das microalgas estão a capacidade de converter dióxido de carbono (CO₂) e águas residuais em biomassas ricas em bioprodutos como lipídios, carboidratos, proteínas, biopolímeros e pigmentos (COLLET et al., 2014; GE et al., 2017).

Dentre os compostos produzidos por microalgas, podem ser destacados os pigmentos, principalmente carotenoides, ficobiliproteínas e clorofilas (ARASHIRO et al., 2020; BEGUM et al., 2016a). Essas moléculas estruturalmente diversas desempenham vários papéis na natureza, tais como, capturar a luz solar, fotoproteção, prevenir a oxidação celular e conferir pigmentação (ALLEN; SMITH, 1969; BOGAERT et al., 2019; DINESHKUMAR et al., 2016). Esses pigmentos podem ser aplicados em produtos da indústria alimentícia e farmacêutica como corantes naturais.

Diversas fontes podem ser utilizadas para obtenção dos compostos bioativos potenciais para serem incorporados às embalagens. O açazeiro é uma palmeira nativa das várzeas do estuário do Amazonas que produz frutos (açaí). Dentre os compostos bioativos presentes nesses frutos, pode-se destacar os flavonóides, compostos fenólicos, lignóides, antocianinas, ácidos graxos, quinonas, terpenos e norisoprenóides (YAMAGUCHI et al., 2015). A presença de antocianinas no açaí possibilita sua aplicação como indicador de pH, devido ao potencial desse pigmento em alterar a cor através da exposição a diferentes pHs (LI et al., 2019; POURJAVAHHER et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada dez pessoas sofre com contaminação de origem alimentar todos os anos. Este problema está relacionado com as condições higiênico-sanitárias dos alimentos disponibilizados aos consumidores. A qualidade desses produtos está ligada a toda cadeia produtiva, desde a recepção, seleção da matéria prima, estocagem e distribuição do alimento processado.

As embalagens nas quais os alimentos são acondicionados desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade do produto. Estas têm como finalidade proteger, moldar e informar ao consumidor sobre o produto acondicionado (TRINETTA, 2016). A incorporação de compostos com bioatividades as embalagens alimentícias pode fornecer informações ao consumidor sobre alterações na qualidade dos alimentos (BALBINOT-

ALFARO et al., 2019; EZATI et al., 2019; SIRACUSA; LOTTI, 2019), ou manter a qualidade pela adição de agentes antioxidantes e antimicrobianos (JANJARASSKUL; SUPPAKUL, 2018; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014). A adição desses compostos às embalagens nem sempre é tarefa fácil, uma vez que para a produção das mesmas são utilizadas elevadas temperaturas. Nesse sentido, estudos são necessários visando elevar o conhecimento técnico científico, que é o primeiro passo para implantação de novas tecnologias nas indústrias.

Nanofibras produzidas por *electrospinning* têm sido estudadas para aplicação na engenharia de tecidos. Recentemente esta técnica passou a ser investigado também para a produção de embalagens (ANU BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014; EZATI et al., 2019). As nanofibras poliméricas são alternativa para incorporação de biocompostos em embalagens para alimentos, uma vez que podem ser utilizados polímeros biocompatíveis, atóxicos e biodegradáveis para sua produção. Estes nanomateriais apresentam vantagens em relação aos filmes poliméricos devido a elevada área superficial e porosidade, o que lhes confere maior interação do biocomposto com o meio externo (RAMAKRISHNA, 2005) e devido ao potencial para aumento de escala do processo.

Visando incrementar o conhecimento científico na área de produção e aproveitamento de biocompostos, o presente trabalho se insere como forte complemento aos projetos em andamento dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB) e Microbiologia e Bioquímica (MiBi) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O projeto intitulado “Centros de Vocação Tecnológica (CVT's) das Agrobiodiversidades Bailique-Rio Grande” busca elevar a capacidade socioeconômica da população do Arquipélago do Bailique – AP, pela formação de mão de obra qualificada, bem como, pelo desenvolvimento e divulgação de trabalhos que utilizem produtos oriundos da região, como é o caso do açaí. O projeto “Desenvolvimento de Sistemas de Cultivo Sustentáveis Para a Produção de Microalgas” é uma parceria formada com o Centro de Biotecnologia (CeBiTec) da Universidade de Bielefeld – Alemanha, para elucidar e elevar a produção e biocompostos por microalgas. Sendo assim, a realização desse trabalho é de grande valor para a sociedade e universidade, uma vez que busca e dissemina conhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de biocompostos e crescimento de microalgas cultivadas em diferentes fontes de carbono e desenvolver nanofibras poliméricas contendo extratos pigmentados de açaí e microalgas utilizando a técnica de *electrospinning*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* quando cultivadas com CO₂, Xilose, Glicose, Celobiose e Arabinose.
- Produzir biomassa, pigmentos e lipídios pelas microalgas *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri*, *Chlorella fusca* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando xilose como fonte de carbono.
- Desenvolver nanofibras de PCL e PEO com extrato de açaí para utilização como sensor de pH com potencial para a indústria alimentícia.
- Desenvolver sensor de pH a partir de nanofibras poliméricas de PCL e PEO com extratos de açaí e microalgas com potencial para aplicação em alimentos.

CAPÍTULO II

Revisão da literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

A população mundial depende da indústria para produzir, transformar e fornecer alimentos seguros. Os cerca de 7,8 bilhões de habitantes em 2020 passarão, para mais de 9 bilhões em 2050 (“World Population Clock: 7.8 Billion People (2020) - Worldometer”, 2020). Isso contrasta com a capacidade de produção dos alimentos, uma vez que a demanda será maior que a capacidade atual de produção (BALDWIN, 2015). A cadeia alimentícia é considerada uma das principais responsáveis pelos problemas ambientais. A quantidade de energia utilizada no processo de produção, transformação, armazenamento e transporte dos alimentos são sete vezes e meia a quantidade de energia que os alimentos fornecem em troca (HELLER; KEOLEIAN, 2000). Assim, surge a necessidade de encontrar meios de produção sustentável, obtendo alimentos de fontes alternativas, com alta qualidade e vida útil.

3.1 MICROALGAS

As microalgas compreendem um grupo diversificado de organismos, tanto eucariotas (protistas) quanto procariotas (cianobactérias). A base de dados para microalgas (AlgaeBase) atualmente têm mais de 157.000 espécies e nomes infra-específicos em seu banco de dados (“Algaebase :: Listing the World’s Algae”, 2020). Microalgas podem ser encontradas em sistemas marinhos, água doce e terrestres (BROWN; LARSON; BOLD, 1964). Pela utilização da energia da luz no processo de fotossíntese, as microalgas são capazes de converter compostos inorgânicos, por exemplo, H_2O , CO_2 , nitrogênio (N) e fósforo (P) em compostos orgânicos ricos em energia química, tais como carboidratos, proteínas e lipídios. Além disso, podem ser obtidos pigmentos, biopolímeros, antifúngicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (GOUVEIA et al., 2010; SALOMÉ; MERCHANT, 2019; SINGH et al., 2011).

Segundo Johansen (2012), as microalgas são os organismos fotossintéticos mais eficientes encontrados na natureza, por apresentarem taxas de biofixação de CO_2 maiores que as plantas. Ainda segundo o autor, as microalgas são alternativa para a produção de biomassa, pois apresentam menor necessidade de espaço geográfico e água em comparação as culturas vegetais. Goldman e Hole (1979) relatam que algumas espécies de microalgas, apresentam a capacidade de duplicar sua massa a cada 24 horas. A elevada taxa de crescimento, aliada a capacidade de produção de diversos compostos, tornam as microalgas potenciais fontes de obtenção de produtos naturais para indústrias (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013).

As Cianobactérias, também chamadas de cianoprocariotas, cianofitas, bactérias azul-esverdeadas e algas verde azuladas, são um grupo de procariotas, foto-autotróficas e

Gram-negativos capazes de realizar fotossíntese. Estes nomes são atribuídos devido à presença do pigmento c-ficocianina (C-PC) utilizado para a fotossíntese. As cianobactérias têm registro fóssil de 3,3 a 3,5 bilhões de anos estando entre os organismos mais bem-sucedidos da Terra (SCHOPF; PACKER, 1987).

De maneira geral, a multiplicação microbiana e produção de biocompostos pode ser influenciada por uma série de fatores. A luminosidade é, sem dúvida, um dos fatores mais importantes no crescimento e rendimento da cultura de microalgas (HARUN et al., 2014; SEYFABADI; RAMEZANPOUR; KHOEYI, 2011). No que diz respeito ao pH, microalgas raramente crescem em valores extremos de pH, sendo o ideal para o crescimento da maioria das espécies de microalgas entre 7 e 9 (BLINOVÁ; BARTOŠOVÁ; GERULOVÁ, 2015). O aumento da temperatura no cultivo de microalgas geralmente é acompanhado da elevação na taxa de crescimento até que se atinja a temperatura ótima de crescimento.

3.1.1 Spirulina

Spirulina como é conhecida comercialmente, refere-se a *Arthrospira platensis* e *Arthrospira máxima*, é utilizada a décadas na dieta de diferentes civilizações e conhecida como um super alimento (VONSHAK, 1997). Os primeiros registros de *Spirulina* datam de 1519 quando foi observada pelo cientista espanhol Hernando Cortez. Cortez observou que a *Spirulina* fazia parte da dieta dos Astecas, fato ocorrido durante a sua visita ao Lago Texcoco no Vale do México.

A *Spirulina* é uma cianobactéria verde azulada, microscópica (1 a 12 µm diâmetro e até 1 mm comprimento), filamentosa, pertencente à classe *Oscillatoriaceae*. Essa microalga pode se desenvolver em ambientes com diferentes composições químicas, tais como meios alcalinos, pântanos, lagos e águas marinhas (PANDEY et al., 2014). Esta cianobactéria apresenta características peculiares pois contém clorofila-a, como as plantas superiores, sendo classificada como microalga e também como bactéria devido a sua estrutura procariótica (KORU, 2012; SUDHAKAR; PREMALATHA, 2015).

Com alto valor energético, esse organismo apresenta em sua composição de biomassa cerca de 60 a 70 % (massa seca) de proteínas, além de ser rica em carboidratos, vitaminas A, vitamina C, vitamina E, minerais tais como ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco, ácido graxo linolênico, pigmentos como clorofila-a, ficocianina e carotenoides também estão presentes. A parede celular da *Spirulina* consiste de polissacarídeos que têm alta digestibilidade de 86 %, podendo ser facilmente absorvidos pelo corpo humano (FAO, 2010).

3.1.2 Chlorella

A microalga do gênero *Chlorella* é uma das microalgas comerciais mais importantes, com produção mundial de 2000 t (massa seca) (SPOLAORE et al., 2006). A principal espécie desse gênero é a *vulgaris*, que foi observada pela primeira vez em cultura pura por Beijerinck (BEIJERINCK, 1890). *Chlorella* é uma alga verde, unicelular, pertencente à família *Chlorellaceae*, cujo nome deriva do sufixo '*Chloros*' que significa verde, e do sufixo latino '*ella*' que significa pequena. A célula de *Chlorella* tem de 2 a 8 µm de diâmetro e não contém cílios (BOROWITZKA; MOHEIMANI, 2013). A biomassa dessa microalga, apresenta pigmentos verdes como clorofilas a e b, consiste em 55 a 60 % de proteína, 1 a 4 % de clorofila, 9 a 18 % de fibra dietética, vitaminas e minerais (AHMAD et al., 2018).

A *Chlorella* spp. é a microalga verde mais amplamente explorada, sendo utilizada como alimento saudável, na pecuária e na aquicultura, bem como em indústrias de medicamentos e cosméticos. Seu crescimento e a composição da biomassa são influenciados por vários requisitos ambientais, tais como a formulação química do meio de cultura, o nível de pH, salinidade, temperatura e a intensidade e/ou duração da luz (SHARMA, 2012).

Sob alta iluminância, ocorrem as maiores taxas de crescimento de *Chlorella vulgaris* (BLAIR; KOKABIAN; GUDE, 2014; YAN et al., 2013), visto que sob iluminação contínua esta microalga cresce melhor do que quando cultivada sob luz alternada e/ou natural (SHARMA, 2012). Em contrapartida, sob baixa iluminação ocorre desaceleração das taxas de crescimento da cultura de *Chlorella vulgaris* (AHMAD et al., 2018). A alteração do pH para ácido (3,0 a 6,2) ou alcalino (8,3 a 9,0) retarda o crescimento do gênero *Chlorella*, uma vez que essas apresentam pH ótimo de crescimento entre 7 e 8,5. Nesse caso a produção de biomassa costuma ser elevada em 20 a 25 % comparado com o crescimento em valores mais baixos de pH (WANG et al., 2010). Para o gênero *Chlorella* essa temperatura corresponde a aproximadamente 25 °C. Porém, esta é capaz de se multiplicar entre 15 e 30 °C, sendo a temperatura mais elevada a responsável pelo melhor desenvolvimento bioquímico da microalga (SHARMA, 2012).

3.1.3 Chlamydomonas

A *Chlamydomonas* foi mencionada pela primeira vez em 1830, quando Christian Ehrenberg esboçou as células de *Chlamydomonas pulvisculus* e *Volvox* que estão expostos no museu da natureza de Berlim (EHRENBERG, 1838). As primeiras observações a respeito dessas algas unicelulares dizem respeito fototaxia e a reprodução, uma vez que todas as etapas do ciclo sexual podem ser observadas através de microscópio. Em 1888 *C. pulvisculus* (a espécie desenhada por Ehrenberg) foi renomeada como *Chlamydomonas reinhardtii* pelo

botânico francês Pierre Dangeard em homenagem ao botânico ucraniano Ludwig Reinhardt (HARRIS; STERN; WITMAN, 2009; SALOMÉ; MERCHANT, 2019).

Diferentes espécies de *Chlamydomonas* têm sido coletadas em habitats com grande variação de condições de umidade, temperatura e salinidade, em água doce e marinha. Essa microalga é tolerante à poluição, podendo ser encontrada em águas residuais. (BROWN; LARSON; BOLD, 1964; SHETTY; GITAU; MARÓTI, 2019). Em escala laboratorial, a principal fonte de carbono do gênero *Chlamydomonas* é o acetato, sendo esse utilizado juntamente com CO₂ para elevar a produção de biomassa. Assim, a microalga é capaz de utilizar acetato para crescimento na presença de luz, em condições mixotróficas como na ausência de luz em regime heterotrófico. Após o transporte para a célula, o acetato é metabolizado em acetil-CoA. Este entra no ciclo do glioxilato que permite a formação de blocos de construção de aminoácidos e glicose ou entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para alimentar a cadeia respiratória com equivalentes redutores (BOGAERT et al., 2019).

Chlamydomonas reinhardtii, é considerada micro-organismos modelo, por ter suas rotas metabólicas extensivamente estudadas. É uma microalga unicelular, de forma oval com dimensões de 5 x10 µm, a célula de *Chlamydomonas* é rodeada por parede celular de glicoproteínas e carboidratos, dispostos em sete camadas. Quando os recursos não são limitados, *Chlamydomonas* se multiplica assexuadamente por simples divisão mitótica, onde cada célula filha carrega a informação genética idêntica codificada pelos genomas nuclear, mitocondrial e cloroplástico da célula mãe e o tempo de divisão pode variar. Células que crescem em luz constante apresentam tempo de geração de 8 a 10 h. Este ciclo celular pode ser prolongado por até 24 h quando cultivadas com fotoperíodo (MAJDINASAB et al., 2018; SHETTY; GITAU; MARÓTI, 2019).

3.2 MODOS DE OPERAÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As microalgas podem ser cultivadas em diferentes condições, desde cultivos laboratoriais controlados, até cultivos com menor controle, como em tanques ao ar livre. As técnicas mais utilizadas para a cultura de microalgas incluem cultivos *Indoor* e *Outdoor*. Os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento das algas são a quantidade e qualidade dos nutrientes, a luz, o pH, a agitação, a salinidade e a temperatura. A concentração ótima de cada nutriente, assim como a tolerância a eles são específicos de cada espécie. Esses fatores podem ser independentes um do outro ou dependentes (VAN STAPPEN, 1996).

3.2.1 Requerimento nutricional

O CO₂ é o principal gás de efeito estufa e responsável pelo aquecimento global. Quando as microalgas são expostas a luz, essas são capazes de assimilar o CO₂ com eficiência enquanto capturam nutrientes de resíduos (BENEMANN, 1997). Essa habilidade associada a elevada taxa de crescimento e baixa demanda de terra fértil fazem das microalgas fonte importante para obtenção de energia e alimentos (BOROWITZKA, 1999; SOLOVCHENKO; KHOZIN-GOLDBERG, 2013). Durante a fotossíntese, o carbono inorgânico (CO₂, HCO₃⁻) é reduzido a carbono orgânico, que pode fazer parte da estrutura de carboidratos, proteínas e lipídios (Hata et al. 2000). Os nutrientes, principalmente N e P, são essenciais para produção de biomassa.

No entanto, algumas microalgas sob certas condições podem utilizar compostos orgânicos de carbono para crescimento em regime heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. Embora as microalgas sejam tipicamente cultivadas em condições fotoautotróficas, a absorção de luz é dificultada à medida que a densidade celular aumenta, o que resulta em custos adicionais para a suplementação da luz. A utilização de fontes exógenas de carbono em regimes de cultivo heterotróficos (sem luz) ou mixotróficos (com luz) tem sido relatado para aumentar a biomassa de diversas microalgas. Segundo Bhatnagar et al. (2011), as três espécies de microalgas *Chlamydomonas globosa*, *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus bijuga* produziram de 3 a 10 vezes mais biomassa quando foram cultivadas em regime mixotrófico em comparação com o autotrófico. Além disso, a biomassa, taxa de crescimento e conteúdo lipídico de cepas de *Chlorella* podem ser aumentados pela suplementação do meio de cultura com fontes de carbono orgânico (WAN et al., 2011).

Diferentes substratos vêm sendo estudados de maneira a elevar a produção de biomassa e produtos das microalgas. Chai et al. (2018), suplementaram o meio de crescimento da *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 com quatro monossacarídeos (glicose, frutose, galactose e xilose). A suplementação com glicose elevou a densidade ótica (OD 750 nm), biomassa e produção de lipídios em 2, 7 e 12 vezes, respectivamente, em comparação com o rendimento autotrófico. Entretanto, houve redução no conteúdo de proteínas. Uma baixa concentração de glicose (<4 g L⁻¹) promoveu simultaneamente a biossíntese de clorofilas e proteínas. A suplementação com frutose promoveu crescimento de *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 em menor grau em comparação com a glicose, enquanto a suplementação com galactose não teve efeito e a suplementação com xilose nas concentrações testadas inibiu o crescimento.

Os carboidratos são compostos orgânicos amplamente distribuídos na Terra e tem papel central no metabolismo dos animais e das plantas. Os materiais lignocelulósicos são

matérias-primas promissoras como fonte de carbono, pois apresentam-se em abundância e tem custo relativamente baixo, já que podem ser obtidos em resíduos agroindustriais (CHAI et al., 2018; ZHENG et al., 2014). Os monossacarídeos podem ser obtidos a partir da hidrólise do material lignocelulósico e servem como fontes de carbono para culturas heterotróficas ou mixotróficas. A D-glicose (obtido da lise da celulose) e a D-xilose (lise da hemicelulose) são dois carboidratos principais de hidrolisados lignocelulósicos (BLIFERNEZ-KLASSEN et al., 2012; ZHENG et al., 2014).

A glicose é fonte de carbono frequentemente utilizada para culturas heterotróficas de microalgas. As taxas de crescimento e respiração obtidas com glicose costumam ser superiores a qualquer outro substrato (FU et al., 2019; LIU et al., 2009; WAN et al., 2011). Esse carboidrato pode promover alterações fisiológicas em cepas de microalgas capazes de assimilá-lo, como a *Chlorella vulgaris*, que tem suas vias metabólicas de assimilação do carbono, tamanho das células, densidades volumétricas dos materiais de armazenamento, tais como amido e grãos lipídicos e proteínas, clorofila, ARN e conteúdos vitamínicos afetadas pela presença da glicose (BHATNAGAR et al., 2011; RUIZ et al., 2014).

Diferente do que ocorre com a glicose, que é amplamente estudada, a utilização de xilose como fonte de carbono para cultivos microalgais não está elucidada até o momento. Geralmente a assimilação da xilose é avaliada em combinação com outras fontes de carbono. Neish (1951) avaliou carboidratos sobre o crescimento de *Chlorella vulgaris*. Os resultados mostraram que D-glicose, D-frutose, D-galactose e β -glicosídeos são boas fontes de carbono e energia para o crescimento das algas. No entanto as pentoses, incluindo a D-xilose, causavam pouca ou nenhuma estimulação no crescimento microalgal. Recentemente, estudos têm sido realizados buscando avaliar a capacidade de diferentes cepas de microalgas em assimilar as pentoses, bem como possíveis rotas metabólicas envolvidas no processo (CHAI et al., 2018; FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017; JUÁREZ et al., 2011; ZHENG et al., 2014).

3.3 BIOPRODUTOS DE ORIGEM MICROALGAL

Os estudos com microalgas foram intensificados a partir de 1970. Com a crise do petróleo, estudiosos buscavam alternativas para obter combustíveis que pudessem suprir a demanda mundial. A capacidade das microalgas em converter a luz solar, CO₂ e nutrientes em biomassa rica em óleo para posterior obtenção de bioenergia foi tratada como opção aos combustíveis fósseis (BENEMANN, 1997). No entanto, as aplicações potenciais da biomassa de algas vão além de bioenergia e biocombustíveis, destaca-se também sua aplicação nas indústrias alimentícias, de rações, farmacêuticas e químicas (PANDEY et al., 2014). A

matéria seca das microalgas consiste principalmente de carboidratos, proteínas e lipídios, juntamente com vitaminas, minerais e outros metabólitos em menor proporção. Mais de quinze mil compostos foram identificados nas algas (CARDOZO et al., 2007), muitos desses com relevância comercial, tais como pigmentos, ácidos graxos, enzimas, polímeros, peptídeos, toxinas, esteróis, polissacarídeos (ABD EL-BAKY; EL-BAROTY, 2013; PULZ; GROSS, 2004; SPOLAORE et al., 2006).

3.3.1 Lipídios

O acúmulo de lipídios nas células das microalgas, bem como ocorre para outros micro-organismos, depende de fatores como a temperatura de crescimento, o pH, os desequilíbrios nutricionais do carbono, nitrogênio, fósforo e silicato. O regime de crescimento (autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico), bem como a idade da cultura e as especificidades das cepas dos micro-organismos também influenciam a produção de lipídios (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Estudos relatam que os teores de lipídios podem variar de 20 a 50 % da biomassa seca para microalgas como *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, e *Tetraselmis* (CHEN et al., 2018; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Os lipídios das microalgas podem ser divididos em dois grupos de acordo com as suas estruturas, os lipídios não polares neutros como ácidos graxos livres, ceras e ésteres esterfílicos e os lipídios polares, como, fosfoglicerídios. Entretanto, os principais lipídios de armazenamento nas microalgas são os neutros (GE et al., 2017).

Entre os lipídios neutros gerados pelas microalgas estão os poli-hidroxialcanoatos (PHAs), biopolímeros acumulados intracelularmente como fonte de reserva energética, que além de serem biodegradáveis, podem ser utilizados em diversas áreas, como alimentícia, médica, agricultura, entre outras. Os biopolímeros vêm se destacando devido a facilidade de descarte, já que estes quando depositados em aterros, são naturalmente degradados a água e dióxido de carbono.

A produção de biopolímeros por micro-organismos fotossintéticos tais como as microalgas, apresenta dupla vantagem, pois enquanto fixam o CO₂ ou resíduos agroindustriais reduzem a concentração desses contaminantes e produzem plásticos biodegradáveis que não representam riscos ao meio ambiente. Algumas microalgas podem produzir naturalmente pequenas quantidades PHAs (CAMPBELL; STEVENS; BALKWILL, 1982; MARTINS et al., 2014). Entre as cianobactérias já conhecidas como produtoras de PHAs podem ser citadas a *Chlorogloeafritschii* (primeiro relato de poli-hidroxibutirato (PHB) em cianobactéria), *Spirulina* spp., *Aphanathece* spp., *Gloeotheca* spp. *Synechococcus* spp., *Synechocystis* spp.,

Gleocapsa spp., *Nostoc* spp., *Microcystis aeruginosa*, *Trichodesmium thiebautii*, *Oscillatorialimosa* spp. e *Gloeotheca* spp (BALAJI; GOPI; MUTHUVELAN, 2013). A produção de biopolímeros por microalgas esteve até pouco tempo restrita as algas verdes azuladas (cianobactérias), entretanto, trabalhos demonstraram a possibilidade de produção de PHAs também por microalgas verdes (CASSURIAGA et al., 2018; KAVITHA et al., 2016).

A possibilidade de utilização dos PHAs produzidos por bactérias, cianobactérias e outros organismos para aplicações industriais ainda são limitados devido ao alto custo do cultivo microbiano quando comparado aos plásticos derivados de petróleo (BALAJI; GOPI; MUTHUVELAN, 2013). Diversas estratégias de aprimoramento da produção de PHAs a partir de micro-organismos estão sendo testadas, desde alteração de nutrientes a modificações genéticas que permitem que as células produzam PHAs em níveis mais altos do que a sua capacidade natural. A limitação de nitrogênio e fósforo estimula o acúmulo de PHA, desviando efetivamente as reservas de energia e carbono para sua síntese. O conteúdo destes biopolímeros pode ser aumentado ainda mais, completando o meio de cultivo com acetato, levando a um fluxo aumentado de acetil-CoA necessário para a síntese (KHETKORN et al., 2016; MARTINS et al., 2014; MIYAKE; ERATA; ASADA, 1996; PANDA; SHARMA; MALLICK, 2005; WU; WU; SHEN, 2001).

3.3.2 Pigmentos

As microalgas são produtoras de diversos pigmentos, que metabolicamente tem funções tanto na absorção de luz para fotossíntese, como para fotoproteção. Os carotenoides, ficobiliproteínas e clorofilas exibem cores que variam do verde ao amarelo, marrom e vermelho. Esses pigmentos são obtidos de diferentes microalgas e podem ser utilizados como corantes naturais, destacando-se a ficocianina (pigmento azul de *Spirulina*), β -caroteno (pigmento amarelo de *Dunaliella*) e astaxantina (pigmento amarelo a vermelho de *Haematococcus*) (MEIXNER et al., 2018; QU et al., 2020; SINGH et al., 2019).

Os carotenoides são pigmentos naturais, lipofílicos, insolúveis em água, mas solúveis em solventes como acetona, álcool e clorofórmio. Esses pigmentos são amplamente distribuídos na natureza e apresentam coloração amarela, laranja e vermelha, e estão presentes em vegetais e micro-organismos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). Do ponto de vista químico, os carotenoides possuem estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente, criando uma molécula simétrica com 40 carbonos. Muitos outros carotenoides podem derivar-se dessa estrutura primária, através de modificações químicas como a ciclização, hidrogenação, desidrogenação, encurtamento ou extensão de cadeia,

isomerização ou combinação desses e de outros processos (AKSU; EREN, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

As ficobiliproteínas são pigmentos de absorção de luz, comumente presentes em cianobactérias. De acordo com a sequência de aminoácidos e propriedades espectroscópicas, elas podem ser divididas em três classes, consistindo em pigmentos de cor vermelha como a ficoeritrina ou de cor azul como a c-ficocianina e aloficocianina (BEGUM et al., 2016). Na maioria das cianobactérias, a principal ficobiliproteína é a C-ficocianina. A ficocianina é aproximadamente 20 % do total de proteínas presentes na biomassa de algumas microalgas (VONSHAK, 1997). A importância industrial é, principalmente, devido as propriedades antioxidante e anti-inflamatória (BEGUM et al., 2016).

O pigmento responsável pela coloração verde observada na maioria das plantas e microalgas é a clorofila. Existem diversos tipos de clorofila, entretanto, todas contêm em sua estrutura anel de porfirina em torno de um íon magnésio e uma longa cauda de hidrocarboneto acoplada. O tipo mais importante é a clorofila-a, encontrada em todas as plantas, algas e cianobactérias. A clorofila-b, ocorre apenas em algas verdes e em plantas, enquanto a clorofila-c, é encontrada apenas nos membros fotossintéticos do reino Chromista, bem como organismos unicelulares conhecidos como dinoflagelados (EASTAUGH et al., 2013). Quando em solução, a estrutura química da clorofila é menos intensa em pHs ácidos do que em básicos, devido a formação de agregados do monômero de clorofila-a. Nessas condições, os íons de magnésio no centro da molécula clorofila-a são substituídos por dois íons de hidrogênio e convertidos em feofitina (QU et al., 2020). Essa propriedade pode ser explorada para ser utilizada como indicador colorimétrico de pH.

3.4 AÇAÍ

O açaí é um dos mais conhecidos e mundialmente explorados alimentos da Amazônia, devido a polpa rica em biocompostos. Os principais constituintes encontrados em base seca de seu fruto são lipídios (50 %), fibras (25 %), proteínas (10 %) e carboidratos (3,5 %) (glicose, frutose e sacarose). O açaí também é fonte de pigmentos como as antocianinas, clorofila e carotenoides, além de compostos orgânicos como fósforo, sódio, zinco, ferro, manganês, cobre, boro, cromo, cálcio, magnésio, potássio e níquel (COSTA et al., 2013; RUFINO et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2015).

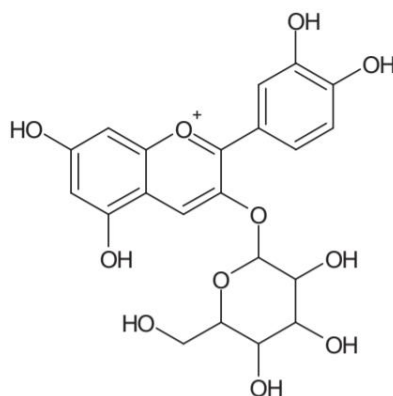
O açaí pode ser obtido na região tropical da América Central e do Sul, mais especificamente na região amazônica. Nessa região, existem cerca de 28 espécies identificadas, sendo as três mais frequentes a *Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria* e *Euterpe*

edulis. A espécie *E. oleracea*, uma das mais comercialmente exploradas é também conhecida como açaí do Pará. Esta pode ser encontrada em áreas florestadas próximas ao rio Amazonas em estados brasileiros como Pará, Maranhão, Tocantins, Amapá, além de países como Guiana e Venezuela (YAMAGUCHI et al., 2015).

Os frutos do açaizeiro são globulares, compostos por uma semente rígida, mesocarpo e casca. O fruto tem de 0,9 a 1,3 cm de diâmetro e são verdes quando imaturos, vermelhos no estágio médio e roxo escuro quando maduros (HENDERSON, 1995). Dentre os principais benefícios estudados dos frutos do açaí estão a atividade antioxidante e anti-inflamatória (ALCÁZAR-ALAY et al., 2017; PEIXOTO et al., 2016; RUFINO et al., 2010). Para fins de comparação, o açaí apresenta maior atividade antioxidante (capacidade de retenção do radical ABTS) frente a frutos da Amazônia como abiu, acerola, araçá-boi, bacaba, bacuri, buriti, cajá, cajarana, cupuaçu, caju, graviola, murici, noni e tamarindo (CANUTO et al., 2010).

A atividade biológica do açaí fruto está ligada à sua composição. Mais de 90 substâncias foram descritas, como flavonoides (31 %), compostos fenólicos (23 %), lignóides (11 %), antocianinas (9 %), entre outros em menor proporção, como quinonas, terpenos e norisoprenóides. A antocianina é um dos compostos responsáveis pela cor de frutos, como a cor roxa do açaí maduro (CARVALHO et al., 2017). As espécies de açaizeiro foram caracterizadas pela predominância de cianidina-3-glicosídeo (Figura 1) e cianidina-3-rutinosida em seus frutos. A diferença entre as espécies está na presença de pelargonidina-3-glucosídeo em *E. precatoria*, e peonidina-3-rutinosida em *E. oleracea*.

Figura 1 - Estrutura química de cianidina-3-glicosídeo.



As antocianinas são biocompostos sensíveis as variações de pH. Em pH ácido, as antocianinas apresentam coloração vermelha intensa, enquanto em pH mais básico podem variar de cinza a verde. Ao baixar o pH de uma solução, íons H^+ são adicionados a solução contendo antocianina. A antocianina tem o H ligado ao seu O, incorporando o íon H , o que

por sua vez modifica a estrutura e características visuais. Já em solução básica, a adição de íons hidroxila (OH^-) sequestra o H da estrutura da antocianina, alterando sua estrutura novamente. De acordo com Choi et al. (2017), a variação observada no comprimento de onda de absorção da antocianina em diferentes valores de pH é chamado de deslocamento batocrômico e é atribuído a formação de carbinol pseudobase. Este deslocamento pode ser explorado para o desenvolvimento de indicadores de pH naturais.

3.5 EMBALAGENS ATIVAS E INTELIGENTES

Um dos setores que passou a ganhar destaque na aplicação de biocompostos, diz respeito as embalagens alimentícias. As embalagens apresentam um papel significativo na cadeia produtiva de alimentos, uma consequência de suas múltiplas funções (AHVENAINEN, 2003; JORGE, 2013). As funções básicas das embalagens como facilitação do transporte e distribuição, identificação do produto e do fabricante, atuação como agente de comunicação entre o produtor e o consumidor são amplamente conhecidas (GAVA, 1984). Porém, os avanços na produção, distribuição, armazenamento e venda dos produtos alimentícios, decorrentes da demanda dos consumidores por maior segurança e qualidade, requerem que as embalagens desempenhem novas funções. O desafio de fornecer proteção, qualidade, frescor e segurança aos produtos, com utilização mínima de aditivos tornam as embalagens ferramentas importantes na indústria de alimentos (AHVENAINEN, 2003; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014). Nesse contexto, emergiram as chamadas embalagens ativas e inteligentes principalmente nas funções de proteção e comunicação, respectivamente.

Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), embalagens ativas são aquelas que em contato com o alimento, adsorvem ou liberam substâncias que atuam na melhora da qualidade ou permitem elevar a vida útil do produto através da aplicação por exemplo de antimicrobianos (KIM et al., 2002; PIRES et al., 2008) ou antioxidantes (BARBOSA-PEREIRA et al., 2014; LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012; RAMOS et al., 2014). Já as embalagens inteligentes são aquelas que detectam parâmetros que caracterizam as alterações dos alimentos ou ambiente, como por exemplo presença de oxigênio (LÓPEZ-CARBALLO et al., 2019), alterações de pH (DING et al., 2020), temperatura (BRIZIO; PRENTICE, 2015), dentre outros.

As embalagens ativas e inteligentes são importantes ferramentas para a indústria de alimentos no desenvolvimento de métodos ou dispositivos precisos, econômicos, rápidos, confiáveis, não invasivos e não destrutivos para avaliação da qualidade em tempo real

(RUKCHON et al., 2014). Dentro desse grupo, os indicadores colorimétricos recebem ampla atenção por permitirem a obtenção por parte dos consumidores de informações objetivas de forma simples, através das alterações visíveis de cor (SALIU; DELLA PERGOLA, 2018a; ZHAI et al., 2017).

3.6 SENSORES DE PH PARA EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS

Durante o crescimento microbiano ou ocorrência de reações químicas que podem levar a deterioração de alimentos há formação de compostos que alteram o pH, o que permite que os sensores de pH sejam utilizados como embalagens inteligentes (DAGNAS; ONNO; MEMBRÉ, 2014; MA et al., 2018; WEI et al., 2017). Esses sensores geralmente consistem em duas partes, uma base sólida e um corante sensível a mudanças de pH (POURJAVAHHER et al., 2017).

Para o desenvolvimento desses sensores podem ser utilizados tanto materiais de origem petroquímica quanto de origem natural. Este último apresenta como principais vantagens sua maior segurança para aplicações que exijam seu contato com os alimentos além de serem mais bem aceitos pelos consumidores (GOLASZ; SILVA; SILVA, 2013). Assim, destacam-se os pigmentos naturais que podem ser utilizados como indicadores de pH.

Filmes de amido e polivinil álcool adicionados de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* foram utilizados para o desenvolvimento de sensores para acompanhamento do frescor de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) (ZHAI et al., 2017). Três formulações desenvolvidas de filme com concentrações de 30 (SPVA-30), 60 (SPVA-60) e 120 (SPVA-120) mg de antocianinas por 100 g de amido, foram armazenadas juntamente com as amostras de carpa durante 165 h a 4 °C, e acompanhou-se além da variação de cor dos sensores os valores de nitrogênio das bases voláteis totais (TVB-N). Os valores de TVB-N consiste na quantificação de aminas e amônia que são formadas durante o processo de deterioração do pescado, indicando seu estado de frescor (HOWGATE, 2010). De acordo com o descrito por ZHAI et al. (2017) os valores iniciais de TVB-N era de 6,61 mg/ 100g e os indicadores apresentavam coloração púrpura (SPVA-30), rosa (SPVA-60) e vermelha (SPVA-120). Ao longo do tempo de armazenamento a elevação dos valores de TVB-N aumentaram o pH do sistema para valores mais básicos, o que levou a alteração das cores para amarelo (SPVA-30 após 135 h), verde (SPVA-60 após 150 h) e roxo (SPVA-120 após 135 h). Todos os filmes testados apresentaram variação de cor rápida ligadas à variação dos teores de TVB-N o que demonstra a sua capacidade de serem utilizados como indicadores de qualidade desse pescado.

Além dos indicadores naturais, a nanotecnologia é uma das ferramentas utilizadas para a evolução de embalagens, principalmente na área alimentícia (MEI; WANG, 2020; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014). A incorporação de nanoestruturas em materiais de embalagem melhora o desempenho e funcionalidade desses materiais, permitindo que nos últimos anos ocorresse um rápido progresso nas propriedades de barreira, atividade antimicrobiana, incorporação de sensores e melhoria de propriedades como biodegradabilidade e biocompatibilidade (CERQUEIRA; VICENTE; CASTRO, 2018; MEI; WANG, 2020).

A nanotecnologia é objeto de estudo no mundo todo. Existe ainda muitas incertezas sobre o assunto, desde a mais simples como, “o que é nano?”. A palavra, "nano" é utilizada para descrever várias quantidades físicas dentro da escala de um bilionésimo como nanômetro (comprimento), nanosegundo (tempo), nanograma (massa) e nanofarad (carga) (KIM et al., 2018; KULKARNI, 2015). Fisicamente falando, nanoestrutura é qualquer estrutura com uma ou mais dimensões em escala nanométrica (10^{-9} m) (KULKARNI, 2015).

3.7 NANOFIBRAS

Dentre os diferentes materiais, dimensões, formas e funções de nanoestruturas que vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de embalagens para alimentos, as nanofibras recebem destaque por seu diâmetro reduzido, elevada área superficial e elevada porosidade (SHANG; LIN; THEATO, 2017). Historicamente, o termo fibra vem do Latin (alongado) e nano é de origem Grega “*nanos*” que se refere a algo muito pequeno. Polímeros que quando processados por metodologias específicas dão origem a filamentos com alguns nanômetros de diâmetro que são chamados de nanofibras. Os estudos com nanofibras tem como objetivo o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica que apresentem características físico-químicas diferenciadas. Suas propriedades favorecem a aplicação desde roupas tecnológicas a indústria aeroespacial (HAMRANG et al., 2015).

Nanofibras de nylon 6 adicionadas de mistura de corantes (vermelho de fenol, vermelho de metila, azul de bromotimol, fenolftaleína e verde de bromocresol) foram testadas como indicadores de pH por Agarwal et al. (2012). As nanofibras apresentaram variação de cor do rosa (pH 1) para verde (5 a 7) até azul (pH 10). Os valores de ΔE (Diferença de Cor Total) foram superiores a 12, sendo assim a variação de cor não só é percebida pelo olho humano, como as cores assumidas pelo sensor ocupam espaços de cor diferentes. Exposição a temperatura extremas (100 °C e -70 °C durante 24 h) foi utilizada para testar a estabilidade do sensor proposto. De acordo com os autores o comportamento halocrômico e a estrutura física

do nanosensor não foram afetados pela temperatura. Nenhuma alteração na sensibilidade a alteração de pH foi percebida no sensor, mesmo após 6 meses a temperatura ambiente, demonstrando também que o sensor proposto pelos autores possui estabilidade cinética.

Em outro estudo, um sensor colorimétrico a base de nanofibras de acetato de celulose e alizarina foi utilizado como indicador de frescor de filés de truta arco-íris (AGHAEI et al., 2018). Os filés de peixe foram mantidos a 4 °C por 12 dias, sendo acompanhados os parâmetros TVB-N, pH, contagem de micro-organismos viáveis e colorimetria. Durante esse período os valores de TVB-N, pH, contagem de micro-organismos viáveis sofreram elevações acompanhando a deterioração do produto. Os valores máximo e mínimo de ΔE foram 30,5 e 7,8 no 12º e 2º dia, respectivamente. Essa tendência de aumento dos valores demonstra que o nanosensor pode indicar as alterações visuais da cor com a modificação do valor de pH. Não foram observadas alterações de cor em 48 horas, mas após esse período (4º dia), uma cor vermelho-tijolo foi observada quando o pH estava na faixa de 6,6, tornando-se mais escura no 6º dia (pH= 6,7). Ao final do armazenamento (12º dia) o sensor apresentava coloração violeta com pH=7, teores de TVB-N de 22,4 mg N/100 g e contagem de micro-organismos viáveis de 10^7 unidades formadoras de colônia por g de amostra (UFC/g).

Nanofibras de nylon-6 adicionadas de uma mistura dos corantes roxo de bromocresol, vermelho de fenol e fenolftaleína foram utilizadas como indicadores de adulteração de leite por Tripathy et al. (2019). Para amostras de leite puro (pH 6,6 a 6,9), foi observada cor esverdeada nas nanofibras, entretanto na faixa $5,2 < \text{pH} < 6,5$ as fibras apresentavam coloração tendendo ao amarelo e quando imersas em amostras de leite adulteradas com NaOH, as nanofibras apresentaram cor púrpura. Os autores testaram a eficiência do sensor colorimétrico proposto frente a diferentes adulterantes comerciais como hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, ureia, ácido salicílico, ácido bórico e amido. A presença de adulterantes que alteram a acidez do leite foi facilmente detectada utilizando o sensor de pH proposto. Adulterantes como ureia e amido não induziram alterações significativas na acidez do leite quando usados em quantidades menores e, portanto, permaneceram não detectados em tais faixas.

Além de corantes sintéticos e suas misturas, os sensores desenvolvidos com nanofibras podem utilizar compostos naturais como indicadores colorimétricos. Por exemplo, fibras ultrafinas (tamanhos médios de 477 a 510 nm) de zeína adicionadas 3, 4 e 5 % de antocianinas de repolho roxo (*Brassica oleracea* L.) foram testadas como indicadores de pH (PRIETTO et al., 2018b). De acordo com os autores, o uso de 5 % de antocianinas permitiu

uma maior variação de cor do que as demais concentrações testadas, tendo as fibras variado da coloração vermelho (pH 1) para azul (pH em torno de 7) chegando à coloração verde (pH 10). Essas variações visuais de coloração foram quantificadas numericamente através do cálculo de ΔE apresentando a maioria valores superiores a 5, demonstrando que as mudanças de cor dos sensores são percebidas pelo olho humano, sendo de grande importância para o desenvolvimento de sensores colorimétricos.

Sensores de pH desenvolvidos a partir de nanofibras de celulose bacteriana e antocianinas de cenoura roxa foram utilizados para acompanhamento de qualidade de truta arco-íris e carpa comum. Nos testes colorimétricos o indicador apresentou cor vermelha quando exposto a pH 2, passando para coloração rosa em pH 3 e 4. Em pH 5 e 6, a cor rosa ficou mais pálida e em pH 7 tornou-se azul brilhante com maior intensidade em pH 8 e 9. Em pH básico o indicador assumiu coloração acinzentada. Durante os testes de qualidade dos filés de peixe o indicador fabricado exibiu alterações visuais de cores durante o armazenamento (15 dias a 4 °C), permitindo a obtenção de forte e positiva correlação entre os valores de ΔE do indicador e a contagem total de micro-organismos psicrofílos ($R = 0,952$ e $0,991$) e valores de nitrogênio das bases voláteis totais (TVB-N) ($R = 0,815$ e $0,92$) em amostras de truta arco-íris e carpa comum, respectivamente (MORADI et al., 2019).

Sensores de pH formulados a partir da incorporação de antocianinas de repolho roxo em matrizes de Poli(álcool polivinílico) (PVA) foram utilizados por Maftoonazad; Ramaswamy (2019), como bioindicadores para acondicionamento de tâmaras. Os sensores desenvolvidos apresentaram coloração avermelhada (pH 1), passando para violeta (pH 5), azul (pH 9) verde (pH 11) até amarelo (pH 12) com valores de ΔE variando de 9 até 151. As alterações de pH das tâmaras durante armazenamento a 5 e 25 °C foram acompanhadas utilizando-se tanto um medidor padrão de pH como através das mudanças de cor dos bioindicadores. No início do armazenamento medido estava entre 6,7 e 6,9, com os indicadores apresentando coloração violeta-azulada. As amostras armazenadas a 25 °C apresentaram uma ligeira alteração de cor em 72 h, após esse período a coloração mudou de forma progressiva para violeta acompanhando a queda de pH para 5 em 10 dias. Para os produtos armazenados a 5 °C, a redução do pH até 6,2 foi gradual durante 12 dias com mudanças mais nítidas de coloração entre o 12º e 20º dia de armazenamento, onde o indicador assumiu coloração violeta ao atingir pH entre 5 e 5,5.

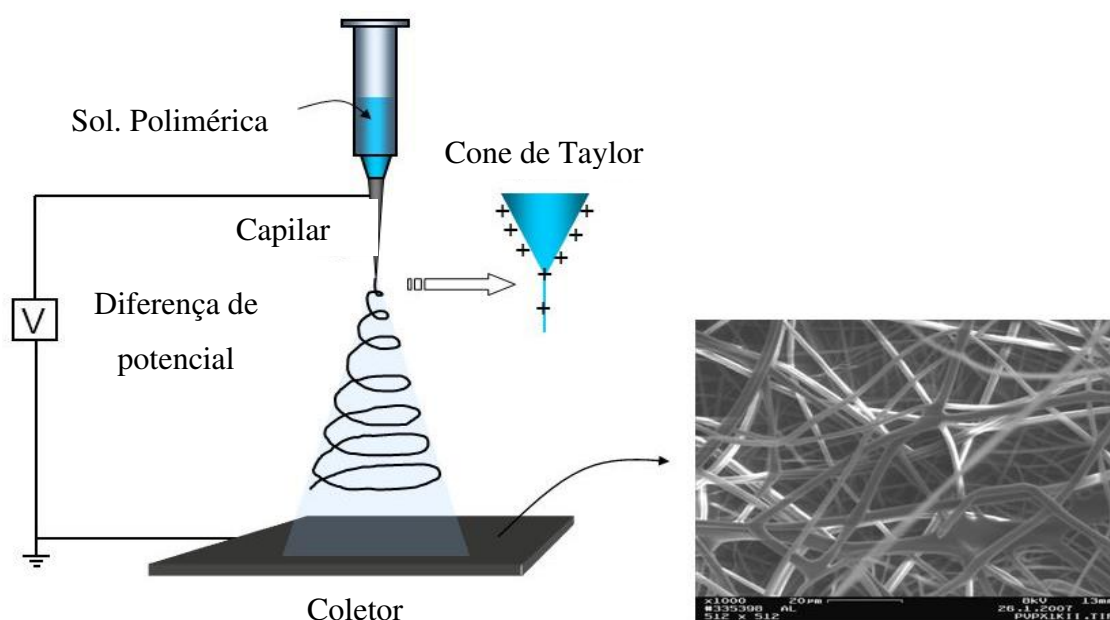
Uma das ferramentas com maior capacidade de aumento de escala de processo e manutenção da qualidade dos sensores produzidos é a técnica de *electrospinning*. Com ele, é possível produzir nanofibras contendo os compostos indicadores que mostrarão as variações

de qualidade de um alimento. Diferentes técnicas de fabricação de nanofibras podem ser aplicadas, essas são classificadas em dois tipos principais: *top-down* e *bottom-up*. Na primeira técnica pode ser utilizado tratamento químico e/ou mecânico para reduzir materiais complexos a nanoescala, por exemplo a decomposição química da madeira a nanofibras de celulose (BARHOUM et al., 2019). Na técnica de *bottom-up* são geralmente utilizadas para a fabricação de nanofibras a partir da constituição de moléculas e incluem *electrospinning* (LEE et al., 2018) e *handspinning* (LEE et al., 2016). No entanto, o *electrospinning* é a técnica mais utilizada devido à sua simplicidade e configuração de baixo custo (BARHOUM et al., 2019).

3.8 ELECTROSPINNING

O equipamento de *electrospinning* consiste em três componentes principais: fonte de alimentação de alto potencial elétrico, reservatório de polímero com ponteira (agulha) e placa coletora (Figura 2). Neste método, são utilizados dois eletrodos: um está ligado à solução polimérica através da agulha e outro é conectado ao coletor, que geralmente é uma folha metálica (RAMAKRISHNA, 2005). O conceito básico da técnica é empregar repulsão eletrostática nos jatos de polímeros carregados para produzir nanofibras orientadas aleatoriamente ou alinhadas na superfície do coletor (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Figura 2 - Esquema de produção de nanofibras poliméricas pela técnica de electrospinning.



A obtenção de nanofibras pode ser descrita em cinco etapas. Na primeira etapa a seringa é preenchida com solução polimérica e essa solução é carregada por elevado potencial variando de 10 a 60 kV. A segunda etapa consiste na formação do cone de jato (Cone de

Taylor), onde através da variação na tensão aplicada sobre a solução polimérica há alteração na polaridade do fluido que atrai a camada superficial da gota em direção ao coletor (carga contrária), deformando a gota na ponta da agulha a uma estrutura cônica, conhecida como cone de Taylor. Além de densidade de carga crítica, o cone de Taylor torna-se instável e o jato de fluido é ejetado da ponta do cone em direção ao coletor. Na terceira etapa o jato formado percorre o trajeto capilar ao coletor, formando um filamento líquido fino e contínuo. A quarta etapa consiste na aceleração do filamento por efeito do campo elétrico, que distorce o trajeto da fibra antes de chegar ao coletor. A quinta etapa consiste na coleta das nanofibras. As fibras carregadas deslocam-se para o coletor até ocorrer o seu impacto com a placa coletora (GHORANI; TUCKER, 2015; JAWOREK et al., 2009; KAI; LIOW; LOH, 2015; RAMAKRISHNA, 2005; SENTHIL MUTHU KUMAR et al., 2019).

Segundo Ramakrishna (2005), os principais fatores que podem influenciar a formação de nanofibras pelo processo de *electrospinning* estão relacionados as características da solução polimérica e aos parâmetros do processo. As características físico-químicas da solução polimérica apresentam relação com o diâmetro e qualidade das fibras produzidas. A massa molecular do polímero, bem como a concentração da solução polimérica alteram a viscosidade da solução, produzindo fibras de diferentes diâmetros, porosidade e uniformidade. Quanto maior a massa molecular do polímero, maior o emaranhado molecular em solução, o que aumenta a viscosidade. Em soluções de elevada viscosidade, ocorre a formação de fibras de maior diâmetro, além de dificultar o bombeamento e ocorrer evaporação da solução na ponta da agulha. Já em soluções com baixa viscosidade, ocorre formação de gotículas ao longo das fibras (SENTHIL MUTHU KUMAR et al., 2019). A condutividade da solução polimérica também tem efeito sobre a fibra produzida. Para que ocorra a formação do cone de Taylor, a solução polimérica necessita certa condutividade, esta pode ser aumentada pela adição de sal, polieletrólito ou ainda pela adição de fármacos e proteínas que se dissociam em íons quando dissolvidos. Essa modificação conduz à maior instabilidade de flexão levando à maior área de deposição da fibra formada, como resultado o percurso do jato é aumentado e são formadas fibras mais finas (HAMRANG; BALKÖSE, 2015).

As condições de processo que podem influenciar no diâmetro das fibras são: potencial elétrico, temperatura, taxa de alimentação, diâmetro da agulha, umidade relativa, e distância do injetor ao coletor (HAMRANG; BALKÖSE, 2015). É importante observar que todos os parâmetros exibem valores ideais de operação para diferentes polímeros, sendo necessário estudo detalhado a cada batelada de experimentos. O potencial elétrico aplicado sobre a solução polimérica altera a estabilidade do cone de Taylor. Em baixo potencial, o cone

de Taylor não é formado, desfavorecendo a produção de nanofibras. Entretanto, ao elevar a tensão de operação o jato acelera rapidamente, dando origem ao cone de Taylor menor e instável (EDMONDSON, 2013).

Em temperaturas elevadas, a viscosidade da solução polimérica diminui e a taxa de evaporação se eleva, o que permite maior alongamento da solução e produção de fibras uniformes. A taxa de alimentação também influencia no diâmetro da fibra, pois quanto maior a vazão da solução polimérica na extremidade do injetor, maior o diâmetro (KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018).

Em relação ao diâmetro do capilar, a utilização de diâmetros pequenos minimiza os efeitos de obstrução devido a menor exposição da solução à atmosfera e leva à formação de fibras com menor diâmetro. Entretanto, orifícios muito pequenos apresentam a desvantagem da formação de gotículas de solução ao invés de fibras (SENTHIL MUTHU KUMAR et al., 2019). O coletor do *electrospinning* deve ser de material condutivo, pois coletores de material não condutivos reduzem a quantidade de fibra que está sendo depositada, resultando em menor densidade de empacotamento. Coletores rotativos são úteis na obtenção de fibras secas, pois fornecem mais tempo para evaporação do solvente (HAMRANG; BALKÖSE, 2015).

Diferentes polímeros podem ser utilizados para produção de nanofibras, como poliácido láctico (PLA) (SCHMATZ; COSTA; MORAIS, 2019), Policaprolactona (PCL) (SAMANTA et al., 2017), Poli-óxido de etileno (PEO) (KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018), entre outros (KUK et al., 2014; SENTHIL MUTHU KUMAR et al., 2019).

3.9 Polímeros

A policaprolactona (PCL) é um poliéster biodegradável, de baixo custo, ponto de fusão de cerca de 60 °C e temperatura de transição vítrea de cerca de - 60 °C. Por apresentar degradação das suas ligações ésteres em condições fisiológicas (como no corpo humano), tem recebido muita atenção para utilização como biomaterial implantável. Vários fármacos foram encapsulados em esferas de PCL para liberação controlada e para o fornecimento de medicamentos específicos (MCKEEN, 2012). As mesmas características que fazem o PCL ser bom polímero para implantes, também o tornam alternativa para o desenvolvimento de sensores que ficarão em contato direto com alimentos.

As principais aplicações do PCL incluem garrafas biodegradáveis; películas biodegradáveis; liberação controlada de medicamentos, pesticidas e fertilizantes; processamento de polímeros; adesivos; suporte para tecidos e moldes ortopédicos. Na produção de nanofibras por *electrospinnig*, este polímero passou a ser utilizado como suporte para diversos biocompostos, como dexametasona (RUBERT et al., 2014), ficocianina

(SCHMATZ; COSTA; MORAIS, 2019), biopeptídios (GONÇALVES et al., 2017), entre outros.

O poli-óxido de etileno (PEO) é um polímero neutro, não tóxico, solúvel em água e que apresenta biocompatibilidade. Dentre as aplicações mais comuns desse polímeros estão os cosméticos para a pele, emulsões, lubrificantes, entre outros produtos farmacêuticos (THEODOSOPOULOS et al., 2017). O polímero PEO vem sendo estudado individualmente ou na formulação de blendas poliméricas para atuar como suporte a biocompostos como quitosana (KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018), biomassa (MORAIS et al., 2010) e proteína microalgal (MOREIRA et al., 2018), e ficocianina (FIGUEIRA et al., 2016).

A aplicação desses polímeros é limitada as características físico químicas de ambos. O PEO, como citado é um composto solúvel em água, logo é muito bom suporte a compostos hidrossolúveis que se deseja a liberação controlada. Mas nem sempre é interessante a liberação do composto encapsulado, pois há casos em que o composto deve interagir com o meio externo sem que seja liberado da matriz. Nesse caso, a formação de blendas (combinação de polímeros) se torna útil, uma vez que a característica de um determinado polímero pode ser alterada em direção as características de um outro (KUK et al., 2014; QIU; IKEHARA; NISHI, 2003; SAMANTA et al., 2017).

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, onde cada etapa gerou 2 artigos científicos que serão submetidos para publicação em periódico qualificado de circulação internacional, de acordo com o QUALIS. O artigo 3, intitulado “*Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (Euterpe oleracea) extract*”, foi publicado no periódico *Food Chemistry* em 2019, encontra-se disponível pelo doi 10.1016/j.foodchem.2019.05.059

A primeira etapa foi realizada na Universidade de Bielefeld - Alemanha, por meio do projeto intitulado “Desenvolvimento de sistemas de cultivo sustentáveis para a produção de microalgas”, no período em que foi realizado o Doutorado Sanduíche. Na Alemanha, o trabalho foi supervisionado pelo Prof. Dr. Olaf Kruse, no qual foi estudado a utilização de diferentes fontes de carbono para o cultivo de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri*. Também foi avaliado a produção de lipídios e pigmentos quando as cepas *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri*, *Chlorella fusca* LEB 111 e *Spirulina* sp. LEB18 foram cultivadas com xilose como fonte de carbono e redução de nitrogênio.

A segunda etapa, realizada no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MiBi) da Universidade federal do Rio Grande – FURG, consistiu em produzir sensor colorimétrico pela técnica de *electrospinning* utilizando de extrato de açai como indicador. Esta etapa está associada ao projeto “Centros de Vocação Tecnológica (CVT's) das Agrobiodiversidades Bailique-Rio Grande”, que busca elevar a capacidade socioeconômica da população do Arquipélago do Bailique – AP, pela formação de mão de obra qualificada, bem como, pelo desenvolvimento e divulgação de trabalhos que utilizem produtos oriundos da região, como é o caso do açai. Por fim, o indicador produzido foi melhorado combinando pigmentos do açai e das microalgas.

Diante do exposto, foram produzidos 4 artigos:

Artigo 1: CRESCIMENTO DE *Chlamydomonas komma* E *Parachlorella kessleri* CULTIVADAS COM CO₂ (C1), PENTOSE (C5) E GLICOSE (C6) COM FONTES DE CARBONO

Artigo 2: ACÚMULO DE LIPÍDIOS NEUTROS ESTIMULADO EM MICROALGAS CULTIVADAS COM XILOSE COMO FONTE DE CARBONO

Artigo 3: INOVADORES SENSORES DE pH DESENVOLVIDOS A PARTIR DE FIBRAS ULTRAFINAS CONTENDO EXTRATO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*)

Artigo 4: SENSOR COLORIMÉTRICO DE pH BASEADO EM NANOFIBRAS CONTENDO EXTRATOS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) E MICROALGAS (*Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111)

ARTIGO 1

**CRESCIMENTO DE *Chlamydomonas komma* E *Parachlorella kessleri* CULTIVADAS
COM CO₂ (C1), PENTOSE (C5) E GLICOSE (C6) COM FONTES DE CARBONO**

RESUMO

Microalgas são naturalmente responsáveis por parte da fixação dos crescentes volumes de dióxido de carbono (CO₂) gerados no planeta. Além do CO₂ que é C1, outras substâncias podem ser assimiladas por esses micro-organismos, dentre elas C5 (exemplo pentoses) e C6 (monossacarídeos como a glicose). No entanto, nem todas as microalgas têm capacidade de assimilação desses açúcares, sendo necessário que cada espécie seja investigada separadamente. Com base nisso, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento das cepas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* cultivadas em fontes de carbono C1, C5 e C6. Para isso foram realizados cultivos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos com CO₂, xilose, arabinose, celobiose e glicose. A melhor resposta de produção de biomassa para a microalga *Chlamydomonas komma* foi obtida em regime mixotrófico com 3 % (m v⁻¹) de CO₂ e 1000 mg L⁻¹ de xilose, enquanto a cepa *Parachlorella kessleri* apresentou melhor crescimento ao ser cultivada em regime mixotrófico com 3 % (m v⁻¹) de CO₂ e 5000 mg L⁻¹ de glicose. Assim, este estudo demonstrou o potencial da cepa *Chlamydomonas komma* em assimilar pentoses contribuindo para novas pesquisas que visem a melhoria do processo de assimilação desses compostos e o esclarecimento das rotas metabólicas envolvidas.

Palavras-chave: arabinose, celobiose, dióxido de carbono, microalga, xilose.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável, amparado pelo aproveitamento de resíduos e redução de gases do efeito estufa, está cada vez mais presente no cotidiano, não apenas como ideologia de vida, mas como necessidade de manutenção do meio ambiente. Dentre as ações que vêm sendo apoiadas ao longo dos últimos anos tem-se o incentivo às pesquisas relacionadas ao meio ambiente. Diversos estudos vêm sendo realizados com microalgas, uma vez que esses micro-organismos fotossintéticos podem se desenvolver em ambientes não favoráveis a outras fontes de biomassa. Entre as principais características das microalgas estão a capacidade de converter o dióxido de carbono (CO₂), resíduos solúveis e águas residuais em biomassas ricas em produtos como lipídios, carboidratos, proteínas e biopolímeros (COSTA; MORAIS, 2011; KAVITHA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; RAZZAK et al., 2013; SLEGERS et al., 2013).

Segundo dados da Agência Nacional Oceânica e Atmosférica (NOAA) dos Estados Unidos, a concentração de CO₂ na atmosfera atingiu 408 ppm em setembro de 2019. Esses valores vêm sendo superados ano após ano (NOAA, 2019). O carbono é um dos principais nutrientes requeridos para o crescimento microalgal e a principal via de assimilação por microalgas eucarióticas utiliza o CO₂. Assim, as microalgas são excelente alternativa para mitigar esse gás de efeito estufa proveniente da queima de combustíveis fósseis (CHEN; ZHAO; QI, 2015; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016). Outros resíduos que despertam a atenção de pesquisadores são os agroindustriais, uma vez que são fontes ricas em nutrientes tanto para o cultivo de plantas como de micro-organismos como fungos, bactérias e microalgas. Em países da América do Sul, como o Brasil, o bagaço de cana de açúcar é um dos principais resíduos agroindustriais (UDOP, 2019). A partir desse, é possível obter compostos como a celulose e as pentoses que por sua vez, podem ser utilizados como fonte de nutrientes para o cultivo de micro-organismos (SANTANA et al., 2017).

A utilização de açúcares de origem lignocelulósica, como as pentoses (C5) no cultivo de microalgas tem apresentado respostas satisfatórias quanto ao crescimento e produção de bioprodutos. A microalga *Chlorella fusca* LEB 111, quando cultivada com adição de xilose elevou a produção de polihidroxibutirato (PHB) para 17,4 % (m m⁻¹) (CASSURIAGA et al., 2018). *Chlorella minutíssima* ao ser cultivada com xilose e variação na intensidade luminosa apresentou alterações no seu perfil proteico e de carboidratos (FREITAS et al., 2017a). Essa cepa também aumentou seus parâmetros de crescimento ao ser cultivada na combinação de pentoses com CO₂ (FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017). A adição de baixas concentrações de glicose (C6) elevou a taxa de biofixação de CO₂ por

Chlorella vulgaris (FU et al., 2019). *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. apresentaram respostas diferentes quando cultivadas com xilose, na primeira cepa o efeito foi benéfico, elevando a produção de lipídeos enquanto que, na segunda não houve alteração em nenhum parâmetro de crescimento quando comparados ao controle (LEITE; PARANJAPE; HALLENBECK, 2016).

A compreensão das vias envolvidas na assimilação de pentose como fonte de carbono para microalgas segue como tema de diversos estudos. No cultivo de *Chlorella sorokiniana*, as enzimas xilose redutase (XR) ligada ao NAD(P)H e xilitol desidrogenase (XDH) ligada ao NADP⁺ são as responsáveis pela assimilação de xilose por essa microalga (ZHENG et al., 2014). A assimilação de açúcares pelas microalgas nem sempre é de fácil observação, visto que estes micro-organismos são geralmente adaptados a sua principal fonte de carbono e os genes necessários ao metabolismo de fontes alternativas de carbono podem estar suprimidos. Blifernez-Klassen et al. (2012) cultivaram *Chlamydomonas reinhardtii* com celulose como fonte de carbono e constataram que na presença de CO₂ as enzimas responsáveis pela quebra de celulose não foram observadas. Entretanto, ao retirar o CO₂ do meio de cultivo e suplementar com celulose, foi possível quantificar endo e beta-glucanases, que são as enzimas responsáveis pela quebra da celulose a açúcares mais simples, favorecendo a assimilação dos mesmos pelos micro-organismos.

Sendo assim, como nem todas as microalgas têm capacidade de assimilação de pentoses como fontes de carbono e sendo poucos os estudos que relatam esse assunto torna-se indispensável encontrar micro-organismos capazes de assimilar estes compostos. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento das cepas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* quando cultivadas em fontes de carbono CO₂, pentoses e glicose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO

As microalgas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* pertencentes ao Grupo de Biotecnologia e Bioenergia de Algas da Universidade de Bielefeld na Alemanha, foram utilizadas nesse estudo. As células foram mantidas em placas contendo meio de cultura padrão TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (GORMAN; LEVINE, 1965). O pré-inóculo foi preparado em meio TAP sob agitação a 120 rpm e 25 °C. Para os cultivos, foi utilizado meio HSM (Hight Salt Medium) suplementado com CO₂, xilose, celobiose, arabinose e Glicose (SUEOKA, 1960).

2.2 CRESCIMENTO DE *Chlamydomonas komma* E *Parachlorella kessleri* EM REGIME AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO.

Para verificar se as microalgas seriam capazes de crescer em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, cultivos foram realizados em placas de 12 poços (12-Well CytoOne® Plate, CytoOne, Alemanha) utilizando 3 mL de cultura em meio HSM. As placas foram incubadas a 23 °C. Cada experimento foi realizado em triplicata durante 168 h. O crescimento celular foi monitorado por meio de densidade óptica (DO) a 750 nm lido diretamente nas placas.

A fim de investigar o regime de crescimento, para as microalgas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri*, foram realizados cultivos: autotróficos com 24 h de luz ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) contendo 3 % de CO_2 (m v^{-1}), heterotróficos na ausência de luz contendo 3 % de CO_2 (m v^{-1}), e glicose ou xilose ou celobiose nas concentrações de 1000, 2500 e 5000 mg L^{-1} ; e mixotróficos com 24 h de luz ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) contendo 3 % de CO_2 (m v^{-1}), e glicose ou xilose ou celobiose nas concentrações de 1000, 2500 e 5000 mg L^{-1} .

2.3 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CO_2 NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Chlamydomonas komma* E *Parachlorella kessleri*

Após determinado o regime de cultivo para as cepas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri*, foi avaliado o efeito da adição de CO_2 nos cultivos. Para isso, foram realizados ensaios com 24 h de luz ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$): foto-autotróficos (controles) com a adição de ar atmosférico ou 3 % (m v^{-1}) de CO_2 ao meio de cultura, foto-heterotróficos com adição de 333, 666 e 1000 mg L^{-1} de xilose e glicose e, mixotróficos com a adição de 3 % (m v^{-1}) de CO_2 e 333, 666 e 1000 mg L^{-1} de xilose e glicose. Ensaios com as pentoses xilose e arabinose nas concentrações de 25, 50, 100 e 1000 mg L^{-1} também foram realizados com 3 % de CO_2 (m v^{-1}), bem como foi avaliada a utilização combinada dessas fontes de carbono.

2.4 Cultivo de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* em reator tipo Algem

As microalgas foram cultivadas em reator Algem (Algae Environment Modelling Labscale Photobioreactor, Algenuity, Reino Unido). As cepas foram cultivadas em meio HSM sob condições autotróficas com 3 % de CO_2 (m v^{-1}) (controle) e mixotróficas com 3 % de CO_2 (m v^{-1}) adicionado de 1000 mg L^{-1} de glicose ou 1000 mg L^{-1} de xilose. Os cultivos foram realizados em reator de 0,5 L (volume útil de 0,4 L) com agitação constante (120 rpm) a 25 °C e ciclos de 12:12 h com iluminância de $134 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Amostras diárias foram coletadas assepticamente para monitorar a concentração de biomassa por DO a 750 nm, massa seca e contagem de células. O conteúdo de clorofila foi determinado por espectrofotometria

de acordo com Arnon (1949) e os carotenoides totais de acordo com a metodologia proposta por Lichtenthaler e Buschmann (2005).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) e submetidos à análise de variância ANOVA seguido de teste estatístico Tukey ($p=0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO MICROALGAL EM REGIME AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

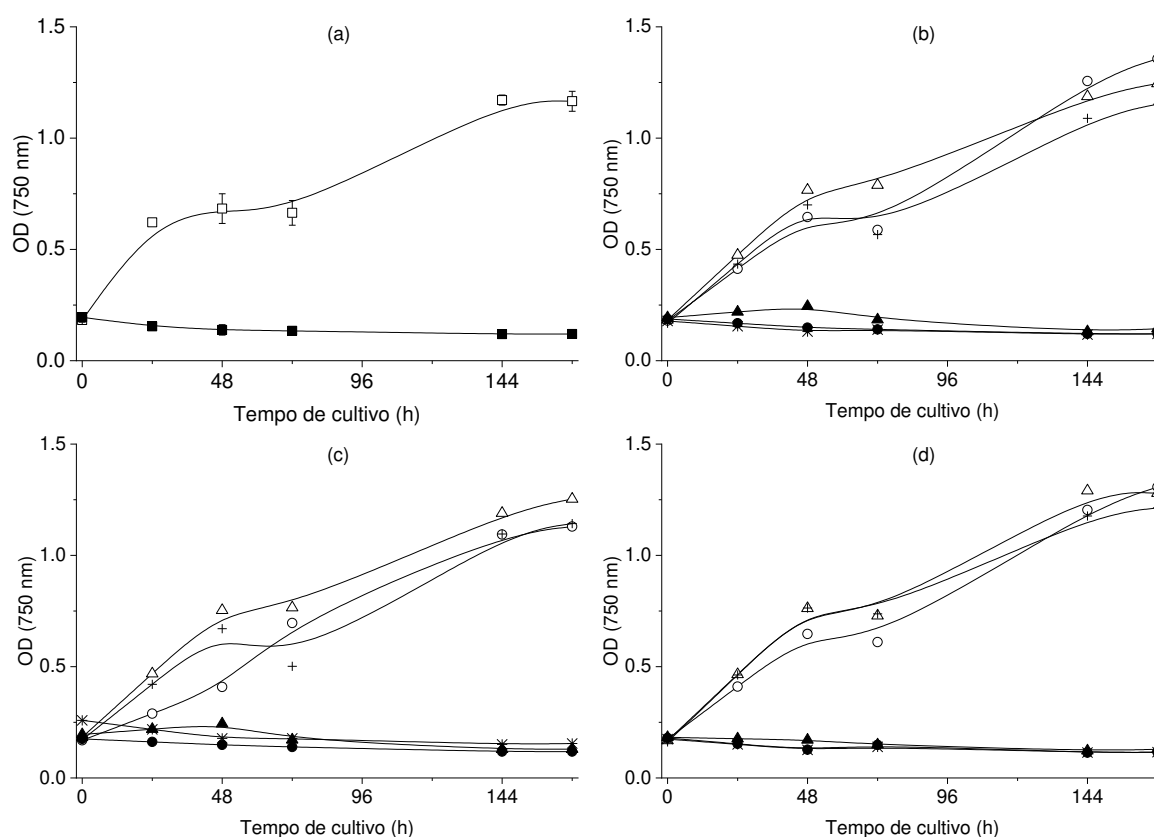
Para a microalga *Chlamydomonas komma* foi observado crescimento celular apenas para cultivos realizados na presença de luz, o que demonstra que a fonte de obtenção de energia dessa microalga provém do processo de fotossíntese (Figura 1). Quanto à fonte de carbono, *Chlamydomonas komma* apresentou crescimento acelerado na presença de CO_2 e luz (Figura 1a).

Quando o meio de cultura para *Chlamydomonas komma* foi suplementado com 2500 e 5000 mg L^{-1} de xilose, glicose ou celobiose não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no crescimento ao serem comparados ao ensaio controle, onde o CO_2 era a única fonte de carbono. Isso ocorreu tanto na presença como na ausência de luz. O mesmo ocorreu para glicose e celobiose na concentração de 1000 mg L^{-1} . Entretanto, ao adicionar 1000 mg L^{-1} de xilose ao meio, menor concentração utilizada nessa etapa, a densidade ótica passou de $1,16 \pm 0,04$ em regime autotrófico para $1,36 \pm 0,02$ em cultivo mixotrófico, indicando que concentrações menores de xilose podem favorecer o crescimento dessa microalga (Figura 1b).

Em condições autotróficas com 3 % (m v^{-1}) de CO_2 a microalga *Parachlorella kessleri* apresentou crescimento constante nas primeiras 48 h de cultivo, seguido de fase exponencial e estacionária/morte celular, alcançando densidade ótica de $1,83 \pm 0,02$ em 144 h de cultivo (Figura 2a). Ao realizar ensaios heterotróficos não houve evidências de crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas de xilose e celobiose (Figura 2b e 2d). Entretanto, assim como constatado para *Chlamydomonas komma*, em ensaios mixotróficos de *Parachlorella kessleri* o incremento na concentração de xilose ao meio de cultura acarretou na redução do crescimento celular, evidenciando a necessidade de utilização de concentrações inferiores as testadas nesses ensaios. A cepa *Parachlorella kessleri* apresentou crescimento em todas as condições testadas com glicose, tanto nos ensaios heterotróficos quanto nos mixotróficos (Figura 2c). O incremento na concentração de glicose em condições

heterotróficas para 1000, 2500 e 5000 mg L⁻¹ no meio de cultura elevou a densidade ótica para $0,50 \pm 0,01$, $0,92 \pm 0,02$ e $1,34 \pm 0,02$ respectivamente, em 144 h de cultivo, sendo esses resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 1 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada com (a) 3 % de CO₂ na presença de luz (□) ou ausência de luz (■); (b) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (*); (d) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (*).

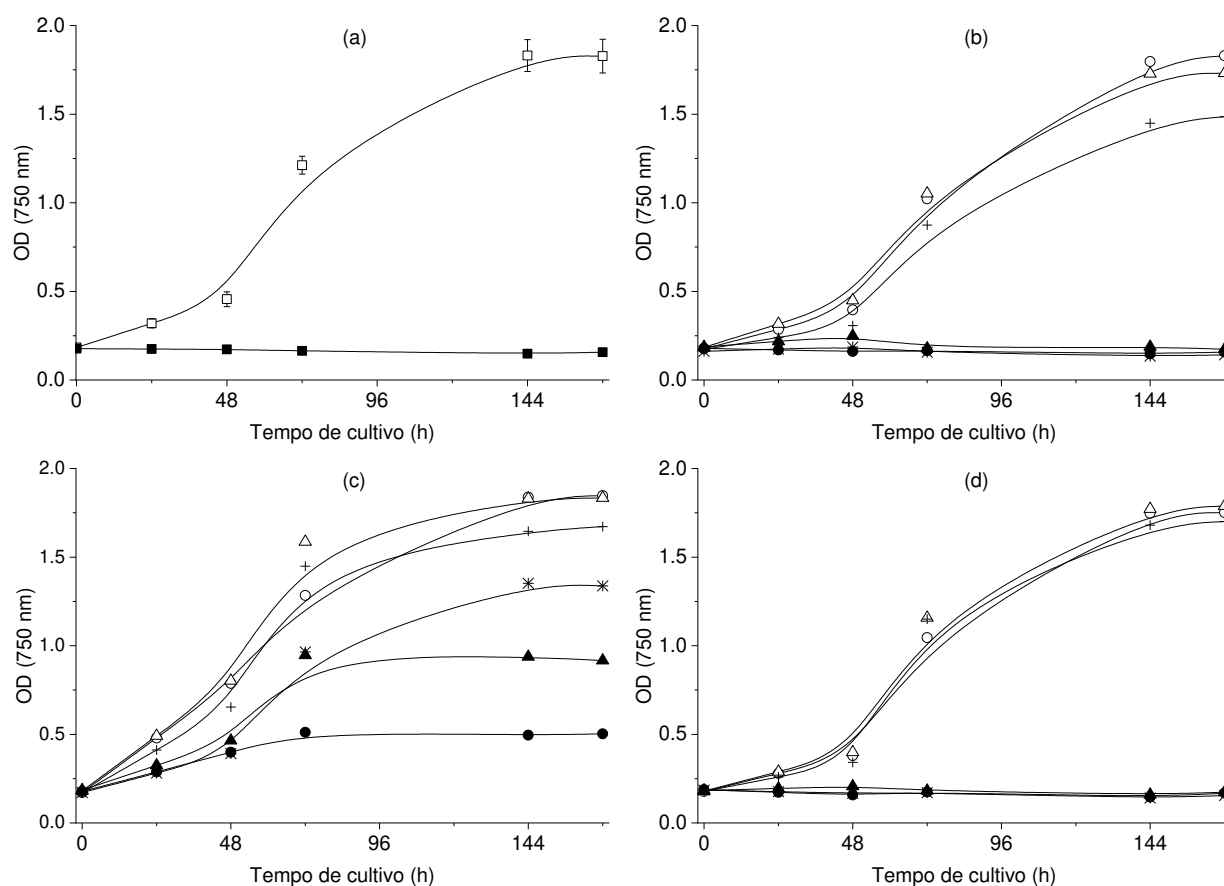


Em condições mixotróficas, o crescimento celular de *Parachlorella kessleri* ao final das 168 h de cultivo foi considerado estatisticamente igual ($p > 0,05$) para as três concentrações de glicose avaliadas ($DO = 1,85 \pm 0,04$). Entretanto, a adição de glicose nos cultivos mixotróficos elevou a multiplicação celular nas primeiras 72 h de cultivo (Figura 2c). Esse comportamento ocorre, pois, a suplementação do meio de cultura com fonte de carbono orgânico possibilita tanto o consumo de CO₂ quanto o de glicose por vias diferentes e, isso acontece a vários micro-organismos fotossintéticos. Moraes et al. (2019) observaram comportamento similar ao cultivar a cianobactéria *Spirulina* em regime mixotrófico utilizando glicerol como fonte de carbono orgânico. Os autores observaram que no cultivo com 0,05 mol

L⁻¹ de glicerol o crescimento de *Spirulina* foi cinco vezes maior que no cultivo controle, ao qual utilizou bicarbonato como fonte de carbono.

Enquanto xilose, celobiose e arabinose não apresentaram efeito positivo no crescimento da microalga *Parachlorella kessleri*, a adição de glicose aos cultivos acarretou incremento na produção de biomassa em condições heterotróficas, foto-heterotróficas e mixotróficas. Ao elevar a concentração de glicose ao meio de cultivo, foi observado aumento na produção de biomassa. Segundo Gao et al. (2019), a adição de fonte orgânica de carbono ao meio de cultivo resulta na troca do regime autotrófico para heterotrófico ou mixotrófico favorecendo maior acúmulo de biomassa. Além disso, estudos anteriores (FU et al., 2019; JUÁREZ et al., 2011; SANTANA et al., 2017) já haviam demonstrado a capacidade de assimilação de glicose pelo gênero *Chlorella*.

Figura 2 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada com (a) 3 % de CO₂ na presença de luz (□) ou ausência de luz (■); (b) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de glicose (*); (d) na presença de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (○), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (Δ), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (+) e ausência de luz com: 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de celobiose (●), 3 % de CO₂ + 2500 mg L⁻¹ de celobiose (▲), 3 % de CO₂ + 5000 mg L⁻¹ de celobiose (*).

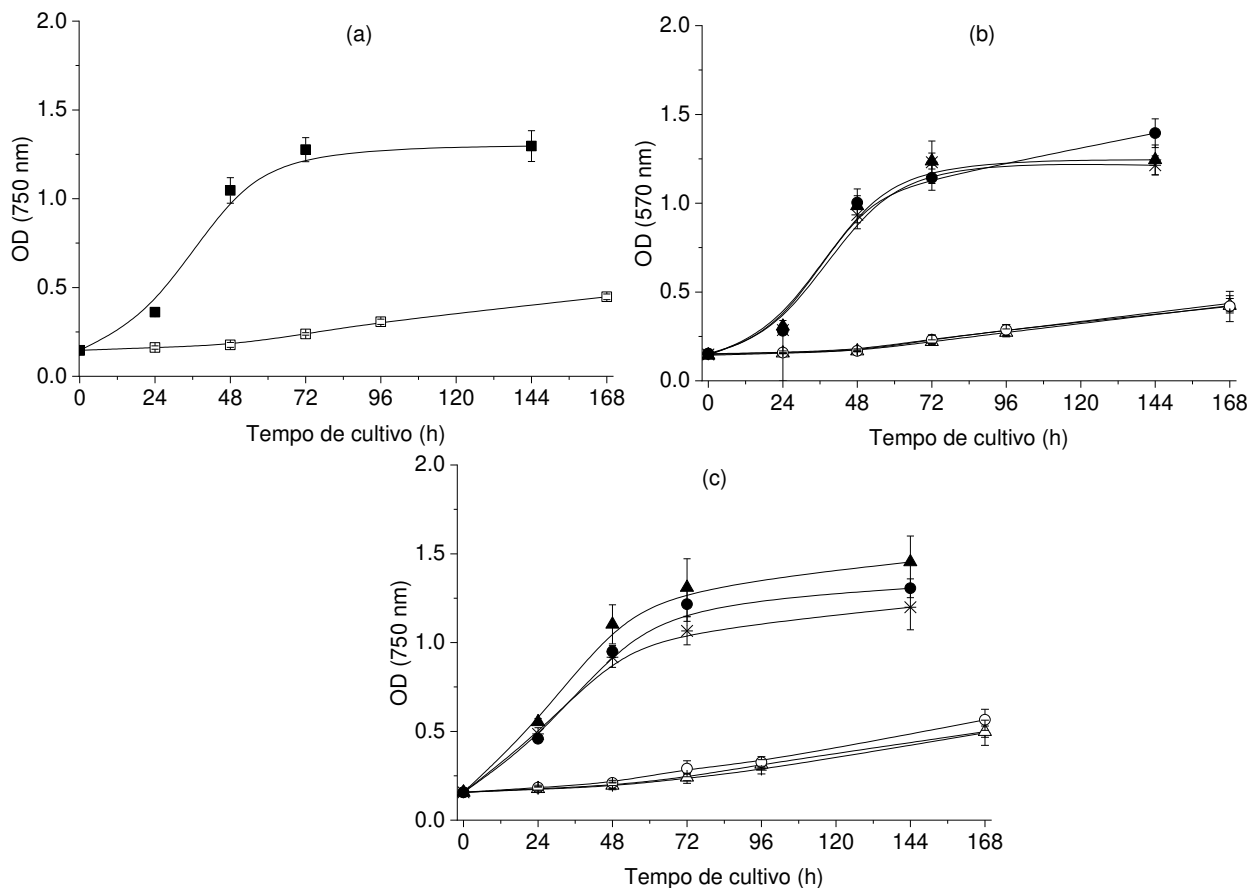


Ao cultivar a microalga *Parachlorella kessleri* em regime mixotrófico utilizando glicose como fonte de carbono, verificou-se maior velocidade de crescimento nas primeiras 24 h quando comparado aos ensaios em condições autotróficas (Figura 2c). Esse comportamento pode ser explicado, pois em cultivos autotróficos a energia utilizada para o crescimento de microalgas é obtida da luz durante o processo de fotossíntese e a principal fonte de carbono é o CO₂. Nos cultivos heterotróficos, a energia provém de elementos químicos presentes no meio e a fonte de carbono utilizada é de origem orgânica. Quando o regime utilizado para o cultivo de microalgas é o mixotrófico, existe a combinação de fontes de carbono, orgânica e inorgânica, sendo que, em culturas mixotróficas a velocidade de crescimento dos micro-organismos é maior do que em condições unicamente autotróficas ou heterotróficas (KHAN; SHIN; KIM, 2018; MUTHURAJ et al., 2013).

3.2 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CO₂ NO CRESCIMENTO CELULAR DE *Chlamydomonas komma* E *Parachlorella kessleri*

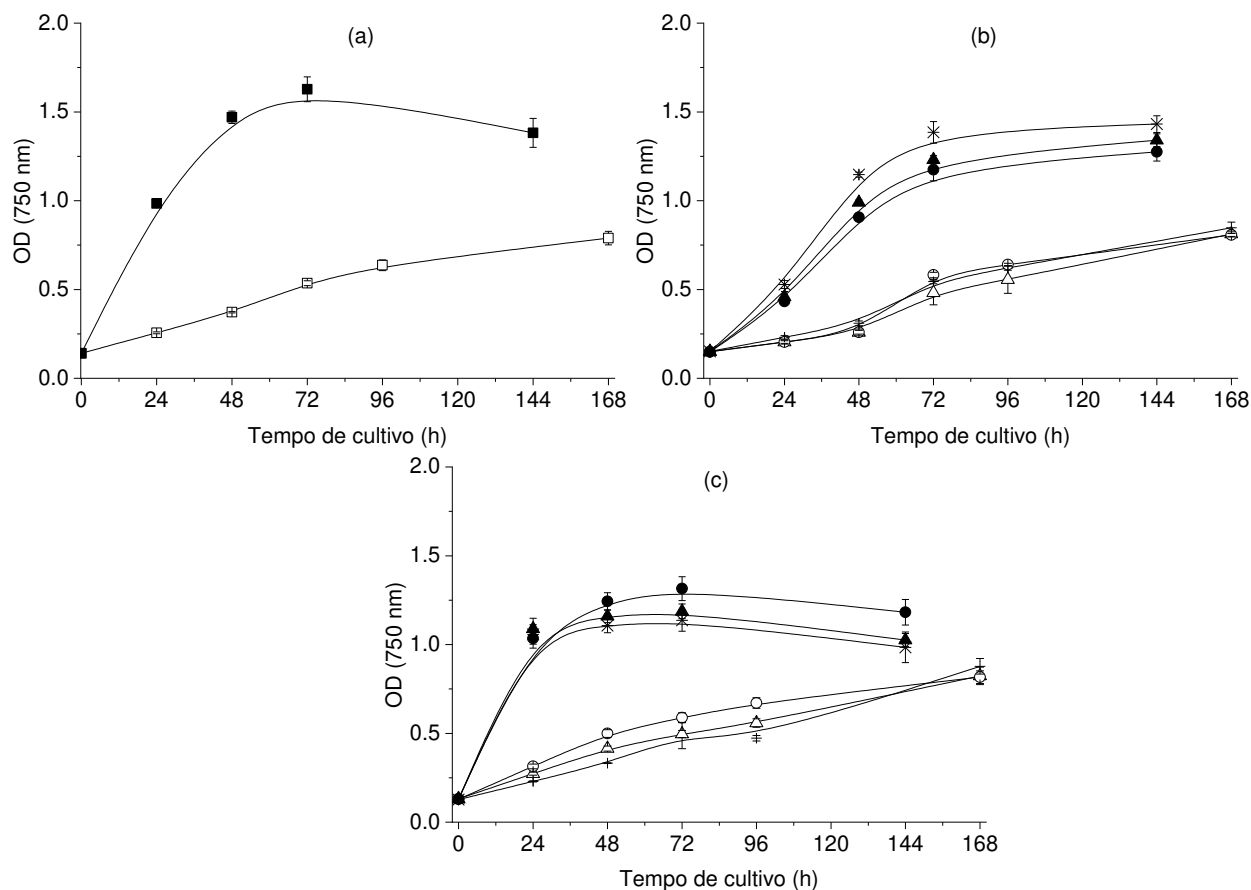
Em todos os ensaios com *Chlamydomonas* em que houve a adição de CO₂, o crescimento celular foi estatisticamente superior aos ensaios realizados apenas com os açúcares como fonte de carbono. Nos ensaios com xilose e glicose sem adição de CO₂, a densidade ótica aumentou de 0,15 para 0,5 ao final de 168 h. Esses resultados foram estatisticamente iguais ao ensaio controle contendo apenas CO₂ atmosférico como fonte de carbono (Figura 3). A adição de 3 % (m v⁻¹) de CO₂ ao cultivo contendo 333 mg L⁻¹ de xilose elevou a densidade ótica a 1,23 em 72 h, sendo que, esse resultado não diferiu estatisticamente das demais concentrações de xilose, 666 e 1000 mg L⁻¹. Em relação a utilização combinada de glicose e CO₂, não foi verificada variação para crescimento nas concentrações testadas (Figura 3c), o que leva a entender que esta cepa não apresenta capacidade de assimilação da glicose.

Figura 3 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou CO₂ atmosférico (□); (b) 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 666 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 333 mg L⁻¹ de xilose (+), 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 666 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 333 mg L⁻¹ de glicose (+) e 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de glicose (*).



Assim como nos ensaios anteriores, para *Parachlorella kessleri*, a adição de xilose ao meio de cultura não afetou o crescimento celular da microalga quando comparado aos ensaios apenas com aeração. O mesmo ocorreu para a utilização combinada de xilose e CO₂, onde ao final de 168 h de cultivo, a densidade ótica alcançada foi $1,38 \pm 0,08$ no cultivo apenas com CO₂ e $1,43 \pm 0,05$ no ensaio com 333 mg L⁻¹ de xilose e CO₂. Ao adicionar maiores concentrações de xilose, 666 e 1000 mg L⁻¹, a densidade ótica foi reduzida para $1,34 \pm 0,03$ e $1,27 \pm 0,05$ respectivamente (Figura 4b). Nos ensaios em que a glicose foi adicionada, o incremento na concentração do açúcar proporcionou maior crescimento tanto nos ensaios com adição de CO₂ quanto na ausência de CO₂ (Figura 4c).

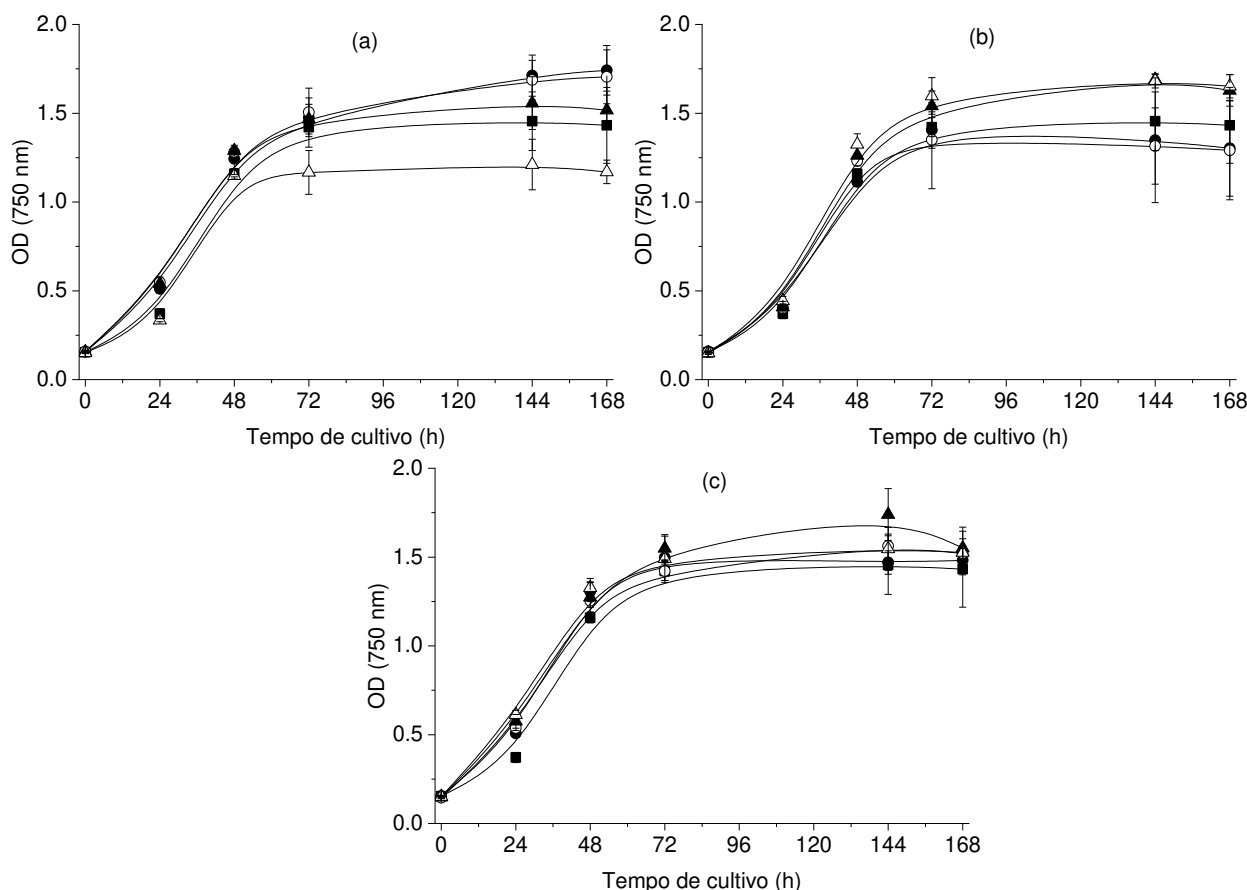
Figura 4 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou CO₂ atmosférico (□); (b) 1000 mg L⁻¹ de xilose (○), 666 mg L⁻¹ de xilose (Δ), 333 mg L⁻¹ de xilose (+), 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de xilose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de xilose (*); (c) 1000 mg L⁻¹ de glicose (○), 666 mg L⁻¹ de glicose (Δ), 333 mg L⁻¹ de glicose (+) e 3 % de CO₂ + 1000 mg L⁻¹ de glicose (●), 3 % de CO₂ + 666 mg L⁻¹ de glicose (▲), 3 % de CO₂ + 333 mg L⁻¹ de glicose (*).



Os resultados mostrados para *Chlamydomonas komma* indicam que em regime mixotrófico, onde xilose foi suplementada ao meio, maior quantidade de CO₂ pode ter sido convertida em biomassa. Esse ganho na conversão de CO₂ em biomassa pode ser consequência da ativação ou inibição de alguma via metabólica causada pela presença da xilose. Como não foi observado crescimento de *Chlamydomonas komma* em condições heterotróficas, entende-se que o ganho no crescimento celular é dependente da luz para geração de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) durante o processo fotossintético (JOHNSON; ALRIC, 2013; MUTHURAJ et al., 2013). Os resíduos lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, um biopolímero constituído por hexoses (glicose, manose, ramnose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (LEE; HAMID; ZAIN, 2014). Em relação as pentoses, a relação xilose / arabinose costuma ser elevada, sendo normalmente encontradas altas concentrações de xilose e baixas concentrações de arabinose em resíduos lignocelulósicos. Por exemplo, a madeira de bétula contém 89,3 % de xilose e 1 % de arabinose (KORMELINK; VORAGEN, 1993), o farelo de arroz contém 46 % de xilose e 44,9

% de arabinose (SHIBUYA; IWASAKI, 1985) e, o trigo contém 65,8 % de xilose e 33,5 % de arabinose (GRUPPEN; HAMER; VORAGEN, 1992). Como essa etapa do estudo utilizou-se baixas concentrações de pentoses, a arabinose foi incluída a formulação do meio de cultura.

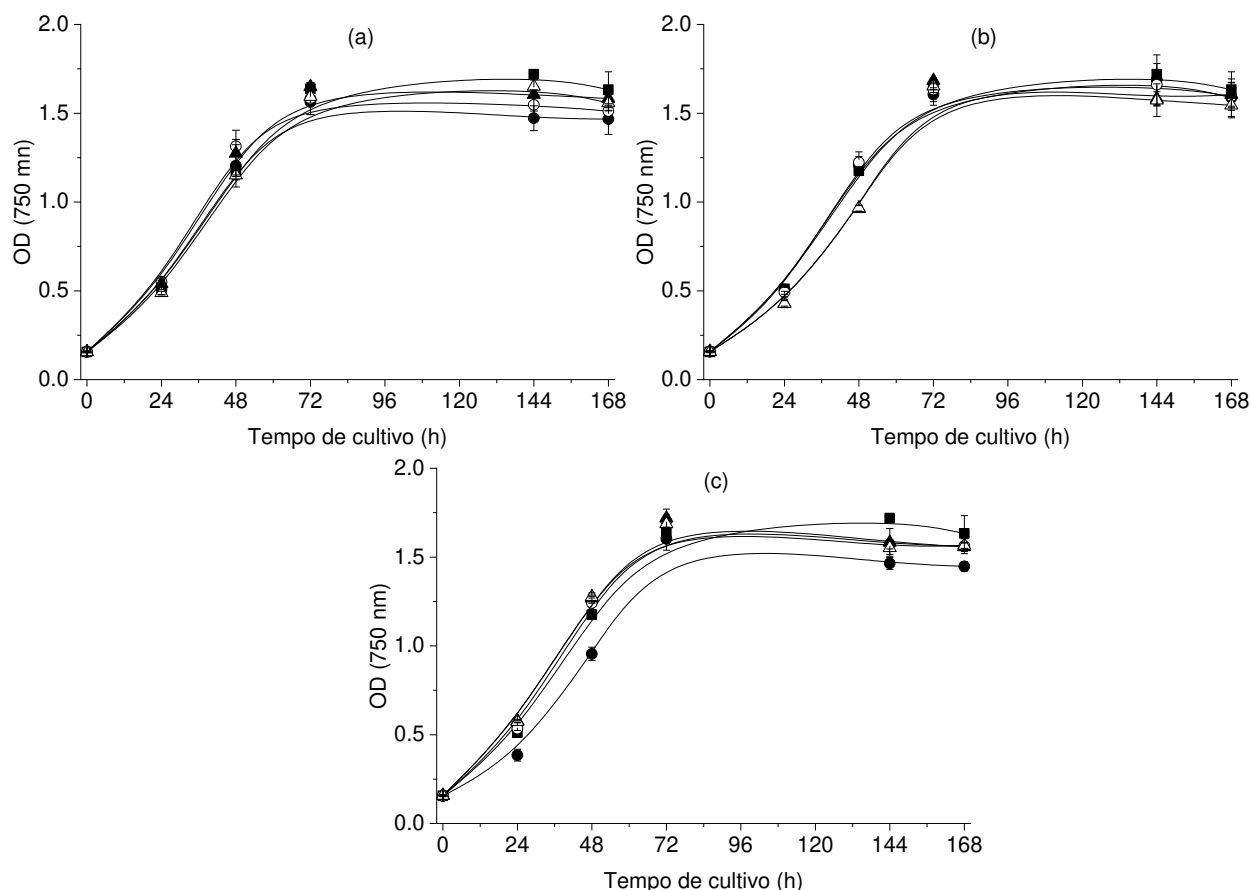
Figura 5 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose (Δ); (b) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ); (c) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose + 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose + 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose + 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose + 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ).



Indicado pelos ensaios anteriores, concentrações baixas de pentoses foram testadas. Para a xilose, a concentração de 1000 mg L⁻¹ foi a responsável pelo maior crescimento celular ($1,75 \pm 0,1$) quando comparado ao ensaio contendo apenas CO₂ como fonte de carbono ($1,43 \pm 0,2$) (Figura 5a). Sendo assim, pode-se afirmar que a adição de 1000 mg L⁻¹ de xilose aumentou o crescimento celular de *Chlamydomonas komma* cultivada com CO₂. A adição de arabinose aos cultivos de *Chlamydomonas komma* com CO₂ mostrou-se interessante apenas em concentrações mais baixas (Figura 5b). Em 72 h de experimento a densidade ótica foi $1,54 \pm 0,02$ e $1,60 \pm 0,1$ nos ensaios contendo 50 e 25 mg L⁻¹ respectivamente, enquanto, no ensaio controle foi $1,43 \pm 0,05$. Além disso, foi observado que a combinação de xilose e arabinose não alterou o crescimento da microalga em nenhuma das concentrações testadas ao final de

168 h de cultivo (Figura 5c). Entretanto, assim como observado nos ensaios com xilose, em 24 h de experimento a adição de xilose e arabinose elevou o crescimento celular, quando comparado ao ensaio controle, composto somente de CO₂ como fonte de carbono.

Figura 6 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada na presença de luz com (a) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose (Δ); (b) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ); (c) 3 % de CO₂ (■) ou 3 % de CO₂ +: 1000 mg L⁻¹ de xilose + 1000 mg L⁻¹ de arabinose (●), 100 mg L⁻¹ de xilose + 100 mg L⁻¹ de arabinose (○), 50 mg L⁻¹ de xilose + 50 mg L⁻¹ de arabinose (▲), 25 mg L⁻¹ de xilose + 25 mg L⁻¹ de arabinose (Δ).



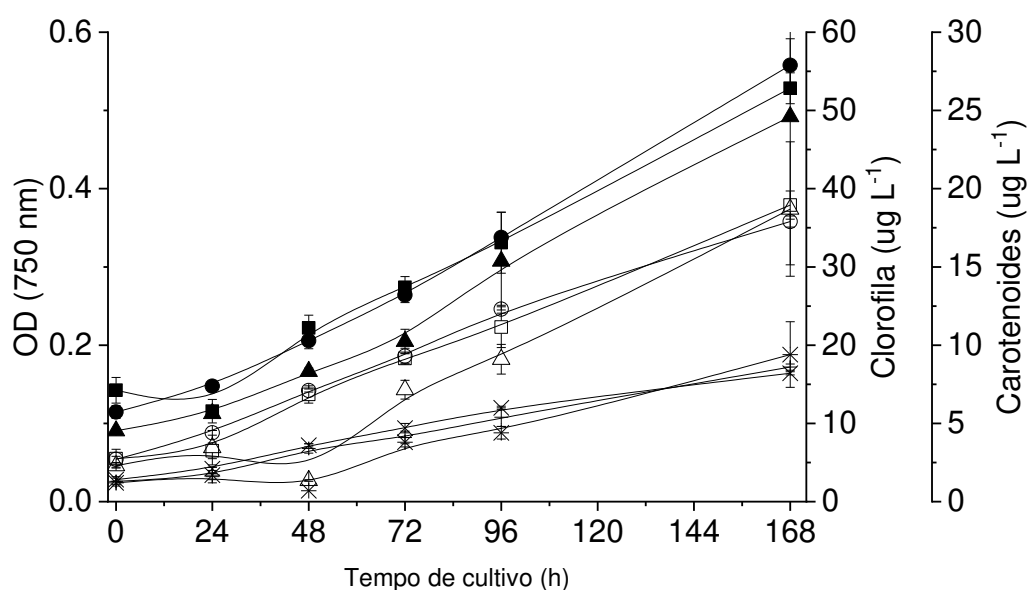
Esses resultados vão ao encontro com o que foi observado ao cultivar a cepa *Chlamydomonas komma* com concentrações mais altas de xilose. Nas primeiras 24 h de experimento, a adição de baixa concentrações de xilose elevaram a velocidade de crescimento nos ensaios mixotróficos quando comparados ao regime autotrófico, o que acarretou maior acúmulo de biomassa. Já com concentrações mais altas de xilose (Figura 1b) ocorreu redução na biomassa, caracterizando a inibição pelo substrato, que é comum quando se adiciona concentrações elevadas de carbono orgânico ao meio de cultivo (LIU et al., 2009).

Ao cultivar a microalga *Parachlorella kessleri*, não foi possível observar efeito da adição de nenhuma das concentrações de xilose, arabinose ou o uso combinado dessas duas pentoses (Figura 6a, 6b e 6c) no crescimento microalgal.

3.3 Cultivo de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* em reatores de maior escala

Para a microalga *Chlamydomonas komma*, não houve variação significativa ($p > 0,05$) em nenhuma resposta quanto a adição de fontes de carbono orgânicas ao meio de cultivo (Figura 7). As produções de biomassa máxima, clorofila e carotenoides obtidas foram de $0,55 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, $37,9 \pm 1,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $8,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

Figura 7 - Crescimento de *Chlamydomonas komma* cultivada com CO_2 atmosférico (■), 1000 mg L^{-1} de xilose (●) e 1000 mg L^{-1} de glicose (▲); concentração de clorofila quando cultivada com CO_2 atmosférico (□), 1000 mg L^{-1} de xilose (○) e 1000 mg L^{-1} de glicose (Δ) e concentração de carotenoides totais quando cultivada com CO_2 atmosférico (+), 1000 mg L^{-1} de xilose (x) e 1000 mg L^{-1} de glicose (*);

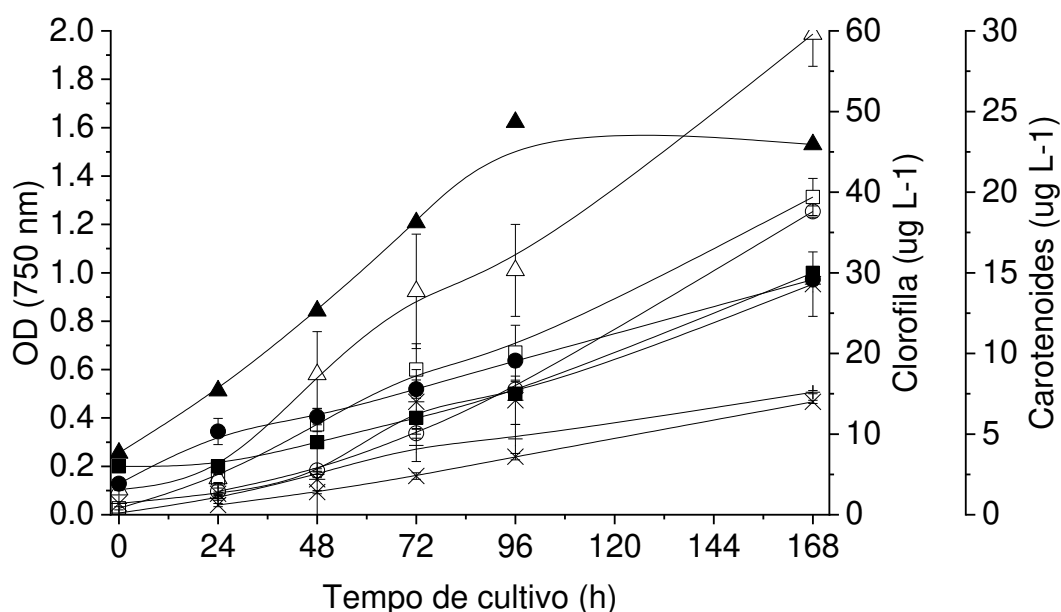


A microalga *Parachlorella kessleri* novamente demonstrou afinidade pela adição de glicose, onde foi observado incremento em todos os parâmetros avaliados (Figura 8). Houve incremento na concentração de biomassa de $0,52 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ no cultivo controle para $0,74 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ com adição de 1000 mg L^{-1} de glicose. A xilose apresentou efeito inibitório na produção de biomassa. Em relação a pigmentos, a glicose também apresentou efeito positivo, elevando a concentração de clorofila e carotenoides de $39,4 \pm 2,3$ e $7,6 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, no cultivo padrão para $59,6 \pm 4$ e $14 \pm 2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ no cultivo com glicose, respectivamente.

Na literatura não existem muitas informações sobre possíveis rotas metabólicas que envolvem a absorção de xilose por algas verdes. A rota mais aceita até o momento foi descrita para a cepa *Chlorella sorokiniana*. Nessa rota estão envolvidas as enzimas xilose redutase (XR) NADPH dependente e xilitol desidrogenase (XDH), onde em uma primeira etapa a XR reduz D-xilose a xilitol que por sua vez é oxidado por XDH a D-xilulose. Por fim, a D-xilulose é fosforilada por um ATP resultando em D-xilulose-5-fosfato, que é um intermediário da via da pentose fosfato (ZHENG et al., 2014). Nossos resultados vão ao

encontro dessa afirmação, uma vez que a xilose só apresentou efeito positivo no crescimento celular em condições mixotróficas. Como o catabolismo de xilose necessita de ATP, NADPH e NAD, a assimilação da xilose só é possível quando existe excesso de energia na célula, energia essa gerada durante o processo de fotossíntese.

Figura 8 - Crescimento de *Parachlorella kessleri* cultivada com CO₂ atmosférico (■), 1000 mg L⁻¹ de xilose (●) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (▲); concentração de clorofila quando cultivada com CO₂ atmosférico (□), 1000 mg L⁻¹ de xilose (○) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (Δ) e concentração de carotenoides totais quando cultivada com CO₂ atmosférico (+), 1000 mg L⁻¹ de xilose (x) e 1000 mg L⁻¹ de glicose (*);



4 CONCLUSÃO

As melhores respostas de produção de biomassa para as microalgas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* foram obtidos em regime mixotrófico. *Chlamydomonas komma* apresentou crescimento elevado pela adição de xilose em concentrações de até 1000 mg L⁻¹ ou pela utilização combinada de 25 e 50 mg L⁻¹ de xilose e arabinose. Com relação a utilização de glicose e celobiose, estas fontes não apresentaram efeito no crescimento celular de *Chlamydomonas komma*. A adição de glicose elevou o crescimento celular de *Parachlorella kessleri* tanto em regime heterotrófico como mixotrófico. Desta forma, fica evidenciado a possibilidade de aplicação de xilose combinada com CO₂ para elevar a produção de biomassa de *Chlamydomonas komma*. O mesmo ocorreu para *Parachlorella kessleri* na presença de glicose, porém nesse caso, há também a possibilidade de cultivo somente heterotrófico. Esse estudo corroborou com a ampliação do conhecimento sobre as cepas utilizadas, porém estudos moleculares e genômicos ainda devem ser realizados.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. [s.l.] McGraw-Hill, 1986.

BLIFERNEZ-KLASSEN, O.; KLASSEN, V.; DOEBBE, A.; KERSTING, K.; GRIMM, P.; WOBBE, L.; KRUSE, O. Cellulose degradation and assimilation by the unicellular phototrophic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature Communications**, v. 3, p. 1214–1219, 2012.

CASSURIAGA, A. P. A.; FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456–463, 2018.

CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282–291, 2015.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, 2011.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248–253, 2017.

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

FU, W.; GUDMUNDSSON, S.; WICHUK, K.; PALSSON, S.; PALSSON, B. O.; SALEHI-ASHTIANI, K.; BRYNJÓLFSSON, S. Sugar-stimulated CO₂ sequestration by the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 275–283, 2019.

GAO, B.; HUANG, L.; WANG, F.; CHEN, A.; ZHANG, C. Bilateral and simultaneous accumulation of lipid and biomass in the novel oleaginous green microalga *Tetradismus bernardii* under mixotrophic growth. **Algal Research**, v. 37, n. September 2018, p. 64–73, 2019.

GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 6, p. 1665–1669, 1965.

GRUPPEN, H.; HAMER, R. J.; VORAGEN, A. G. J. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. **Journal of Cereal Science**, v. 16, n. 1, p. 53–67, jul. 1992.

JOHNSON, X.; ALRIC, J. Central carbon metabolism and electron transport in *chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 6, p. 776–793, 2013.

JUÁREZ, Á. B.; VÉLEZ, C. G.; IÑIGUEZ, A. R.; MARTÍNEZ, D. E.; RODRÍGUEZ, M. C.; VIGNA, M. S.; DE MOLINA, M. D. C. R. A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. **Phycologia**, v. 50, n. 4, p. 413–421, 2011.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; PALANI, P.; RENGASAMY, R. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 700–706, ago. 2016.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 688–695, 1993.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, v. 16, p. 338–348, 2016.

LIU, X.; DUAN, S.; LI, A.; XU, N.; CAI, Z.; HU, Z. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 2, p. 239–246, 2009.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MORAIS, E. G. DE; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp LEB 18. **Process Biochemistry**, v. 76, n. August 2018, p. 40–45, 2019.

MUTHURAJ, M.; PALABHANVI, B.; MISRA, S.; KUMAR, V.; SIVALINGAVASU, K.; DAS, D. Flux balance analysis of *Chlorella* sp. FC2 IITG under photoautotrophic and heterotrophic growth conditions. **Photosynthesis Research**, v. 118, n. 1–2, p. 167–179, 2013.

NOAA. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. Disponível em: <<http://www.noaa.gov>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse:

Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001.

SHIBUYA, N.; IWASAKI, T. Structural features of rice bran hemicellulose. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 285–289, fev. 1985.

SLEGGERS, P. M.; VAN BEVEREN, P. J. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

SUEOKA, N. Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in Chlamydomonas Reinhardi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 46, n. 1, p. 83–91, 1960.

UDOP. **União Nacional da Bioenergia**, 2019. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/>>

VAZ, B. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium Spirulina sp. LEB 18 and the Green Alga Chlorella fusca LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga Chlorella sorokiniana. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

ARTIGO 2

**ACÚMULO DE LIPÍDIOS NEUTROS ESTIMULADO EM MICROALGAS
CULTIVADAS COM XILOSE**

RESUMO

O aproveitamento de fontes alternativas de carbono para o crescimento microbiano ganha destaque em diversos estudos, pois podem elevar a produção de biomassa e biocompostos ao mesmo tempo em que reduzem a poluição, visto que muitas vezes a fonte de carbono é o resíduo de processos agroindustriais. Considerando a disponibilidade de resíduos lignocelulósicos, este trabalho teve por objetivo produzir biomassa, pigmentos e lipídios pelas microalgas *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri*, *Chlorella fusca* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando xilose como fonte de carbono. A substituição da fonte de carbono do meio de cultura por xilose mostrou ser ferramenta para indução da síntese de lipídios neutros nas cepas estudadas. Ao combinar xilose e privação de nitrogênio (N) no meio, ocorreu incremento máximo em lipídios neutros de 89 % para *Chlorella fusca* cultivada em 50 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N, 580 % para *Chlamydomonas komma* cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N, 4424 % para *Parachlorella kessleri* cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N e 8131 % para *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N. Dentre os lipídios neutros sintetizados pelas cepas, destaca-se a produção de Polihidroxialcanoatos (PHA) por *Chlorella fusca*, que elevou sua produção em 978 % ao ser cultivada com 100 µg L⁻¹ de xilose e 5 % de N.

Paravas-chave: carotenoides, *Chlamydomonas komma*, clorofila, *Chlorella fusca*, *Parachlorella kessleri*, pentose, pigmentos, poli-hidroxialcanoato, *Spirulina* sp. LEB 18.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional gera a necessidade de novas tecnologias que possam suprir a demanda mundial de alimentos. Essa demanda eleva também a geração de resíduos. Por esses motivos, buscam-se alternativas de aumento de produção aliada a redução nas emissões de resíduos, como exemplos podem ser citadas a Cúpula da Terra no Rio de Janeiro (1992), assinatura do Protocolo de Quioto (1997), Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (2005), Conferência do Clima em Madri - Espanha (COP 25) (2019).

Microalgas são micro-organismos fotossintéticos que apresentam requerimentos nutricionais menos complexos quando comparadas as plantas superiores. Entre as principais características das microalgas estão a capacidade de converter dióxido de carbono (CO_2) e águas residuais em biomassa rica em bioprodutos como lipídios, carboidratos, proteínas, biopolímeros, dentre outros compostos (COSTA; DE MORAIS, 2011; KAVITHA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; RAZZAK et al., 2013; SLEGERS et al., 2013). O maior desafio na produção desses bioprodutos está atrelado ao custo de produção. Assim, a descoberta de micro-organismos com elevada produtividade, bem como, a utilização de nutrientes de baixo custo, faz-se necessário para viabilizar maior exploração dos compostos.

O carbono é um dos principais nutrientes requeridos para o crescimento microalgal. Entre as fontes alternativas, pode-se considerar a utilização de pentoses (FREITAS et al., 2017a). Pentoses são monossacarídeos formados por cinco moléculas de carbono (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A vantagem da utilização desse açúcar é porque, pode ser obtido a partir de resíduos lignocelulósicos. No Brasil, a produção de bagaço de cana de açúcar é uma das principais fontes para obtenção das pentoses. Em 2014 foram obtidas cerca de 180.103 toneladas de bagaço (UDOP, 2015). Outras fontes de obtenção de pentoses incluem resíduos da obtenção de papel e resíduos agroindustriais. A utilização de açúcares, como as hexoses, no cultivo de microalgas tem apresentado respostas satisfatórias no crescimento e na produção de bioprodutos. Por outro lado, a utilização de pentoses necessita ser mais explorada, principalmente no que diz respeito a absorção destes compostos pelas microalgas.

Considerando a disponibilidade de resíduos lignocelulósicos, torna-se indispensável encontrar micro-organismos capazes de assimilar estes compostos, gerando biomassa com grande valor agregado. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo produzir biomassa, pigmentos e lipídios pelas microalgas *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri*, *Chlorella fusca* e *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando xilose como fonte de carbono.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMOS E SELEÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as cepas de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Spirulina* sp. LEB 18 pertencentes a Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), e cepas de *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* pertencentes ao grupo *Algae Biotechnology and Bioenergy* (Bielefeld University, Alemanha).

As cepas de *Chlorella fusca* LEB 111, *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri*, foram cultivadas em meio BG-11 (STANIER et al., 1979) e meio TAP (Meio Tris-Acetato-Fosfato). A cepa de *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e meio TAP. As culturas líquidas foram incubadas em frascos tipo Erlenmeyer em agitador rotativo (120 rpm) sob intensidade luminosa constante de $120 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 25 °C. A amostragem foi realizada em 0, 24, 48, 72 e 144 h, sendo realizada contagem celular (Z2 Cell and Particle Counter, Beckmand Coulter, Inglaterra) e medidas de densidade óptica a 750 e 680 nm em espectrofotômetro para o acompanhamento do crescimento. Os maiores resultados para crescimento microbiano para cada microalga foram utilizados para seleção do meio de cultura. Estes ensaios também foram utilizados como controles.

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Após a seleção dos meios de cultura para o crescimento de cada cepa, foram realizados experimentos com modificações no meio de cultivo: substituição da fonte de carbono padrão por de D-xilose (Vetec Química, Sigma, Aldrich Corporation), redução (50 % do padrão) e privação (5 % do padrão) de nitrogênio (Tabela 1). As culturas foram incubadas em frascos tipo Erlenmeyer sob agitação a 120 rpm e intensidade luminosa constante de $120 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 25 °C.

Tabela 1 – Condições experimentais realizados com modificação no meio de cultivo

Micro-organismo	Meio de cultivo	Xilose (mg L ⁻¹)	Nitrogênio (%)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111 <i>Chlamydomonas komma</i> <i>Parachlorella kessleri</i>	TAP (controle)	-	100
	TAP	100	100
	TAP	100	50
	TAP	100	5
	TAP	50	100
	TAP	50	50
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	TAP	50	5
	Zarrouk (controle)	-	100
	Zarrouk	100	100
	Zarrouk	100	50
	Zarrouk	100	5
	Zarrouk	50	100
	Zarrouk	50	50
	Zarrouk	50	5

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A amostragem foi realizada nos tempos 0, 24, 48, 72 e 144 h para o acompanhamento do crescimento, sendo realizada contagem celular (Z2 Cell and Particle Counter, Beckmand Coulter, Inglaterra) e medidas de densidade óptica a 750 e 680 nm.

2.3.1 Determinação de pigmentos e Eficiência fotoquímica do PSII

Para a extração de pigmentos foram adicionadas 800 µL de acetona a amostras de 200 µL das culturas e agitou-se com auxílio de vórtex, seguido de centrifugação a 20.000 xg, durante 1 min. As leituras de absorbância foram realizadas em 470, 645 e 663 nm. O conteúdo de clorofila foi calculado de acordo com Arnon (1949), e os carotenoides totais de acordo com a metodologia proposta por Lichtenthaler et al. (2005).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila foram medidos nas culturas microalgais através da parede de vidro do frasco de cultivo, utilizando sistema Fluorômetro Mini-PAM (H. Walz, Effeltrich, Alemanha). As medidas da fluorescência mínima (F_0) e a máxima eficiência fotoquímica do fotossistema (PS II) (F_v/F_m) foram realizadas após 10 min no escuro. O rendimento quântico do transporte não cíclico de elétrons do fotossistema foi estimado e foi determinada a eficiência de conversão de energia do PSII (F_v/F_m) (FREITAS et al., 2016).

2.3.2 Determinação de lipídios neutros totais por fluorescência

A determinação dos lipídios neutros foi realizada através de metodologia de fluorescência, que utiliza *Nile red* como corante. Para isso, 100 μL das culturas foram diretamente coradas com o mesmo volume de solução de 0,1 $\mu\text{L ml}^{-1}$ de *Nile red* (concentração final da solução de trabalho dissolvido em dimetilsulfoxido [DMSO] a 50 %), durante 10 min no escuro. A fluorescência foi então medida em leitor de microplacas utilizando placas escuras de 96 poços, com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 nm e 590 nm, respectivamente (DENG et al., 2012; RODOLFI et al., 2003).

2.3.3 Análise quantitativa de poli-hidroxialcanoatos (PHA) por fluorescência

Amostras dos cultivos (1,0 mL) foram centrifugadas a 12000 xg durante 5 min e o precipitado foi ressuspenso em 1,0 mL de água destilada. Posteriormente, 40,0 μL de Nile Red (80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dissolvido em DMSO) foram adicionados à suspensão para se obter concentração final de 3,1 μg de Nile Red por mL de suspensão, e incubados à 23 °C por 30 min. A suspensão corada foi então centrifugada a 12.000 xg, durante 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se água destilada (1,0 mL) e o pellet resultante foi vigorosamente agitado em vórtice. Uma alíquota de 200 μL de suspensão foi pipetada para microplaca preta de 96 poços. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 535 e 605 nm, respectivamente, utilizando leitor de microplacas (ZURIANI et al., 2013). A curva padrão foi plotada para intensidade de fluorescência versus concentração de PHA. A quantidade de PHA de cada ensaio foi determinada a partir da curva padrão (MAHANSARIA et al., 2018).

2.3.4 Identificação dos PHAs produzidos pelas cepas

Amostras das culturas foram retiradas em 0, 72 e 144 h de cultivo e submetidas à metanólise. A metanólise foi realizada com 15 mg de biomassa seca (105 °C por 24 h), com 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988; DA SILVA; COSTA; DE MORAIS, 2018). Após a metanólise, os grupos metil éster formados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-MS). As corridas foram realizadas em Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA) equipado com coluna RTX-5/MS, Restek (coluna capilar de sílica de 30 m, 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de espessura). Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,0 mL min^{-1} . As condições da cromatografia foram as seguintes: temperatura do detector 250 °C e temperatura inicial de 60 °C mantida durante 2 min e aumentada para 180 °C a taxa de 25 °C min^{-1} , sendo então mantida por 8 min a 180 °C. Para a identificação dos biopolímeros foi utilizada a Biblioteca de dados NIST5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

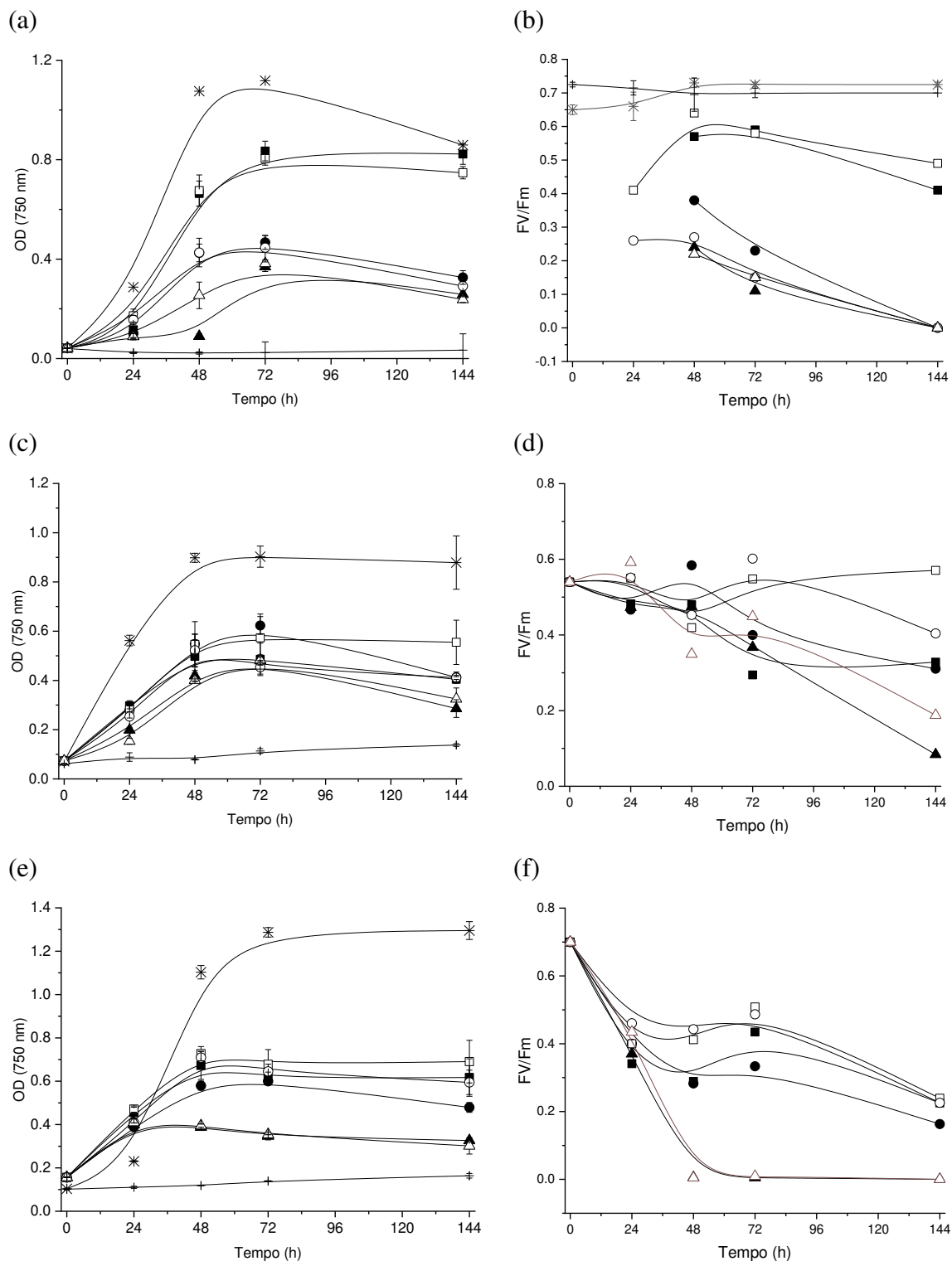
Neste estudo, a síntese dos biocompostos PHA, lipídios e pigmentos, bem como o crescimento celular por *Chlamydomonas komma*, *Chlorella fusca*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina sp.* LEB 18, foi afetado tanto pela utilização de xilose como fonte de carbono quanto a redução da fonte de nitrogênio. Sendo esses responsáveis pela variação das rotas metabólicas dessas microalgas.

3.1 Crescimento celular e eficiência fotossintética

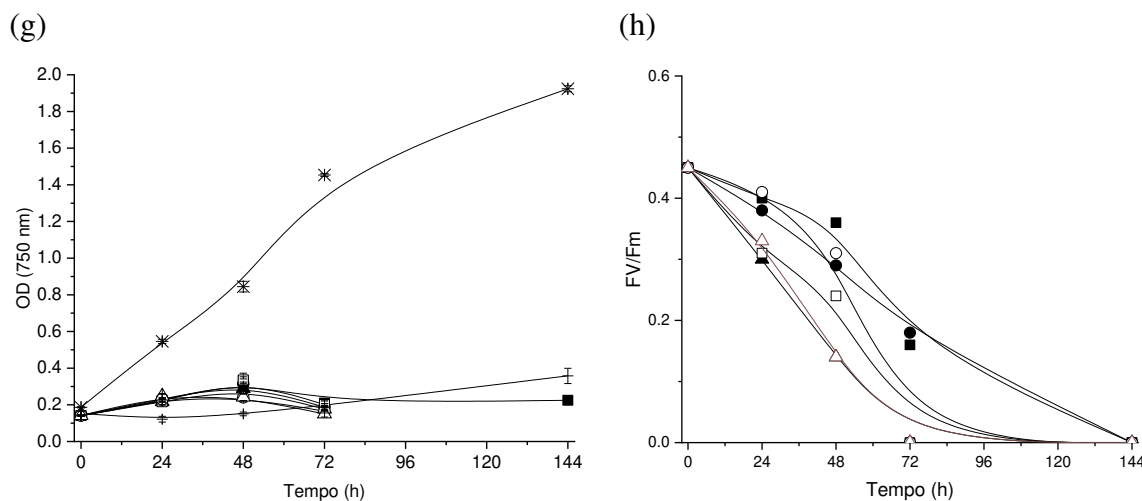
Na Figura 1 são apresentadas as curvas de crescimento para as microalgas *Chlorella fusca* (Figura 1a), *Chlamydomonas komma* (Figura 1c), *Parachlorella kessleri* (Figura 1e) e *Spirulina sp.* LEB 18 (Figura 1g) cultivadas com 50 ou 100 mg L⁻¹ de xilose e 100, 50 ou 5 % (m m⁻¹) de nitrogênio do meio. Para as três cepas de algas verdes, o maior crescimento foi obtido em meio TAP padrão em 72 h de cultivo. Nesse tempo, as cepas *C. fusca*, *C. komma*, *P. kessleri* apresentaram densidade ótica (OD) igual a 1,36, 0,90 e 1,28 respectivamente. A cianobactéria *Spirulina sp.* LEB 18 apresentou máximo crescimento (OD = 1,92) em 144 h de cultivo, utilizando meio de cultura padrão Zarrouk. Esses resultados confirmaram a hipótese de que os meios padrão iriam proporcionar maior crescimento, pois as microalgas já estão adaptadas. Sendo assim, todos os ensaios posteriores foram realizados em meio TAP para as algas verdes e Zarrouk para a cianobactéria.

Segundo Benemann (1997) e Pandey et al. (2014), uma alternativa para minimizar os custos de produção é a substituição da fonte de carbono padrão dos meios de cultura por alternativas como resíduos orgânicos para o crescimento autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico das microalgas. Quando o meio de cultura foi modificado, alterando a fonte de carbono para 50 ou 100 mg L⁻¹ de xilose, ocorreu redução no crescimento celular de todas as microalgas verdes em comparação ao meio TAP padrão, porém não foi possível observar diferença estatística ($p > 0,05$) ao comparar as duas concentrações de xilose no mesmo micro-organismo. *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* cultivadas com xilose no meio, também apresentaram máxima concentração celular em 72 h de cultivo, representada por OD igual a 0,83, 0,62 e 0,72 respectivamente (Figura 1). Resultado esse inferior ao encontrado no meio de cultura padrão.

Figura 1 - Crescimento celular de *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e máxima eficiência fotoquímica do fotossistema PSII de *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio controle (*), meio BG-11 (x), TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (■), TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (●) e TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (▲), TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (□), TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (○) e TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (Δ).



Cont.Fig.1



O carbono é um dos principais elementos para o crescimento das microalgas, sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono é o componente mais importante a todas as substâncias orgânicas sintetizadas por microalgas (LOURENÇO, 2006). Naturalmente, a fonte preferencial de carbono para microalgas é o CO_2 proveniente da atmosfera. Se a concentração de carbono utilizável pela microalga é mínima no meio de cultura, ocorre redução do crescimento do micro-organismo causado pela falta do nutriente, ou o micro-organismo passa a crescer em regime heterotrófico e/ou mixotrófico (RICHMOND, 2007). A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou crescimento celular lento nas primeiras 48 h de cultivo, variando OD de aproximadamente 0,15 no tempo 0 para 0,33 em 48 h, no ensaio com 100 mg L^{-1} de xilose e 100 % N. Após essa fase, ocorreu morte e lise celular para todas as condições testadas na presença de xilose. Isso ocorreu provavelmente pelo esgotamento dos nutrientes ou pela formação de compostos inibitórios.

A quantidade e qualidade dos nutrientes adicionados aos meios de cultura são de fundamentais nos cultivos de microalgas, pois influenciam no comportamento de crescimento das mesmas. Os resultados obtidos reafirmaram a influência da composição do meio de cultivo no crescimento das microalgas. Quando as microalgas *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* foram cultivadas com 50 % do nitrogênio do meio padrão, ocorreu redução no crescimento, apresentando OD igual a 0,46, 0,62 e 0,71, respectivamente. Já ao serem cultivadas com 5 % do nitrogênio padrão do meio, o crescimento ficou restrito a OD igual a 0,38, 0,48 e 0,41, respectivamente. Em ambos os casos foi observado crescimento até 48 h de cultivo, após esse período o número de células permaneceu constante ou houve redução na concentração.

O nitrogênio é a segunda molécula mais abundante na biomassa microalgal (SUN et al., 2014). Por consequência, é também o segundo nutriente mais importante na composição de meios de cultura para microalgas. Quando a concentração de nitrogênio disponível no meio de cultura é baixa, ocorre redução nos parâmetros de crescimento microalgal (LOURENÇO, 2006). Ainda, em baixas concentrações de nitrogênio no meio de cultura de microalgas, costuma ocorrer o acúmulo de lipídios e polissacarídeos nas células devido a modificações nas rotas metabólicas. Entretanto, o suprimento abundante de nitrogênio no meio acarreta na elevação das concentrações de proteínas e clorofila nas células microalgais. Isso ocorre pois as células tendem a adaptar seu metabolismo aos nutrientes disponíveis no meio de cultura, buscando a manutenção da sobrevivência (CARVALHO; OLIVEIRA; ALBERTO, 2014; FU et al., 2019; PARANJAPÉ; LEITE; HALLENBECK, 2016).

Uma das principais características das microalgas, incluído as cianobactérias, é a capacidade de converter o CO₂ atmosférico e água em matéria orgânica e oxigênio. Isso ocorre durante o processo de fotossíntese. Sendo assim, mensurar a capacidade fotossintetizante em cultivos é excelente ferramenta para monitorar os cultivos. A eficiência fotossintética (EF) é a fração de energia luminosa convertida em energia química durante a fotossíntese. Assim, o maior valor de EF é geralmente obtido no início dos cultivos, quando a concentração celular é menor. Ao longo do cultivo, esse valor tende a diminuir devido à elevação na densidade celular (DINESHKUMAR et al., 2016; SFORZA et al., 2012; SUN et al., 2018). De fato, os máximos valores de EF foram obtidos nos primeiros dias de cultivo para todas as microalgas utilizadas nesse estudo, seguidos de redução do valor de EF, conforme o aumento do crescimento microalgal.

Outro fator que pode ter reduzido a eficiência fotossintética, está relacionado a condição em que essas microalgas foram cultivadas. Observa-se na Figura 1(b, d, f e h) que nos ensaios realizados com redução ou privação de nitrogênio houve redução da eficiência fotossintética. Isso pode ser explicado ao relacionar-se a EF com a produção de pigmentos (Figura 2), pois a diminuição do nitrogênio reduz a concentração de pigmentos de clorofila, moléculas que são necessárias a atividade fotossintética (SHIH et al., 2014).

3.2 Pigmentos

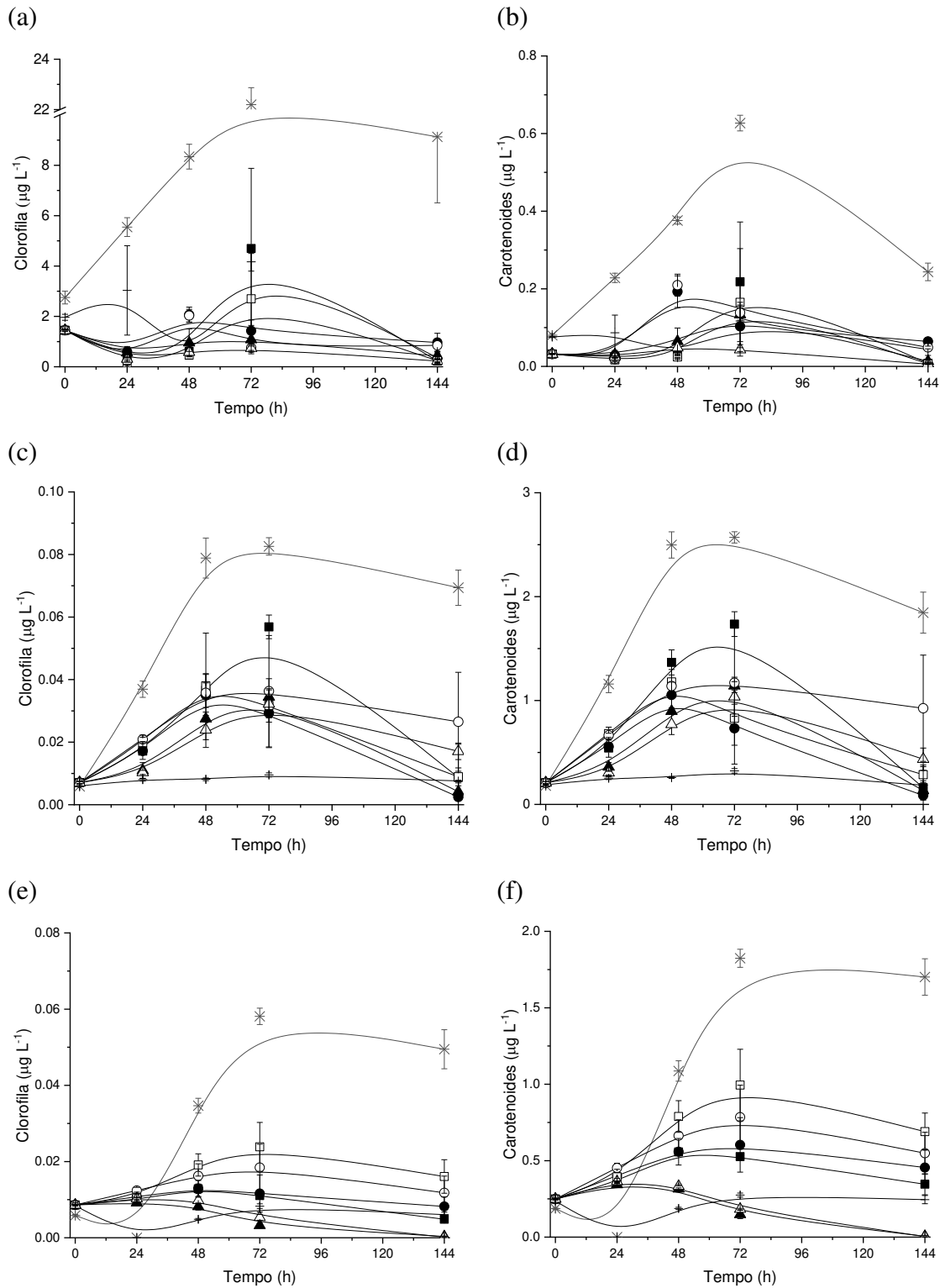
As clorofilas são naturalmente encontradas nas microalgas, e a concentração desse pigmento nas células depende das condições nutricionais e ambientais nas quais o micro-organismo foi cultivado. Nesse estudo, as máximas concentrações de clorofila para *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Paraclorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18 (22,20, 0,08, 0,06 e 1,92 µg L⁻¹, respectivamente) foram obtidas nos cultivos em meio padrão (Figura 2). A

substituição da fonte de carbono, além de reduzir a produção de biomassa diminuiu a produção de clorofila para todas as microalgas. Ao reduzir ou privar o nitrogênio no meio de cultivo de *Chlorella fusca* houve decréscimo na concentração de clorofila de $4,69 \mu\text{g L}^{-1}$ (cultivo com 100 mg L^{-1} de xilose e 100 % de N) para $1,42 \mu\text{g L}^{-1}$ (cultivo com 100 mg L^{-1} de xilose e 50 % de N) e para apenas $1,08 \mu\text{g L}^{-1}$ no cultivo com máxima redução de nitrogênio (100 mg L^{-1} de xilose e 5 % de N). Comportamento similar foi observado para as outras duas cepas de algas verdes. Entretanto, para a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 a concentração de clorofila se manteve estatisticamente igual ($p > 0,05$) para todos ensaios contendo xilose no meio de cultura, independentemente da concentração de nitrogênio no meio. Isso ocorreu, pelo fato de que esta não apresentou crescimento quando cultivada com xilose.

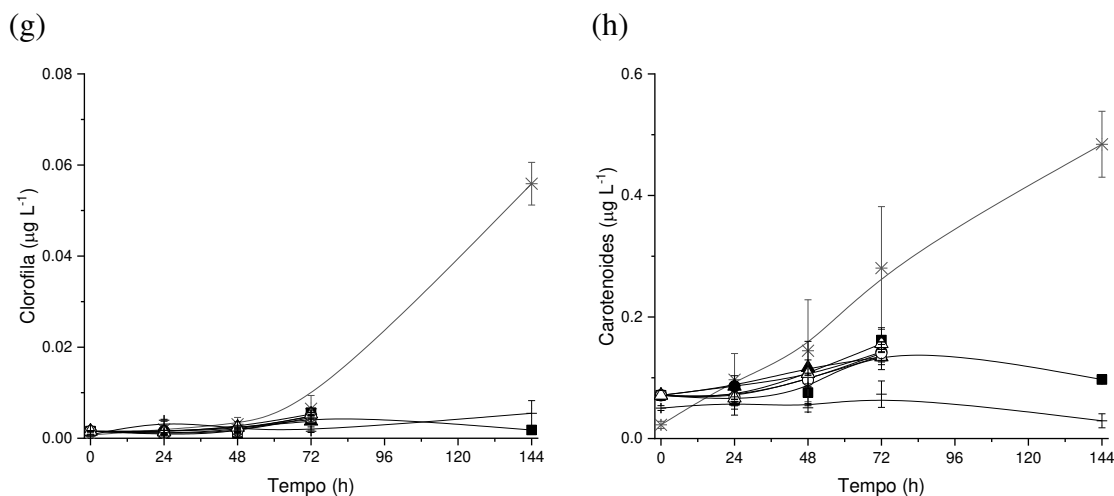
A concentração de clorofila total aumentou para as três cepas de algas verdes durante as primeiras 72 h de cultivo, seguido de redução nos dias seguintes, inclusive para os ensaios em meio de cultura padrão (Figura 2). O conteúdo de clorofila pode ser considerado o principal regulador da atividade fotossintética e o fato de ter apresentado comportamento similar aos de crescimento celular, sugere que as microalgas, mesmo cultivadas na presença de carbono orgânico foram capazes de manter o aparato de clorofila necessário para sustentar o processo de fotossíntese. Essa é uma evidência de adaptação das microalgas as novas condições de cultivo, onde utilizaram tanto a xilose quanto o CO_2 atmosférico para sua manutenção.

Dentre as três algas verdes testadas, a cepa de *Parachlorella kessleri* apresentou maior ($p < 0,05$) concentração de clorofila ao ser cultivada apenas com 50 mg L^{-1} de xilose, do que quando na presença de 100 mg L^{-1} de xilose, independentemente da concentração de nitrogênio no meio. Comportamento similar foi observado no crescimento dessa cepa, o que leva a conclusão de que a xilose não é boa alternativa como fonte de carbono para *Parachlorella kessleri*.

Figura 2 – Concentração de clorofila em *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e concentração de carotenoides em *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio controle (*), meio BG-11 (x), meio TAP + 100 mL L⁻¹ xilose com 100 % N (■), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (●), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (▲), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (□), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (○) e meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (Δ).



Cont.Fig.2



Diferente da clorofila que faz parte do metabolismo primário, o qual requer disponibilidade de nutrientes, a concentração de carotenoides nas células é decorrente do metabolismo secundário das microalgas. Apesar de muitas cepas produzirem carotenoides, apenas *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são comercialmente exploradas (BEGUM et al., 2016). O incremento ou redução desses compostos nas células pode ser regulado por condições nutricionais e ambientais. No presente estudo, a maior produção de carotenoides coincide com o final da fase exponencial de crescimento para todas as microalgas estudadas. As cepas de *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18 produziram 0,63, 2,57, 1,82 e 0,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carotenoides, respectivamente, em meio padrão de cultivo. Ao substituir a fonte de carbono, assim como ocorreu com a biomassa, também houve redução na concentração de carotenoides, sendo as máximas concentrações do pigmento obtidas ao cultivar *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma* e *Spirulina* sp. LEB 18 com 100 mg L^{-1} de xilose e 100 % de nitrogênio. Nessas condições, a produção foi 0,21, 1,73 e 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carotenoides, respectivamente. A cepa de *Parachlorella kessleri* apresentou máxima concentração de carotenoides de 0,99 $\mu\text{g L}^{-1}$, ao ser cultivada com 50 mg L^{-1} de xilose e 100 % de nitrogênio. Essa concentração obtida para *P. kessleri* foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) ao comparar com os 0,53 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtidos no cultivo com 100 mg L^{-1} de xilose e 100 % de nitrogênio.

Estudos descrevem que parâmetros físicos e nutricionais (pH do meio nutriente, temperatura, fonte de nitrogênio e fósforo, salinidade e condições de luz) podem alterar o crescimento celular e a concentração de carotenoides nas microalgas (KHAN; SHIN; KIM, 2018; SINGH et al., 2019). Assim como ocorreu nesse estudo, Singh et al. (2019), ao cultivar

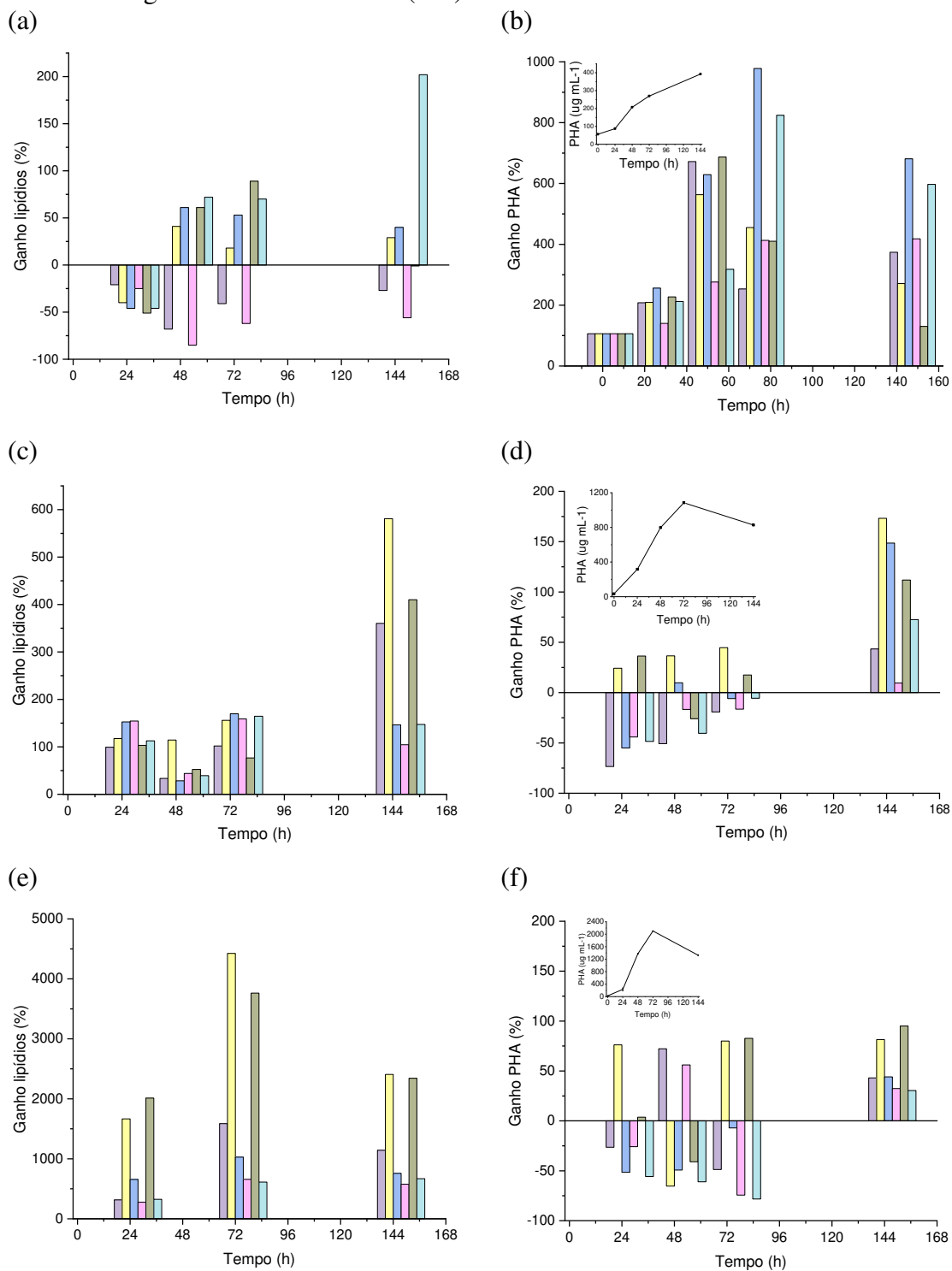
a microalga *Asterarcys quadricellulare*, obteve as maiores concentrações de carotenoides coincidindo com a máxima concentração de biomassa. No estudo, o autor avaliou 3, 10, 20 e 40 mM de N no meio de cultura e observou que concentrações elevadas de N não favorecem a produção do pigmento, pois causam desequilíbrio no meio. Entretanto, a limitação do nitrogênio no meio de cultura pode dificultar a produção de pigmentos, visto que a rota metabólica é redirecionada para onde o equilíbrio energético seja mais favorável, por exemplo, para o metabolismo de lipídios, que ocorre dentro do cloroplasto (JOHNSON; ALRIC, 2013).

3.3 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS NEUTROS

De acordo com as análises de fluorescência, *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18 apresentaram aumento na produção de lipídios neutros quando ocorreu redução ou privação da fonte de nitrogênio no meio (Figura 3). Comparando ao cultivo controle, *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18 obtiveram incremento nos lipídios neutros de 53, 146, 1027 e 8131 %, respectivamente, quando cultivadas com 100 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N, e incremento de 70, 147, 612 e 5607 % nos cultivos com 50 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N. Ao reduzir o nitrogênio a 50 %, as cepas cultivadas com 100 mg L⁻¹ de xilose obtiveram incremento de lipídios neutros de 18, 580, 4424 e 6892 %, e com 50 mg L⁻¹ de xilose houve incremento de 89, 410, 3762 e 6517 %, respectivamente. Já nos cultivos realizados com 50 ou 100 mg L⁻¹ de xilose, onde a fonte de nitrogênio foi mantida em 100 %, ocorreu redução na produção de lipídios neutros para *Chlorella fusca* e elevação para as demais cepas (Figura 3).

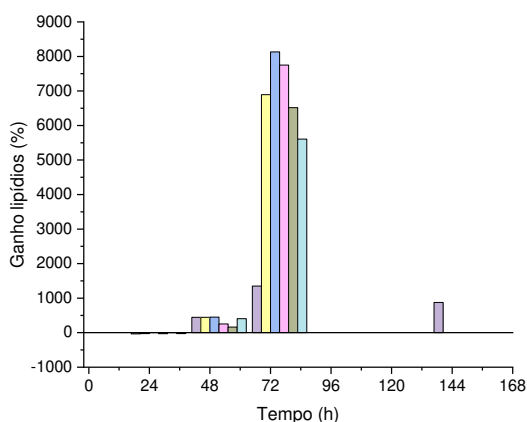
Estudos têm demonstrado que a limitação ou privação de nitrogênio em culturas microalgais podem elevar a concentração de lipídios (JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012). Esse aumento na produção lipídica é decorrente do estresse causado pela falta do nutriente. Entretanto, ao mesmo tempo em que é benéfico pela produção do lipídio, a ausência de nitrogênio reduz a divisão celular ou é capaz de inibi-la (FREITAS et al., 2016; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Este comportamento foi observado neste estudo.

Figura 3 – Incremento em lipídios neutros para *Chlorella fusca* (a), *Chlamydomonas komma* (c), *Parachlorella kessleri* (e), *Spirulina* sp. LEB 18 (g) e incremento de PHAs em *Chlorella fusca* (b), *Chlamydomonas komma* (d), *Parachlorella kessleri* (f), *Spirulina* sp. LEB 18 (h) cultivadas em meio TAP + 100 mL L⁻¹ xilose com 100 % N (■), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (■), meio TAP + 100 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (■), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 100 % N (■), meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 50 % N (■) e meio TAP + 50 mg L⁻¹ xilose com 5 % N (■).

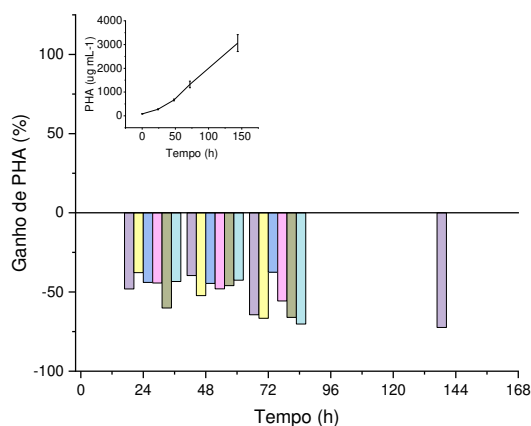


Cont.Fig.3

(g)



(h)



Para reduzir a perda na produtividade de biomassa em prol do ganho em lipídios, técnicas podem ser aplicadas, como o cultivo em dois estágios, onde em um primeiro momento a biomassa é produzida e após, limita-se o nitrogênio no meio, induzindo as células cultivadas a produzir lipídios (HO; CHEN; CHANG, 2010). Outra alternativa para manter a produtividade tanto de biomassa quanto de lipídios é a adição mínima diária de nitrogênio. Zhu et al. (2016), descrevem que com essa técnica é possível elevar a produção de lipídios aliado a alta produtividade de biomassa.

Como evidenciado, a falta de nitrogênio nas células resultou no acúmulo de lipídios. No entanto, observou-se nesse estudo que *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18 elevaram a produção de lipídios também pela substituição da fonte de carbono no meio de cultura. O mecanismo responsável ainda não está elucidado, mas entende-se que ocorre algum tipo de estresse as células, uma vez que as cepas estudadas não apresentam normalmente os genes necessários a produção das enzimas ligadas a assimilação dessa fonte de carbono. Entretanto, estudos com *Chlorella sorokiniana* demonstraram que as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), responsáveis pela assimilação da xilose em outros micro-organismos só são detectadas após o micro-organismo ser submetido ao meio contendo a fonte de carbono (CHAI et al., 2018; ZHENG et al., 2014). Com isso, a xilose adicionada além de ser responsável pelo estresse nas células, pode ter sido também catabolizada em processo ainda não descrito na literatura.

Um grupo específico de lipídios neutros vem chamando a atenção nos últimos anos, os polihidroxialcanatos (PHA). Estes são biopolímeros de cadeia curta, média ou longa que apresentam características de grande interesse na área industrial atual, como biodegradabilidade e biocompatibilidade. Em nossos estudos as microalgas *Chlorella fusca*,

Chlamydomonas komma e *Parachlorella kessleri* elevaram a produção desses compostos com a limitação ou privação do nitrogênio no meio, bem como com a adição da xilose como fonte de carbono. A microalga *Chlorella fusca*, a qual já tem documentos que relatam a produção desses compostos (CASSURIAGA et al., 2018), houve aumento máximo de 978 % (m m^{-1}) em 72 h de cultivo com 100 mg L^{-1} de xilose e 5 % de nitrogênio no meio. A microalga *Chlamydomonas komma* obteve incremento máximo ao final do cultivo, apresentando ganho de 173 % ao ser cultivada em 100 mg L^{-1} de xilose e 50 % de nitrogênio, enquanto que, *Parachlorella kessleri* apresentou aumento em 95 % a concentração de PHAs, ao ser cultivada em 50 mg L^{-1} de xilose e 50 % de nitrogênio. Já a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, produtora de PHA (SILVA; COSTA; MORAIS, 2018), assim como ocorreu para a biomassa, teve a produção de PHAs reduzida pelas alterações no meio de cultura.

O processo de síntese de PHAs e as rotas metabólicas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos ainda não estão estudadas o suficiente, principalmente em microalgas, porém acredita-se que sejam similares a síntese em bactérias. O metabolismo de PHA, assim como para muitos outros compostos, ocorre em diferentes etapas, iniciando pela ativação da expressão do gene, causado por variações ambientais, como a privação de nutrientes. A segunda etapa é a ativação de enzimas de síntese e inibição de enzimas metabólicas de vias concorrentes (HONDO et al., 2015; KESSLER; WITHOLT, 1998; SINGH; MALLICK, 2017). Isso justifica a maior produção de PHAs quando os microrganismos estão em condições desfavoráveis de crescimento, devido a mudanças nas condições ambientais ou desequilíbrio nutricional.

Como demonstrado ao longo desse estudo, as microalgas são fonte de diferentes compostos e a produção de um ou outro composto é favorecida pela cepa e pela variação nutricional e ambiental. Em nossos ensaios foi possível produzir simultaneamente pigmentos e lipídios neutros. Estes podem ser aplicados por exemplo, na produção de biodiesel enquanto os pigmentos são destinados a fins mais nobres, como corantes para alimentos ou indicadores de cor em sensores.

4 CONCLUSÃO

A substituição da fonte de carbono padrão do meio de cultura por xilose mostrou ser uma alternativa na indução da síntese de lipídios neutros nas cepas de *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18. Os benefícios da adição de xilose foram elevados quando combinados com redução na fonte de nitrogênio, sendo obtidos incrementos máximos de lipídeos neutros de 89 % para *Chlorella fusca*

cultivada em 50 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N, 580 % para *Chlamydomonas komma* cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N, 4424 % para *Parachlorella kessleri* cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 50 % de N e 8131 % para *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em 100 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N. Dentre os lipídios neutros sintetizados pelas cepas, destaca-se a produção de PHA por *Chlorella fusca*, que elevou sua produção em 978 % ao ser cultivada com 100 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N. Se por um lado, a adição de xilose combinada com deficiência de nitrogênio apresentou resultados positivos quanto aos lipídios, a mesma modificação também foi responsável pela redução drástica na biomassa microalgal e pigmentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNON, D. I. COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 1949.
- BEGUM, H.; YUSOFF, F. M. D.; BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2 out. 2016.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S475–S479, 1 jan. 1997.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Pseudomonas oleovorans as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, ago. 1988.
- CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALBERTO, J. C. V. Evaluation of the Influence of Nitrogen and Phosphorus Nutrients in the Culture and Production of biosurfactants by Microalga Spirulina. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 6, p. 90–98, 2014.
- CASSURIAGA, A. P. A.; FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Innovative polyhydroxybutyrate production by Chlorella fusca grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456–463, 2018.
- CHAI, S.; SHI, J.; HUANG, T.; GUO, Y.; WEI, J.; GUO, M.; LI, L.; DOU, S.; LIU, L.; LIU, G. Characterization of chlorella sorokiniana growth properties in monosaccharide-supplemented batch culture. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–19, 2018.
- CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282–291, 2015.
- CHEN, Z.; WANG, L.; QIU, S.; GE, S. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty

Acid for Biofuel Production. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–17, 2018.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, 2011.

DA SILVA, C. K.; COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 Using Biopolymer Extraction Waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, 2018.

DENG, C.; HU, Z.; FU, H.; HU, M.; XU, X.; CHEN, J. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1–2, p. 70–5, jan. 2012.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, G.; DASH, S. K.; SEN, R. Development of an optimal light-feeding strategy coupled with semi-continuous reactor operation for simultaneous improvement of microalgal photosynthetic efficiency, lutein production and CO₂ sequestration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 113, p. 47–56, 2016.

FREITAS, B. C. B.; ESQUÍVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129–133, out. 2016.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248–253, 2017.

FU, W.; GUDMUNDSSON, S.; WICHUK, K.; PALSSON, S.; PALSSON, B. O.; SALEHI-ASHTIANI, K.; BRYNJÓLFSSON, S. Sugar-stimulated CO₂ sequestration by the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 275–283, 2019.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 4 fev. 2009.

HO, S.-H.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8725–8730, nov. 2010.

HONDO, S.; TAKAHASHI, M.; OSANAI, T.; MATSUDA, M.; HASUNUMA, T.; TAZUKE, A.; NAKAHIRA, Y.; CHOHNAN, S.; HASEGAWA, M.; ASAYAMA, M. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 510–517, 2015.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, maio 2012.

JOHNSON, X.; ALRIC, J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 6, p. 776–793, 2013.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; PALANI, P.; RENGASAMY, R.

Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 700–706, ago. 2016.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: A short overview. **Macromolecular Symposia**, v. 130, n. 1, p. 245–260, 1 abr. 1998.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

LICHTENTHALER, H. K.; LANGSDORF, G.; LENK, S.; BUSCHMANN, C. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 355–369, set. 2005.

LOURENÇO, S. DE O. Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações. [s.l.] RiMa, 2006.

MAHANSARIA, R.; DHARA, A.; SAHA, A.; HALDAR, S.; MUKHERJEE, J. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwensis* (as synonym) $\equiv$ *Natrinema altunense* strain RM-G10. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1480–1490, 2018.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

PANDEY, A.; LEE, D.-J.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. R. **Biofuels From Algae**. San Diego: Elsevier B.V., 2014.

PARANJAPE, K.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 778–786, 2016.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RICHMOND, A. (ED.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M. R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 243–248, 2003.

SFORZA, E.; SIMIONATO, D.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; MOROSINOTTO, T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

SHIH, P. M.; ZARZYCKI, J.; NIYOGI, K. K.; KERFELD, C. A. Introduction of a synthetic CO₂-fixing photorespiratory bypass into a cyanobacterium. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 289, n. 14, p. 9493–9500, 2014.

SINGH, A. K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. **FEMS Microbiology Letters**, n. December, p. 1–13, 2017.

SINGH, D. P.; KHATTAR, J. S.; RAJPUT, A.; CHAUDHARY, R.; SINGH, R. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–19, 2019.

SLEGERS, P. M.; VAN BEVEREN, P. J. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

STANIER, R. Y.; DERUELLES, J.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WATERBURY, J. B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1 mar. 1979.

SUN, H.; ZHAO, W.; MAO, X.; LI, Y.; WU, T.; CHEN, F. High-value biomass from microalgae production platforms: Strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2018.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D.; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. 2014.

VAZ, B. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Paris: University of Paris, 1966.

ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

ZHU, J.; CHEN, W.; CHEN, H.; ZHANG, X.; HE, C.; RONG, J.; WANG, Q. Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.

ZURIANI, R.; VIGNESWARI, S.; AZIZAN, M. N. M.; MAJID, M. I. A.; AMIRUL, A. A. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 472–478, 2013.

ARTIGO 3

**INOVADORES SENSORES DE pH DESENVOLVIDOS A PARTIR DE FIBRAS
ULTRAFINAS CONTENDO EXTRATO DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*)**

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de fibras ultrafinas com extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para utilização como sensores de pH com potenciais aplicações na indústria alimentícia. As fibras foram produzidas pela técnica de *electrospinning* utilizando soluções poliméricas compostas de 7 % (m v⁻¹) policaprolactona, 2 % (m v⁻¹) óxido de polietileno e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí (EA). Os polímeros foram solubilizados em clorofórmio e metanol na proporção de 3:1. As fibras produzidas apresentaram diâmetro médio de 1635 ± 277 nm, com características hidrofílicas (ângulo de contato < 90°), um ponto de fusão de 58 °C e temperatura máxima de degradação de 408 °C. A diferença de cor total (ΔE) da resposta colorimétrica foi superior a 5, valor que corresponde a capacidade humana de diferenciação de cores. Este novo material pode ser utilizado como sensor de pH para alimentos como a carne de porco e peixes para garantir qualidade e segurança ao consumidor, que pode verificar visualmente o estado sanitário no qual o produto se encontra.

Palavras-chave: Antocianinas. *Electrospinning*. Extrato de Açaí. Nanofibras. Sensor de pH.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1 em cada 10 pessoas adoece todos os anos devido à ingestão de alimentos contaminados. A qualidade dos alimentos à disposição do consumidor depende das condições higiênicas e sanitárias ligadas à seleção das matérias-primas, à produção, manuseio, armazenamento e distribuição dos alimentos processados (HOFFMANN et al., 2017).

As embalagens utilizadas para o armazenamento de alimentos têm um papel fundamental na manutenção da qualidade do produto. A embalagem destina-se a proteger o alimento, para manter a sua forma e para informar ao consumidor sobre a condição sanitária do produto (TRINETTA, 2016). Os sensores podem ser adicionados às embalagens para fornecer informações sobre a qualidade dos alimentos nelas contidos. Estes incluem sensores de CO₂ (HUSSAIN et al., 2018; PULIGUNDLA; JUNG; KO, 2012), NH₃ (MA; DU; WANG, 2017), bisfenol A (YIN et al., 2018) e de pH (CHOI et al., 2017; PRIETTO et al., 2017, 2018b).

Os sensores de pH são dispositivos utilizados para ajudar a garantir a qualidade dos alimentos. À medida que os micro-organismos se multiplicam, ocorrem mudanças no pH e o monitoramento em tempo real por sensores pode indicar aos consumidores se o alimento está adequado para o consumo humano. Sensores que empregam agentes químicos, como o verde bromocresol (MAKOTE; M. COLLINSON, 1999), vermelho clorofenol e vermelho cresol (DONG et al., 2008), podem ser utilizados para medir o pH. No entanto, para aplicações na indústria alimentícia, o uso de agentes químicos é controlado pela legislação, uma vez que pode afetar a saúde do consumidor. Por esta razão, a busca por sensores que utilizem compostos naturais, como os pigmentos de microalgas (MOREIRA et al., 2018) e antocianinas (MAFTOONAZAD; RAMASWAMY, 2019; PRIETTO et al., 2017), tornou-se importante.

Estudos foram realizados para produzir biosensores utilizando antocianinas, porque estes pigmentos mudam de cor quando expostos a diferentes níveis de pH. Algumas das fontes de antocianinas que já foram testadas para aplicação como biosensores incluem a flor de rosa (PEREIRA; DE ARRUDA; STEFANI, 2015; SHUKLA et al., 2016), repolho vermelho (SALIU; DELLA PERGOLA, 2018b), rosélia (ZHAI et al., 2017), batata doce roxa (CHOI et al., 2017), pata de vaca (ZHANG; LU; CHEN, 2014) e feijão preto (PRIETTO et al., 2017). O perfil de antocianinas varia significativamente entre diferentes fontes (AGAWA et al., 2011; PRIETTO et al., 2017), e a intensidade, tonalidade e estabilidade da cor estão ligados às diferentes estruturas químicas encontradas (ANANGA et al., 2013). Assim, o

estudo de novas fontes, tais como açaí para obtenção de extratos ricos em antocianinas pode ajudar na melhoria dos sensores de pH naturais. O Açaí (*Euterpe oleracea* Mart) é um fruto comum da região amazônica que ganhou destaque no mercado global como superalimento por ser uma fonte rica em energia além de sua composição química. Os compostos fenólicos, antocianinas, lignoides, ácidos graxos, quinonas, terpenos e norisoprenoides estão entre os compostos bioativos encontrados no açaí (YAMAGUCHI et al., 2015). As antocianinas do açaí que permitem a sua utilização como sensor de pH.

As fibras poliméricas ultrafinas são alternativa para o desenvolvimento de sensores alimentares visto que polímeros biocompatíveis, não tóxicos e biodegradáveis podem ser utilizados para a sua produção. Estes materiais têm vantagens sobre filmes poliméricos devido à sua alta área de superfície e porosidade, que aumentam a interação do biocomposto com o meio (RAMAKRISHNA, 2005), e devido ao potencial para aumentar a sua produção (PETRIK, 2011). Outra vantagem é a possibilidade de utilizar misturas de polímeros para controlar as características dos suportes, de modo que estes sejam suficientemente hidrofílicos para interagir com o indicador de pH, porém sem dissolver-se na água (TIPDUANGTA et al., 2016).

A aplicação de fibras como biossensores na indústria alimentícia não foi investigada e espera-se contribuir para a base de conhecimento técnico e científico com este estudo sobre o aproveitamento de antocianinas do açaí com a aplicação desses pigmentos em fibras poliméricas para utilização como sensores de pH. Neste trabalho, objetivou-se produzir fibras utilizando extrato de açaí (EA) como um sensor para pH com potenciais aplicações na indústria alimentícia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE AÇAÍ E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS

O Açaí foi obtido de produtores do arquipélago do Bailique (Amapá - Brasil) e utilizado para produzir extratos contendo antocianinas de acordo com a metodologia descrita por Francis (1982). Açaí liofilizado (5 g) foi suspenso em 30 mL de metanol acidificado (85 % de metanol P.A. acidificado com HCl 1,5 mol L⁻¹). A suspensão foi mantida no escuro a 4 °C durante 24 h. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2000×g por 10 min (CR22GIII - Hitachi, Japão), e o sobrenadante (extrato contendo antocianinas) foi armazenado a 4 °C. A concentração de antocianinas no EA foi determinada por espectrofotometria UV-Vis de acordo com Equação 1:

$$(\text{cianidina-3-glicosídeo equivalentes, mg L}^{-1}) = (A * MW * FD * 10^3) / (\epsilon * 1) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, $A = (ab_{S520nm} - ab_{S700nm})_{pH1,0} - (ab_{S520nm} - ab_{S700nm})_{pH4,5}$; MW (massa molecular da cianidina-3-glicosídeo) = $449,2 \text{ g mol}^{-1}$; FD = fator de diluição; 1 = espessura da cubeta (cm); ϵ =coeficiente de excitação molar em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 10^3 =fator de conversão de g para mg (LEE; DURST; WROLSTAD, 2005).

2.2 MUDANÇA DE COR DO EA

A capacidade de mudança de cor do EA quando submetido a diferentes valores de pH foi determinada por espectrofotometria (UVmini-1240 Shimadzu, Japão). Para esse processo, o EA foi adicionado a 10 tampões diferentes com valores de pH variando de 1 a 10 e escaneados na faixa de 800-200 nm.

2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

Soluções poliméricas contendo 3 % (m v^{-1}) de EA foram preparadas a partir das seguintes concentrações dos polímeros policaprolactona (PCL) e óxido de polietileno (PEO), respectivamente, 4:2; 5:2; 6:2; 7:2; 8:2; 6:1,7; 5:1,4; 4:1,1; 3:0,85; 11:0 e 0:6 (% m v^{-1}), utilizando os solventes clorofórmio e metanol na proporção 3:1 v v^{-1} . Os raios de polímeros e solventes foram determinados previamente (dados não mostrados). Os polímeros foram inicialmente dissolvidos em clorofórmio utilizando agitador magnético durante 16 h à temperatura ambiente ($22 \pm 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, 3 % (m v^{-1}) de EA em metanol foi adicionado à solução polimérica e agitado por mais 20 minutos. Também foram produzidas soluções sem adição de EA e com os polímeros individuais, contendo 11 % (m v^{-1}) de PCL (SCHMATZ et al., 2016) ou 6 % (m v^{-1}) de PEO (FIGUEIRA et al., 2016), ambos em clorofórmio e metanol (3:1) como solvente.

2.4 VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS

A viscosidade das soluções poliméricas foram medidas utilizando amostras de 0,5 mL de cada solução em reômetro (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, EUA) (KUNTZLER et al., 2018). Esta análise consistiu em medições diretas da viscosidade das soluções poliméricas com ou sem a adição de EA.

2.5 PROCESSO DE ELECTROSPINNING

No processo de *electrospinning* as soluções preparadas foram injetadas através do capilar e depositadas em coletor de alumínio do tipo rotatório cilíndrico. As nanofibras

contendo diferentes relações PCL/PEO e extrato de açaí foram produzidas utilizando taxa de alimentação igual a $600 \mu\text{L h}^{-1}$, potencial elétrico de 20 kV, diâmetro de capilar de $0,45 \mu\text{m}$ e distância entre capilar e coletor igual a 125 mm. Todos os testes foram conduzidos à $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $50 \pm 2\%$. As nanofibras somente com PCL foram produzidas com distância entre capilar e coletor de 120 mm, diâmetro do capilar $0,80 \text{ mm}$, potencial elétrico 25 kV e taxa de alimentação $2000 \mu\text{L h}^{-1}$ (SCHMATZ et al., 2016). Nas nanofibras contendo PEO foram utilizadas as condições de distância entre capilar e coletor de 120 mm, diâmetro do capilar $0,45 \text{ mm}$, potencial elétrico 24,3 kV e taxa de alimentação $150 \mu\text{L h}^{-1}$ (FIGUEIRA et al., 2016).

2.6 MORFOLOGIA DAS FIBRAS PRODUZIDAS

As fibras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Para este fim, as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro, utilizando-se a pulverização do diodo *sputtering* (Denton Vacuum CAR001-0038, EUA). Os parâmetros do microscópio utilizados para a obtenção das imagens foram 15 kV de tensão do feixe de elétrons, uma distância de trabalho para medição de 12 mm e zoom de 3500 vezes. O diâmetro das fibras foi determinado utilizando a média de 40 medidas.

2.7 PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FIBRAS PRODUZIDAS

As fibras ultrafinas foram caracterizadas pela análise termogravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA) (Shimadzu DTG-60, Japão) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japão). Para a análise DSC, foi colocada uma amostra de 3 mg de fibras sob atmosfera de nitrogênio a 50 mL min^{-1} . A temperatura inicial de 25°C foi aumentada para 180°C , com uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Para determinar a estabilidade térmica e o solvente residual, amostras de 3 mg foram analisadas pela TGA e pela DTA. A análise foi conduzida de 25 a 500°C sob atmosfera de nitrogênio a 30 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ (ASTM, 2014, 2015).

2.8 MOLHABILIDADE DAS FIBRAS

A molhabilidade das fibras foi determinada medindo o ângulo de contato da água com a fibra. Uma gota de água deionizada foi colocada em 5 posições diferentes na superfície da fibra e fotografada (microscópio Digital Blue). O ângulo de contato formado entre a amostra e a gota d'água foi medido utilizando o software ImageJ (KUNTZLER et al., 2018).

2.9 VARIAÇÃO DA COR DA FIBRA EM FUNÇÃO DO PH

As fibras contendo EA foram divididas em seções de 20 mm×20 mm e submersas em 10 tampões diferentes (0,2 mM) com valores de pH variando de 1 a 2 (tampão KCl), 3 a 5 (tampão citrato), 6 a 8 (tampão fosfato) e 9 a 10 (tampão glicina). Cada fibra foi mantida em contato com o tampão por 5 s e então foi realizada a leitura da cor.

Os parâmetros de cor das fibras ultrafinas foram determinados utilizando colorímetro (Modelo Medidor de Croma CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão) com o sistema CIELab (iluminante D65). Três medidas foram realizadas para cada sensor, e os valores de L^* (luminosidade), a^* (vermelho/verde) e b^* (amarelo/azul) foram determinados. Com estes valores, a diferença de cor total (ΔE) foi calculada pela equação $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$, onde: $\Delta L^* = L^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b^* - b_0^*$. Os valores de ΔE foram obtidos entre os diferentes valores de pH, por exemplo, o ΔE de pH 5 utiliza o pH 4 como referência. Esta abordagem garante mudanças perceptíveis de um pH para outro. A única exceção é o ΔE para o pH 1, que foi calculado utilizando como referência as fibras que ainda não estão em contato com o tampão como referência. Os parâmetros para tonalidade, ângulo *Hue* e cromatização foram calculados utilizando as seguintes equações: $Hue = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ e $Chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, onde a^* e b^* são parâmetros do sistema CIELab.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos resultados foram comparadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com um nível de confiança de 95 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

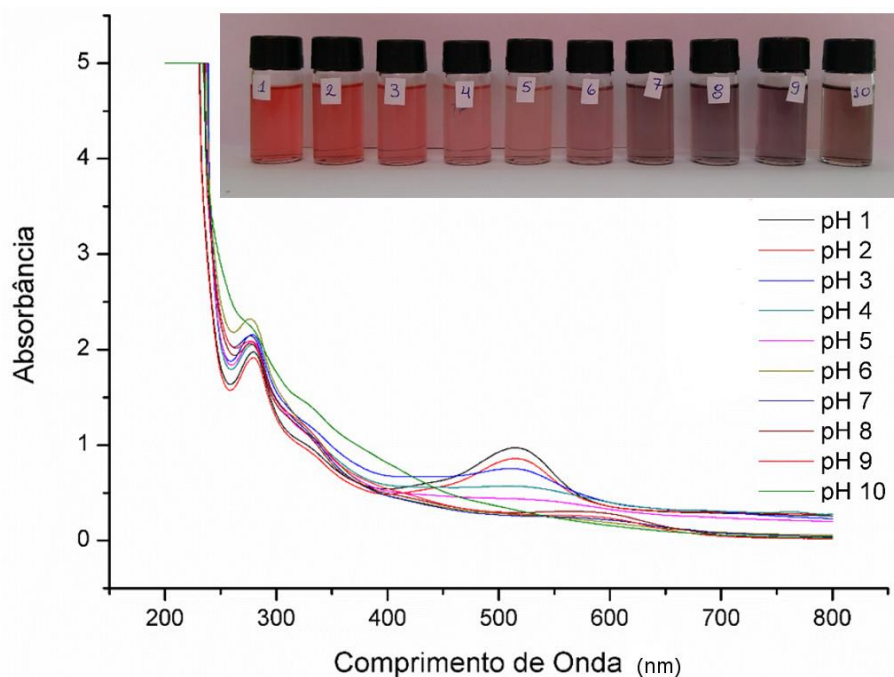
3.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MUDANÇA DE COR DO EA

Antes da produção das fibras, o conteúdo de antocianinas no extrato foi quantificado como $0,61 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando metanol como o solvente extrator. Como a extração das antocianinas não foi o objetivo do estudo, nenhum outro método foi utilizado para extrair o composto. O metanol foi selecionado como solvente, devido à solubilidade do polímero no mesmo.

O primeiro passo para o desenvolvimento dos sensores de pH foi a avaliação da capacidade de mudança de cor do EA (Fig. 1). Os compostos responsáveis para a coloração do açaí incluem antocianinas e clorofilas, sendo que frutos maduros tem concentrações mais elevadas de antocianinas (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). De acordo com Fernandes et al. (2013), e Fibigr; Šatínský; Solich (2017), seis antocianinas estão

presentes no açaí: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, e petunidina. Estas antocianinas são responsáveis pela variação de cor observada em soluções contendo o extrato.

Figura 1 - Imagens da coloração da amostra e dos espectros UV-Vis de soluções de EA em diferentes valores de pH.



No pH 1, um pico máximo de absorção foi observado em comprimentos de onda próximos de 520 nm. Neste pH, foi observada uma cor vermelha intensa no extrato. Quando pH aumentou de 1 para 5, observou-se redução gradual na absorbância e a cor vermelha diminuiu a intensidade. Ao mudar o pH de 6 para 10, surgiu uma cor mais escura, próxima ao roxo acinzentado (Fig. 1). Nesta faixa de pH, foi observada mudança no pico máximo de absorção, variando de 520 a 590 nm. De acordo com Choi et al. (2017), tal alteração no pico de absorção da solução contendo antocianinas é chamada de deslocamento batocrômico. Este fenômeno é atribuído à formação de uma pseudobase de carbinol (LEVI et al., 2004; MA et al., 2017).

3.2 PRODUÇÃO DE FIBRAS ULTRAFINAS DE PCL E PEO CONTENDO EA

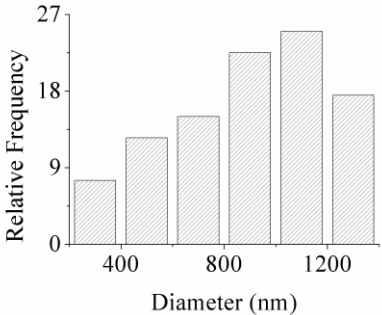
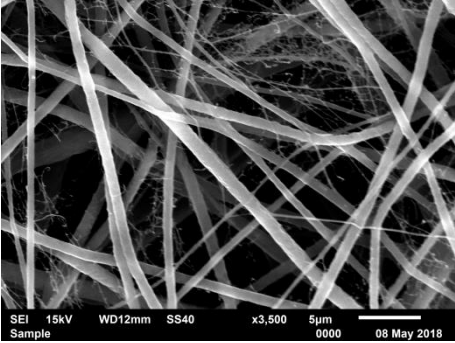
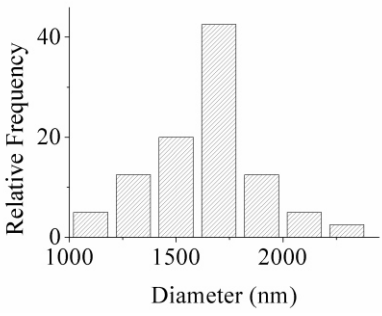
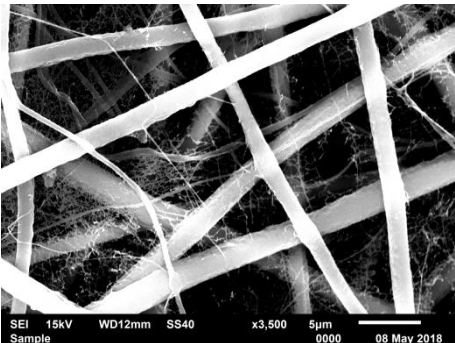
Devido a capacidade de variação de cor apresentada pelo extrato exposto a diferentes valores de pH foram produzidas fibras com incorporação deste extrato. Os ensaios contendo somente 11 % (m v⁻¹) PCL ou 6 % (m v⁻¹) PEO apresentaram diâmetros médios de 438 ± 125 nm e 319 ± 55 nm, respectivamente. A adição de 3 % (m v⁻¹) extrato de açaí aumentou os diâmetros médios para 2445 ± 875 nm quando a solução foi formulada com 11

% (m v⁻¹) de PCL e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí e, aumentou para 2518 ± 895 quando composto por 6 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí. Além da adição de extrato de açaí, as condições de operação do *electrospinning* utilizadas nos ensaios citados, foram determinadas para a produção de fibras utilizando a blenda dos polímeros. Essas condições do processo também podem ter ocasionado a elevação do diâmetro médio.

Como pode ser visualizado nas micrografias e gráficos de frequência, ocorreu baixa homogeneidade das fibras produzidas (Tabela 1). De acordo com Bhardwaj e Kundu (2010), a produção de fibras uniformes pode ser resultado da concentração polimérica na etapa de pré-produção. Em baixas concentrações de polímero pode não ocorrer a formação de fibras, ou quando são formadas é comum o aparecimento de grânulos. Esse comportamento foi observado no ensaio contendo 3 % (m v⁻¹) de PCL, 0,85 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí. Por outro lado, concentrações altas de polímero dificultam o processo de formação de fibras, devido ao entupimento do capilar, o que foi observado no ensaio formulado com 8 % (m v⁻¹) de PCL, 2 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí. Sendo assim, a concentração ideal da solução polimérica deve ser definida para que o jato de *electrospinning* seja estabilizado e ocorra a formação de fibras contínuas.

No ensaio composto pela blenda de PCL, PEO e extrato de açaí (4:2:3 %) foram produzidas fibras ultrafinas com diâmetro médio de 885 ± 284 nm. Quando a blenda foi composta por maiores concentrações de PCL (5, 6 e 7 %) os diâmetros médios foram superiores a 1000 nm (1774 ± 159 nm, 1588 ± 361 nm e 1635 ± 277 nm, respectivamente). No ensaio correspondente a menor concentração polimérica capaz de formar fibras, contendo 4 % (m v⁻¹) de PCL, 1,1 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí foi obtido o menor diâmetro médio de fibras (456 ± 129 nm). A baixa concentração polimérica ocasionou a menor viscosidade obtida. Segundo Jaworek et al. (2009), quando a viscosidade da solução é baixa, o jato de *electrospinning* é desestabilizado, dando origem a fibras com gotas ou a ausência da formação de fibras. Isso acontece devido a não formação do entrelaçamento entre as cadeias poliméricas. O aumento da viscosidade das soluções ocorreu com a adição de PCL, pois a concentração total dos polímeros (PCL + PEO) aumentou de 6 para 9 % (m v⁻¹). A elevada concentração polimérica resulta no aumento da viscosidade da solução, influenciando na morfologia e na formação de fibras uniformes com maior diâmetro. Entretanto, viscosidades muito altas podem obstruir o capilar, impedindo a formação do jato de *electrospinning*. As baixas viscosidades não proporcionam a formação de fibras e indicam a ausência do entrelaçamento entre as cadeias poliméricas (KAI; LIOW; LOH, 2015).

Tabela 1 - Micrografia, diâmetro médio e frequência de distribuição de diâmetros das fibras produzidas com policaprolactona (PCL), polietileno oxido (PEO) e extrato de açaí (EA).

Solução (m v ⁻¹)	Frequência de diâmetro	Micrografia e diâmetro médio
PCL:PEO:EA		
4:2:3		 Diâmetro das fibras = 885 ± 284 nm
7:2:3		 Diâmetro das fibras = 1635 ± 277 nm

3.3 PROPRIEDADES TÉRMICAS DAS FIBRAS

Nos testes com fibras que foram produzidas com PCL ou PEO, a decomposição térmica ocorreu em um único evento endotérmico cujas temperaturas são apresentadas na Tabela 2. Em ambos casos, observou-se que a adição do extrato de açaí nas concentrações estudadas não afetou as propriedades térmicas das fibras. No entanto, a adição do extrato causou uma leve mudança na temperatura de fusão do PCL de 60 °C para 57 °C e na temperatura de fusão do PEO de 68 °C para 66 °C. Comportamento similar foi relatado por Gonçalves et al., (2017), que, ao adicionar biopeptídeos às nanofibras de PCL, verificaram deslocamento das curvas térmicas.

Tabela 2 - Propriedades térmicas das fibras produzidas com policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO) e extrato de açaí (EA): temperatura de fusão (T_f), Entalpia (H), temperatura inicial de degradação (T_{id}), Temperatura de degradação máxima (T_{dm}) e temperatura final de degradação (T_{fd}).

Concentração da solução, % (PCL:PEO:EA)	T_f (°C)	H (J g⁻¹)	T_{id} (°C)	T_{dm} (°C)	T_{fd} (°C)
11:0:0	60	-56,4	356	405	425
0:6:0	68	-150,2	319	391	417
4:2:3	57	-75,5	351	396	429
5:2:3	58	-82,4	350	405	425
6:2:3	59	-82,4	358	403	429
7:2:3	58	-87,7	353	408	431
6:1,7:3	58	-87,9	354	399	420
5:1,4:3	58	-89,4	360	407	420
4:1,1:3	57	-92,3	355	402	418
11:0:3	57	-81,2	352	403	429
0:6:3	66	-142,7	344	401	425

Para os outros ensaios contendo PCL, PEO e EA, a mistura dos componentes resultou em uma temperatura de fusão intermediária variando de 57 a 59 °C, uma entalpia de 75,5 a 92,3 °C e uma degradação média de temperatura entre 396 e 408 °C. Estes valores demonstram o potencial das fibras ultrafinas para aplicação em embalagens de alimentos, pois estas temperaturas dificilmente são alcançadas durante a armazenagem. Outro ponto importante em relação à sua aplicabilidade para utilização em alimentos é a ausência de solventes residuais nas fibras. Isso pode ser confirmado afirmada pela ausência de sobreposição de picos endotérmicos na curva DSC e a ausência de perda de massa observada em TGA próximo da temperatura de ebulição dos solventes clorofórmio (61,2 °C) e metanol (64,7 °C). Os valores obtidos neste estudo coincidem com os relatados por Gonçalves et al. (2017). Os autores produziram nanofibras de PCL com diâmetro médio de 404 nm e as seguintes propriedades térmicas: $T_f=58,8$ °C, $T_d=403$ °C e $T_{fd}=434$ °C.

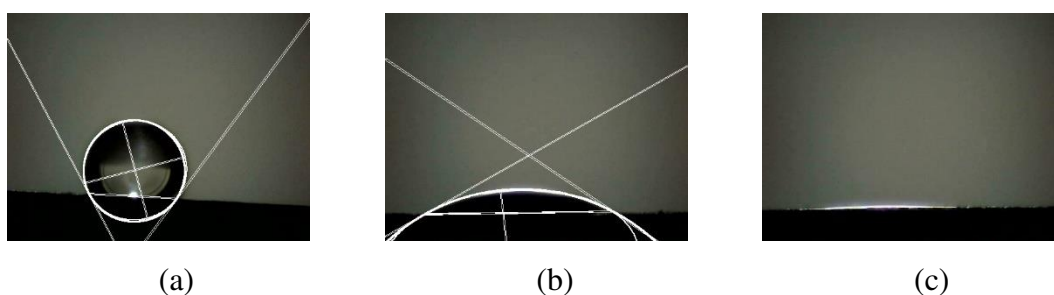
A fabricação de um sensor deve proteger o composto utilizado, mas ao mesmo tempo deve permitir a interação entre o composto e o ambiente (por exemplo, carne de porco). Neste caso, a escolha de PCL e PEO pode ser justificada pelas propriedades que se combinam para proteger os compostos do extrato de açaí presentes no sensor sem prejudicar a interação

entre o sensor e o ambiente. O PCL é um polímero biodegradável derivado do petróleo, com baixo ponto de fusão de aproximadamente 60 °C (MCKEEN, 2012). As razões para a sua utilização na indústria incluem facilidade de processamento, flexibilidade e boa resistência à água e ao óleo (RUDNIK, 2013). Como será demonstrado na seção seguinte, a utilização exclusiva do PCL não proporcionou boa interação com a água, mostrando que outro componente foi necessário para melhorar a qualidade do sensor. A adição de PEO, um polímero solúvel em água para formar uma mistura PCL:PEO, aumentou a interação entre o sensor e os tampões.

3.4 MOLHABILIDADE DAS FIBRAS

Para fibras produzidas exclusivamente com PCL, o ângulo médio de contato foi de $122,34 \pm 1,72^\circ$ (Fig. 2a). De acordo com Yuan e Lee (2013), quando o valor desse ângulo é maior que 90° , as fibras produzidas têm características hidrofóbicas. De acordo com esses autores, materiais com esta característica desfavorecem a absorção de água na superfície, formando gotículas líquidas compactas. Para fibras produzidas com misturas PCL e PEO, foi possível medir o ângulo de contato apenas no teste contendo 7:2 % (m v⁻¹) (Fig. 2b), que foi $30,25 \pm 4,32^\circ$. Nos outros testes, não foi possível medir o ângulo de contato porque a água foi instantaneamente dissipada na superfície das fibras (Fig. 2c).

Figura 2 - Ângulo de contato das fibras produzidas com 11 % PCL (a), 7:2:3 % PCL:PEO:EA, respectivamente e (b) demais ensaios (c).



3.5 RESPOSTA DAS FIBRAS À VARIAÇÃO DO PH

A blenda de PCL, PEO e EA (8:2:3 %), que não produziu fibras, e a mistura contendo (0:6:3 %), que foi solúvel em água porque apenas PEO estava presente na formulação, não foram testadas.

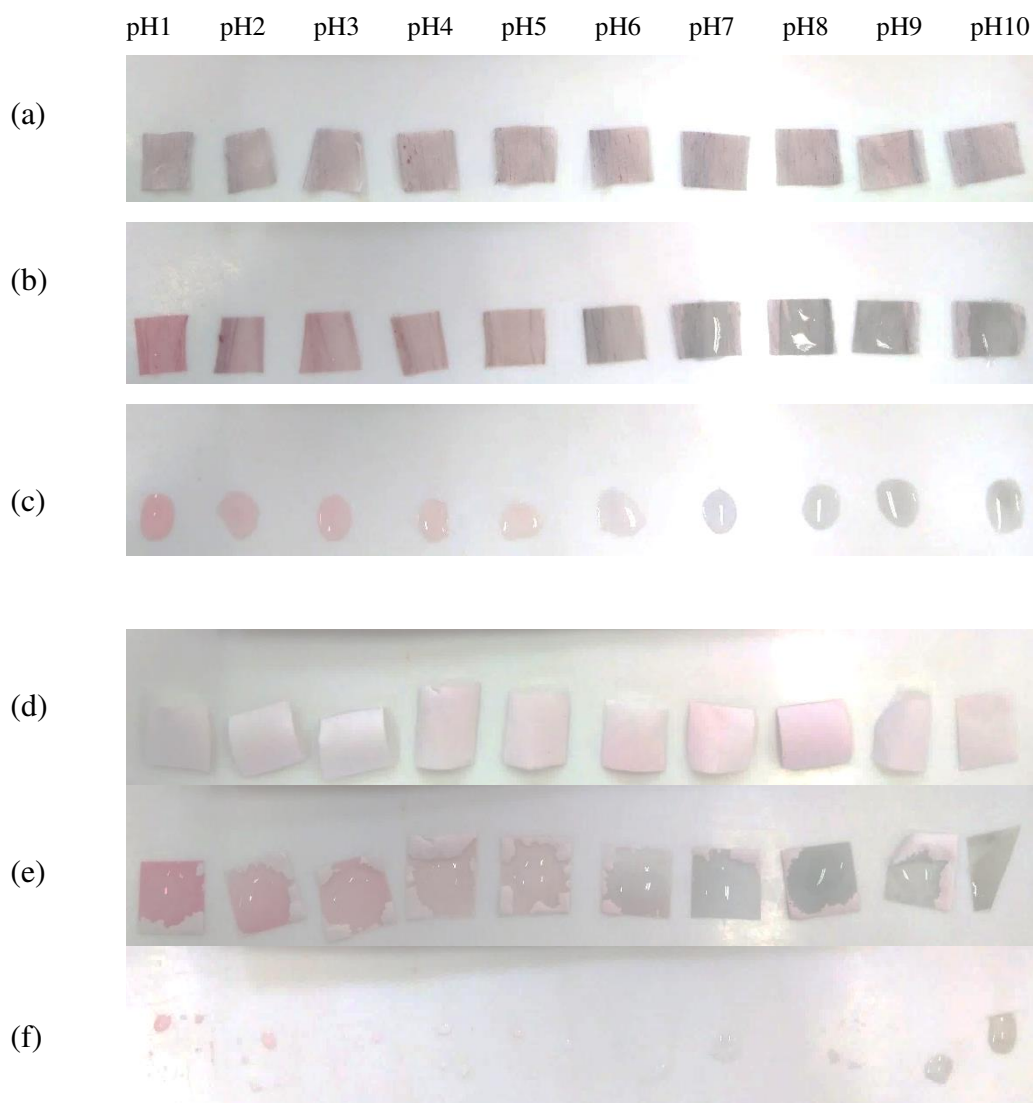
As fibras produzidas apresentaram coloração rosa característica devido às antocianinas presentes no EA (Fig. 3a e Fig. 3d). Após serem colocadas em contato com o tampão, a coloração observada nos ensaios variou de acordo com o pH, vermelha em pH ácido e cinza em pH alcalino. (Fig. 3b e Fig. 3e). Entretanto, nos ensaios com menor

concentração de PCL, após as fibras terem sido mergulhadas nos tampões, os compostos pigmentados foram liberados, indicando baixa fixação nas fibras, conforme mostra a Fig. 3c. Quando uma maior proporção da blenda PCL:PEO foi utilizada, foi observada melhor fixação do composto nas fibras (Fig. 3e), uma vez que o polímero PCL apresenta características mais hidrofóbicas que o PEO. A utilização de blendas formadas por polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos permitem um melhor controle da liberação dos compostos. O aumento do teor de polímeros não polares aumenta a hidrofobicidade do material, reduzindo a tendência de absorção de água e melhora a estabilidade a longo prazo (TIPDUANGTA et al., 2016; YANG et al., 2013).

Baseado nas observações anteriores, a análise colorimétrica foi realizada nas fibras ultrafinas produzidas nas proporções 4:2:3 e 7:2:3 % PCL:PEO:EA, para avaliar qual apresentava a melhor resposta quanto a variação do pH. Nesta análise, os parâmetros L^* e b^* permaneceram praticamente constantes em diferentes valores de pH. Entretanto, quando o pH foi elevado de 1 para 10, o parâmetro a^* variou de aproximadamente 18 para 0 em todos os ensaios. Este comportamento foi observado nos experimentos de variação de cor avaliados por espectros UV-Vis, que mostraram que a cor do extrato de açaí mudou de vermelho para verde.

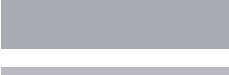
Entre os parâmetros de diferenciação de cor, a diferença de cor total (ΔE) é considerada um dos mais importantes. De acordo com Mokrzycki (2011), para valores de ΔE abaixo de 1, o observador não detecta a diferença de cor; para valores entre 1 e 2, apenas observadores treinados podem detectar a diferença; entre 2 e 3,5, observadores inexperientes também percebem a diferença de cor; entre 3,5 e 5, a diferença de cor é evidente; e para valores de ΔE superiores a 5, o observador detecta duas cores diferentes. Na Tabela 3, são apresentados os valores de ΔE para cada valor de pH, sendo utilizados como valores de referência, os parâmetros $L^*a^*b^*$ medidos no pH anterior. Apenas para o ΔE do pH 1 foi utilizado como referência os parâmetros $L^*a^*b^*$ do branco, pois o cálculo de ΔE exige um valor de referência. O sensor de pH composto por PCL, PEO e extrato de açaí (7:2:3 %) apresentou os máximos valores de ΔE para todos os valores de pH. Isso pode estar ligado ao fato de que neste ensaio foi utilizada a maior relação polimérica entre o PCL e PEO o que reduz a perda do extrato para o meio.

Figura 3 - Fibras ultra finas em diferentes valores de pH: Ensaio com 4:2 % m v⁻¹ de PCL:PEO, (a) antes, (b) durante e (c) após entrar em contato com tampões; Ensaio com 7:2 % m v⁻¹ de PCL:PEO, (d) antes, (e) durante e (f) após entrar em contato com tampões.



Na Tabela 3 também, são apresentadas as variações no tom de cor das amostras descritas pelos valores dos ângulos *Hue*, para os ensaios contendo (4:2:3 %) e (7:2:3 %), respectivamente, de PCL, PEO e EA, quando colocados em 10 tampões com diferentes valores de pH. Estes valores situavam-se entre o quadrante I e IV (MCLELLAN; LIND; KIME, 1994), representando uma variação entre vermelho na faixa de pH ácido de 1 a 5 e azul em pH básico de 7 a 10. Além da variação de cor, a saturação de cor, indicada pelos valores *Chroma*, também foram afetados pela mudança do pH. Tanto a amostra formulada com 4:2:3 % como o 7:2:3 % apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na saturação da cor com a redução do pH.

Tabela 3 - Indicadores de variação de cor das fibras ultrafinas produzidas com policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO) e extrato de açaí (EA) submetidos a diferentes valores de pH.

Ensaio composto por PCL:PEO:EA (4:2:3, %)				
pH	ΔE	Chroma	Hue	Cor correspondente
Branco	-	6.68 ± 0.44^c	352.70 ± 5.26^a	
1	11.85 ± 1.38^a	13.83 ± 1.09^a	346.73 ± 1.84^{ab}	
2	2.05 ± 0.23^{bc}	14.03 ± 0.95^a	351.18 ± 1.49^a	
3	4.20 ± 1.46^{bc}	10.02 ± 0.65^b	349.65 ± 2.46^{ab}	
4	5.12 ± 1.52^{bc}	6.33 ± 0.05^c	337.04 ± 0.46^{bc}	
5	1.17 ± 0.30^c	6.27 ± 0.36^c	335.87 ± 4.07^{bc}	
6	5.84 ± 2.66^b	5.29 ± 0.05^{cd}	329.47 ± 11.43^c	
7	5.56 ± 1.27^b	3.85 ± 0.16^{de}	290.97 ± 5.41^d	
8	3.34 ± 1.75^{bc}	3.41 ± 0.19^e	275.68 ± 4.97^e	
9	5.44 ± 1.84^{bc}	4.32 ± 0.10^{ed}	287.94 ± 1.20^{de}	
10	5.12 ± 1.03^{bc}	3.53 ± 0.08^e	291.22 ± 1.74^d	
Ensaio composto por PCL:PEO:EA (7:2:3, %)				
pH	ΔE	Chroma	Hue	Cor correspondente
Branco	-	7.80 ± 0.38^d	358.65 ± 1.31^a	
1	17.41 ± 4.39^a	18.10 ± 2.97^a	357.69 ± 2.22^{ab}	
2	6.13 ± 4.62^b	13.42 ± 1.26^b	356.87 ± 2.65^{abc}	
3	4.75 ± 3.04^b	11.62 ± 1.53^{bc}	356.84 ± 1.59^{abc}	
4	5.56 ± 0.67^b	8.97 ± 0.05^{cd}	3.71 ± 1.26^e	
5	9.15 ± 2.02^{ab}	6.66 ± 1.04^{ed}	343.60 ± 8.77^{cb}	

Cont. Tab. 3

6	8.92±2.84 ^{ab}	6.35±0.50 ^{ed}	342.70±4.00 ^c	
7	7.46±0.32 ^b	2.99±0.68 ^f	283.88±5.83 ^d	
8	6.51±4.18 ^{ab}	3.40±0.60 ^{ef}	284.03±10.89 ^d	
9	4.33±3.98 ^b	4.25±0.11 ^{ef}	289.12±0.45 ^d	
10	4.53±2.96 ^b	3.36±0.29 ^{ef}	296.66±3.65 ^d	

Segundo Castañeda-Ovando et al. (2009), a variação de cor observada em pH 1 é atribuída a predominância do cátion flavílio (vermelha), entretanto, em valores de pH entre 2 e 4, as espécies de azul quinoidal são predominantes. Valores de pH entre 5 e 6 favorecem duas espécies, que são a pseudobase de carbinol e chalcona. Em pH superior a 7, as antocianinas iniciam o processo de degradação.

De acordo com Barba; Esteve; Frigola (2013), quando o valor de ΔE entre dois valores de pH era 0 a 0,5, a diferença de cor não era perceptível; para valores de 0,5 a 1,5, a diferença era ligeiramente perceptível; para 1,5 a 3,0, a diferença era perceptível; para 3,0 a 6,0, a diferença era claramente visível; e para 6,0 a 2,0, a diferença de cor era grande. Assim, de acordo com esta classificação, o sensor de pH produzido com 7 % (m v⁻¹) de PCL, 2 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de EA foi o mais adequado para detectar alterações de pH em alimentos porque os valores de ΔE entre os valores de pH adjacentes eram superiores a 4 (Tabela 3).

Um exemplo de aplicações possíveis para estes sensores é carne de porco. Os produtos de suínos podem deteriorar-se depois de 20 h de armazenamento à temperatura ambiente, conforme indicado pela variação de pH entre 5.8 e 6.3. Após 48 h à temperatura ambiente, o pH pode atingir um valor de 7,4 (CHOI et al., 2017). Outra aplicação possível para estes sensores é o peixe. A contaminação microbiana dos peixes causa alteração no pH. De acordo com Zhang; Lu; Chen, (2014), peixes armazenados à temperatura ambiente mostraram um aumento de pH de 5,8 para mais de 6,9 em apenas 22 h.

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou um potencial método de produção de sensores de pH de fibras ultrafinas utilizando extrato de açaí como indicador. O extrato de açaí respondeu às variações de pH, tanto em testes de solução como após incorporação nas fibras. O ensaio composto por PCL, PEO e EA (7:2:3 %, m v⁻¹) apresentou capacidade de mudança de cor quando sujeito a diferenças de pH, resultando em valores de ΔE detectáveis pelo olho humano ($\Delta E > 5$). Este resultado indica uma composição apropriada para o desenvolvimento de sensores de pH para aplicações em embalagem de alimentos. Neste caso, as fibras ultrafinas foram produzidas com diâmetro médio de 1635 ± 277 nm utilizando condições como uma taxa de alimentação de $600 \mu\text{L h}^{-1}$, potencial elétrico de 20 kV, diâmetro capilar de 0,45 mm, e distância entre o capilar e colector de 125 mm, em condições ambientais de 21 ± 2 °C e 50 ± 2 % de umidade relativa. Este trabalho apresenta inovação sobre o desenvolvimento de sensores para estimar o pH dos produtos alimentícios. Além disso, foi demonstrada a utilidade das blendas poliméricas na produção de fibras, e que este parâmetro pode influenciar a interação do indicador com o ambiente externo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAWA, S.; SAKAKIBARA, H.; IWATA, R.; SHIMOI, K.; HERGESHEIMER, A.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins in Mesocarp/Epicarp and Endocarp of Fresh Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and their Antioxidant Activities and Bioavailability. **Food Science and Technology Research**, v. 17, n. 4, p. 327–334, 2011.

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOV, V. Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**. [s.l.] InTech, 2013.

ASTM. D7426-08 Standard Test Method for Assignment of the DSC Procedure for Determining Tg of a Polymer or an Elastomeric Compound. v. i, n. Reapproved 2013, p. 2013–2016, 2014.

ASTM. D3850-12 Standard Test Method for Rapid Thermal Degradation of Solid Electrical Insulating Materials By Thermogravimetric Method (TGA). v. i, p. 1–4, 2015.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545–549, mar. 2013.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. DE L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CHOI, I.; LEE, J. Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**, v. 218, p. 122–128, 2017.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical

Composition and Pigment Stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, 2004.

DONG, S.; LUO, M.; PENG, G.; CHENG, W. Broad range pH sensor based on sol-gel entrapped indicators on fibre optic. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 129, n. 1, p. 94–98, 2008.

FERNANDES, I.; MARQUES, F.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2923–2933, 2013.

FIBIGR, J.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 204–213, 2017.

FIGUEIRA, F. DA S.; GARCIA GETTENS, J.; VIEIRA COSTA, J. A.; DE MORAIS, M. G.; MORAES, C. C.; JULIANO KALIL, S. Production of Nanofibers Containing the Bioactive Compound C-Phycocyanin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 944–949, 1 jan. 2016.

FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: **Anthocyanins as Food Colors**. 1. ed. New York: Academic Press Inc., 1982. p. 263.

GONÇALVES, C. F.; SCHMATZ, D. A.; DA SILVA UEBEL, L.; KUNTZLER, S. G.; VIEIRA COSTA, J. A.; ZIMMER, K. R.; DE MORAIS, M. G. Microalgae biopeptides applied in nanofibers for the development of active packaging. **Polimeros**, v. 27, n. 4, p. 290–297, 2017.

HOFFMANN, S.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ASPINALL, W.; COOKE, R.; CORRIGAN, T.; HAVELAAR, A.; ANGULO, F.; GIBB, H.; KIRK, M.; LAKE, R.; SPEYBROECK, N.; TORGERSOON, P.; HALD, T. Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–26, 2017.

HUSSAIN, M. M.; ASIRI, A. M.; ARSHAD, M. N.; RAHMAN, M. M. Development of selective Co²⁺/ionic sensor based on various derivatives of benzenesulfonohydrazide (BSH) compound: An electrochemical approach. **Chemical Engineering Journal**, v. 339, n. October 2017, p. 133–143, 2018.

JAWOREK, A.; KRUPA, A.; LACKOWSKI, M.; SOBCZYK, A. T.; CZECH, T.; RAMAKRISHNA, S.; SUNDARRAJAN, S.; PLISZKA, D. Electrospinning and electrospraying techniques for nanocomposite non-woven fabric production. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 75, n. 4, p. 77–81, 2009.

KAI, D.; LIOW, S. S.; LOH, X. J. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 659–670, 2015.

KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008–1014, 2018.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LEVI, M. A. B.; SCARMINIO, I. S.; POPPI, R. J.; TREVISAN, M. G. Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 299–305, 2004.

MA, Q.; REN, Y.; GU, Z.; WANG, L. Developing an intelligent film containing

Vitis amurensis husk extracts: The effects of pH value of the film-forming solution. **Journal of Cleaner Production**, v. 166, p. 851–859, 2017.

MA, Q.; DU, L.; WANG, L. Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH₃ indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 244, p. 759–766, 2017.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. Design and testing of an electrospun nanofiber mat as a pH biosensor and monitor the pH associated quality in fresh date fruit (Rutab). **Polymer Testing**, v. 75, n. September 2018, p. 76–84, 2019.

MAKOTE, R.; M. COLLINSON, M. Organically modified silicate films for stable pH sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 394, n. 2–3, p. 195–200, 1999.

MCKEEN, L. Renewable Resource and Biodegradable Polymers. In: **The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 305–317.

MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue Angle Determinations and Statistical. **Journal of Food Quality**, v. 18, n. 1995, p. 235–240, 1994.

MOKRZYCKI W.S., T. M. Color difference Delta E - A survey. **Machine Graphics and Vision**, v. 20, n. 4, p. 383–411, 2011.

MOREIRA, J. B.; LUIZA, A.; TERRA, M.; COSTA, A. V.; MORAIS, M. G. DE. PT SC. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. #pagerange#, 2018.

PEREIRA, V. A.; DE ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180–188, 2015.

PETRIK, S. Industrial Production Technology for Nanofibers. In: **Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications**. [s.l.] InTech, 2011.

PRIETTO, L.; MIRAPALHETE, T. C.; PINTO, V. Z.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; LIM, L. T.; GUERRA DIAS, A. R.; DA ROSA ZAVAREZE, E. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 492–500, 2017.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2735–2741, maio 2018.

PULIGUNDLA, P.; JUNG, J.; KO, S. Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 328–333, 2012.

RAMAKRISHNA, S. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. [s.l.] World Scientific, 2005.

RUDNIK, E. Compostable Polymer Properties and Packaging Applications. In: **Plastic Films in Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 217–248.

SALIU, F.; DELLA PERGOLA, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1117–1124, 2018.

SCHMATZ, D. A.; DA SILVA UEBEL, L.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; VIEIRA COSTA, J. A.; DE MORAIS, M. G. Scaffolds Containing Spirulina sp. LEB 18 Biomass: Development, Characterization and Evaluation of In Vitro Biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1050–1059, 1 jan. 2016.

SHUKLA, V.; KANDEEPAN, G.; VISHNURAJ, M. R.; SONI, A. Anthocyanins based indicator sensor for intelligent packaging application. **Agricultural Research**, v. 5, n. 2, p. 205–209, 2016.

TIPDUANGTA, P.; BELTON, P.; FÁBIÁN, L.; WANG, L. Y.; TANG, H.; EDDLESTON, M.; QI, S. Electrospun Polymer Blend Nanofibers for Tunable Drug Delivery:

The Role of Transformative Phase Separation on Controlling the Release Rate. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 25–39, 2016.

TRINETTA, V. Definition and Function of Food Packaging. [s.l.] Elsevier, 2016.

YAMAGUCHI, K. K. D. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015.

YANG, Z.; NOLLENBERGER, K.; ALBERS, J.; CRAIG, D.; QI, S. Microstructure of an Immiscible Polymer Blend and Its Stabilization Effect on Amorphous Solid Dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 7, p. 2767–2780, 28 jul. 2013.

YIN, W.; WU, L.; DING, F.; LI, Q.; WANG, P.; LI, J.; LU, Z.; HAN, H. Surface-imprinted SiO₂@Ag nanoparticles for the selective detection of BPA using surface enhanced Raman scattering. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 566–573, 2018.

YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. In: [s.l.: s.n.]. p. 3–34.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, W.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 308–317, 2017.

ZHANG, X.; LU, S.; CHEN, X. A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 198, p. 268–273, 2014.

ARTIGO 4

SENSOR COLORIMÉTRICO DE pH BASEADO EM NANOFIBRAS CONTENDO
EXTRATOS DE AÇAÍ (*Euterpe Oleracea*) E CIANOBACTÉRIA (*Spirulina* sp. LEB 18)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver sensor de pH a partir de nanofibras poliméricas de PCL e PEO com extratos de açaí e *Spirulina* sp. LEB 18, com potencial para aplicação em embalagens de alimentos. A fabricação do sensor foi realizada pela técnica de *electrospinning*. O sensor produzido apresentou espessura média de 0,08 mm, diâmetro médio de fibras de 860 nm, propriedades térmicas como $T_{di} = 358\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_f = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$, características hidrofílicas ($\theta < 90^{\circ}$) e capacidade de variação de cor frente a variações de pH perceptíveis a pessoas não treinada ($\Delta E > 5$). As fibras contendo 3 % de extrato de açaí e 1,5 % de extrato microalgal respondem rapidamente a variação de pH do meio, variando sua cor de vermelho em pH ácido a cinza em pHs básicos. Ao colocar o sensor desenvolvido em contato com aditivos alimentares, destacaram-se positivamente a pectina e a gelatina que elevaram a resposta do sensor em até 600 % e, negativamente goma arábica, hidróxido de amônio e ácido ascórbico que reduziram a eficácia do sensor em até 90 %. Esses resultados mostram pela primeira vez que esses sensores podem ser afetados pela presença de aditivos comuns a formulação de muitos alimentos, ficando evidenciado a importância da escolha correta do sensor a se aplicar em função do alimento. Espera-se que este sensor seja empregado para monitorar o pH de alimentos para a detecção visual da qualidade.

Paravas-chave: aditivos alimentares, antocianina, biopolímero, PCL, PEO

1 INTRODUÇÃO

O setor alimentício vem enfrentando alguns desafios devido à complexidade do processamento, mudanças nas necessidades e no comportamento do consumidor, aplicação de novas leis e regulamentos e problemas relacionados à segurança alimentar causados pela deterioração dos alimentos (DUTRA RESEM BRIZIO, 2016; JIA et al., 2019). Para gerenciar esses desafios e fortalecer o monitoramento de segurança durante o processo de transporte e preservação dos alimentos surgem abordagens inovadoras no setor de embalagens como as embalagens inteligentes (BIJI et al., 2015; DING et al., 2020; KUSWANDI et al., 2012).

As embalagens inteligentes são nova tendência com rápido crescimento na indústria de alimentos. Materiais inteligentes baseiam-se no uso de indicadores interativos compostos de corantes, que ajudam a monitorar o status do ambiente da mercadoria e informam aos consumidores sobre os alimentos (KUSWANDI; NURFAWAIDI, 2017; MORADI et al., 2019). Essa função pode ser o monitoramento em tempo real das mudanças de temperatura durante o armazenamento, o controle da concentração de oxigênio ou a atividade de microrganismos que alteram o pH dos produtos (KUSWANDI; NURFAWAIDI, 2017).

Os sensores visuais de pH são materiais inteligentes que sinalizam a mudança de pH alterando a cor e permitem a detecção a olho nu sem o uso de instrumentos (PACQUIT et al., 2007; ZHANG; LU; CHEN, 2014). Esses sensores são baseados em pigmentos que alteram a sua cor de acordo com o pH do ambiente em que são aplicados (EZATI et al., 2019). Os corantes naturais atraíram considerável atenção para uso em sensores colorimétricos devido a sustentabilidade e não toxicidade desses compostos (HUANG et al., 2019; JAMRÓZ et al., 2019). A antocianina extraída do açaí é um dos corantes naturais mais importantes, pois é solúvel em água e pertence à classe de flavonoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018; TANG et al., 2019). As cores das antocianinas podem alterar de vermelho a cinza em diferentes valores de pH como observado por Silva et al. (2019) e essa alteração de cor está relacionada às transformações estruturais reversíveis em determinada faixa de pH (ZHAO et al., 2019). As microalgas *Chlorella* e *Spirulina* também podem ser utilizadas como fonte de corantes naturais para sensores de pH. Essas microalgas apresentam biocompostos como carotenoides, compostos fenólicos, ficocianina e clorofila que conferem características biológicas interessantes para aplicação em sensores de pH (MORAIS et al., 2015; SOCCOL; PANDEY; LARROCHE, 2013; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). A clorofila é o principal pigmento que contribui para a coloração verde nas microalgas e a causa

da descoloração deste é a conversão de clorofilas em feofitinas pela influência do pH (KOCA; KARADENIZ; BURDURLU, 2007).

A qualidade dos sensores colorimétricos depende do tipo de material que é utilizado para a produção, pois um dos problemas mais comuns no preparo e no uso de sensores é a baixa estabilidade de cores. Isso faz com que em alguns casos, o sensor não transmita a informação real (EBRAHIMI TIRTASHI et al., 2019). A fim de superar esse problema, o encapsulamento dos corantes em materiais fibrosos tem sido alternativa para o desenvolvimento de sensores colorimétricos de pH. Nanofibras produzidas por *electrospinning* para aplicação em sensores inteligentes protegem o corante da degradação e apresentam elevada área superficial em relação ao volume e alta porosidade que aumentam a sensibilidade do corante quando aplicado em diferentes pHs (DROSOU; KROKIDA; BILIADERIS, 2017; SENTHIL MUTHU KUMAR et al., 2019; TANG et al., 2019). Portanto, este trabalho teve por objetivo desenvolver sensor de pH a partir de nanofibras poliméricas de PCL e PEO com extratos de açaí e *Spirulina* sp. LEB 18 com potencial para aplicação em alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E *SPIRULINA*

O açaí utilizado para obtenção do extrato foi adquirido junto a produtores do arquipélago do Bailique (Amapá - Brasil). Para cada 5 g de açaí liofilizado foram adicionados 30 mL de metanol acidificado (85 % de metanol PA / 15 % de HCl 1,5 mol L⁻¹). A suspensão formada foi acondicionada a 4 °C por 24 h em ausência de luz. Ao final, a suspensão foi centrifugada a 2000 g por 20 min e o sobrenadante (extrato de antocianina) armazenado a 4 °C. A determinação da concentração de antocianinas no extrato de açaí foi realizada por espectrofotometria segundo Francis (1982) e Lee; Durst; Wrolstad (2005). Para obtenção do extrato *Spirulina* sp. LEB 18 foi realizado o mesmo procedimento do açaí, porém com metanol não acidificado.

2.2 ALTERAÇÕES DE COR DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E *SPIRULINA*

A capacidade de variação de cor dos extratos frente a alterações de pH foi avaliada por espectrofotometria (UVmini-1240 Shimadzu, Japan). Para isso, os extratos de açaí e *Spirulina* sp. LEB 18 foram adicionados a tampões com pHs variando entre 1 e 10 e realizou-se varredura em espectro de variação de 800 a 200 nm. A combinação de extratos também foi avaliada nas proporções de 1:1, 2:1.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS

Os sensores foram produzidos por processo de *electrospinning* utilizando solução polimérica composta por 7 % (m v⁻¹) de policaprolactona (PCL), 2 % (m v⁻¹) de óxido de polietileno (PEO), 1,4 % (m v⁻¹) de cloreto de sódio (NaCl) e 3 % de extrato (1:1 e 2:1 açaí e *Spirulina*) (SILVA et al., 2019). A solução polimérica foi solubilizada em clorofórmio e metanol na proporção (3:1). Para o preparo da solução, os polímeros foram inicialmente dissolvidos somente em clorofórmio e mantidos sob agitação por 16 h a temperatura ambiente (22 ± 4 °C). Posteriormente foi adicionado o extrato juntamente com o metanol e manteve-se por mais 20 min sob agitação.

As soluções foram injetadas através do capilar ($\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$) e depositadas em coletor de alumínio tipo rotatório cilíndrico (R= 2,5 cm). Os parâmetros de operação do *electrospinning* para obtenção das fibras de PCL, PEO e extratos foram, taxa de alimentação 600 $\mu\text{L h}^{-1}$, potencial elétrico 20 kV, diâmetro de capilar 0,45 μm e distância entre capilar e coletor 12,5 cm (SILVA et al., 2019).

2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SENSOR

A morfologia do sensor foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6610 LV, Japão). Para isso, amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com ouro utilizando o metalizador diode sputtering (Denton Vacuum CAR001-0038, Estados Unidos).

O sensor produzido foi caracterizado quanto a suas propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA) (Shimadzu DTG-60, Japan) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japan) (ASTM, 2014, 2015).

O grau de molhabilidade do sensor foi determinado por medida do ângulo da água com o sensor (KUNTZLER et al., 2018). Uma gota de água deionizada foi adicionada sobre a superfície da amostra e fotografada (Digital Blue microscope). O ângulo de contato foi medido com auxílio do software ImageJ.

2.5 VARIAÇÃO DE COR DOS SENSORES EM FUNÇÃO DO PH

Os parâmetros de cor do sensor foram determinados com auxílio de colorímetro (Modelo Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Osaka, Japão) mediante sistema CIELab (iluminante D₆₅). Três medições foram realizadas para cada sensor, e os valores de L* (lightness), a* (red/green) e b* (yellow/blue) foram mensurados. A diferença total de cores

(ΔE) foi calculada segundo a equação: $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$, onde, $\Delta L^* = L - L_0^*$; $\Delta a^* = a - a_0^*$; $\Delta b^* = b - b_0^*$; L_0^* , a_0^* , b_0^* são os valores de referência para cada sensor.

Os parâmetros *Hue angle* e *Chroma* foram calculados através das equações: $Hue = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ e $Chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, onde a^* e b^* são os parâmetros do sistema CIELab. Para avaliar a sensibilidade dos sensores frente a variações de pH foram preparados tampões com pH variando entre 3 a 7. As fibras foram seccionadas em 10 x 10mm, submergidas em cada tampão durante 30 s e a seguir realizou-se a análise de cor.

2.6 Atividade antioxidante do sensor

A atividade antioxidante do sensor desenvolvido foi determinada por metodologia de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio (ABTS⁺). Para tal, 10 mg de amostras do sensor composto por PCL, PEO e extrato de açaí, bem como o de PCL, PEO, extrato de açaí e extrato de *Spirulina*, foram solubilizados separadamente em 4 mL de tampão bicarbonato/carbonato 0,2 M (pH 9,5), seguido de homogeneização em vórtex (AP-59, Phoenix, Argentina) por 10 min. Logo as amostras foram submetidas a banho ultrassônico (Q3350, Quimis, Brasil) por 15 min e posterior centrifugação (Microcentrifuge 5410, Eppendorf, Brasil) a 12.800 x g por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a realização dos ensaios de ABTS.

A determinação de ABTS foi realizada de acordo com a metodologia de Miliauskas Venskutonis e Beek (2004), no qual foram adicionados 3 mL da solução ABTS⁺ a 30 μ L de solução contendo a amostra. As soluções foram mantidas na ausência de luz à temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro (UVmini-1240 Shimadzu, Japan) a 734 nm. A atividade antioxidante por redução do radical ABTS⁺ foi determinada a partir da Redução ABTS⁺(%) = $((A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}) * 100$, em que A_{amostra} é a absorvância da amostra após 6 min e A_{controle} é a absorvância da solução contendo apenas o solvente com o radical ABTS⁺. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 95 % ($p < 0,05$).

2.7 Influência de aditivos alimentares na resposta colorimétrica do sensor

Visando avaliar o comportamento do sensor desenvolvido frente a aditivos comumente utilizados na indústria alimentícia, análises colorimétricas foram realizadas em tampões de pH 3 a 7, contendo 2 % ($m \cdot v^{-1}$) dos seguintes aditivos: ácido acético, ácido ascórbico, ácido láctico, carbonato de sódio, EDTA, gelatina, goma arábica, hidróxido de amônio, nitrato de sódio e pectina. Para isso, as fibras foram seccionadas em 10 x 10mm, submergidas em cada tampão contendo os aditivos durante 30 s e em seguir realizou-se a análise de cor.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios de Variação de Cor Total, Ângulo Hue e Chroma foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95 %.

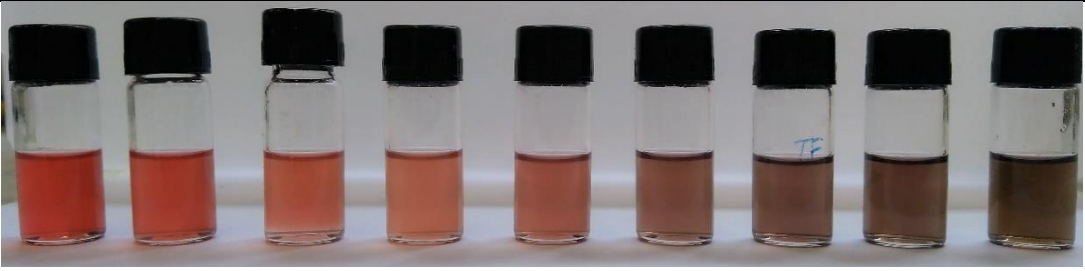
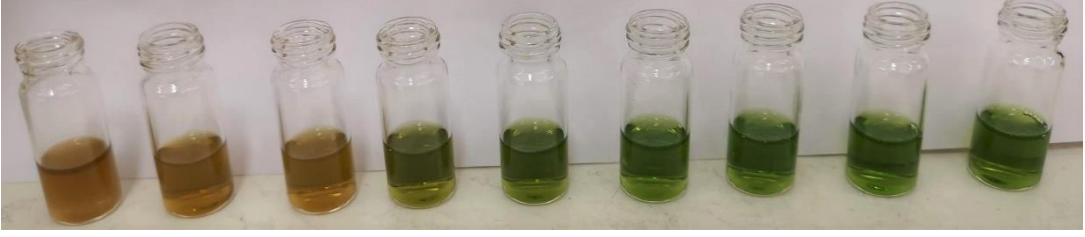
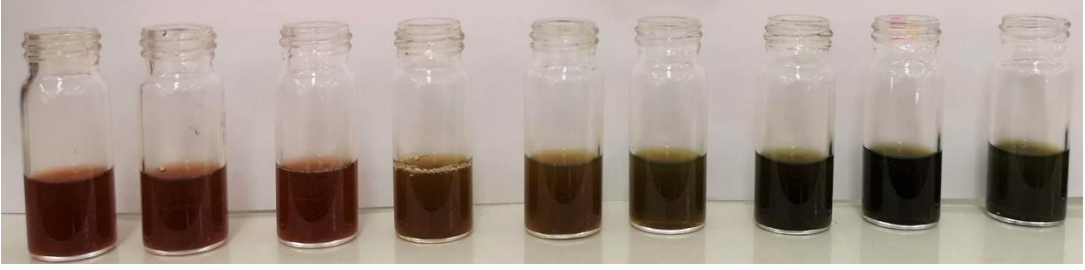
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ALTERAÇÕES DE COR DOS EXTRATOS DE AÇAÍ E MICROALGAS E CARACTERIZAÇÃO ESPECTRAL

A Figura 1 mostra a imagem óptica de soluções aquosas dos extratos de açaí contendo antocianina e *Spirulina* sp. LEB 18 com diferentes valores de pH (1–9). A solução do extrato de açaí apresentou coloração rosa brilhante devido a presença de antocianinas em pH 1 e 2 e a intensidade dessa cor diminuiu quando os valores de pH variaram de 3 a 5. Zhai et al. (2017), também observaram a cor rosa nas soluções contendo antocianinas de Flor da Jamaica em pH entre 1 e 5. Em pH entre 6 e 9 o extrato de açaí sofreu a perda da coloração rosa e apresentou a coloração cinza. As cores da antocianina são sensíveis à acidez e alcalinidade, que se deve às transformações da estrutura molecular com mudança de pH nas soluções (TANG et al., 2019). Correspondendo às mudanças de cor nas soluções de extrato de açaí, o pico máximo de absorção de UV-vis foi observado em torno de 500 nm quando as soluções estavam em pH entre 1 e 3, conforme mostrado na Figura 4a. A banda de absorção reduziu em intensidade e passou para 600 nm quando o pH foi alterado de 4 para 9. Zhang; Lu; Chen, (2014), observaram que o pico de absorção também diminui de intensidade quando as soluções contendo antocianinas estavam em pH acima de 5.

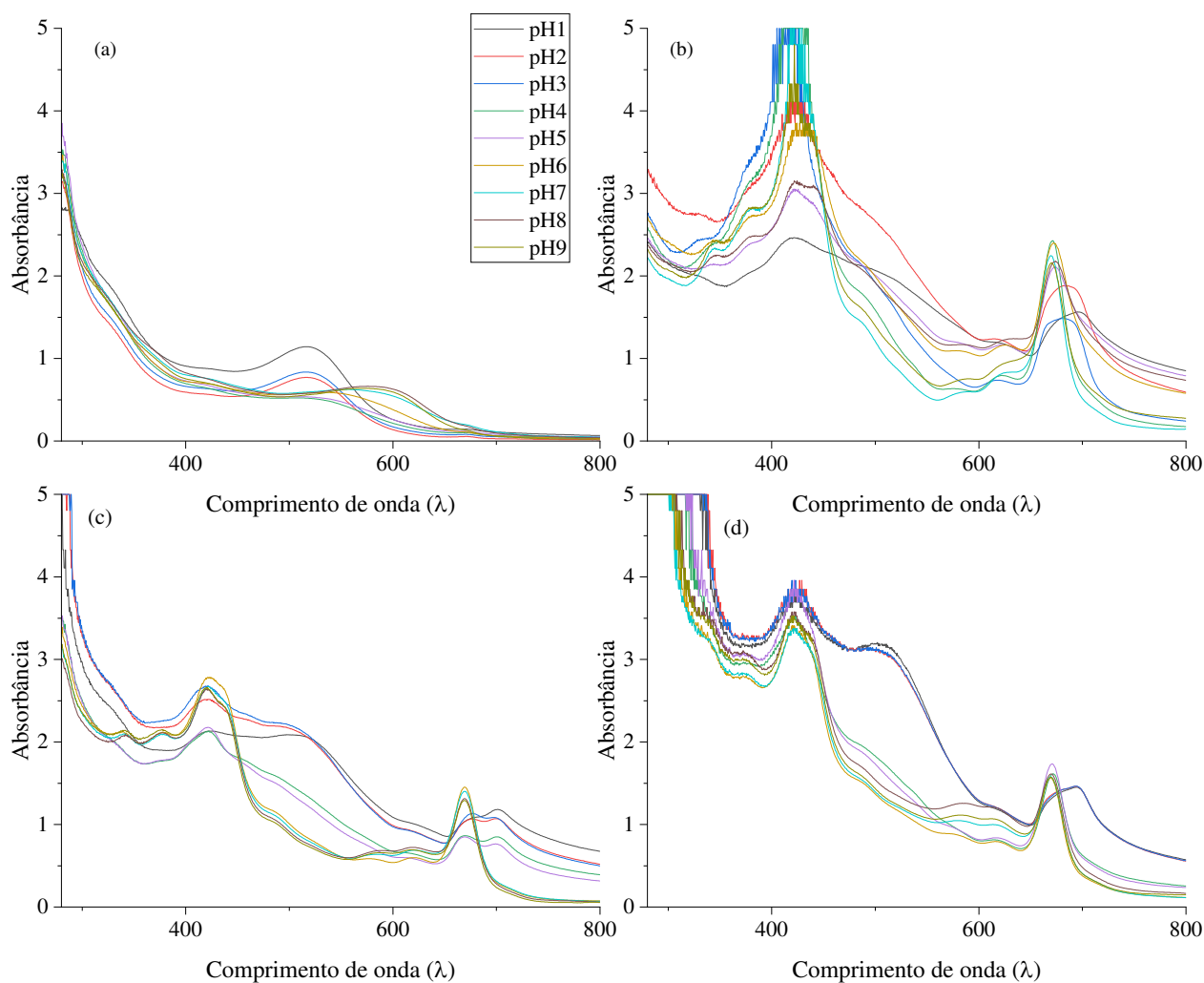
O extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou coloração amarela em pH entre 1 e 3 e a partir do pH 4 o extrato alterou a coloração para verde que se refere a presença de clorofila. Os espectros de absorção UV-vis do extrato mostraram dois picos de absorção em aproximadamente 400 nm e outro em 680 nm (Figura 4c). As bandas de absorção do extrato contendo clorofila apresentam menor intensidade em pHs ácidos, devido a formação de agregados do monômero de clorofila-a (Chl-a) na presença de solução ácida. Sob a condição de pH ácido, os íons de magnésio no centro da molécula Chl-a são substituídos por dois íons de hidrogênio e convertidos em feofitina (QU et al., 2020). Em pH alcalinos a clorofila não sofreu a ação das bases e permaneceu na coloração verde. Como mostrado na Figura 2b, os espectros de absorção com diferentes valores de pH alcalinos têm apresentado maior intensidade de absorção em relação ao pH ácido.

Figura 1 - Extratos de açaí e *Spirulina* em tampões pH 1 – pH 9

Amostra	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
Açaí									
<i>Spirulina</i>									
Açaí + <i>Spirulina</i> (2:1)									

Ao combinar os extratos de açaí com *Spirulina* sp. LEB 18 nas proporções 2:1 e 1:1 obteve-se maior intensidade dos picos de absorção das clorofilas em relação aos picos da antocianina em todos os valores de pH. Especificamente, a proporção 2:1 apresentou banda de absorção em aproximadamente 500 nm (Figura 2c) em pH entre 1 e 3, referente a presença de antocianinas nas soluções. A mistura dos extratos na proporção 2:1 proporcionou três tonalidade de cores entre os pH de 1 e 9 e apresentou as principais bandas de absorção referente a clorofila e antocianina. Dessa forma, a percepção de alterações das cores dessa mistura tem maior potencialidade em relação às outras soluções para o desenvolvimento do sensor.

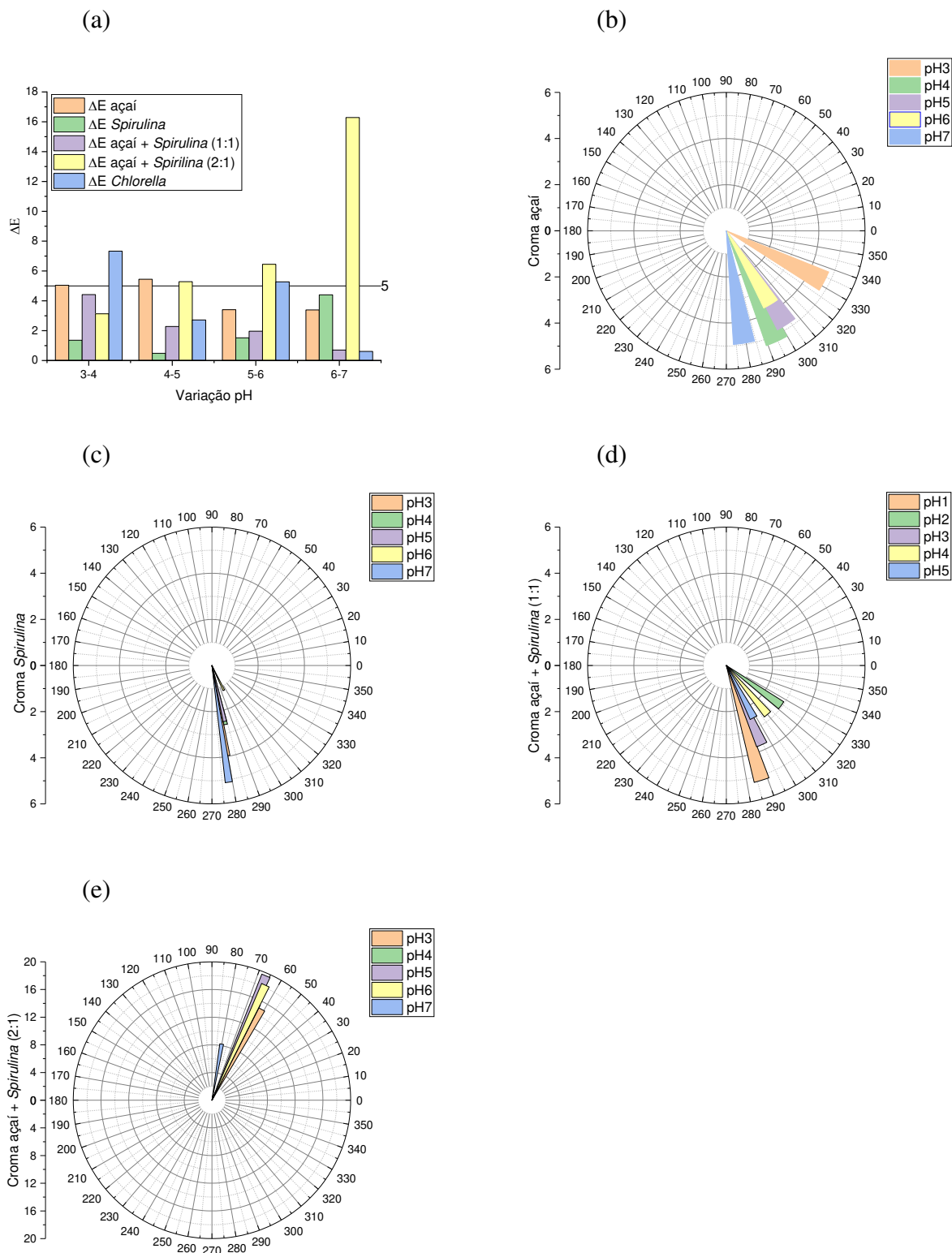
Figura 2 - Variação de cor dos extratos de açaí (a), *Spirulina* sp. LEB 18 (b), Açaí + *Spirulina* sp. LEB 18 1:1 (c) e Açaí + *Spirulina* sp. LEB 18 2:1 (d) expostos à diferentes pHs



3.2 VARIAÇÃO DE COR DOS SENSORES PRODUZIDOS EM FUNÇÃO DO PH

Os sensores de pH foram comparados em relação a sua amplitude de ΔE quando emergidos nas soluções de pH 3, 4, 5, 6 e 7. Conforme observado na Figura 3a os sensores com açaí, *Spirulina* sp. LEB 18 e extratos de açaí+*Spirulina* sp. LEB 18 (1:1) não apresentaram fácil visualização de cor pelos consumidores, pois a diferença total de cor permaneceu abaixo de 5 em todos os pHs testados.

Figura 3 – Diferença total de cor (a) e cromaticidade dos sensores de pH com açaí (b), *Spirulina* sp. LEB 18 (c), açaí+*Spirulina* sp. LEB 18 (1:1) (d) e açaí+*Spirulina* sp. LEB 18 (2:1) (e).



Segundo Mokrzycki W.S. (2011), ΔE maior que 5 implica em mudança de cor perceptível pelo olho humano, e ΔE maior que 12 indica diferença absoluta na cor. Nessa

percepção enquadra-se o sensor de pH composto de açaí + *Spirulina* (2:1) que apresentou ΔE maior do que 5 na maioria dos pHs analisados e por isso mostrou melhor desempenho na mudança da cor, principalmente, no pH 6 para 7 em que se encontram diversos alimentos.

A cromaticidade dos sensores contendo extratos de açaí (Figura 3b), *Spirulina* (Figura 3c) e açaí + *Spirulina* (1:1) (Figura 3d) está apresentada no 4º quadrante referente a transição das cores azul para vermelho. Os maiores ângulos *Hue* foram obtidos nos sensores de açaí que variam de 278 até 332 que significam melhor visualização da mudança de cor entre um pH e outro. A cromaticidade do sensor de pH de açaí + *Spirulina* (2:1) (Figura 3e) está no 1º quadrante representando a transição das cores vermelho para amarelo com ângulos *Hue* de 61 até 80.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SENSOR

O sensor de pH sem a presença dos extratos apresentou espessura de $0,08 \pm 0,01$ mm e diâmetro médio das nanofibras de 861 ± 627 nm. O diâmetro na escala nanométrica oferece propriedades como alta área superficial em relação ao volume e a porosidade que resulta no aumento dos mecanismos de sensibilidade dos compostos reativos, o que possibilita melhor desempenho de detecção do sensor (FAN et al., 2015; LI; YU; DING, 2015; ZHAI et al., 2017).

A análise termogravimétrica foi realizada para examinar a perda de massa do sensor em função da temperatura. O sensor mostrou o início do estágio de degradação em 358 °C que finalizou em 429 °C. No estudo de Schmatz; Costa; Moraes, (2019), verificou-se que a temperatura de degradação térmica das nanofibras de PCL variavam entre 362-442 °C. A temperatura de degradação depende da proporção de polímero nas nanofibras, pois este se degrada na mesma faixa de temperaturas (384 °C) (KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018). A temperatura de fusão do sensor de PCL/PEO não foi influenciada pela adição do PEO no material. Segundo Schmatz; Costa; Moraes, (2019), a temperatura de fusão das nanofibras de PCL é 59 °C, isso indica que o processo de *electrospinning* com PCL foi realizada, não causou alteração na temperatura de fusão ou entalpia.

O sensor de pH foi caracterizado como material hidrofílico segundo análise de ângulo de contato. O ângulo obtido foi menor que 90°, isso é atribuído principalmente à adição de PEO para a produção das nanofibras, pois este polímero solubiliza-se facilmente em água a temperatura ambiente. A hidrofiliabilidade é útil para o desenvolvimento de sensores de pH, pois isso facilita a difusão de H^+ ou OH^- nas nanofibras resultando na fácil e rápida visualização das cores (PRIETTO et al., 2018a).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SENSOR

Sensor de pH composto de PCL/PEO com extratos de açaí e açaí+*Spirulina* (2:10) apresentaram capacidade antioxidante de $14,12 \pm 1,66$ e $13,53 \pm 0,83$ %, respectivamente, no método ABTS após 18 min de reação. A atividade antioxidante dos sensores foi significativamente igual, mesmo estes apresentando diferente composição dos extratos.

A capacidade antioxidante dos sensores é devido às moléculas antocianinas presente no extrato de açaí e ficocianina encontrada no extrato de *Spirulina*. A atividade antioxidante das antocianinas é atribuída à sua estrutura única, que facilita a doação de átomos de H de grupos OH aromáticos ou facilita a capacidade de doação de elétrons (Ma et al., 2020). A ficocianina é uma ficobiliproteína de cor azul encontrada em microalgas e explorada como composto nutracêutico e como aditivos naturais de corante azul em alimentos e cosméticos (Hemlata et al., 2018; Moraes et al., 2011).

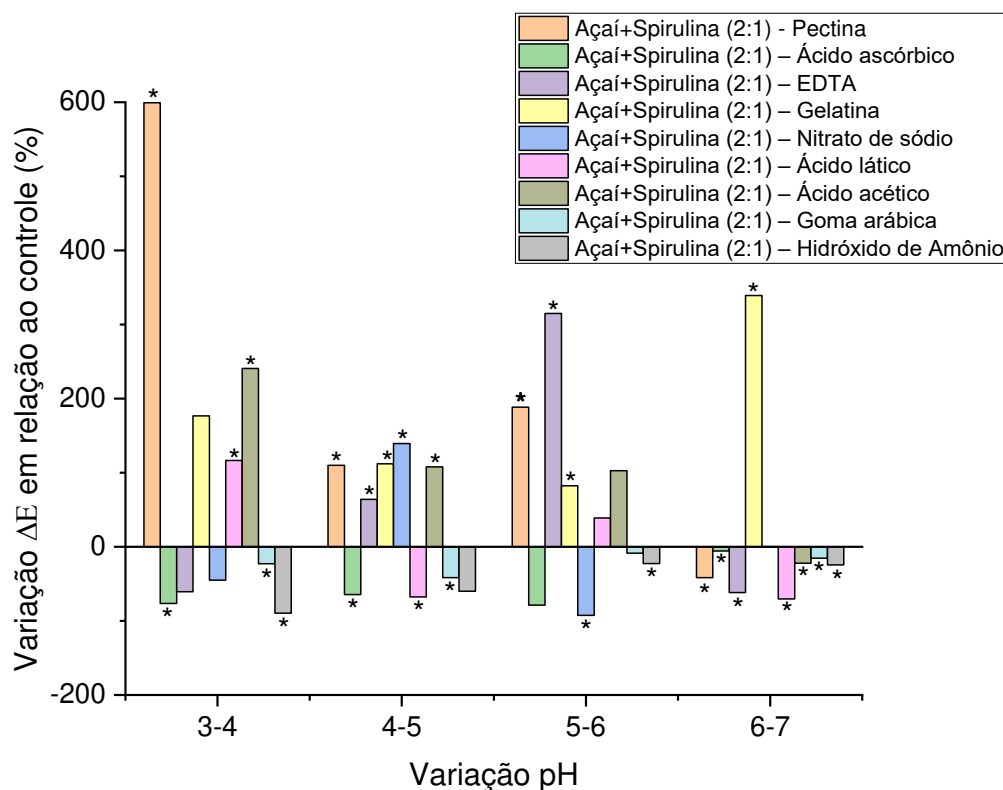
Os pigmentos ficocianina e antocianina possuem importantes propriedades biológicas que podem ser destruídas sob condições adversas de temperatura, umidade e luz devido à degradação destes compostos (Thangam et al., 2013; Yan, Liu, Jiao, & Quin, 2014). Assim, a aplicação de ficocianina e antocianina em produtos alimentícios e/ou embalagens é restrita. Para superar esse problema, os pesquisadores exploram o encapsulamento em nanofibras para aumentar a estabilidade de compostos e manter suas propriedades antioxidantes por um período prolongado (Schmatz et al. 2020; Moreira et al., 2019, Silva et al., 2019).

3.5 INFLUÊNCIA DE ADITIVOS ALIMENTARES NA RESPOSTA COLORIMÉTRICA DO SENSOR

A capacidade de variação de cor do sensor desenvolvido é influenciada pela presença de aditivos alimentares (Figura 4). Estes são parte importante na formulação de alimentos processados e podem desempenhar diferentes funções como, conservantes, estabilizantes, aromatizantes, corantes entre outros. Dentre os aditivos testados, a pectina foi a responsável pelo maior incremento no valor de ΔE quando comparado ao controle (sem adição de aditivo), apresentando ganho de aproximadamente 600 % em pH ácido (3 a 4). Os valores de ΔE para pH 4 a 5 e 5 a 6 também foram elevados em 110 e 188 % respectivamente, entretanto para pH 6 a 7 o valor de ΔE ficou abaixo do controle, acarretando redução de 41 % na capacidade de visualizar diferença entre as cores. A variação nos valores de ΔE dos sensores na presença de pectina pode estar atrelada as características que a tornam tão utilizadas em alimentos. Pectinas são polissacáridos vegetais utilizados na formulação de

alimentos devido às suas propriedades gelificantes (PHILLIPS; STEPHEN; WILLIAMS, 2006). O mecanismo de formação gel é diferente para pectinas de alta ou baixa metoxilação, entretanto ambas formam mais géis em pHs ácidos (GAWKOWSKA; CYBULSKA; ZDUNEK, 2018).

Figura 4 - Variação do valor de ΔE (%) do sensor quando em contato com pectina, ácido ascórbico, EDTA, gelatina, nitrato de sódio, ácido lático, ácido acético, goma arábica ou hidróxido de amônio.



* representa valores estatisticamente ($p < 0,5$) diferentes ao controle.

O EDTA é um composto orgânico capaz de se ligar a íons metálicos no alimento formando complexos fortemente estáveis. Por essa razão, é utilizado em inúmeros alimentos e apresenta como funções realce de aroma, cor e retenção de textura (FDA, [s.d.]). Ao colocar o sensor em contato com solução tampão contendo EDTA, não houve diferença significativa ($p < 0,5$) de ΔE para a variação de pH 3 a 4. Entretanto ao variar o pH de 4 a 5 e 5 a 6, os valores obtidos de ΔE foram estatisticamente maiores em relação ao controle, com elevação de 64 e 315 % respectivamente. Ao passo que de pH 6 a 7 ocorreu redução na capacidade de mudança de cor do sensor de aproximadamente 62 %.

No que diz respeito a gelatina, a presença da mesma nas soluções tampão elevou a resposta dos sensores para todos os pHs testados, com destaque para a variação entre o pH 6 e 7, que apresentou elevação dos valores de ΔE em 340 %. A gelatina é ingrediente amplamente

utilizada na indústria alimentícia, farmacológica e cosméticos como agente gelificante, estabilizante, espessante, emulsionante, bem como formador de filme (BORAN; REGENSTEIN, 2010). Quando os sensores entram em contato com esse composto, provável que tenha ocorrido comportamento similar ao da pectina, que protege o sensor, inclusive elevando sua capacidade de mudança de cor.

O nitrato de sódio pode elevar ou reduzir a capacidade de variação de cor do sensor, aumentando ou diminuindo a capacidade de percepção ΔE . Em pH 4 a 5, o nitrato de sódio eleva os valores de ΔE em 140 % enquanto em pH 5 a 6, ΔE tem redução de 93 %. Para os ácidos láctico e acético, as maiores variações em ΔE foram obtidas ao variar o pH de 3 a 4, alcançando 116 e 241 % de aumento respectivamente. O ácido acético ainda apresentou elevado aumento de ΔE para pH 4 a 5, chegando a ganho de 107 % em relação ao controle. Nos demais pHs, a presença desses ácidos, ou apresentaram perda na capacidade de variação de cor, ou não apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). A presença de goma arábica, hidróxido de amônio e ácido ascórbico foram responsáveis pela redução na capacidade de variação de cor para todos os pHs quando comparados ao controle.

Os resultados acima demonstraram a importância da seleção do sensor colorimétrico em função do alimento a ser monitorado. A composição do alimento deve ser conhecida, a fim de evitar que resultados seja sub ou superestimados. Com base nessas informações, o sensor desenvolvido nesse trabalho apresenta características ideais para produtos ácidos a neutros, pois apresentou melhor variação de cor na faixa de pH de 3 a 7, bem como aqueles que contenham em sua formulação especialmente pectina e gelatina. Além de evitar alimentos que contenham ácido ascórbico, goma arábica e hidróxido de amônio em sua formulação pois estes podem reduzir o desempenho do sensor produzido.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foram desenvolvidas nanofibras funcionais de PCL e PEO adicionados de extrato de açaí e *Spirulina* sp. LEB 18, ao qual chamamos de sensor por ter apresentado a capacidade de variação de cor frente a mudanças de pH. Entre as formulações testadas, a melhor resposta corresponde a 7 % PCL, 2 % PEO, 3 % de extrato de açaí e 1,5 % de extrato microalgal. Nessas condições, o sensor apresentou resposta as variações de uma unidade de pH com ΔE superior a 5, sendo perceptível visualmente ao olhar de pessoas não treinadas. Este estudo foi pioneiro ao demonstrar que esses sensores colorimétricos são fortemente influenciados pela presença de aditivos alimentares. Verificou-se que pectina e gelatina elevam a capacidade do sensor colorimétrico, aumentando em até 600 % a

capacidade de variação de cor em pHs ácidos. Entretanto, compostos como goma arábica, hidróxido de amônio e ácido ascórbico devem ser evitados uma vez que podem reduzir a eficiência deste sensor. Sendo assim, os sensores desenvolvidos são boa alternativa tanto para detecção de analitos puros, como também para matrizes complexas como alimentos, visto que proporcionaram sinal visual rápido e de fácil compreensão, porém a escolha do produto a se aplicar o sensor fica limitado a formulações que não alterem sua eficácia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM. D7426-08 Standard Test Method for Assignment of the DSC Procedure for Determining Tg of a Polymer or an Elastomeric Compound. v. i, n. Reapproved 2013, p. 2013–2016, 2014.

ASTM. D3850-12 Standard Test Method for Rapid Thermal Degradation of Solid Electrical Insulating Materials By Thermogravimetric Method (TGA). v. i, p. 1–4, 2015.

BIJI, K. B.; RAVISHANKAR, C. N.; MOHAN, C. O.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6125–6135, 2015.

BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. Fish gelatin. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 60, p. 119–143, 1 jan. 2010.

DING, L.; LI, X.; HU, L.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; MAO, Z.; XU, H.; WANG, B.; FENG, X.; SUI, X. A naked-eye detection polyvinyl alcohol/cellulose-based pH sensor for intelligent packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, n. January, p. 115859, 2020.

DROSOU, C. G.; KROKIDA, M. K.; BILIADERIS, C. G. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications *Drying Technology* Taylor and Francis Inc., , 25 jan. 2017.

DUTRA RESEM BRIZIO, A. P. **Use of Indicators in Intelligent Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2016.

EBRAHIMI TIRTASHI, F.; MORADI, M.; TAJIK, H.; FOROUGH, M.; EZATI, P.; KUSWANDI, B. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 920–926, 2019.

EZATI, P.; TAJIK, H.; MORADI, M.; MOLAEI, R. Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 157–165, 1 jul. 2019.

FAN, X.; JIANG, Q.; SUN, Z.; LI, G.; REN, X.; LIANG, J.; HUANG, T. S. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 8, p. 1751–1758, 29 ago. 2015.

FDA. **Overview of Food Ingredients, Additives & Colors** | FDA. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: **Anthocyanins as Food Colors**. 1. ed. New York: Academic Press Inc., 1982. p. 263.

GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. polymers Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. 2018.

HUANG, S.; XIONG, Y.; ZOU, Y.; DONG, Q.; DING, F.; LIU, X.; LI, H. A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebia euchroma* root extracts

for monitoring fish freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 198–205, 1 maio 2019.

JAMRÓZ, E.; KULAWIK, P.; KRZYŚCIAK, P.; TALAGA-ĆWIERTNIA, K.; JUSZCZAK, L. Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 745–757, 1 fev. 2019.

JIA, R.; TIAN, W.; BAI, H.; ZHANG, J.; WANG, S.; ZHANG, J. Amine-responsive cellulose-based ratiometric fluorescent materials for real-time and visual detection of shrimp and crab freshness. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2019.

KOCA, N.; KARADENİZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 609–615, 2007.

KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008–1014, 2018.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 800–806, 1 out. 2018.

KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 184–189, 1 maio 2012.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LI, Y.; YU, J.; DING, B. Facile and ultrasensitive sensors based on electrospinning–netting nanofibers/nets. **NanoScience and Technology**, v. 96, p. 1–34, 2015.

MOKRZYCKI W.S., T. M. Color difference Delta E - A survey. **Machine Graphics and Vision**, v. 20, n. 4, p. 383–411, 2011.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ALMASI, H.; FOROUGH, M.; EZATI, P. A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, n. March, p. 115030, 2019.

MORAIS, M. G. DE; VAZ, S.; MORAIS, E. G. DE; ALBERTO, J.; COSTA, V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, 2015.

PACQUIT, A.; FRISBY, J.; DIAMOND, D.; LAU, K. T.; FARRELL, A.; QUILTY, B.; DIAMOND, D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, v. 102, n. 2, p. 466–470, 1 jan. 2007.

PHILLIPS, G. O.; STEPHEN, A. M.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. [s.l.] Taylor & Francis, 2006.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2735–2741, 2018.

QU, F.; GONG, N.; WANG, S.; GAO, Y.; SUN, C.; FANG, W.; MEN, Z. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. **Dyes and Pigments**, v. 173, n. September 2019, p. 107975, 2020.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural Food Pigments and Colorants. In: [s.l.] Springer, Cham, 2018. p. 1–35.

SCHMATZ, D. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospraying. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100314, 1 jun. 2019.

SENTHIL MUTHU KUMAR, T.; SENTHIL KUMAR, K.; RAJINI, N.; SIENGCHIN, S.; AYRILMIS, N.; VARADA RAJULU, A. A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. **Composites Part B: Engineering**, v. 175, n. June, p. 107074, 2019.

SILVA, C. K. DA; MASTRANTONIO, D. J. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (Euterpe oleracea) extract. **Food Chemistry**, v. 294, p. 397–404, out. 2019.

SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Fermentation processes engineering in the food industry**. [s.l.] CRC, 2013.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. Spirulina – From growth to nutritional product: A review *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.

TANG, B.; HE, Y.; LIU, J.; ZHANG, J.; LI, J.; ZHOU, J.; YE, Y.; WANG, J.; WANG, X. Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. **Dyes and Pigments**, v. 170, n. June, p. 107643, 2019.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, W.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 308–317, 2017.

ZHANG, X.; LU, S.; CHEN, X. A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 198, p. 268–273, 2014.

ZHAO, S.; PARK, C. H.; YANG, J.; YEO, H. J.; KIM, T. J.; KIM, J. K.; PARK, S. U. Molecular characterization of anthocyanin and betulinic acid biosynthesis in red and white mulberry fruits using high-throughput sequencing. **Food Chemistry**, v. 279, p. 364–372, 1 maio 2019.

CAPÍTULO IV

Conclusão geral

5 CONCLUSÃO GERAL

As melhores respostas de produção de biomassa para as microalgas *Chlamydomonas komma* e *Parachlorella kessleri* foram obtidos em regime mixotrófico. *Chlamydomonas komma* apresentou seu crescimento elevado pela adição de até 1000 mg L⁻¹ de xilose combinada com CO₂, enquanto glicose e celobiose não influenciaram seu crescimento. Já *Parachlorella kessleri* teve seu crescimento elevado proporcionalmente a adição de glicose, tanto em regime heterotrófico como mixotrófico.

A substituição da fonte de carbono padrão do meio de cultura por xilose mostrou ser uma ferramenta na indução da síntese de lipídios neutros nas cepas de *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas komma*, *Parachlorella kessleri* e *Spirulina* sp. LEB 18. Os benefícios da adição de xilose foram ainda mais elevados quando combinados com redução na fonte de nitrogênio. Dentre os lipídios neutros sintetizados pelas cepas, destaca-se a produção de PHA por *Chlorella fusca*, que elevou sua produção em 978 % ao ser cultivada com 100 mg L⁻¹ de xilose e 5 % de N. Se por um lado, a adição de xilose combinada com deficiência de nitrogênio apresentou resultados positivos quanto aos lipídios, a mesma modificação também foi responsável pela redução drástica na biomassa microalgal e pigmentos.

Foi possível produzir fibras ultrafinas de PCL e PEO com diâmetro médio de 1635 ± 277 nm utilizando condições como taxa de alimentação de 600 $\mu\text{L h}^{-1}$, potencial elétrico de 20 kV, diâmetro capilar de 0,45 mm, e distância entre o capilar e coletor de 125 mm, em condições ambientais de 21 ± 2 °C e 50 ± 2 % de umidade relativa. O ensaio composto por 7 % (m v⁻¹) de PCL, 2 % (m v⁻¹) de PEO e 3 % (m v⁻¹) de extrato de açaí apresentou capacidade de indicar visualmente a variação de cor causada por mudanças de pH, resultando em valores de ΔE detectáveis pelo olho humano ($\Delta E > 5$).

A adição de 1,5 % de extrato microalgal na formulação do sensor de PCL, PEO, extrato de açaí apresentou resposta as variações de uma unidade de pH com ΔE superior a 5, sendo perceptível visualmente ao olhar de pessoas não treinadas. Este foi o primeiro estudo a demonstrar que esses sensores colorimétricos são fortemente influenciados pela presença de aditivos alimentares. Verificou-se que pectina e gelatina elevam a capacidade do sensor colorimétrico em até 600 % a capacidade de variação de cor em pHs ácidos. Também foi observado que compostos como goma arábica, hidróxido de amônio e ácido ascórbico devem ser evitados uma vez que podem reduzir a eficiência deste sensor.

CAPÍTULO V

Referências bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-BAKY, H. H.; EL-BAROTY, G. S. The potential use of microalgal carotenoids as dietary supplements and natural preservative ingredients. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 22, n. 4, p. 392–406, 4 jul. 2013.

AGARWAL, A.; RAHEJA, A.; NATARAJAN, T. S.; CHANDRA, T. S. Development of universal pH sensing electrospun nanofibers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 1097–1101, 2012.

AGAWA, S.; SAKAKIBARA, H.; IWATA, R.; SHIMOI, K.; HERGESHEIMER, A.; KUMAZAWA, S. Anthocyanins in Mesocarp/Epicalp and Endocarp of Fresh Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and their Antioxidant Activities and Bioavailability. **Food Science and Technology Research**, v. 17, n. 4, p. 327–334, 2011.

AGHAEI, Z.; EMADZADEH, B.; GHORANI, B.; KADKHODAEI, R. Cellulose Acetate Nanofibres Containing Alizarin as a Halochromic Sensor for the Qualitative Assessment of Rainbow Trout Fish Spoilage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 5, p. 1087–1095, 2018.

AHMAD, M. T.; SHARIFF, M.; MD. YUSOFF, F.; GOH, Y. M.; BANERJEE, S. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, p. 1–19, 2018.

AHVENAINEN, R. Active and Intelligent Packaging: an introduction. In: AHVENAINEN, R. (Ed.). **Novel Food Packaging Techniques**. Cambridge: CRC Press, 2003. p. 50–70.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 107–113, 15 jul. 2007.

ALCÁZAR-ALAY, S. C.; CARDENAS-TORO, F. P.; OSORIO-TOBÓN, J. F.; BARBERO, G. F.; MEIRELES, M. A. DE A. Obtaining anthocyanin-rich extracts from frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp using pressurized liquid extraction. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 48–54, 2017.

Algaebase :: Listing the World's Algae. Disponível em: <<https://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOV, V. Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**. [s.l.] InTech, 2013.

ANU BHUSHANI, J.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 21–33, 2014.

ARNON, D. I. COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 1949.

ASTM. D7426-08 Standard Test Method for Assignment of the DSC Procedure for Determining Tg of a Polymer or an Elastomeric Compound. v. i, n. Reapproved 2013, p. 2013–2016, 2014.

ASTM. D3850-12 Standard Test Method for Rapid Thermal Degradation of Solid Electrical Insulating Materials By Thermogravimetric Method (TGA). v. i, p. 1–4, 2015.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. [s.l.] McGraw-Hill, 1986.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly b hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 278–285, 2013.

BALBINOT-ALFARO, E.; CRAVEIRO, D. V.; LIMA, K. O.; COSTA, H. L. G.; LOPES, D. R.; PRENTICE, C. Intelligent Packaging with pH Indicator Potential. **Food Engineering Reviews**, v. 11, n. 4, p. 235–244, 2019.

BALDWIN, C. The 10 principles of food industry sustainability. Oxford, UK: [s.n.].

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545–549, mar. 2013.

BARBOSA-PEREIRA, L.; AURREKOETXEA, G. P.; ANGULO, I.; PASEIRO-LOSADA, P.; CRUZ, J. M. Development of new active packaging films coated with natural phenolic compounds to improve the oxidative stability of beef. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 249–254, jun. 2014.

BARHOUM, A.; PAL, K.; RAHIER, H.; ULUDAG, H.; KIM, I. S.; BECHELANY, M. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nanospinning fabrication techniques to emerging applications. **Applied Materials Today**, v. 17, p. 1–35, 2019.

BEGUM, H.; YUSOFF, F. M. D.; BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2 out. 2016.

BEIJERINCK, M. W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v. 47, p. 725–739, 1890.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S475–S479, 1 jan. 1997.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K. C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425–3431, 1 out. 2011.

BIJI, K. B.; RAVISHANKAR, C. N.; MOHAN, C. O.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6125–6135, 2015.

BLAIR, M. F.; KOKABIAN, B.; GUDE, V. G. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 665–674, 1 mar. 2014.

BLIFERNEZ-KLASSEN, O.; KLASSEN, V.; DOEBBE, A.; KERSTING, K.; GRIMM, P.; WOBBE, L.; KRUSE, O. Cellulose degradation and assimilation by the unicellular phototrophic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature Communications**, v. 3, p. 1214–1219, 2012.

BLINOVÁ, L.; BARTOŠOVÁ, A.; GERULOVÁ, K. Cultivation Of Microalgae (*Chlorella vulgaris*) For Biodiesel Production. **Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology**, v. 23, n. 36, p. 87–95, 8 set. 2015.

BOGAERT; PEREZ; RUMIN; GILTAY; CARONE; COOSEMANS; RADOUX; EPPE; LEVINE; REMACLE; REMACLE. Metabolic, Physiological, and Transcriptomics Analysis of Batch Cultures of the Green Microalga *Chlamydomonas* Grown on Different Acetate Concentrations. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1367, 2019.

BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. Fish gelatin. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 60, p. 119–143, 1 jan. 2010.

BOROWITZKA, M. A. **Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters**. Journal of Biotechnology. *Anais...Elsevier Sci B.V.*, 30 abr. 1999

BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N. R. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 13–25, 2013.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Pseudomonas oleovorans as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–82, ago. 1988.

BRIZIO, A. P. D. R.; PRENTICE, C. Development of an intelligent enzyme indicator for dynamic monitoring of the shelf-life of food products. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p. 208–217, ago. 2015.

BROWN, R. M.; LARSON, D. A.; BOLD, H. C. Airborne algae: Their abundance and heterogeneity. **Science**, v. 143, n. 3606, p. 583–585, 7 fev. 1964.

CAMPBELL, J.; STEVENS, S. E.; BALKWILL, D. L. Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in Spirulina platensis. **Journal of bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361–3, jan. 1982.

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; LEANDRO, C. N.; DE BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, dez. 2010.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. **Metabolites from algae with economical impact Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology** Elsevier, , 1 jul. 2007.

CARVALHO, A. V.; FERREIRA FERREIRA DA SILVEIRA, T.; MATTIETTO, R. DE A.; PADILHA DE OLIVEIRA, M. DO S.; GODOY, H. T. Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (Euterpe oleracea) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 5, p. 1467–1474, 2017.

CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; ALBERTO, J. C. V. Evaluation of the Influence of Nitrogen and Phosphorus Nutrients in the Culture and Production of biosurfactants by Microalga Spirulina. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 6, p. 90–98, 2014.

CASSURIAGA, A. P. A.; FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Innovative polyhydroxybutyrate production by Chlorella fusca grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456–463, 2018.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. DE L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CERQUEIRA, M. Â. P. R.; VICENTE, A. A. M. DE O. S.; CASTRO, L. M. P. Nanotechnology in food packaging: opportunities and challenges. In: CERQUEIRA, M. Â. P. R. et al. (Eds.). . **Nanomaterials for Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–11.

CHAI, S.; SHI, J.; HUANG, T.; GUO, Y.; WEI, J.; GUO, M.; LI, L.; DOU, S.; LIU, L.; LIU, G. Characterization of chlorella sorokiniana growth properties in monosaccharide-supplemented batch culture. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–19, 2018.

CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282–291, 2015.

CHEN, Z.; WANG, L.; QIU, S.; GE, S. Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. **BioMed Research International**, v. 2018, p.

1–17, 2018.

CHOI, I.; LEE, J. Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**, v. 218, p. 122–128, 2017.

COLLET, P.; SPINELLI, D.; LARDON, L.; HÉLIAS, A.; STEYER, J.-P.; BERNARD, O. **Biofuels from Algae**. [s.l.] Elsevier, 2014.

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries *Journal of Functional Foods* Elsevier, , 1 abr. 2013.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, 2011.

DA SILVA, C. K.; COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 Using Biopolymer Extraction Waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, 2018.

DAGNAS, S.; ONNO, B.; MEMBRÉ, J. M. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 95–104, 2014.

DALMASNETO, C. J.; SYDNEY, E. B.; ASSMANN, R.; NETO, D.; SOCCOL, C. R. **Biofuels from Algae**. [s.l.] Elsevier, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Fennema's Food Chemistry**. 4. ed. [s.l.] CRC Press, 2007.

DE MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872–2876, 2010.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, 2004.

DENG, C.; HU, Z.; FU, H.; HU, M.; XU, X.; CHEN, J. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1–2, p. 70–5, jan. 2012.

DINESHKUMAR, R.; SUBRAMANIAN, G.; DASH, S. K.; SEN, R. Development of an optimal light-feeding strategy coupled with semi-continuous reactor operation for simultaneous improvement of microalgal photosynthetic efficiency, lutein production and CO₂ sequestration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 113, p. 47–56, 2016.

DING, L.; LI, X.; HU, L.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; MAO, Z.; XU, H.; WANG, B.; FENG, X.; SUI, X. A naked-eye detection polyvinyl alcohol/cellulose-based pH sensor for intelligent packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, n. January, p. 115859, 2020.

DONG, S.; LUO, M.; PENG, G.; CHENG, W. Broad range pH sensor based on sol-gel entrapped indicators on fibre optic. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 129, n. 1, p. 94–98, 2008.

DROSOU, C. G.; KROKIDA, M. K.; BILIADERIS, C. G. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications *Drying Technology* Taylor and Francis Inc., , 25 jan. 2017.

DUTRA RESEM BRIZIO, A. P. **Use of Indicators in Intelligent Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2016.

EASTAUGH, N.; WALSH, V.; CHAPLIN, T.; SIDDAL, R. Pigment Compendium. A Dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments. [s.l.: s.n.]. v. 53

EBRAHIMI TIRTASHI, F.; MORADI, M.; TAJIK, H.; FOROUGH, M.; EZATI,

P.; KUSWANDI, B. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 920–926, 2019.

EDMONDSON, D. L. Electrospinning Scaffold Fabrication of Polymer Nanofibers and Sensors for Tissue Engineering Applications. **ProQuest Dissertations and Theses**, p. 178, 2013.

EHRENBERG, C. G. Die infusionsthierchen als vollkommene organismen. Ein blick in das tiefere organische leben der natur. Leipzig,: L. Voss, 1838.

EZATI, P.; TAJIK, H.; MORADI, M.; MOLAEI, R. Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 157–165, 1 jul. 2019.

FAN, X.; JIANG, Q.; SUN, Z.; LI, G.; REN, X.; LIANG, J.; HUANG, T. S. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 8, p. 1751–1758, 29 ago. 2015.

FAO, F. AND A. O. OF THE U. N. **Algae-based Biofuels Applications and Co-products**. 44. ed. Rome: [s.n.].

FDA. **Overview of Food Ingredients, Additives & Colors | FDA**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

FERNANDES, I.; MARQUES, F.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2923–2933, 2013.

FIBIGR, J.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 204–213, 2017.

FIGUEIRA, F. DA S.; GARCIA GETTENS, J.; VIEIRA COSTA, J. A.; DE MORAIS, M. G.; MORAES, C. C.; JULIANO KALIL, S. Production of Nanofibers Containing the Bioactive Compound C-Phycocyanin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 944–949, 1 jan. 2016.

FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: **Anthocyanins as Food Colors**. 1. ed. New York: Academic Press Inc., 1982. p. 263.

FREITAS, B. C. B.; ESQUÍVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in Chlorella minutissima cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129–133, out. 2016.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of Chlorella minutissima. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248–253, 2017a.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of Chlorella minutissima. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248–253, ago. 2017b.

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

FU, W.; GUDMUNDSSON, S.; WICHUK, K.; PALSSON, S.; PALSSON, B. O.; SALEHI-ASHTIANI, K.; BRYNJÓLFSSON, S. Sugar-stimulated CO₂ sequestration by the green microalga Chlorella vulgaris. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 275–283, 2019.

GAO, B.; HUANG, L.; WANG, F.; CHEN, A.; ZHANG, C. Bilateral and simultaneous accumulation of lipid and biomass in the novel oleaginous green microalga *Tetrademus bernardii* under mixotrophic growth. **Algal Research**, v. 37, n. September 2018, p. 64–73, 2019.

GAVA, A. J. Embalagens para Alimentos. In: **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1984. p. 242 p.

GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. polymers Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. 2018.

GE, S.; CHAMPAGNE, P.; PLAXTON, W. C.; LEITE, G. B.; MARAZZI, F. Microalgal cultivation with waste streams and metabolic constraints to triacylglycerides accumulation for biofuel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 2, p. 325–343, 11 mar. 2017.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GOLASZ, L. B.; SILVA, J. DA; SILVA, S. B. DA. Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 155–162, 2013.

GOLDMAN, J. C.; HOLE, W. OUTDOOR ALGAL MASS CULTURES - II. PHOTOSYNTHETIC YIELD LIMITATIONS. v. 13, 1979.

GONÇALVES, C. F.; SCHMATZ, D. A.; DA SILVA UEBEL, L.; KUNTZLER, S. G.; VIEIRA COSTA, J. A.; ZIMMER, K. R.; DE MORAIS, M. G. Microalgae biopeptides applied in nanofibers for the development of active packaging. **Polimeros**, v. 27, n. 4, p. 290–297, 2017.

GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 6, p. 1665–1669, 1965.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; SOUSA, J. M.; MOURA, P.; BANDARRA, N. M. Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 2, p. 21–37, 2010.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 4 fev. 2009.

GRUPPEN, H.; HAMER, R. J.; VORAGEN, A. G. J. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. **Journal of Cereal Science**, v. 16, n. 1, p. 53–67, jul. 1992.

HAMRANG, A.; BALKÖSE, D. **Applied Methodologies in Polymer Research and Technology**. Oakville: Taylor & Francis Group, 2015.

HARRIS, E. H.; STERN, D. B.; WITMAN, G. B. Chapter 1 - The Genus *Chlamydomonas*. In: **The Chlamydomonas Sourcebook**. [s.l.: s.n.]. p. 1–24.

HARUN, I.; YAHYA, L.; CHIK, M. N.; KADIR, N. N. A.; PANG, M. A. M. A. Effects of Natural Light Dilution on Microalgae Growth. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 2, p. 112–116, 2014.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. [s.l.] Oxford University Press, 1995.

HO, S.-H.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8725–8730, nov. 2010.

HOFFMANN, S.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ASPINALL, W.; COOKE, R.; CORRIGAN, T.; HAVELAAR, A.; ANGULO, F.; GIBB, H.; KIRK, M.; LAKE, R.; SPEYBROECK, N.; TORGERSON, P.; HALD, T. Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–26, 2017.

HONDO, S.; TAKAHASHI, M.; OSANAI, T.; MATSUDA, M.; HASUNUMA, T.; TAZUKE, A.; NAKAHIRA, Y.; CHOHNAN, S.; HASEGAWA, M.; ASAYAMA, M. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 510–517, 2015.

HOWGATE, P. A CRITICAL REVIEW OF TOTAL VOLATILE BASES AND TRIMETHYLAMINE AS INDICES OF FRESHNESS OF FISH. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 58–88, 2010.

HUANG, S.; XIONG, Y.; ZOU, Y.; DONG, Q.; DING, F.; LIU, X.; LI, H. A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebia euchroma* root extracts for monitoring fish freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 198–205, 1 maio 2019.

HUSSAIN, M. M.; ASIRI, A. M.; ARSHAD, M. N.; RAHMAN, M. M. Development of selective Co²⁺ ionic sensor based on various derivatives of benzenesulfonohydrazide (BSH) compound: An electrochemical approach. **Chemical Engineering Journal**, v. 339, n. October 2017, p. 133–143, 2018.

JAMRÓZ, E.; KULAWIK, P.; KRZYŚCIAK, P.; TALAGA-ĆWIERTNIA, K.; JUSZCZAK, L. Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 745–757, 1 fev. 2019.

JANJARASSKUL, T.; SUPPAKUL, P. Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 808–831, 2018.

JAWOREK, A.; KRUPA, A.; LACKOWSKI, M.; SOBCZYK, A. T.; CZECH, T.; RAMAKRISHNA, S.; SUNDARRAJAN, S.; PLISZKA, D. Electrospinning and electrospraying techniques for nanocomposite non-woven fabric production. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 75, n. 4, p. 77–81, 2009.

JIA, R.; TIAN, W.; BAI, H.; ZHANG, J.; WANG, S.; ZHANG, J. Amine-responsive cellulose-based ratiometric fluorescent materials for real-time and visual detection of shrimp and crab freshness. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2019.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, maio 2012.

JOHANSEN, M. N. **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**. New York: Nova Science Publishers, 2012.

JOHNSON, X.; ALRIC, J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 6, p. 776–793, 2013.

JORGE, N. **Embalagens para Alimentos**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, 2013.

JUÁREZ, Á. B.; VÉLEZ, C. G.; IÑIGUEZ, A. R.; MARTÍNEZ, D. E.; RODRÍGUEZ, M. C.; VIGNA, M. S.; DE MOLINA, M. D. C. R. A *Parachlorella kessleri* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. **Phycologia**, v. 50, n. 4, p. 413–421, 2011.

KAI, D.; LIOW, S. S.; LOH, X. J. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 659–670,

2015.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; PALANI, P.; RENGASAMY, R. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii* kütz. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 700–706, ago. 2016.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: A short overview. **Macromolecular Symposia**, v. 130, n. 1, p. 245–260, 1 abr. 1998.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2018.

KHETKORN, W.; INCHAROENSAKDI, A.; LINDBLAD, P.; JANTARO, S. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 761–768, 2016.

KIM, D. Y.; KADAM, A.; SHINDE, S.; SARATALE, R. G.; PATRA, J.; GHODAKE, G. Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p. 849–864, 2018.

KIM, Y. M.; AN, D. S.; PARK, H. J.; PARK, J. M.; LEE, D. S. Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. **Packaging Technology and Science**, v. 15, n. 5, p. 247–254, 2002.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 609–615, 2007.

KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 688–695, 1993.

KORU, E. Earth Food Spirulina (*Arthrospira*): Production and Quality Standarts. In: **Food Additive**. [s.l.] InTech, 2012.

KUK, E. J.; HWANG, M. G.; KIM, M. G.; KIM, S. B.; KIM, Y. J.; LIM, J. K. PCL / PEO composite Nanofiber Manufacturing Technology using Air Jet Spinning method. 2014.

KULKARNI, S. K. Nanotechnology: Principles and Practices. [s.l.: s.n.].

KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1008–1014, 2018.

KUNTZLER, S. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 800–806, 1 out. 2018.

KUSWANDI, B.; JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 184–189, 1 maio 2012.

KUSWANDI, B.; NURFAWAIDI, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. **Food Control**, v. 82, p. 91–100, 2017.

LEE, H.; WATANABE, K.; KIM, M.; GOPIRAMAN, M.; SONG, K.; LEE, J. S.; KIM, I. S. Handspinning Enabled Highly Concentrated Carbon Nanotubes with Controlled Orientation in Nanofibers. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–8, 2016.

LEE, H.; NISHINO, M.; SOHN, D.; LEE, J. S.; KIM, I. S. Control of the morphology of cellulose acetate nanofibers via electrospinning. **Cellulose**, v. 25, n. 5, p. 2829–2837, 1 maio 2018.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. **Algal Research**, v. 16, p. 338–348, 2016.

LEVI, M. A. B.; SCARMINIO, I. S.; POPPI, R. J.; TREVISAN, M. G. Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 299–305, 2004.

LI, Y.; YU, J.; DING, B. Facile and ultrasensitive sensors based on electrospinning-netting nanofibers/nets. **NanoScience and Technology**, v. 96, p. 1–34, 2015.

LICHTENTHALER, H. K.; LANGSDORF, G.; LENK, S.; BUSCHMANN, C. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. **Photosynthetica**, v. 43, n. 3, p. 355–369, set. 2005.

LIU, X.; DUAN, S.; LI, A.; XU, N.; CAI, Z.; HU, Z. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 2, p. 239–246, 2009.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; MURIEL-GALET, V.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Chromatic sensor to determine oxygen presence for applications in intelligent packaging. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 21, 2019.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376–1384, abr. 2012.

LOURENÇO, S. DE O. Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações. [s.l.] RiMa, 2006.

MA, Q.; REN, Y.; GU, Z.; WANG, L. Developing an intelligent film containing *Vitis amurens* husk extracts: The effects of pH value of the film-forming solution. **Journal of Cleaner Production**, v. 166, p. 851–859, 2017.

MA, Q.; LIANG, T.; CAO, L.; WANG, L. Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 576–584, mar. 2018.

MA, Q.; DU, L.; WANG, L. Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH_3 indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 244, p. 759–766, 2017.

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H. Design and testing of an electrospun nanofiber mat as a pH biosensor and monitor the pH associated quality in fresh date fruit (Rutab). **Polymer Testing**, v. 75, n. September 2018, p. 76–84, 2019.

MAHANSARIA, R.; DHARA, A.; SAHA, A.; HALDAR, S.; MUKHERJEE, J. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwuensis* (as synonym) $\equiv$ *Natrinema altunense* strain RM-G10. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1480–1490, 2018.

MAJDINASAB, M.; HOSSEINI, S. M. H.; SEPIDNAME, M.;

NEGAHDARIFAR, M.; LI, P. Development of a novel colorimetric sensor based on alginate beads for monitoring rainbow trout spoilage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 1695–1704, 2018.

MAKOTE, R.; M. COLLINSON, M. Organically modified silicate films for stable pH sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 394, n. 2–3, p. 195–200, 1999.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Pergamon, , 1 jan. 2010.

MCKEEN, L. Renewable Resource and Biodegradable Polymers. In: **The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 305–317.

MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue Angle Determinations and Statistical. **Journal of Food Quality**, v. 18, n. 1995, p. 235–240, 1994.

MEI, L.; WANG, Q. Advances in Using Nanotechnology Structuring Approaches for Improving Food Packaging. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 339–364, 2020.

MEIXNER, K.; KOVALCIK, A.; SYKACEK, E.; GRUBER-BRUNHUMER, M.; ZEILINGER, W.; MARKL, K.; HAAS, C.; FRITZ, I.; MUNDIGLER, N.; STELZER, F.; NEUREITER, M.; FUCHS, W.; DROSG, B. Cyanobacteria Biorefinery — Production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 265, n. October 2017, p. 46–53, 2018.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 149–167, 2014.

MIYAKE, M.; ERATA, M.; ASADA, Y. A Thermophilic Cyanobacterium , *Synechococcus* sp . MA19 , Capable of Accumulating Poly- ,& Hydroxybutyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 512–514, 1996.

MOKRZYCKI W.S., T. M. Color difference Delta E - A survey. **Machine Graphics and Vision**, v. 20, n. 4, p. 383–411, 2011.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ALMASI, H.; FOROUGH, M.; EZATI, P. A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, n. March, p. 115030, 2019.

MORAIS, E. G. DE; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. Glycerol increases growth, protein production and alters the fatty acids profile of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp LEB 18. **Process Biochemistry**, v. 76, n. August 2018, p. 40–45, 2019.

MORAIS, M. G. DE; VAZ, S.; MORAIS, E. G. DE; ALBERTO, J.; COSTA, V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, 2015.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349–1352, 2007.

MOREIRA, J. B.; LUIZA, A.; TERRA, M.; COSTA, A. V.; MORAIS, M. G. DE. PT SC. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. #pagerange#, 2018.

MUTHURAJ, M.; PALABHANVI, B.; MISRA, S.; KUMAR, V.; SIVALINGAVASU, K.; DAS, D. Flux balance analysis of *Chlorella* sp. FC2 IITG under photoautotrophic and heterotrophic growth conditions. **Photosynthesis Research**, v. 118, n. 1–2, p. 167–179, 2013.

NADATHUR, S. R.; WANASUNDARA, J. P. D.; SCANLIN, L. Feeding the Globe Nutritious Food in 2050. In: **Sustainable Protein Sources**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 409–421.

NEISH, A. C. CARBOHYDRATE NUTRITION OF *CHLORELLA VULGARIS*. **Canadian Journal of Botany**, v. 29, n. 1, p. 68–78, 1 jan. 1951.

NOAA. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. Disponível em: <<http://www.noaa.gov>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

PACQUIT, A.; FRISBY, J.; DIAMOND, D.; LAU, K. T.; FARRELL, A.; QUILTY, B.; DIAMOND, D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, v. 102, n. 2, p. 466–470, 1 jan. 2007.

PANDA, B.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 12, p. 1376–1379, 2005.

PANDEY, A.; LEE, D.-J.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. R. **Biofuels From Algae**. San Diego: Elsevier B.V., 2014.

PARANJAPE, K.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 778–786, 2016.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WINK, M. An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1283–1290, 2016.

PEREIRA, V. A.; DE ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180–188, 2015.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

PETRIK, S. Industrial Production Technology for Nanofibers. In: **Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications**. [s.l.] InTech, 2011.

PHILLIPS, G. O.; STEPHEN, A. M.; WILLIAMS, P. A. **Food polysaccharides and their applications**. [s.l.] Taylor & Francis, 2006.

PIRES, A. C. D. S.; SOARES, N. D. F. F.; DE ANDRADE, N. J.; DA SILVA, L. H. M.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, v. 21, n. 7, p. 375–383, 2008.

POURJAVAHER, S.; ALMASI, H.; MESHKINI, S.; PIRSA, S.; PARANDI, E. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 193–201, 2017.

PRIETTO, L.; MIRAPALHETE, T. C.; PINTO, V. Z.; HOFFMANN, J. F.; VANIER, N. L.; LIM, L. T.; GUERRA DIAS, A. R.; DA ROSA ZAVAREZE, E. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 492–500, 2017.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2735–2741, 2018a.

PRIETTO, L.; PINTO, V. Z.; EL HALAL, S. L. M.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; LIM, L.-T.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Ultrafine fibers of

zein and anthocyanins as natural pH indicator. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2735–2741, maio 2018b.

PULIGUNDLA, P.; JUNG, J.; KO, S. Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 328–333, 2012.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer, , 6 nov. 2004.

QIU, Z.; IKEHARA, T.; NISHI, T. Miscibility and crystallization of poly(ethylene oxide) and poly (ϵ -caprolactone) blends. **Polymer**, v. 44, n. 10, p. 3101–3106, 2003.

QU, F.; GONG, N.; WANG, S.; GAO, Y.; SUN, C.; FANG, W.; MEN, Z. Effect of pH on fluorescence and absorption of aggregates of chlorophyll a and carotenoids. **Dyes and Pigments**, v. 173, n. September 2019, p. 107975, 2020.

RAMAKRISHNA, S. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. [s.l.] World Scientific, 2005.

RAMOS, M.; BELTRÁN, A.; PELTZER, M.; VALENTE, A. J. M.; GARRIGÓS, M. DEL C. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 470–477, out. 2014.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

RICHMOND, A. (ED.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M. R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 243–248, 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural Food Pigments and Colorants. In: [s.l.] Springer, Cham, 2018. p. 1–35.

RUBERT, M.; LI, Y. F.; DEHLI, J.; TASKIN, M. B.; BESENBACHER, F.; CHEN, M. Dexamethasone encapsulated coaxial electrospun PCL/PEO hollow microfibers for inflammation regulation. **RSC Advances**, v. 4, n. 93, p. 51537–51543, 2014.

RUDNIK, E. Compostable Polymer Properties and Packaging Applications. In: **Plastic Films in Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 217–248.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 15 ago. 2010.

RUIZ, J.; ARBIB, Z.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Influence of light presence and biomass concentration on nutrient kinetic removal from urban wastewater by *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 32–37, 2014.

RUKCHON, C.; NOPWINYUWONG, A.; TREVANICH, S.; JINKARN, T.; SUPPAKUL, P. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, v. 130, p. 547–554, 2014.

SALIU, F.; DELLA PERGOLA, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1117–1124, 2018a.

SALIU, F.; DELLA PERGOLA, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 1117–1124, 2018b.

SALOMÉ, P. A.; MERCHANT, S. S. A series of fortunate events: Introducing chlamydomonas as a reference organism. **Plant Cell**, v. 31, n. 8, p. 1682–1707, 2019.

SAMANTA, P.; SRIVASTAVA, R.; NANDAN, B.; CHEN, H. L. Crystallization behavior of crystalline/crystalline polymer blends under confinement in electrospun nanofibers of polystyrene/poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) ternary mixtures. **Soft Matter**, v. 13, n. 8, p. 1569–1582, 2017.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, P. S.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001.

SCHMATZ, D. A.; DA SILVA UEBEL, L.; KUNTZLER, S. G.; DORA, C. L.; VIEIRA COSTA, J. A.; DE MORAIS, M. G. Scaffolds Containing Spirulina sp. LEB 18 Biomass: Development, Characterization and Evaluation of In Vitro Biodegradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1050–1059, 1 jan. 2016.

SCHMATZ, D. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospraying. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100314, 1 jun. 2019.

SCHOPF, J.; PACKER, B. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. **Science**, v. 237, n. 4810, p. 70–73, 3 jul. 1987.

SENTHIL MUTHU KUMAR, T.; SENTHIL KUMAR, K.; RAJINI, N.; SIENGCHIN, S.; AYRILMIS, N.; VARADA RAJULU, A. A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. **Composites Part B: Engineering**, v. 175, n. June, p. 107074, out. 2019.

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; KHOEYI, Z. A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, p. 721–726, 3 ago. 2011.

SFORZA, E.; SIMIONATO, D.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; MOROSINOTTO, T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

SHANG, J.; LIN, S.; THEATO, P. Fabrication of color changeable CO₂ sensitive nanofibers. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 48, p. 7446–7451, 2017.

SHARMA, R. Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 03, n. 05, 2012.

SHETTY, P.; GITAU, M. M.; MARÓTI, G. Salinity Stress Responses and Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1657, 2019.

SHIBUYA, N.; IWASAKI, T. Structural features of rice bran hemicellulose. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 285–289, fev. 1985.

SHIH, P. M.; ZARZYCKI, J.; NIYOGI, K. K.; KERFELD, C. A. Introduction of a synthetic CO₂-fixing photorespiratory bypass into a cyanobacterium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 14, p. 9493–9500, 2014.

SHUKLA, V.; KANDEEPAN, G.; VISHNURAJ, M. R.; SONI, A. Anthocyanins based indicator sensor for intelligent packaging application. **Agricultural Research**, v. 5, n. 2, p. 205–209, 2016.

SILVA, C. K. DA; MASTRANTONIO, D. J. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Innovative pH sensors developed from ultrafine fibers containing açai (*Euterpe oleracea*) extract. **Food Chemistry**, v. 294, p. 397–404, out. 2019.

SINGH, A. K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. **FEMS Microbiology Letters**, n. December, p. 1–13, 2017.

SINGH, D. P.; KHATTAR, J. S.; RAJPUT, A.; CHAUDHARY, R.; SINGH, R. High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–19, 2019.

SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 401–412, 2011.

SIRACUSA, V.; LOTTI, N. **Intelligent packaging to improve shelf life**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

SLEGGERS, P. M.; VAN BEVEREN, P. J. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Fermentation processes engineering in the food industry**. [s.l.] CRC, 2013.

SOLOVCHENKO, A.; KHOZIN-GOLDBERG, I. High-CO₂ tolerance in microalgae: Possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation *Biotechnology Letters*, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23801125>>. Acesso em: 5 mar. 2020

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. Spirulina – From growth to nutritional product: A review *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STANIER, R. Y.; DERUELLES, J.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WATERBURY, J. B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1 mar. 1979.

SUDHAKAR, K.; PREMALATHA, M. Characterization of micro algal biomass through FTIR/TGA /CHN analysis: Application to *Scenedesmus* sp. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 37, n. 21, p. 2330–2337, 2 nov. 2015.

SUEOKA, N. Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in *Chlamydomonas Reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 46, n. 1, p. 83–91, 1960.

SUN, H.; ZHAO, W.; MAO, X.; LI, Y.; WU, T.; CHEN, F. High-value biomass from microalgae production platforms: Strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2018.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D.; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. 2014.

TANG, B.; HE, Y.; LIU, J.; ZHANG, J.; LI, J.; ZHOU, J.; YE, Y.; WANG, J.; WANG, X. Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. **Dyes and Pigments**, v. 170, n. June, p. 107643, 2019.

THEODOSOPOULOS, G.; ZISIS, C.; CHARALAMBIDIS, G.; NIKOLAOU, V.; COUTSOLELOS, A.; PITSIKALIS, M. Synthesis, Characterization and Thermal Properties of Poly(ethylene oxide), PEO, Polymacromonomers via Anionic and Ring Opening Metathesis Polymerization. **Polymers**, v. 9, n. 12, p. 145, 21 abr. 2017.

TIPDUANGTA, P.; BELTON, P.; FÁBIÁN, L.; WANG, L. Y.; TANG, H.; EDDLESTON, M.; QI, S. Electrospun Polymer Blend Nanofibers for Tunable Drug Delivery: The Role of Transformative Phase Separation on Controlling the Release Rate. **Molecular**

Pharmaceutics, v. 13, n. 1, p. 25–39, 2016.

TRINETTA, V. Definition and Function of Food Packaging. [s.l.] Elsevier, 2016.

TRIPATHY, S.; REDDY, M. S.; VANJARI, S. R. K.; JANA, S.; SINGH, S. G. A Step Towards Miniaturized Milk Adulteration Detection System: Smartphone-Based Accurate pH Sensing Using Electrospun Halochromic Nanofibers. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 2, p. 612–624, 2019.

UDOP. **União Nacional da Bioenergia**, 2019. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/>>

VAN STAPPEN, G. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), Manual on the production and use of live food for aquaculture. **FAO Technical Paper**, n. 361, p. 295, 1996.

VAZ, B. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology. [s.l.] Taylor & Francis, 1997.

WAN, M.; LIU, P.; XIA, J.; ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; BETENBAUGH, M. J.; NIE, Z.; QIU, G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 835–844, ago. 2011.

WANG, C.; LI, H.; WANG, Q.; WEI, P. Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. **Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1074–1079, ago. 2010.

WEI, Y.-C.; CHENG, C.-H.; HO, Y.-C.; TSAI, M.-L.; MI, F.-L. Active gellan gum/purple sweet potato composite films capable of monitoring pH variations. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 491–502, ago. 2017.

World Population Clock: 7.8 Billion People (2020) - Worldometer. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/world-population/>>. Acesso em: 2 maio. 2020.

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Bioresource technology**, v. 76, n. 2, p. 85–90, jan. 2001.

YAMAGUCHI, K. K. D. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015.

YAN, C.; ZHANG, L.; LUO, X.; ZHENG, Z. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. **Ecological Engineering**, v. 51, p. 24–32, fev. 2013.

YANG, Z.; NOLLENBERGER, K.; ALBERS, J.; CRAIG, D.; QI, S. Microstructure of an Immiscible Polymer Blend and Its Stabilization Effect on Amorphous Solid Dispersions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 7, p. 2767–2780, 28 jul. 2013.

YIN, W.; WU, L.; DING, F.; LI, Q.; WANG, P.; LI, J.; LU, Z.; HAN, H. Surface-imprinted SiO₂@Ag nanoparticles for the selective detection of BPA using surface enhanced Raman scattering. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 258, p. 566–573, 2018.

YUAN, Y.; LEE, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. In: [s.l.: s.n.]. p. 3–34.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. Paris: University of Paris, 1966.

ZHAI, X.; SHI, J.; ZOU, X.; WANG, S.; JIANG, C.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, W.; HOLMES, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 308–317, 2017.

ZHANG, X.; LU, S.; CHEN, X. A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 198, p. 268–273, 2014.

ZHAO, S.; PARK, C. H.; YANG, J.; YEO, H. J.; KIM, T. J.; KIM, J. K.; PARK, S. U. Molecular characterization of anthocyanin and betulinic acid biosynthesis in red and white mulberry fruits using high-throughput sequencing. **Food Chemistry**, v. 279, p. 364–372, 1 maio 2019.

ZHENG, Y.; YU, X.; LI, T.; XIONG, X.; CHEN, S. Induction of D-xylose uptake and expression of NAD(P)H-linked xylose reductase and NADP + -linked xylitol dehydrogenase in the oleaginous microalga *Chlorella sorokiniana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

ZHU, J.; CHEN, W.; CHEN, H.; ZHANG, X.; HE, C.; RONG, J.; WANG, Q. Improved productivity of neutral lipids in *Chlorella* sp. A2 by minimal nitrogen supply. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–11, 2016.

ZIENKIEWICZ, K.; DU, Z.-Y.; MA, W.; VOLLHEYDE, K.; BENNING, C. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 9, p. 1269–1281, set. 2016.

ZURIANI, R.; VIGNESWARI, S.; AZIZAN, M. N. M.; MAJID, M. I. A.; AMIRUL, A. A. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 472–478, 2013.