

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CULTIVO DE MICROALGAS UNICELULARES PARA
DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO LIPÍDICA E
SEQUESTRO DE CARBONO**

Liliana do Rosário Velez Carolino

MESTRADO DE BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**CULTIVO DE MICROALGAS UNICELULARES PARA
DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO LIPÍDICA E
SEQUESTRO DE CARBONO**

Liliana do Rosário Velez Carolino

MESTRADO DE BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado orientada por:
Professora Doutora Vanda Costa Brotas Gonçalves
Doutor Bruno Miguel Freire Boa de Jesus

2011

Resumo

O uso de microalgas como fonte de biocombustível adquire grande relevância, numa altura em que o mundo se depara com uma crise energética, devido à depleção do petróleo e outros combustíveis fósseis, cujo uso crescente e continuado, desde a industrialização, tem conduzido à degradação ambiental. As grandes vantagens da utilização destes microorganismos como matéria-prima na produção de biocombustível residem: no facto de as conseqüentes emissões de CO₂ corresponderem à quantidade sequestrada deste gás, através da fotossíntese, durante o crescimento da biomassa; na grande capacidade de fixar dióxido de carbono e de acumular lípidos. Desta forma, a presente dissertação teve como principal finalidade o cultivo de clorófitas unicelulares, *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, de modo a determinar o sequestro de carbono (medição da produtividade primária) e a produção lipídica, visando a possível obtenção de biodiesel. O cultivo em fotobioreactores *air-lift* permitiu elevadas taxas de crescimento e produtividade da biomassa. Em geral, evidenciou-se aumento da concentração dos pigmentos na fase estacionária e redução dos parâmetros fotossintéticos $rETR_{max}$, α e Fv/Fm nesta mesma fase, relativamente à exponencial. A aplicação das metodologias de determinação da produtividade primária (método de Winkler e método do ¹⁴C) permitiram verificar uma elevada e maior capacidade fotossintética em *Scenedesmus* sp.1, $P^B_{max}=57 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$ e $225,4 \mu\text{molC}(\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$, comparativamente a *Ankistrodesmus fusiformis*, $P^B_{max}=31 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$ e $165,5 \mu\text{mol C} (\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$. A produção lipídica das espécies foi semelhante, quer observando os resultados obtidos para o conteúdo lipídico, quer pelo perfil de ácidos gordos. O conteúdo lipídico total em *Ankistrodesmus fusiformis* foi de 17,1% (fase estacionária); em *Scenedesmus* sp.1 foi de 18,3% (fase exponencial) e 14,9% (fase estacionária). Embora estes valores não sejam muito elevados, a predominância do ácido palmítico (16:0) e ácido oleico (18:1) nas fases do crescimento das espécies, torna estas algas adequadas para a produção de biodiesel. Os valores máximos registados corresponderam a C18:1, na fase estacionária, tanto em *Ankistrodesmus fusiformis* ($37,8\pm 6,9 \%$) como em *Scenedesmus* sp.1 ($38,2 \pm 2,4 \%$). Os resultados e conclusões obtidos fazem valer a pena a concretização de mais estudos relativos à optimização das condições de cultura destas microalgas, visando um maior sequestro de carbono e maior produção lipídica.

Palavras-chave: Microalgas, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Scenedesmus* sp.1, Lípidos, Produtividade primária.

Abstract

The use of microalgae as biofuel source gathers great relevance in a time when world faces an energy crisis, due to oil and other fossil fuels depletion, whose continued and growing use, since the industrialization, has been leading to environmental degradation. The great use advantages of these microorganisms, as feedstock in biofuel production, reside: in fact of the resulting CO₂ emissions match the sequestered quantity of this gas, through photosynthesis, during biomass growth; microalgae have great capacity to fixate carbon dioxide and to accumulate lipids. Thus, this dissertation had as its main purpose, the cultivation of unicellular chlorophyte, *Ankistrodesmus fusiformis* and *Scenedesmus* sp.1, to determine the carbon sequestration (measurement of primary productivity) and lipid production, possible in order to obtain biodiesel. The cultivation in *air-lift* photobioreactors allowed high growth rates and biomass productivity. In general, there was increasing concentration of pigments and reduction of photosynthetic parameters $rETR_{max}$, α and Fv/Fm, in the stationary phase, concerning the exponential phase. The application of primary productivity determination methodologies (Winkler and ¹⁴C methods) allowed confirmation of a high and higher photosynthetic capacity in *Scenedesmus* sp.1, $P_{max}^B=57 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$ and $225,4 \mu\text{mol C} (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$, comparatively to *Ankistrodesmus fusiformis*, $P_{max}^B=31 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$ and $165,5 \mu\text{mol C} (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$. The lipid production of both species was alike, whether looking at the lipid content results, either by the fatty acid profile. The total lipid content of *Ankistrodesmus fusiformis* was 17.1% (stationary phase); in *Scenedesmus* sp.1 was 18,3% (exponential phase) and 14.9% (stationary phase). Although these numbers are not very high, the predominance of palmitic acid (16:0) and oleic acid (18:1) in the species growth phases, makes these algae proper for biodiesel production. The top values recorded corresponded to C18:1, in the stationary phase, both in *Ankistrodesmus fusiformis* ($37,8 \pm 6,9$ %) as in *Scenedesmus* sp.1 ($38,2 \pm 2,4$ %). The obtained results and conclusions make worth the execution of more studies on the optimization of culture conditions for these microalgae, aiming a greater carbon sequestration and a bigger lipid production.

Key words: Microalgae, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Scenedesmus* sp.1, Lipids, Primary productivity.

Agradecimentos

Na concretização de grandes projectos pessoais, o papel das pessoas que estão por perto, sejam amigos, familiares ou orientadores, é insubstituível e decisivo. Sem as pessoas que passo a enunciar, a realização deste trabalho não teria sido possível. O meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora Vanda Brotas e ao Doutor Bruno Jesus pela oportunidade de realizar esta dissertação, por toda a disponibilidade, enorme paciência, dedicação e todo o conhecimento que me foi transmitido.

À Doutora Narcisa Bandarra e Joana Coutinho do IPIMAR pelo trabalho desenvolvido na determinação da produção lípidica.

A toda a equipa que trabalha no Instituto de Oceanografia, especialmente, os colegas do laboratório de Botânica Marinha. Em particular, à Ana Sousa, Bernardo Duarte, Mickael Ruivo, Rute Henriques e à Tânia Diniz, que todos os dias mostraram simpatia e cooperação. Agradeço principalmente à Vera Veloso pelo seu precioso auxílio no desenvolvimento experimental deste trabalho. Também me encontro grata, pela amizade, atenção e recomendações da Herculana Velez.

À Carla Gameiro pela generosidade e enorme disponibilidade que foi determinante na execução do método de produtividade primária de Steemann Nielsen.

Por fim, aos meus adoráveis pais e aos meus amigos, Cláudio, Ivo, João. Todo o vosso apoio e carinho foram fundamentais nesta etapa da minha vida. Em especial, à minha amável irmã, Vanessa, pelo amor incomparável dado em todos os momentos.

Índice

Resumo	i
Agradecimentos	iii
Abreviaturas	iv
Lista das Figuras e Tabelas	v
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – Introdução	1
1.2 – Revisão da literatura	4
1.2.1 – Demanda energética global/Aquecimento Global e Emissões de CO ₂ : <i>Importância do estudo</i>	4
1.2.2 – Sequestro de carbono por microalgas	7
1.2.3 – Lípidos nas microalgas	10
1.2.4 – Produção de biomassa microalgal	14
1.2.5 – Espécies em estudo: <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.1	15
CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 – Espécies	17
2.2 – Preparação do inóculo	18
2.3 – Caracterização das condições de cultura	18
2.4 – Análise do crescimento das culturas	19
2.4.1 – Contagem celular ao microscópio	19
2.4.2 – Leitura da absorvância	20
2.4.3 – Peso seco da amostra	21
2.5 – Determinação do conteúdo pigmentar das culturas	21
2.5.1 – Análise por cromatografia	21
2.5.2 – Análise por espectrofotometria	22
2.5.2.1 – Clorofila <i>a</i> e Feopigmentos	24
2.6 – Produção primária das culturas de microalgas	25
2.6.1 – Curvas de luz-fotossíntese (PE)	25
2.6.2 – Metodologias laboratoriais	26
2.6.2.1 – Método de Winkler	28

2.6.2.2 – Método do ^{14}C	29
2.6.2.2.1 – Alcalinidade e carbono inorgânico dissolvido total (C_{total})	31
2.7 – Produção lipídica	31
2.7.1 – Determinação e quantificação de lípidos totais	31
2.7.2 – Determinação e quantificação de ácidos gordos	32
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 – Características da biomassa de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus sp.1</i>	34
3.2 – Crescimento das culturas microalgais	35
3.3 – Análise pigmentar das culturas	40
3.3.1 – Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC)	40
3.3.2 – Espectrofotometria	44
3.3.3 – Comparação entre espectrofotometria e HPLC	48
3.4 – Produção primária e parâmetros fotossintéticos	50
3.4.1 – Parâmetros fotossintéticos	50
3.4.2 – Medição da produção fotossintética	54
3.5 – Produção de lípidos nas microalgas	61
3.5.1 – Conteúdo lipídico total	61
3.5.2 – Perfil de ácidos gordos na composição do extracto lipídico	64
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	71
CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	79

Abreviaturas

Análise pigmentar

Anth	Anteroxantina
Ast	Astaxantina
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Chlide <i>a</i>	Clorofilide <i>a</i>
Feo	Feopigmentos da clorofila <i>a</i>
Lut	Luteína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
Neo	Neoxantina
Phide- <i>a</i>	Feoforbide <i>a</i>
Phytin- <i>a</i>	Feofitina <i>a</i>
Viola	Violaxantina
Zea	Zeaxantina
β -car	β -caroteno

Parâmetros fotossintéticos e Produtividade Primária

α	Coeficiente máximo de utilização da luz
α^B	Coeficiente máximo de utilização da luz normalizado para a clorofila <i>a</i>
β	Fotoinibição
E_c	Irradiância de compensação
E_K	Irradiância de saturação
Fluorómetro PAM	Fluorómetro de amplitude de pulso modulado
Fv/Fm	Eficiência quântica máxima do fotossistema II
P_{max}	Produtividade primária máxima
P_{max}^B	Produtividade primária máxima normalizada para a clorofila <i>a</i>
PPB	Produtividade primaria bruta
PPL	Produtividade primaria líquida
R	Respiração
R^B	Respiração normalizada para a clorofila <i>a</i>
rETR _{max}	Taxa relativa máxima de transporte electrónico
^{14}C	Isótopo 14 do átomo de carbono

Produção lipídica

ACC	Enzima Acetil-CoA carboxilase
DGDG	Digalactosildiacylglicerol
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
MGDG	Monogalactosildiacylglicerol
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
PUFA	Ácidos gordos poliinsaturados
SFA	Ácidos gordos saturados
TAG	Triglicéridos
n-3 HUFA	Ácidos gordos altamente insaturados da família ómega3

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 – (a) Emissões de CO ₂ da queima de combustíveis fósseis; (b) Emissões mundiais de CO ₂ por sector (IEA, 2009).....	4
Figura 2 – Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de Mata <i>et al.</i> , 2010).....	6
Figura 3 – Representação esquemática da membrana tilacóide do cloroplasto com alguns dos principais componentes do aparato fotossintético (Adaptado de Falkowski & Raven, 1997).	8
Figura 4 – Biosíntese de ácidos gordos e triglicéridos (Adaptado de Courchesne <i>et al.</i> , 2009).	13
Figura 5 – Incubador e montagem utilizada no crescimento das microalgas.	19
Figura 6 – Curva típica da relação entre a taxa fotossintética e a intensidade luminosa (P-E), com a representação dos parâmetros característicos. (Adaptado de Lobban <i>et al.</i> , 1988).	25
Figura 7 – Representação esquemática do incubador utilizado no laboratório para a determinação da produtividade primária (figura adaptada de Gameiro, 2009).....	27
Figura 8 – Alteração da coloração das culturas nas duas clorófitas estudadas e nas duas fases de crescimento analisadas.	34
Figura 9 – Observação ao microscópio Olympus BX 50, numa ampliação de 400x, da espécie <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> (a) e <i>Scenedesmus</i> sp.1 (b).	35
Figura 10 - Curvas de crescimento das culturas de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e de <i>Scenedesmus</i> sp.1.....	36
Figura 11 – Relação linear entre métodos utilizados para a determinação do crescimento das culturas de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	37
Figura 12 – Relação linear entre métodos utilizados para a determinação do crescimento das culturas de <i>Scenedesmus</i> sp.1.....	38
Figura 13 – Crescimento das culturas utilizadas na análise por HPLC, evidenciando os dias em que foram colhidas amostras (setas).	41
Figura 14 – Exemplos de cromatogramas obtidos de amostras colhidas na fase estacionária, para <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> (a) e para <i>Scenedesmus</i> sp.1(b).....	41
Figura 15 – Comparação, entre fases e espécies, da concentração de clorofila <i>a</i> e da razão da soma da concentração de neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina <i>versus</i> concentração da clorofila <i>a</i>	43
Figura 16 – Resultados da concentração de clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> (mg L ⁻¹), e concentração destes pigmentos por célula (µg Cel ⁻¹), ao longo dos dias de cultivo de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	46
Figura 17 – Resultados da concentração de clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i> (mg L ⁻¹), e concentração destes pigmentos por célula (µg Cel ⁻¹), ao longo dos dias de cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp.1.....	47
Figura 18 – Variação da clorofila <i>a</i> e feopigmentos em relação aos dias de cultivo, em <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> (a) e em <i>Scenedesmus</i> sp.1 (b).....	48
Figura 19 – Concentração dos fotopigmentos na fase exponencial (Exp) e fase estacionária (Est) das microalgas, determinada através do espectrofotómetro (SPE) e por cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC)..	49
Figura 20 – Valores médios dos parâmetros fotossintéticos obtidos das curvas P-E conseguidas através do fluorómetro PAM.	51

Figura 21 – Valores médios de variação dos parâmetros fotossintéticos $rETR_{max}$, Fv/Fm e α ao longo dos dias de cultivo das culturas de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.1.....	52
Figura 22 – Curvas P-E obtidas para a cultura de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> (a) e de <i>Scenedesmus</i> sp.1 (b) através da medição do oxigénio dissolvido em amostras submetidas a incubação a diferentes intensidades luminosas.	56
Figura 23 – Relação da taxa fotossintética, conseguida pelo método de ^{14}C , e a intensidade luminosa para <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> (ANK) e <i>Scenedesmus</i> sp.1 (SCE). Os resultados podem ser interpretados em $mg\ C\ m^{-3}\ h^{-1}$ ou em $\mu mol\ C\ L^{-1}\ h^{-1}$	57
Figura 24 – Relação linear entre os resultados obtidos com o método de Winkler e com o método do ^{14}C	58
Figura 25 – Perfil de ácidos gordos encontrado nas culturas colhidas na fase exponencial e estacionária das duas clorófitas em estudo. Resultados em mg/g de peso seco.....	66
Figura 26 – Perfil de ácidos gordos encontrado nas culturas colhidas na fase exponencial e estacionária das duas clorófitas em estudo. Resultados em percentagem relativa de ácidos gordos.....	67
Figura 27 - Totalidade de ésteres metílicos de ácidos gordos obtidos nas duas fases de crescimento para <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.1.	68
Figura 28 - Resultados em percentagem relativa de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poli-insaturados (PUFA) e altamente insaturados da família omega3 (n-3 HUFA), registados nas duas fases de crescimento e em ambas as clorófitas.	69
Tabela 1 – Conteúdo lipídico total de diversas espécies de microalgas (Deng <i>et al.</i> , 2009).	12
Tabela 2 – Início do cultivo das culturas de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.1, com a respectiva fase de crescimento no momento da colheita.	17
Tabela 3 - Composição do meio de cultivo BBM (<i>Bold's Basal Medium</i>) utilizado para o crescimento de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.1.....	*
Tabela 4 – Gradiente da fase móvel (solventes).	22
Tabela 5 – Valores mínimos (Mín), máximos (Máx) e médios (Méd) das taxas de crescimento e respectivos tempos de geração, relativos à concentração celular ($cel\ ml^{-1}dia^{-1}$) e ao peso seco ($g\ L^{-1}dia^{-1}$)	39
Tabela 6 – Identificação dos picos nas duas clorófitas, tempos médios de retenção dos pigmentos nas culturas colhidas na fase exponencial (Exp) e na fase estacionária (Est), e concentração máxima dos pigmentos identificados com a respectiva fase onde foi registada.	42
Tabela 7 – Valores máximos (Máx) e mínimos (Mín) registados para os parâmetros fotossintéticos nas duas algas verdes.	52
Tabela 8 – Características da biomassa de cada cultura utilizada nos dias em que foram efectuadas as medições com o método de oxigénio e o método do ^{14}C , nas duas microalgas em estudo.	55
Tabela 9 – Valores determinados de pH, alcalinidade do carbonato (Alc), do carbono inorgânico dissolvido total (C_{total}) e da massa do carbono inorgânico dissolvido total (W), para as duas clorófitas em estudo.	57

Tabela 10 – Valores determinados para produtividade máxima normalizada para Clorofila <i>a</i> (P_{max}^B , $\mu\text{mol O}_2$ ou C $(\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$) e restantes parâmetros fotossintéticos passíveis de determinação com o modelo utilizado de Platt <i>et al.</i> (1980). Apresentação dos resultados das duas metodologias efectuadas....	57
Tabela 11 – Conteúdo lipídico total das clorófitas nas fases de crescimento, presente numa determinada quantidade de biomassa seca, obtida da junção ou não de replicados.	62
Tabela 12 - Percentagens relativas de ácidos gordos identificados nas culturas de <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e de <i>Scenedesmus sp.1</i>	*
Tabela 13 - Registo da temperatura no dia da colheita das culturas (T, °C), taxa de crescimento ($\text{cel L}^{-1}\text{d}^{-1}$; $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$) e percentagem relativa dos ácidos gordos predominantes em <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> e <i>Scenedesmus sp.1</i>	68

*** em Anexo.**

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1 Introdução

As microalgas constituem um grande e diverso grupo de organismos fotossintéticos, eucariontes e procariontes (cianobactérias), produtores de oxigénio, não-vasculares e com estruturas reprodutoras desprotegidas. A classificação sistemática destes organismos pode ser realizada com base no tipo de pigmentos fotossintéticos, na natureza química dos produtos de armazenamento e paredes celulares (Guschina & Harwood, 2006). As microalgas possuem uma estrutura celular simples, crescem extremamente rápido e em diversos ecossistemas, gozam de elevada eficiência fotossintética e produtividade, sendo fáceis de cultivar, bastando para isso existir luz e alguns nutrientes específicos (Sheehan *et al.*, 1998; Mata *et al.*, 2010).

Actualmente, o cultivo de microalgas é praticável em *raceway ponds* (sistemas abertos) e fotobioreactores tubulares fechados, e a importância do seu estudo incide na possibilidade de diversas aplicações destes microorganismos, *e.g.* em bioremediação, em aquacultura, como biofertilizadores fixando azoto atmosférico e na obtenção de vários bioactivos de elevado valor com fins farmacêutico, nutracêutico, ou cosmético. Esta vasta aplicabilidade inclui também a produção de biocombustíveis, tais como o metano, hidrogénio, etanol e biodiesel (Chisti, 2007; Schenk *et al.*, 2008). Presentemente, o potencial valor das microalgas na produção de combustível renovável têm sido muito investigado, ocorrendo particular interesse na obtenção de biodiesel, biocombustível que possibilita a substituição de petróleo, permitindo a redução de emissão de gases poluentes como o dióxido de carbono, o monóxido de carbono, hidrocarbonos e óxidos de enxofre e partículas. O biodiesel consiste em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) originados essencialmente pelo processo de transesterificação de óleos vegetais, predominantemente óleos vegetais de plantas e cultivares terrestres tais como cana-de-açúcar, soja e palma. No entanto, esta primeira geração de biocombustíveis é ineficiente e pouco sustentável devido às sérias limitações económicas e ambientais (Patil *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009), pelo que, o uso de microalgas como matéria-prima na produção de biodiesel representa uma alternativa viável, garantindo um ganho energético, benefícios ambientais e capacidade de produção em grandes quantidades sem redução de bens alimentares (Hill *et al.*, 2006). As microalgas são organismos com grande capacidade de fixar dióxido de carbono e acumular lípidos, pelo que aproximadamente metade do peso seco da sua biomassa é carbono, o que significa que 1 kg de biomassa algal

fixa 1,6-1,8 kg de CO₂, e regularmente podem produzir um conteúdo lipídico de 50% a 60% por peso seco de biomassa (Sheehan *et al.*, 1998; Patil *et al.*, 2008). É de salientar a importância da escolha rigorosa da espécie algal a produzir, sendo necessário ter em conta o crescimento da biomassa; o conteúdo e produtividade lipídica; características de fácil cultivo e colheita para melhor sucesso de cultivo a larga escala; o sistema de cultivo a utilizar; os recursos disponíveis, localização e as condições ambientais prevalecentes; e que é influenciada pelas condições ambientais, recursos disponíveis e sistema de cultivo; âmbito e objectivos do projecto de estudo em causa (Griffiths & Harrison, 2009).

A ideia do uso de microalgas como fonte de biocombustível adquire grande relevância na medida em que o mundo se confronta com uma crise energética devido à depleção dos recursos finitos do petróleo e outros combustíveis fósseis, os quais, devido ao seu uso crescente e continuado desde a industrialização, têm constituído uma fonte de poluição e degradação ambiental, ameaçando gravemente a biodiversidade e com consequências catastróficas na saúde humana. O consequente aquecimento global, causado pelas concentrações crescentes de gases de estufa na atmosfera, com particular atenção ao dióxido de carbono, põe em evidência a necessidade imediata de acção de estratégias de redução destes gases nocivos, como a produção de combustíveis renováveis biodegradáveis e não tóxicos, em que as consequentes emissões de CO₂ correspondem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa, resultando num ciclo fechado de carbono (Lal, 2008). Actualmente, a produção de biodiesel a partir de microalgas é muito dispendiosa para competir com o petróleo, de modo que os desafios actuais associam-se ao isolamento e selecção de espécies promissoras de elevada acumulação de conteúdo lipídico; a uma estratégia de produção de biorefinaria, melhorando-se o potencial das microalgas através da engenharia genética e metabólica e avanços na engenharia de sistemas de cultivo; ao desenvolvimento de tecnologias de colheita e processamento que podem tornar exequível a efectiva implementação comercial de biocombustível com base em microalgas.

Deste modo foram delineados os seguintes objectivos para esta dissertação de mestrado:

- Estudar *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, cultivando estas microalgas unicelulares em fotobioreactores;
- Efectuar a caracterização do crescimento das espécies em regime *batch* até 1L de cultura;

- Determinar o conteúdo pigmentar das culturas através da análise espectrofotométrica e da análise por cromatografia (HPLC).
- Estimar para cada espécie o sequestro de CO₂, através da medição da produtividade primária; determinação da eficiência fotossintética e execução de curvas luz-fotossíntese (PI) com o Fluorómetro PAM. Aplicação do método do oxigénio e o método do ¹⁴C. Análise comparativa das metodologias de produtividade primária;
- Realizar a extracção e quantificação de lípidos em cada espécie.

1.2 Revisão da literatura

1.2.1 Demanda energética global/Aquecimento Global e Emissões de CO₂:

Importância do estudo

O aquecimento global, induzido por concentração de gases de estufa na atmosfera, têm sido tema de grande preocupação. A utilização contínua de combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão) e a sua combustão tem sido uma grande fonte de emissão de gases de estufa, tais como o dióxido de carbono, óxidos nitrosos, metano, dióxido de enxofre e compostos orgânicos voláteis (Verma *et al.*, 2010). O dióxido de Carbono (CO₂) é reconhecido como o principal gás de estufa e desde a revolução industrial, emissões anuais deste gás, derivadas da combustão de combustíveis fósseis, têm dramaticamente aumentado desde quase zero a 29 Gt em 2007 (Figura 1).

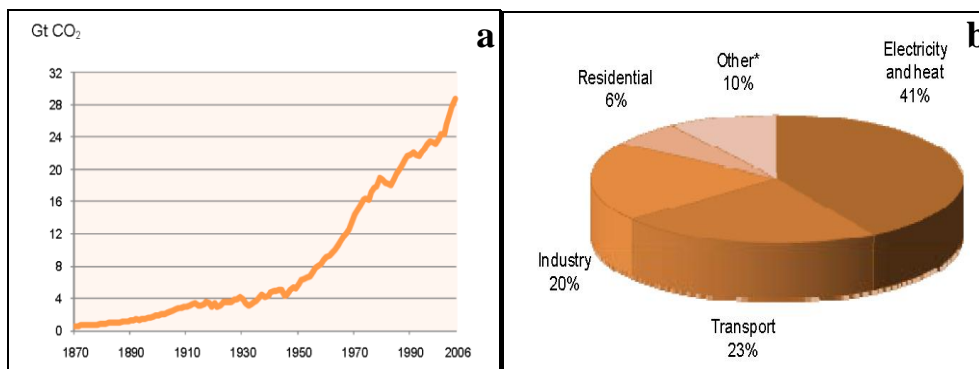


Figura 1 – (a) Emissões de CO₂ da queima de combustíveis fósseis; (b) Emissões mundiais de CO₂ por sector. “Other* 10%” inclui serviços públicos/comerciais, silvicultura/ agricultura, pesca, outras indústrias de energia para além da electricidade e a geração de calor e outras emissões não especificadas (IEA, 2009).

Embora muito carbono seja assimilado durante o seu ciclo natural, as actividades antropogénicas produzem mais carbono do que aquele que é sequestrado por meios naturais (Falkowski *et al.*, 2000). Consequentemente, as graves alterações climáticas e os efeitos perigosos na saúde humana tornam necessário o sequestro, captura e armazenamento do carbono emitido pelos sistemas globais de energia, de forma a reduzir o dióxido de carbono presente na atmosfera. Quer a crise energética quer a necessidade de redução de emissão de gases poluentes tornaram imprescindível considerar opções estratégicas, como a redução da desflorestação, implementação de medidas de eficiência energética utilizando energias

renováveis, desenvolvimento de combustíveis menos poluentes e o sequestro de CO₂ de fontes pontuais ou da atmosfera através de tecnologias abióticas e bióticas (Huntley e Redalje, 2006; Basha *et al.*, 2009; Lal, 2008). Embora o sequestro físico de CO₂ atmosférico seja muitas vezes considerado desafiador por ser tecnicamente difícil separar dióxido de carbono dos outros gases atmosféricos, organismos fotossintéticos têm aperfeiçoado este processo durante milhões de anos e encontram-se claramente bem adaptados para a captura de CO₂ e armazenamento deste gás como biomassa (Schenk *et al.*, 2008). Visto isto, a produção de biocombustíveis utilizando organismos fotossintéticos é vantajosa porque as consequentes emissões de CO₂ correspondem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa, verificando-se um ciclo fechado de carbono (Lal, 2008). Os biocombustíveis constituem um recurso renovável de energia, são biodegradáveis, não tóxicos e possuem propriedades ambientais favoráveis relativamente aos combustíveis convencionais. Os combustíveis renováveis mais comuns são o biodiesel e bioetanol, pelo que o primeiro é indicado como substituto do diesel e o bioetanol como substituto da gasolina. A utilização de biodiesel como fonte de energia reduz a emissão de diversas substâncias prejudiciais, como o dióxido de carbono, o monóxido de carbono, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos diversos e fuligem (Basha *et al.*, 2009), pelo que a libertação do conteúdo em enxofre e monóxido de carbono deverá ser diminuída em 30% e 10% respectivamente (Huang *et al.*, 2010). Este biocombustível consiste em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), que presentemente, são produzidos principalmente pelo processo de transesterificação de óleos vegetais, nomeadamente, óleos de palma, de colza, de soja e de girassol, enquanto que o bioetanol pode ser obtido através da fermentação da cana do açúcar e do milho. No entanto, uma segunda geração de sistemas de produção de combustíveis, propondo fontes de matéria-prima que não constituem biomassa tradicionalmente usada na alimentação, isto é, com base particularmente em microalgas, têm sido amplamente analisada de modo a ultrapassar as desvantagens e limitações inerentes à utilização de plantas e cultivares terrestres (Sheehan *et al.*, 1998; Chisti 2007; Schenk *et al.*, 2008). As microalgas podem assimilar dióxido de carbono como fonte de carbono para o seu crescimento e providenciar matéria-prima para diferentes tipos de combustível renovável, como biodiesel, metano, hidrogénio, etanol, existindo particular interesse na produção de biodiesel. O cultivo destes organismos tem recebido enorme atenção como possível tecnologia de sequestro de CO₂, pelo que diversos estudos têm sido realizados confirmando o seu enorme potencial. Perspectivando a produção de biodiesel, as microalgas apresentam várias vantagens comparativamente às plantas: possuem estrutura celular simples e capacidade de controlar a composição celular sem decréscimo da produtividade; ciclo de

vida curto pelo que crescem extremamente rápido; maior eficiência fotossintética; capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de lípidos, regularmente atingindo 50% a 60% por peso seco de biomassa (Sheehan *et al.*, 1998); facilidade no seu cultivo bastando para isso haver luz e alguns nutrientes, embora as taxas de crescimento possam ser aceleradas pela adição de nutrientes específicos e aeração suficientes; o facto de poderem crescer em diversos ecossistemas, permite a redução de competição com culturas alimentares por terra de agricultura e água doce; a produção de biocombustíveis, através de matéria-prima providenciada pelas microalgas, pode ser conjugada com o sequestro do gás poluente CO₂, com tratamento de águas residuais e a produção de químicos de elevado valor; a capacidade de crescerem em condições controladas em biorreactores pode levar a uma maior produção do produto desejado (Schenk *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009; Griffiths & Harrison, 2009; Huang

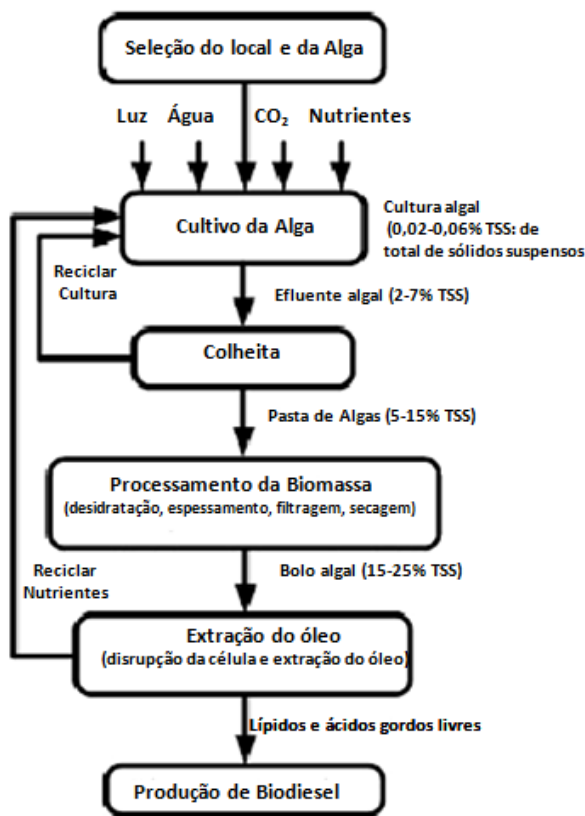


Figura 2- Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de Mata *et al.*, 2010).

et al., 2010; Verma *et al.*, 2010). Na Figura 2 podem observar-se as várias etapas inerentes à produção de biodiesel, iniciando-se com a selecção de espécies de microalgas e o design e implementação do sistema de cultivo para o crescimento microalgal. Posteriormente, a biomassa é colhida e processada para extracção do óleo, que consiste na sua maioria em triglicéridos (90-98%) podendo conter pequenas quantidades de mono e diglicéridos (Mata *et al.*, 2010). Os triglicéridos correspondem a ésteres de ácidos gordos que por transesterificação são convertidos a ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) e a glicerol (subproduto). Embora o processo de produção de biodiesel a partir de algas esteja bastante claro, são necessárias melhorias na economia de produção para que o biodiesel possa competir com o petrodiesel. Têm sido concretizados esforços no sentido de reduzir substancialmente os custos utilizando-se uma

estratégia de produção de biorefinaria, melhorando-se o potencial das microalgas através da engenharia genética e metabólica e avanços na engenharia de fotobioreactores.

1.2.2 Sequestro de carbono por microalgas

A maioria do carbono na Terra é inorgânica e encontra-se na forma de dióxido de carbono (CO_2), ou nos seus equivalentes iónicos ou hidratados, designados bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). As microalgas contêm cerca de 50% de carbono na sua biomassa seca, e na maioria dos casos, todo este carbono é obtido a partir do dióxido de carbono atmosférico (Chisti, 2006, 2007; Mata *et al.*, 2010), pelo que na produção de 100 toneladas de biomassa algal são assimiladas cerca de 183 toneladas de dióxido de carbono (Chisti, 2007). A conversão do carbono inorgânico em compostos orgânicos é conseguida através da fotossíntese, processo biológico em que se pode distinguir duas fases, luminosas (dependente da luz) e escura (independente da luz), e cuja essência pode ser representada na seguinte equação: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$. A nível global do planeta, aproximadamente 45 Pg C/yr é fixado através da fotossíntese fitoplântónica (Falkowski *et al.*, 2000). A fotossíntese possibilita a conversão da luz em energia química, conduzindo à produção de matérias-primas requeridas para a síntese de diversos combustíveis: protões e electrões (para biohidrogénio), açúcares e amido (para o bioetanol), óleos (para o biodiesel) e biomassa (para biometano), entre outros produtos químicos (Schenk *et al.*, 2008).

Na membrana tilacóide dos cloroplastos encontra-se o aparato necessário para a fotossíntese: complexos de antena, fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI), citocromo b6f e ATP sintetase (Figura 3). Os fotossistemas PSII e PSI consistem em centros de reacção fotoquímicos que estão acoplados a complexos de antena (LHCII e LHCI, respectivamente), que servem para captar energia e transferi-la para os centros de reacção, constituindo também o local onde ocorre processos dissipativos do excesso de excitação (fluorescência, calor) (Falkowski & Raven, 1997). Nestes complexos de antena encontram-se organizados pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, *c*, xantofilas e carotenos), sendo a clorofila *a* o principal pigmento, universalmente presente em todos os grupos taxonómicos de algas e essencial na fotossíntese (Masojídek *et al.*, 2004).

Num primeiro passo, o PSII utiliza a energia de excitação para conduzir à reacção de fotólise da água, que converte a água em protões, electrões e oxigénio. Os electrões são transportados ao longo da cadeia de transporte electrónico fotossintético pela plastoquinona

(PQ), citocromo b_6f (Cyt b_6f), PSI e ferredoxina (Fd) e são utilizados para reduzir NADP a NADPH (Falkowski & Raven, 1997). Simultaneamente, os prótons são libertados no lúmen do tilacóide pelo PSII e pelo ciclo PQ/PQH₂, gerando um gradiente protónico que conduz à produção de ATP através de ATP sintetase. Os prótons e electrões são recombinados pela ferredoxina-NADP⁺ oxidoreductase (FNR) para produzir NADPH. NADPH e ATP são utilizados no Ciclo de Calvin e noutras vias bioquímicas para produzir açúcares, amido, óleos e outras biomoléculas (Schenk *et al.*, 2008).

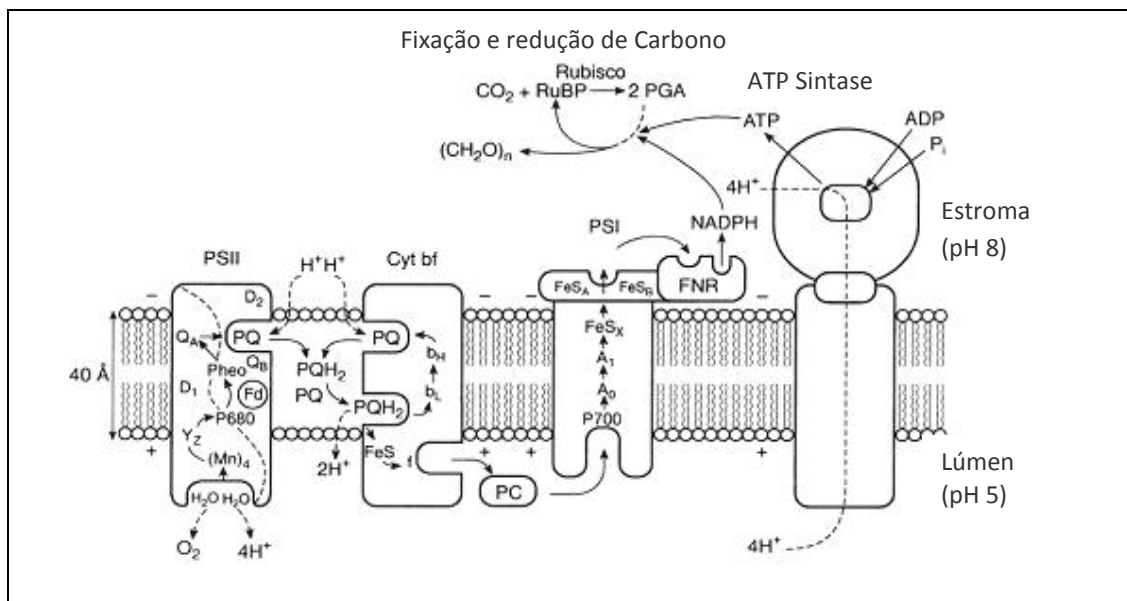


Figura 3- Representação esquemática da membrana tilacóide do cloroplasto com alguns dos principais componentes do aparato fotossintético (Adaptado de Falkowski & Raven, 1997). *Abreviaturas:* Y₂, tirosina que é o doador de electrões imediato para P₆₈₀; P₆₈₀ e P₇₀₀, o centro de reacção de PSII e PSI, respectivamente; Pheo, molécula de feofitina *a*; Q_A, plastoquinona ligada; PQ, plastoquinona livre; PQH₂, forma reduzida de PQ; b_L e b_H, potencial baixo e elevado para citocromo b₆; FeS, componentes ferro-enxofre nos complexos citocromo b₆/f e no sítio de redução de PSI; f, citocromo f; PC, plastocianina, A₀, aceitador imediato de electrões de P700; A₁, filoquinona; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina/NADP⁺ oxidoreductase; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; P_i, fosfato inorgânico; +/-, polaridade da diferença de potencial eléctrico entre a membrana estabelecida na luz; RuBP, ribulose-1,5-bifosfato; Rubisco, ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase; PGA, 3-fosfoglicerato; (CH₂O)_n, fórmula empírica dos carboidratos.

No estroma do cloroplasto, a assimilação do CO₂ realiza-se através do Ciclo de Calvin, compreendendo várias reacções levando no final à produção de carboidratos

$(\text{CH}_2\text{O})_n$. O ciclo de Calvin, ou alternativamente designado por via C_3 ou ciclo de redução de carbono fotossintético, é a via metabólica primária responsável pela redução de carbono. A descoberta desta via metabólica ocorreu no início da década de 1950 por Calvin e os seus colaboradores, tendo sido usado carbono marcado radioactivamente, como $^{14}\text{CO}_2$, para traçar a via de intermediários de assimilação de carbono na alga verde unicelular *Chlorella*. Com este trabalho verificou-se que ^{14}C é um marcador conveniente que possibilita registar o tempo de curso de marcação de compostos orgânicos de $^{14}\text{CO}_2$ a serem determinados (Falkowski & Raven, 1997). O ciclo de Calvin compreende 3 passos principais: carboxilação, em que o CO_2 entra no ciclo para reagir com ribulose 1,5 bifosfato (RuBP), formando-se duas moléculas de 3-fosfoglicerato; redução, os ácidos carboxílicos (ATP e NADPH) produzidos na fase luminosa são reduzidos para formar duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato; regeneração do substrato (RuBP), numa série de reacções uma proporção de gliceraldeído 3-fosfato é convertido a RuBP para posterior fixação de CO_2 . A fixação de carbono e o processo de respiração pode ocorrer, independentemente da presença de luz; na respiração, é consumida uma molécula de O_2 e libertada uma molécula de CO_2 . A cada ciclo de Calvin completo são produzidos carboidratos, mas ácidos gordos, aminoácidos e ácidos orgânicos também podem ser sintetizados na fixação fotossintética de CO_2 (Masojídék *et al.*, 2004). A reacção inicial do ciclo de Calvin, a fixação do dióxido de carbono na ribulose, é catalizada pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase, vulgarmente designada Rubisco. Corresponde à proteína mais abundante na Terra e comporta-se como carboxilase na fase de redução do ciclo, e sob condições aeróbias como oxigenase fazendo parte da fotorespiração, ou seja, o oxigénio e o dióxido de carbono competem pelo mesmo sítio catalítico. Isto implica a redução da taxa de assimilação de CO_2 , da eficiência energética da fotossíntese, podendo também reduzir o quociente fotossintético (Williams *et al.*, 2002). A rubisco é considerada uma enzima cataliticamente ineficiente, em que apenas utiliza 2-3 RuBP por segundo (Williams *et al.*, 2002; Schenk *et al.*, 2008) levando a que as características cinéticas da rubisco requeiram concentrações elevadas de CO_2 no local activo da rubisco para manter a actividade carboxilase e inibir a oxigenase. A taxa de fixação de carbono depende da quantidade de rubisco na célula, a proporção de rubisco que é cataliticamente competente, a actividade catalítica máxima de rubisco activada e a concentração intracelular de CO_2 no local activo da rubisco (Williams *et al.*, 2002). Mecanismos de concentração de CO_2 (*CO}_2* concentrating mechanisms, CCMs) permitem manter a actividade carboxílica de rubisco e incluem desde mecanismos bioquímicos C_4 e CAM envolvendo adicional fixação de carbono inorgânico dissolvido (antes mesmo da carboxilação catalizada pela rubisco) a processos biofísicos

envolvendo o aumento localizado de concentração de CO₂ externo por acidificação do meio externo, e o transporte activo de carbono inorgânico dissolvido por uma ou mais membranas celulares (mais detalhes em Giordano *et al.*, 2005). Relativamente poucas das ~1500 espécies descritas de cianobactérias, ou das ~53 mil espécies descritas de algas eucarióticas, têm sido examinadas para ocorrência de CCM (Giordano *et al.*, 2005), e a maior parte do conhecimento inerente a este assunto baseia-se particularmente no estudo de cianobactérias e clorófitas, como exemplo, a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* que é um organismo modelo que muito tem sido detalhadamente analisado (Badger, 2003; Giordano *et al.* 2005; Raven, 2006). A ocorrência de CCMs depende do transporte de CO₂ e/ou HCO₃⁻, na membrana plasmática na cianobactéria e no cloroplasto e/ou membranas do tilacóide nas eucariotas, e da catálise localizada de CO₂ e HCO₃⁻ pela anidrase carbónica. A actividade da anidrase carbónica é necessária tendo em conta o grande fluxo metabólico do consumo de CO₂ pela rubisco, e a entrada efectiva de carbono inorgânico provindo do meio, o qual será usado na fotossíntese (Raven, 2006). Em cianobactérias, CCM é associado com carboxissomas, enquanto nas clorófitas e outros eucariontes está associado com pirenóides. Estes corpos contêm arranjos cristalinos de rubisco, activase rubisco e anidrase carbónica (Williams *et al.*, 2002; Badger, 2003). A actividade de CCM pode ser modulada pelos factores ambientais tais como o fornecimento de macro e micronutrientes, radiação UV e fotossinteticamente activa, e temperatura. CCMs provavelmente desempenham um papel importante na conjugação da aquisição de carbono inorgânico dissolvido com a disponibilidade de energia e recursos nutricionais (Giordano *et al.*, 2005). Contudo, perante o actual aumento da concentração de CO₂, temperatura e acidez da superfície do oceano, é requerida uma melhor compreensão e conhecimento mais profundo dos mecanismos e da regulação a nível celular e molecular.

1.2.3 Lípidos nas microalgas

As algas produzem diversos tipos de lípidos, os quais podem corresponder a biomoléculas constituintes das células que funcionam como fontes de energia, metabolitos e produtos de armazenamento. Apesar de ser difícil definir grandes classes de lípidos nas algas, visto que na literatura a nomenclatura dos lípidos é muito heterógenea, sabe-se que na sua maioria estes lípidos são tipicamente compostos de glicerol, açucars ou bases esterificadas a ácidos gordos possuindo números de carbono variando de C12-C22 (Becker, 2004). Lípidos como os carotenóides e a cauda fitol de clorofila correspondem a moléculas produzidas pela via

isoprenóide (Ohlrogge & Browse, 1995). Segundo a polaridade, estes compostos podem ser reconhecidos como polares e não polares/neutros. Os lípidos polares correspondem aos principais constituintes de membranas, tais como os glicosilglicéridos (*e.g.* monogalactosildiacylglicerol, MGDG; digalactosildiacylglicerol, DGDG) e fosfoglicéridos (*e.g.* fosfatidiletanolamina, PE; fosfatidilglicerol, PG). Por sua vez, os lípidos neutros correspondem na sua maioria a triglicéridos (TAG) e ácidos gordos livres (Ohlrogge & Browse, 1995; Becker, 2004; Hu *et al.*, 2008). Geralmente em quantidades inferiores a 5% do seu peso seco celular, também podem estar presentes hidrocarbonos, outra categoria de lípidos neutros (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Verma *et al.*, 2010). Considerando o número de ligações duplas presentes na cadeia de ácidos gordos, estes podem ser considerados saturados ou insaturados. As microalgas possuem principalmente ácidos gordos insaturados, tais como ácido palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolénico (18:3). De entre os vários ácidos gordos, os mais relevantes do ponto de vista comercial são os ácidos gordos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), os que possuem duas ou mais ligações duplas, é o caso do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3; 5 ligações duplas) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3; 6 ligações duplas). Os PUFAs possuem um papel importante no metabolismo celular, incluindo a regulação da fluidez membranar, transporte de oxigénio e electrões e adaptação térmica, o que faz com que sejam considerados farmacologicamente importantes na dietética e terapêutica (Becker, 2004; Gushina & Harwood, 2006).

Como mostra a Tabela 1, o conteúdo em óleo nas microalgas pode ser acima dos 70% por peso de biomassa seca (*e.g.* *Botryococcus braunii*), embora este varie entre 20% e 50% na maioria das algas (*e.g.* *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Phaeodactylum*). Para além do conteúdo oleico das microalgas, a taxa de crescimento, a composição do ácido gordo e as condições de cultivo têm que ser tidas em conta para que se identifique espécies de microalgas mais promissoras e se maximize a produtividade do óleo para a produção de biodiesel. Dado que, dependendo da espécie, as microalgas podem produzir diferentes tipos de lípidos, e diversos estudos têm concluído que as proporções relativas de ácidos gordos e a quantidade total de lípidos podem variar segundo factores nutricionais e ambientais, condições de cultivo e fases de crescimento (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Griffiths & Harrison, 2009; Widjaja *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Ao nível da nutrição está bem conhecido que a deficiência em azoto e silício tipicamente desencadeia acumulação lipídica em microalgas. Sob condições de stress no crescimento, muitas algas alteram a sua via biossintética lipídica podendo levar ao aumento de lípidos

totais, essencialmente à produção e acumulação de triglicéridos. Estes lípidos neutros são constituídos por ésteres de ácidos gordos e glicerol e funcionam como armazenamento de carbono e energia sob condições de stress.

Tabela 1 – Conteúdo lipídico total de diversas espécies de microalgas (Deng *et al.*, 2009).

Espécies de Microalgas	Conteúdo lipídico (% peso seco da biomassa)	Espécies de Microalgas	Conteúdo lipídico (% peso seco da biomassa)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24–31	<i>Monodus subterraneus</i>	16
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Monallanthus salina</i>	20–22
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33	<i>Nannochloris sp.</i>	20–56
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21	<i>Nannochloropsis oculata.</i>	22–29
<i>Chlorella emersonii</i>	25–63	<i>Nannochloropsis sp.</i>	12–53
<i>Chlorella minutissima</i>	57	<i>Neochloris oleoabundans</i>	29–65
<i>Chlorella protothecoides</i>	14–57	<i>Pyrrosia laevis</i>	69.1
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19–22	<i>Pavlova salina</i>	30
<i>Chlorella sp.</i>	10–48	<i>Prostanthera incisa</i>	62
<i>Chlorella vulgaris</i>	5–58	<i>Prymnesium parvum</i>	22-39
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20–51	<i>Pavlova lutheri</i>	35
<i>Dunaliella salina</i>	6–25	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	18–57
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11–55
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16–71	<i>Skeletonema costatum</i>	13–51
<i>Dunaliella sp.</i>	17–67	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	<i>Isochrysis galbana</i>	7–40
<i>Isochrysis sp.</i>	7–33	<i>Zitzschia sp.</i>	45-47

Com base na homologia da sequência e algumas características bioquímicas partilhadas por um número de genes e/ou enzimas isoladas das algas e plantas superiores, propõe-se que as vias básicas de biossíntese de ácidos gordos e TAG (Figura 4) em algas sejam directamente análogas às demonstradas em plantas superiores. No entanto, o conhecimento do metabolismo lipídico em algas ainda é muito pobre e fragmentado (Ohlrogge & Browse, 1995; Hu *et al.*, 2008). A biossíntese de lípidos em algas inicia-se com a carboxilação de Acetil-CoA para formar malonil-CoA, reacção catalizada pela enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC). Acetil-CoA é, portanto, um precursor imediato na síntese de ácidos gordos, e a sua origem varia segundo o organismo em causa. Em microalgas, este precursor é decomposto a acetato e CoA livre, em que o acetato deverá difundir para o cloroplasto e tornar a ser incorporado em acetil-CoA pela acção de acetil-CoA sintetase (Sheehan *et al.*, 1998). Uma vez concretizado o passo fundamental, inicial na síntese lipídica, o malonil-CoA é transferido por malonil CoA:ACP transacetilase a uma proteína transportadora de grupos acilo (*acyl-carrier protein*, ACP) pertencente ao complexo multienzimático da sintase de ácidos gordos (*fatty acid synthase*,

FAS). FAS catalisa o alongamento de ácidos gordos por condensação de moléculas malonil CoA e acetil-CoA. Por sua vez, ACP contém um grupo tiol que pode formar malonil-ACP, pela ocorrência de tioésteres com malonil-CoA e mais tarde com o crescimento da cadeia acil a fim de garantir o seu transporte, e também pode fixar acetil pela formação de acetil-ACP (Courchesne *et al.*, 2009). Por conseguinte, o grupo acetil é transferido para outra subunidade de FAS, a cetoacil-ACP sintase (*ketoacyl-ACP synthase*, KAS), enzima que cataliza a condensação de malonil-ACP ou o crescimento da cadeia acil para formar cetobutiril-ACP ou cetoacetil-ACP. O produto resultante é transformado por três sucessivas reacções, ou seja, de redução, desidratação e novamente redução, e posteriormente sofre condensação com outro malonil-CoA. Este ciclo é repetido até à formação das cadeias saturadas dos ácidos esteárico (18:0) e palmítico (16:0). Por fim, ACP-tioesterase cliva a cadeia acil e liberta o ácido gordo. Na obtenção de cadeias insaturadas ou mais longas, são requeridas elongases e desaturases, enzimas localizadas na membrana do retículo endoplasmático e na mitocôndria que actuam no palmitato ou estearato. Estas enzimas podem produzir longas cadeias de ácidos gordos e cadeias acil insaturadas, actuando assim na composição do *pool* de ácidos gordos mas não no seu nível de acumulação (Courchesne *et al.*, 2009).

Relativamente à formação de TAGs em microalgas, sabe-se que nas células eucarióticas a sua síntese tem lugar no retículo endoplasmático, enquanto nas procariotas ocorre no citoplasma. Inicialmente na síntese de TAG ocorre a condensação (acilação) do glicerol-3-fosfato (G3P) com um acil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA), reacção catalizada por acil-CoA:glicerol-*sn*-3 fosfato acil-transferase (GPAT). De seguida, LPA é condensado com outro acil-CoA, através de GPAT, formando-se

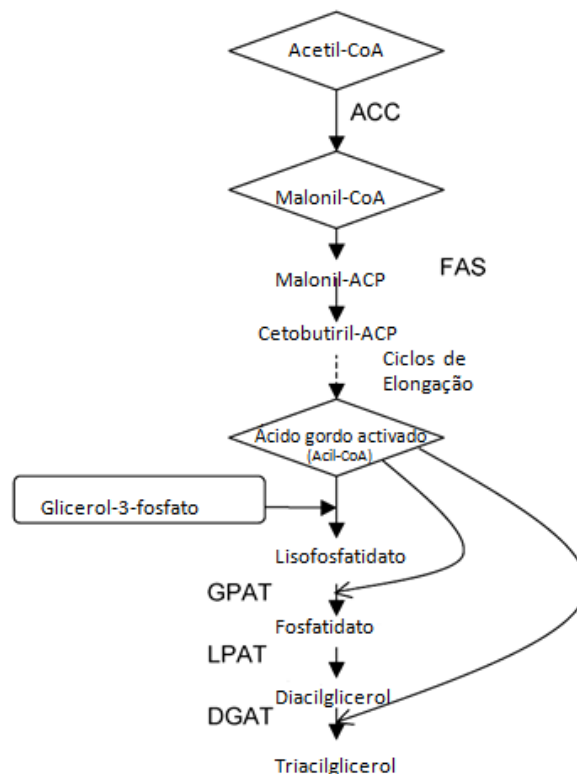


Figura 4- Biosíntese de ácidos gordos e triglicéridos (Adaptado de Courchesne *et al.*, 2009).

fosfatidato (PA). Posteriormente, uma fosfatase (PAP) converte o ácido fosfatídico em diacilglicerol, o qual é associado com o 3° acil-CoA, através de acil-CoA:diacilglicerol acil-transferase (DGAT), para se completar a biossíntese de triglicéridos (Courchesne *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010). Em geral, após o processo de síntese de TAG, os triglicéridos podem ser armazenados em corpos oleicos, presentes no citoplasma (Courchesne *et al.*, 2009). O fosfatidato e o diacilglicerol podem ser utilizados directamente como substratos para a síntese de lípidos polares, tais como fosfatidilcolina e galactolípido. Relativamente à determinação da composição final acil de TAG, as aciltransferases envolvidas na síntese possuem um importante papel, visto poderem exibir preferências para moléculas específicas acil-CoA (Hu *et al.*, 2008).

1.2.4 Produção de biomassa microalgal

O crescimento fotossintético requer luz, água, dióxido de carbono, sais inorgânicos, enquanto que a temperatura deverá permanecer geralmente entre os 20°C e os 30°C na maioria das espécies de microalgas (Chisti, 2006). Para além destes parâmetros necessários ao cultivo e produção de biomassa, diversos factores influenciam o crescimento microalgal: outros factores abióticos como o pH, a salinidade, químicos tóxicos; factores bióticos como patógenos (*e.g.* bactérias, fungos) e competição por outras algas; factores operacionais, tais como a agitação, adição de bicarbonatos, profundidade, taxas de diluição e frequência da colheita (Mata *et al.* 2010). Todos estes factores têm que ser tidos em conta, tal como o sistema de cultivo utilizado. Actualmente, os sistemas de cultivo de microalgas em funcionamento a larga-escala são os *raceways ponds* ou lagoas a céu aberto e os fotobioreactores tubulares fechados. Os *raceways ponds* têm vindo a ser desenvolvidos desde 1950 e são os mais utilizados na produção comercial de microalgas, visto que a sua construção e operação é considerada económica relativamente aos fotobioreactores. Contudo, a produtividade nos sistemas abertos é muito inferior em relação aos sistemas fechados, devido à variação das condições ambientais que se repercutem nas condições de cultivo; à ocorrência de evaporação acentuada com consequência na redução da eficiência no uso de CO₂; à grande possibilidade de contaminação por microorganismos indesejáveis e à agitação deficiente. Os fotobioreactores fechados são sistemas flexíveis que podem ser optimizados de acordo com as características fisiológicas e biológicas das espécies a cultivar, e dependendo da sua forma ou design, possuem algumas vantagens relativamente aos sistemas abertos: melhor economia de água; energia e produtos químicos; controlo das condições de cultivo

permitindo adequar factores que potenciam o crescimento e acumulação de bioprodutos; manutenção duma cultura sem contaminações; e a existência de uma maior concentração volumétrica que leva a que a colheita da biomassa do fotobioreactor se torne menos dispendiosa (Pulz, 2001; Tredici, 2004; Chisti, 2007). No caso particular dos fotobioreactores cilíndricos na forma de colunas de bolhas ou *air-lifts*, estes sistemas previnem que a biomassa algal sedimente devido a uma agitação mais eficiente, influenciando que cada célula passe por zonas com luz e outras com menos luz. Com estes sistemas é também conseguida a melhor transferência volumétrica de gás garantindo a distribuição de CO₂ e O₂, excelentes condições controláveis de crescimento que consequentemente levam as culturas a sofrerem menos fotoinibição e foto-oxidação (Chisti, 2006; Eriksen, 2008; Mata *et al.*, 2010). Todavia, a aplicação dos sistemas fechados a larga escala implica um elevado custo, pelo que este apenas pode ser justificado na produção de produtos de elevado valor comercial, como *e.g.* a nível farmacêutico, nutracêutico e cosmético (Pulz, 2001; Patil *et al.*, 2008). De forma a melhorar a relação custo-eficácia relativa ao cultivo de espécies de elevado rendimento, tem sido considerada a conjugação de sistemas abertos e fechados, definindo-se uma primeira fase em que as microalgas crescem em fotobioreactores para produzir biomassa e uma segunda fase utilizando-se *raceways* com limitações em nutrientes e outros factores de stress para promover a biosíntese de produtos (Huntley & Redalje, 2006; Deng *et al.*, 2009). Neste sentido, também será importante ocorrer desenvolvimento tecnológico de sistemas de cultivo de microalgas.

1.2.5 Espécies em estudo: *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1

Ankistrodesmus fusiformis e *Scenedesmus* sp.1 correspondem a microalgas verdes, classe Chlorophyceae. *Ankistrodesmus fusiformis* é uma microalga que subsiste no plâncton de águas doces, principalmente mesotróficas, charcos e lagoas artificiais. As células alongadas com extremidades aguçadas, geralmente muito atenuadas e com ligeira curva, podem possuir as seguintes dimensões: 19,2-57 x 1-5,8 µm. As células surgem individualmente ou estão agregadas em grupos de 2, 4, 8, 16 células, frequentemente dispostas umas com as outras em ângulos rectos (Komárek & Fott, 1983). Não existe cobertura mucilaginosa e apenas um núcleo se encontra presente nas células, as quais possuem cloroplasto sem pirenóide, parede celular lisa (http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44102&-session=abv4:5D66EFB8161f22F00BLWQY50DE66). A reprodução assexuada é acompanhada pela

formação de 2, 4, 8 autosporos e as espécies do género *Ankistrodesmus* são distinguidas principalmente por detalhes do tamanho e forma da célula (Graham & Wilcox, 2000).

Ao contrário do que acontece com *Ankistrodesmus*, existe disponível diversa informação relativamente ao género *Scenedesmus*, sendo que este é muito comum no plâncton de águas doces e menos frequente em águas salobras. As espécies de *Scenedesmus* podem crescer como unicélulas ou em colónia, possuindo cada célula um único núcleo e plastídio com pirenóide. As células podem ter 3-78 x 2-10 µm de tamanho e possuem forma cilíndrica em que as extremidades são arredondadas ou pontiagudas e particularmente, nas células terminais, ocorrem “espinhas” as quais se acredita que podem conferir flutuação, ou deter os herbívoros, ou ganhar mais espaço de modo a melhorar a captação da luz e disponibilidade de nutrientes (Graham & Wilcox, 2000; Lee, 2008; http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&session=abv4:5D6698611afae063C3VNVIYF6540).

Adicionalmente, as paredes celulares particularmente resistentes das espécies do género *Scenedesmus* implicam uma notória dificuldade de extracção de pigmentos e lípidos nestas microalgas (Wiltshire *et al.*, 2000). As células na colónia ocorrem em múltiplas de dois, sendo que a morfologia da colónia pode variar consideravelmente pela alteração do meio no qual as células crescem (Lee, 2008). Portanto, com base no padrão de ornamentação da parede celular, na forma e tamanho da célula, na morfologia da colónia e no número e tipo de “espinhas”, é possível diferenciar as várias espécies do género em questão. Ocasionalmente, *Scenedesmus spp.* forma zoósporos quando privado de azoto e a presença de herbívoros induz a formação de colónias, pelo que, em situação contrária e em ambos os casos, verifica-se que muitas espécies crescem como unicélulas. O estado unicelular em *Scenedesmus spp.* concede algumas vantagens, por reduzir a velocidade de sedimentação, por melhorar a relação superfície-volume na absorção de nutrientes e por facilitar a captação de luz (Lee, 2008).

Capítulo 2. Material e Métodos

2.1 Espécies

Foram utilizadas neste trabalho duas microalgas unicelulares, *Ankistrodesmus fusiformis* (Chlorophyta; Chlorophyceae; Ankistrodesmaceae) e *Scenedesmus* sp.1 (Chlorophyta; Chlorophyceae; Scenedesmaceae). Os inóculos iniciais pertencem à Algoteca do Centro de Oceanografia da FCUL (ALISU), sendo que o inóculo referente a *Ankistrodesmus fusiformis* oriundo do Estuário do Tejo foi colhido em dezembro de 2005, e o de *Scenedesmus* sp.1 proveniente de Sines foi colhido em Julho de 2008. *Scenedesmus* sp.1 ainda se encontra por identificar, devido à dificuldade de distinguir as espécies dentro deste género. Foram estudadas 10 culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* e 8 culturas de *Scenedesmus* sp.1, em que cada cultivo durou no máximo 15 dias (excepto A7 em que o cultivo durou 18 dias, de forma a avaliar uma possível influência na posterior análise lipídica).

Tabela 2- Início do cultivo das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, com a respectiva fase de crescimento no momento da colheita.

Espécie	Designação da cultura	Início do Cultivo	Fase do crescimento no momento da colheita
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	A1	10-11-2009	Estacionária
	A2	10-11-2009	Estacionária
	A3	12-01-2010	Exponencial
	A4	12-01-2010	Exponencial
	A5	13-01-2010	Estacionária
	A6	13-01-2010	Estacionária
	A7	05-02-2010	Estacionária
	A8	09-02-2010	Exponencial
	A9	24-03-2010	Estacionária
	A10	24-03-2010	Estacionária
<i>Scenedesmus</i> sp.1	S1	07-10-2009	Estacionária
	S2	07-10-2009	Estacionária
	S3	17-11-2009	Exponencial
	S4	17-11-2009	Exponencial
	S5	26-02-2010	Exponencial
	S6	08-03-2010	Exponencial
	S7	16-03-2010	Estacionária
	S8	16-03-2010	Estacionária

2.2 Preparação do inóculo

As culturas das duas espécies foram mantidas numa câmara de culturas Fitoclima 750 E (Aralab) na Algoteca do CO, em meio artificial BBM (*Basal Bold Medium*) (Nichols & Bold 1965) (ver Tabela 3 em anexo), em erlenmeyers de 100 ml de volume contendo 60 ml de cultura. Estas culturas foram repicadas mensalmente. Para cada repicagem utilizou-se um volume reduzido de cultura mãe e volume equivalente de meio de cultura BBM, que se colocou em erlenmeyers de 500 ml, de modo a perfazer 200 ml. Estas últimas culturas, cresceram e foram mantidas na câmara de culturas Fitoclima 750E (Aralab) a uma temperatura de aproximadamente 22°C, com fotoperíodo de 14:10 (14 horas de luz e 10 de escuro), luminosidade de 20 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida com o auxílio do radiómetro LI-250A (Li-Cor Biosciences). Finalmente as culturas foram transferidas para provetas (capacidade de 1 litro), previamente esterilizadas em autoclave (a 121°C e 1 bar durante 20 minutos) juntamente com o meio de cultura a usar (perfazendo 1 litro), onde são realizados os ensaios experimentais. Para obter as necessárias condições de esterilização, as provetas e o meio BBM foram submetidos a radiação UV durante 20 minutos em câmara de fluxo laminar (ESI, FluFrance). Transportaram-se as provetas para uma sala onde se encontrava um incubador montado e todo o sistema necessário para o crescimento das microalgas. Todo o material de vidro utilizado nas pré-culturas foi esterilizado a 180°C na estufa (Selecta, modelo 209) durante 1 hora.

2.3 Caracterização das condições de cultura

Todos os cultivos experimentais foram concretizados em regime *batch*, utilizando-se meio BBM. As culturas foram mantidas uni-algais e cresceram em fotobiorreatores “*air-lift*”, que consistiam em provetas de vidro com um sistema de arejamento e agitação (bombeamento por borbulhamento de ar- “*air-lift*”, através de bombas de ar Eheim (400 l/h), garantindo que em regime *batch* houvesse trocas gasosas e nutrientes entre a interface célula-meio de cultura. O cultivo das espécies algais nestes fotobiorreatores foi sujeito a luz contínua proveniente de lâmpadas tubulares horizontais brancas fluorescentes (Sylvania LuxLine Plus F50W/840 mm) presentes do incubador onde se colocaram as provetas (Figura 5). Deste modo, ao longo de todo o período experimental, as culturas encontraram-se sujeitas a uma intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e a temperatura da sala foi controlada com um ventilador Kent

modelo FH07, registando-se valores de 20-25°C através dum termómetro digital (precisão= $\pm 1^\circ\text{C}$).



Figura 5- Incubador e montagem utilizada no crescimento das microalgas.

2.4 Análise do crescimento das culturas

2.4.1 Contagem celular ao microscópio

Neste método de medição do crescimento de microalgas é necessário ter em atenção a recolha da amostra da cultura, a sua homogeneização, a câmara de contagem, e o microscópio utilizado. A contagem celular foi concretizada num microscópio (Olympus BX 50) e utilizou-se um hemacitómetro, tipo de câmara de Neubauer de 0,1 mm de profundidade. A escolha da câmara de contagem teve em atenção a densidade das culturas, o tamanho e a forma das células ou colónias a serem contadas, a presença e quantidade de filamentos extracelulares, bainhas, ou mucilagem dissolvida. Este hemacitómetro possui duas câmaras nas quais existe uma grelha de contagem com 9 quadrados de 1 mm, subdivididos em quadrados de 250 μm , de 200 μm e 50 μm e em rectângulos de 250 x 220 μm . O volume total em ambas as câmaras (18 quadrados de 1mm) é de 0,0018 ml. Devido a estas características, neste hemacitómetro lida-se facilmente com células cujo tamanho varia entre 2 e 30 μm e quando a densidade de cultura é de 10^4 - 10^7 células ml^{-1} .

Quando necessário, as amostras a contar foram fixadas com lugol, de modo a preservá-las até à sua contagem ao microscópio. Antes da contagem, examinaram-se os conteúdos da câmara sob baixa ampliação no microscópio com o intuito de verificar se os padrões de distribuição das células seriam os satisfatórios. Embora não seja possível avaliar

quando se encontra presente uma distribuição aleatória das células, é concebível determinar quando esta não existe. Uma vez avaliada a distribuição das células no hemacitómetro, a contagem foi efectuada a uma ampliação de 200x e/ou 400x. O número total de células contabilizadas nunca foi inferior a 400 células. Os resultados obtidos foram sempre expressos em número de células por mililitro.

As contagens ao microscópio foram realizadas diariamente e a taxa de crescimento foi calculada por regressão linear durante a fase exponencial de crescimento, de acordo com Guillard (1973):

$$K_e = \frac{\ln(N_t - N_0)}{\Delta t}$$

$$T = \frac{1}{k} \quad \text{em que} \quad k = \frac{\log_2 \left(\frac{N_t}{N_0} \right)}{\Delta t}$$

K_e = taxa de crescimento exponencial;

N = número de células da cultura no início do intervalo de tempo (N_0) e no fim do intervalo de tempo (N_t);

Δt – intervalo de tempo em que N_0 e N_t são determinados (em dias);

T - tempo de geração;

k = divisões por dia.

2.4.2 Leitura da absorvância

A densidade óptica das culturas foi determinada utilizando-se um espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603). Utilizaram-se cuvettes de vidro para a leitura da absorvância efectuada a 540 nm, comprimento de onda que permite uma boa correspondência entre o aumento da densidade óptica e o aumento da densidade populacional da suspensão celular. Verificou-se que o acerto do zero no espectrofotómetro poderia ser feito tanto com o próprio meio de cultura ou com água destilada, sendo utilizada esta última. Antes de cada leitura, procedeu-se à lavagem da cuvette com gotas da própria amostra e homogeneizou-se a amostra algal a ser lida.

2.4.3 Peso seco da amostra

Para determinar o peso das amostras efectuou-se filtração sob vácuo através de filtros de fibra de vidro tipo Whatman® GF/C (47 mm de diâmetro) com poro irregular de $\pm 1,2 \mu\text{m}$. A filtração foi antecedida pela secagem dos filtros na estufa por cerca de 24h a 60°C e a pesagem dos mesmos. A necessidade dos filtros serem submetidos a secagem antes do processo de separação das células do meio advém da possibilidade destes poderem conter humidade. Após o período de secagem, registaram-se novamente os valores do peso dos filtros possibilitando determinar o peso seco da amostra algal num determinado volume filtrado. As culturas foram filtradas a cada dois dias.

2.5 Determinação do conteúdo pigmentar nas culturas

2.5.1 Análise por cromatografia

A separação, identificação e quantificação dos pigmentos fotossintéticos das microalgas foi concretizada por cromatografia líquida de elevada precisão (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography* ou *High-Pressure Liquid Chromatography*). As amostras foram colhidas e filtradas em filtros Whatman® GF/F, 25 mm de diâmetro, com o auxílio de seringas. Depois de filtradas e colocadas em papel de alumínio, foram imediatamente congeladas em azoto líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até à sua análise em cromatografia.

Os pigmentos fotossintéticos para posterior análise em HPLC, foram extraídos dos filtros durante 30 min (a -20°C) numa solução fria de metanol (95%) tamponizado (com 2% de acetato de amónio) após maceração e sonificação durante 1 minuto. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 15 minutos a uma temperatura de 4°C . O extracto resultante foi filtrado para um *ependorf* utilizando filtros de membrana Millipore com $0,2 \mu\text{m}$ de poro, donde se retirou 200 μl para um *vial*, pequeno frasco que se coloca no *auto-sampler* do aparelho de HPLC, sendo imediatamente injectado no aparelho de HPLC. Foi utilizado um aparelho de HPLC da Shimadzu® constituído por um módulo distribuidor de solventes (LC-10ADVP), um sistema de controlo (SCL-10AVP), um detector de fotodiodos (SPD-M10AVP) e um detector de fluorescência (RF-10AXL). A separação cromatográfica dos pigmentos foi efectuada usando uma coluna C18 de fase reversa (Supelcosil; $0,46 \times 25 \text{ cm}$, partículas de $5 \mu\text{m}$). Os solventes utilizados foram: 0,5 M de acetato de amónio em metanol e água (85:15; v/v); acetonitrilo e água (90:10; v/v) e 100% de acetato de etilo (Tabela 4). O gradiente destes solventes foi estabelecido de acordo com o método de Kraay *et al.* (1992)

posteriormente adaptado por Brotas & Plante-Cuny (1996) com um fluxo de 0,6 ml min⁻¹ e um volume de 100 µl de amostra na injeção.

Tabela 4- Gradiente da fase móvel (solventes).

Tempo (min)	Solventes			Tipo de gradiente
	A (%)	B (%)	C (%)	
0	60	40	0	Injeção
2	0	100	0	Linear
7	0	80	20	Linear
17	0	50	50	Linear
21	0	30	70	Linear
28.5	0	30	70	Linear
29.5	0	100	0	Linear
30.5	60	40	0	Linear
35	60	40	0	STOP

Os pigmentos fotossintéticos foram identificados por comparação dos espectros de absorção e respectivos tempos de retenção com o de standards (padrões) comerciais.

Os padrões da clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), β-caroteno (β-car) e da astaxantina (Ast) foram obtidos através da Sigma® e os padrões da clorofilide *a* (Chlide *a*), neoxantina (Neo), violaxantina (Viola), anteraxantina (Anth), luteína (Lut), zeaxantina (Zea), e da feofitina *a* (Phytin-*a*) foram obtidos no DHI (*Water and Environment Institut*, Dinamarca). As concentrações de cada pigmento foram calculadas a partir das áreas dos respectivos picos de absorvância, medidos pelo detector de fotodíodos, através de rectas de calibração (determinadas através de standards).

2.5.2 Análise por espectrofotometria

De forma a quantificar os pigmentos por espectrofotómetro as amostras foram homogeneizadas e submetidas a filtração sob vácuo através de filtros fibra de vidro tipo Whatman® GF/C (47 mm de diâmetro) com poro irregular de ±1,2µm. Após a filtração, os filtros foram dobrados com uma pinça e introduzidos em tubos de centrífugadora de 10 ml de fundo redondo. Como os pigmentos são foto-degradáveis, os tubos de centrifuga foram devidamente etiquetados, fechados, envoltos em papel de alumínio e armazenados no congelador (-20°C) até prosseguimento do procedimento experimental.

Para a extracção de pigmentos e a sua análise espectrofotométrica, os tubos de centrifugação com os respectivos filtros foram retirados do congelador e mantidos sempre no escuro e arrefecidos. A extracção de pigmentos foi conseguida com a adição de 2 ml de

acetona a 90% em cada tubo e posterior maceração do filtro com uma vareta de vidro, até se desfazer completamente. Conforme a intensidade da cor verde que os filtros apresentavam, adicionou-se um volume restante de acetona de modo a perfazer um total de 5 a 10 ml. Seguidamente, colocaram-se os tubos no frigorífico (a 4°C) durante aproximadamente 24 horas.

Imediatamente antes da leitura no espectrofotómetro com cuvettes de quartzo, os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 3000 rpm durante 20 min a 4°C. Com o auxílio de um espectrofotómetro Shimadzu (UV-1603) fez-se a leitura de cada amostra nos seguintes comprimentos de onda: 452 nm (pico de β -caroteno), 468 nm (pico da astaxantina), 647 nm (pico da clorofila *b*), 664 nm (pico da clorofila *a*), 750 nm (as absorvâncias a este comprimento de onda correspondem à turbidez das amostras). Caso a leitura a 750 nm ultrapassasse o valor de 0,02, centrifugaria-se de novo ou fazer-se-ia nova pipetagem. A cada absorvância medida subtraía-se a absorvância a 750 nm, de modo a corrigir o método.

Após o registo dos valores obtidos pelas leituras realizadas nos diferentes comprimentos de onda, calculou-se a concentração dos pigmentos no meio de cultura (em $\mu\text{g ml}^{-1}$) pela equação:

$$\text{Pigmento} = \frac{C_{\text{extracto}} \times V_{\text{acetona}}}{V_f \times L}$$

C_{extracto} - concentração do pigmento no extrato acetónico;

V_{acetona} - volume total de acetona utilizado (em ml);

V_f - volume filtrado de amostra da cultura (em ml);

L - *passo da cuvette* (1 cm).

Em que as concentrações da clorofila *a* e *b* no extrato acetónico foram determinadas pelas seguintes equações de Jeffrey & Humphrey (1975) e o β -caroteno e a astaxantina pelos coeficientes apresentados em Brotas & Plante-Cuny (1996).

$$\text{Clorofila } a = 11.93 * A_{664} - 1.93 * A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20.63 * A_{647} - 5.50 * A_{664}$$

$$\beta\text{-caroteno} = 4.0 * A_{454}$$

$$\text{Astaxantina} = 4.59 * A_{468}$$

2.5.2.1 Clorofila *a* e feopigmentos

O método de Lorenzen (1967) foi igualmente utilizado para a determinação da concentração da clorofila *a* e feopigmentos (Feo). As amostras foram submetidas a filtração, ao processo de extracção e a análise por espectrofotometria exactamente da mesma forma descrita no tópico 2.5.2

. No entanto, o método de Lorenzen pressupõe a adição de 12 µl de HCl (0,5 M) de modo a induzir a degradação de clorofila *a* em feopigmentos. Depois da acidificação, procedeu-se novamente à leitura das absorvâncias a 664 nm e 750 nm para determinar a concentração em Feo. A análise espectrofotométrica apenas permite quantificar o total de Feo, não os distinguindo. O procedimento no espectrofotómetro foi igual para todas as amostras e seus replicados, havendo o cuidado de lavar a *cuvette* com algumas gotas de acetona a 90% entre as leituras de cada amostra. Foram aplicadas as equações de Lorenzen (1967) para quantificar a Chl *a* e o total de Feo.

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = \frac{A * K [(664 - 750) - (664a - 750a)] * v}{V * L}$$

$$\text{Feopigmentos } a \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = \frac{A * K [R (664a - 750a) - (664 - 750)] * v}{V * L}$$

A= Coeficiente de absorção da clorofila *a* (11.0);

K = Factor destinado a restabelecer a concentração inicial em clorofila *a* a partir da redução da absorvância (2.33);

R = Valor máximo da razão 664/664a, na ausência de feopigmentos (1.75);

v = Volume de acetona utilizado para a extração ;

664 e **750** = Valores de absorvância antes da acidificação da amostra ;

664a e **750a** = Valores de absorvância depois da acidificação da amostra;

V = Volume de amostra filtrada (em ml);

L = Passo da *cuvette* (1cm).

2.6 Produção Primária das culturas de microalgas

2.6.1 Curvas de Luz-fotossíntese (P-E)

As curvas de luz-fotossíntese (P-E) descrevem a relação entre a fotossíntese e a irradiância, em que inicialmente se verifica que a taxa fotossintética aumenta linearmente com a intensidade da luz. O declive deste acréscimo é designado por α (coeficiente máximo de utilização da luz) até atingir um valor constante (P_{\max}) a uma intensidade de luz saturante, E_k ($\mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Figura 6). Neste trabalho, a taxa fotossintética, equivalente à taxa de produção primária, foi determinada medindo a taxa de incorporação do carbono (método do ^{14}C ; Steemann Nielsen, 1952) e a produção de oxigénio (método de Winkler; Winkler, 1888) verificado na incubação de amostras (ver tópico 2.6.2), pelo que a taxa fotossintética máxima (P_{\max}) normalizada pela biomassa poderá ser expressa em $\mu\text{mol C}(\text{mg Chl } a)^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $\mu\text{mol O}_2(\text{mg Chl } a)^{-1}\text{h}^{-1}$ respectivamente. A intensidades luminosas excessivamente elevadas pode observar-se decréscimo da taxa fotossintética causado pela fotoinibição (β).

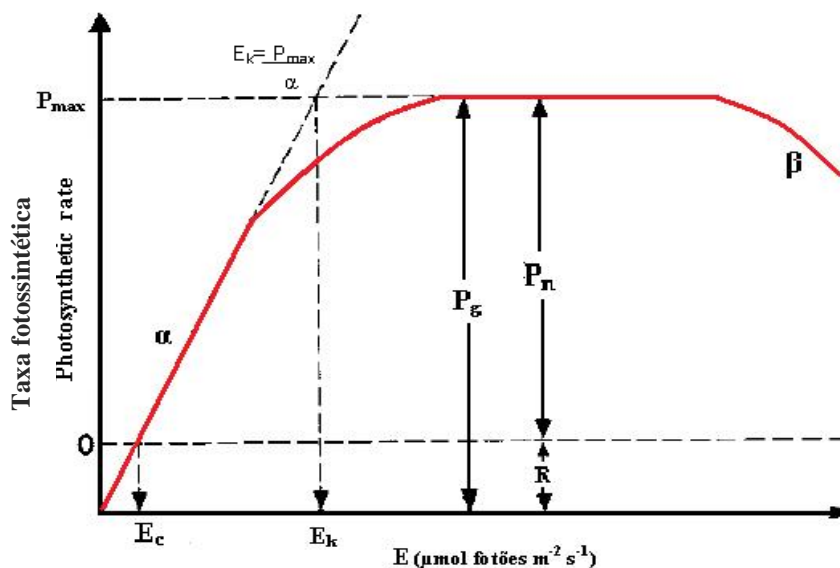


Figura 6- Curva típica da relação entre a taxa fotossintética e a intensidade luminosa (P-E), com a representação dos parâmetros característicos. (Adaptado de Lobban *et al.* 1988).

Curvas P-E também foram registadas com o auxílio de um fluorómetro PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) (Waltz Diving Pam), medindo a fluorescência da Chl *a*. Os fluorómetros PAM, através da aplicação de um pulso de luz saturante, suprimem completamente a energia fotoquímica, induzindo a fluorescência máxima. Uma vez que a energia fotoquímica se encontra reduzida a zero, a fluorescência medida corresponde

exactamente à eficiência fotossintética da amostra, naquele momento. Com este equipamento é possível obter o parâmetro “*Yield*”, a fluorescência quântica máxima do PSII (fotossistema II), calculado pela expressão introduzida por Genty *et al.* (1989), sendo por isso conhecido por factor Genty. Numa amostra adaptada ao escuro, o factor Genty traduz-se na razão da fluorescência máxima variável (F_v) com o valor de fluorescência depois do pulso de luz saturante (F_m). A fluorescência máxima variável corresponde à diferença entre F_m e F_0 (fluorescência base, antes da aplicação do impulso de luz saturante). Portanto, F_0 é medido quando os centros de reacção encontram-se abertos e F_m quando os centros de reacção estão fechados. A razão F_v/F_m corresponde à eficiência quântica máxima do fotossistema II. Para além destes parâmetros, também se pode obter os coeficientes de amortecimento (“*quenching*”) (qP, fotoquímico; qN, NPQ, não fotoquímicos) e a taxa relativa de transporte electrónico (rETR). Esta taxa é calculada pela multiplicação de *Yield* com PAR (radiação fotossintética activa) e com, o factor que explica a partição de energia entre os dois fotossistemas (=0,5).

As amostras foram adaptadas ao escuro durante um periodo de tempo para que fosse dissipado o efeito de exposição à luz. A medição da fluorescência da Chl *a* foi realizada com 5 ml de amostra da cultura. Após 10 minutos de escuridão das amostras, efectuou-se a medição dos parâmetros de fluorescência com o fluorómetro PAM, mantendo constante a distância entre a fibra óptica do PAM e o fundo do recipiente onde se encontra a amostra (± 1 cm), ao longo de todas as experiências. O recipiente em que se depositou a amostra possuía cerca de 4,5 cm de altura e 2,5 cm² na sua base. Curvas luz-fotossíntese (P-E) com 9 intensidades de luz diferentes (0 a 2216 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram registadas com aumentos na densidade do fluxo de fotões a 30 segundos de intervalo.

Das várias formulações matemáticas empíricas que se utilizam para descrever a relação P-E, o modelo de Platt *et al.* (1980) foi o escolhido para ajustar as curvas obtidas através do PAM. O modelo foi ajustado utilizando a técnica de regressão não linear dos mínimos quadrados para os dados medidos. O modelo Platt *et al.* (1980) foi também o utilizado no ajuste dos resultados da taxa de produção primária em função da luz, obtidos pela estimativa da produção de oxigénio e da assimilação de carbono na fotossíntese.

2.6.2. Metodologias laboratoriais

A produtividade primária foi estimada tanto pela medição de oxigénio dissolvido e como pela medição da quantidade de carbono assimilado durante a fotossíntese. O método de Winkler,

que determina a concentração em oxigénio dissolvido na amostra, e o método do ^{14}C foram as metodologias utilizadas para estas medições, pressupondo a incubação de amostra em frascos transparentes e opacos. Estas incubações foram realizadas num incubador que foi adaptado para a avaliação da taxa da produção primária na coluna de água, simulando no laboratório as possíveis condições existentes *in situ* das espécies estudadas em cultura. O esquema representado na figura 7 ilustra o sistema de incubação montado no laboratório, em que a intensidade luminosa foi obtida por dois projectores equipados com lâmpadas de metal de quartzo de 400W (HPI-T Pro da Philips®) e a simulação da atenuação da luz na coluna de água foi conseguida através dum painel de filtros com várias camadas de malha de linho sobrepostas. Com a sobreposição de mais ou menos camadas de linho obtiveram-se vários níveis diferentes de irradiância, possibilitando que cada compartimento do painel de filtros correspondesse a um nível de atenuação de luz. Seis valores de intensidade luminosa diferentes foram obtidos (0, 9, 30, 51, 85 e 153 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De acordo com o espaço físico disponível no incubador, as amostras foram colocadas em duplicado ou em triplicado em cada nível de luz. A obtenção de temperatura igual à registada nas culturas ($\pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$) foi conseguida com o auxílio de um refrigerador (JAD C-150) e de uma bomba de circulação. A simulação da agitação e mistura da coluna de água foi obtida pela rotação dos frascos de incubação (14 rpm).

Os resultados obtidos através dos dois métodos foram comparados, e foi determinado o coeficiente fotossintético (razão molar entre o oxigénio produzido e o carbono assimilado).

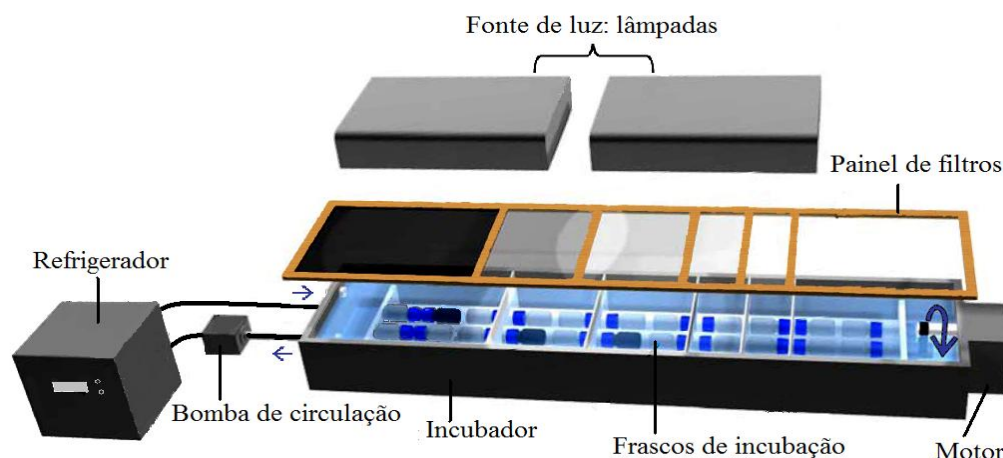


Figura 7- Representação esquemática do incubador utilizado no laboratório para a determinação da produtividade primária (Figura Adaptada de Gameiro, 2009)

2.6.2.1 Método de Winkler

A determinação do oxigénio dissolvido durante a fotossíntese foi efectuada através do método por titulação desenvolvido por Winkler, descrito e modificado por Strickland & Parsons (1972). O método de Winkler consiste na oxidação do hidróxido de manganês pelo oxigénio dissolvido, em meio de iodeto alcalino, resultando um composto de manganês tetravalente. A acidificação deste composto oxida o iodeto a iodo. O iodo livre é equivalente à quantidade de oxigénio dissolvido e é determinado por titulação com uma solução padrão de tiosulfato de sódio.

A aplicação do método iniciou-se com a incubação de amostra algal diluída em frascos de Winkler, os quais foram cheios cuidadosamente evitando a formação de bolhas ao rolar. Para cada nível de luz no incubador foram colocados dois frascos de Winkler, e para o nível sem luz (escuro), dois frascos foram envoltos em papel de alumínio de modo a não serem expostos a luz alguma. Também foram utilizados dois frascos para a medição da quantidade de oxigénio inicial, isto é, medição em amostras não submetidas a incubação. Uma vez terminado o período de incubação, aproximadamente entre 2 a 3 horas, as amostras foram fixadas com 1 ml de solução de manganês (reagente I) e 1 ml de solução de iodato de potássio alcalino (reagente II), e muito bem agitadas, deixando que o precipitado que se forma sedimente. Este precipitado foi dissolvido com a adição de 1 ml de ácido sulfúrico imediatamente antes de submeter as amostras à titulação. Com recurso a um titulador Metrohm 665 Dosimat e utilizando o amido como indicador da mudança de cor, procedeu-se à titulação das amostras com solução de tiosulfato. Durante a titulação as amostras encontravam-se na placa agitadora, a adição do titulante foi concretizada a velocidade controlada, e a quantidade utilizada registada.

Os reagentes devem ser testados para determinar a quantidade de impurezas oxidantes que possam formar iodo. Portanto, antes mesmo da aplicação do método, determinou-se o branco. Na determinação do branco, encheu-se um frasco de Winkler com água destilada e adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico, 1 ml de solução alcalina de iodeto (reagente II) mais 1 ml de solução de manganês (reagente I), agitando-se após cada adição de reagente. Simultaneamente com a determinação do branco, calibrou-se o titulante, a solução de tiosulfato, procedendo-se da mesma forma, sendo que mais 5 ml de solução padrão de iodato tiveram de ser adicionados, homogeneizando-se muito bem e esperando alguns minutos para a libertação do iodo. Após a adição dos reagentes realizou-se a titulação com a solução de tiosulfato padronizada.

A partir das fórmulas abaixo descritas calculou-se a concentração de oxigénio dissolvido e a respiração. A produtividade líquida e bruta foram determinadas considerando a equação $PPB = PPL - R$ (Falkowski & Raven, 1997).

$$[O_2]_{\text{dissolvido}} = \frac{[\text{Tiosulfato}] * (V_{Ta} - V_{Tb})}{[(V_f - V_r) * 4] * 10^6}$$

$$R = \frac{([O_2]_{\text{escuro}} - [O_2]_{\text{inicial}})}{T_{\text{incubação}}}$$

$[O_2]$ = concentração de oxigénio ($\mu\text{mol L}^{-1}$);

$[\text{Tiosulfato}]$ = concentração de titulante (tiosulfato) (mol L^{-1});

V_{Ta} = volume de titulante utilizado na amostra;

V_{Tb} = volume de titulante utilizado no branco;

V_f = volume do frasco de winkler (ml);

V_r = volume de reagentes adicionado;

$T_{\text{incubação}}$ = tempo de incubação das amostras (horas);

PPL = produtividade primária líquida ($\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$);

PPB = produtividade primária bruta ($\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$);

R = respiração ($\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

2.6.2.2 Método do ^{14}C

O método do carbono radioactivo (^{14}C), originalmente proposto por Steemann Nielsen (1952), é utilizado para estimar a taxa de incorporação de carbono durante a fotossíntese. Em traços gerais, uma quantidade conhecida de carbonato radioactivo $^{14}\text{CO}_3^{2-}$, na forma de hidrogeno carbonato de sódio $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, é adicionada às amostras a analisar. Após esta adição, as amostras são submetidas a incubação por um determinado período de tempo, filtradas sob vácuo e a radioactividade dos filtros é medida, pelo que a quantidade de ^{14}C encontrada nos filtros é utilizada para estimar a taxa de produtividade primária.

Mais promenorizadamente, a amostra algal recolhida foi diluída e dividida pelos frascos Schott Duran® transparentes de borossilicato (50 ml). A cada uma destas amostras foram adicionados 100 μl de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, com actividade de 20 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ (764 kBq ml^{-1}) (DHI),

sendo posteriormente submetidas a incubação durante cerca de 2 a 3 horas (condições iguais às utilizadas para o método de Winkler). Terminada a incubação, as amostras foram filtradas através de filtros GF/F de fibra de vidro (25 mm de diâmetro). De forma a remover o ^{14}C que não tenha sido incorporado nas células, os filtros foram lavados com algumas gotas de meio BBM e colocados em frascos de cintilação. Posteriormente, com o intuito de garantir a remoção total do ^{14}C inorgânico, os frascos de cintilação foram depositados num exsiccador com HCl, expondo os filtros a uma atmosfera ácida com vapores do ácido, durante cerca 30 minutos. Após este passo, os frascos foram colocados abertos na *hotte* ao escuro, durante 24 horas. Foram também incubadas amostras sem carbono marcado (amostras de controlo), de modo a detectar uma possível actividade específica intrínseca da amostra. A taxa de incorporação do carbono marcado verificado nos frascos escuros foi subtraída à taxa verificada nos frascos submetidos à luz, para evitar a sobre-estimação da taxa de produção primária pela microalga devido a processos químico-sintéticos. A quantificação da actividade específica de cada amostra foi medida em cpm (contagem por minuto) e realizada num contador de cintilações líquida de Beckman (Model LS 7800) utilizando RadySafe® como cocktail de cintilação (8 ml por amostra). A razão entre os valores obtidos em cpm e a eficiência de contagem do aparelho permitiu a conversão dos valores a dpm (desintegrações por minuto). A actividade específica dos frascos de controlo foi subtraída tanto aos frascos submetidos à luz como aos frascos escuros.

A taxa de produção primária em cada um dos frascos incubados foi determinada segundo a fórmula:

$$P \left(\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1} \right) = \frac{(\text{dpm}_{\text{luz}} - \text{dpm}_{\text{escuro}}) * W * 1,05 * 1000}{\text{dpm}_{\text{total}} * V * T}$$

P- taxa de carbono fixado pela fotossíntese ($\text{mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

Dpm_{luz}- actividade específica dos frascos incubados à luz;

Dpm_{escuro}- actividade específica dos frascos incubados ao escuro;

Dpm_{total}- actividade específica introduzida no início da incubação em cada um dos frascos;

W- massa do carbono inorgânico dissolvido total presente na amostra (mg C m^{-3});

V- volume de amostra incubado (ml);

T- duração na incubação;

1,05- factor de correção do efeito de discriminação do ^{14}C em relação ao ^{12}C ;

1000- factor para converter litros em m^3 .

Dados os curtos tempos de incubação e as características do método do ^{14}C , as taxas fotossintéticas medidas igualaram as taxas fotossintéticas brutas (Williams *et al.*, 2002), pelo que a função utilizada para descrever as curvas P-E passou sempre pela origem, não contabilizando o fenómeno da respiração.

2.6.2.2.1 Alcalinidade e carbono inorgânico dissolvido total (C_{total})

A alcalinidade do carbonato e o conteúdo de carbono inorgânico dissolvido total (C_{total} , $\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$) foram determinados segundo o método de Parsons *et al.* (1984). Mediuse a salinidade da cultura com um refractómetro Atgo S/Mill-E e foi utilizado um medidor de pH (Crison Basic 20) para a determinação do pH. Após medida a salinidade, pH e temperatura da amostra adicionou-se uma solução de HCl (0,01N) e o pH resultante foi novamente medido. O resultado foi obtido aplicando as fórmulas e utilizando as tabelas de Parsons *et al.* (1984).

2.7 Produção lipídica

Para a determinação dos lípidos totais e respectivos ácidos gordos foram colhidas amostras nas fases exponencial e estacionária do crescimento. Procedeu-se à centrifugação das amostras (2500 rpm a 4°C durante 5 minutos, utilizando a centrífuga Rotina 35R, Hettich) e ao armazenamento das mesmas a -80°C . Antes de serem processadas, as amostras foram liofilizadas (Cryodos, Telstar) e guardadas no frigorífico até serem analisadas no IPIMAR (Instituto de Investigação das Pescas e do Mar).

2.7.1 Determinação e quantificação de lípidos totais

A determinação dos lípidos totais foi realizada de acordo com uma adaptação do método de Bligh & Dyer (1959). A amostra a ser analisada foi pesada e a esta se adicionou 30 ml duma solução refrigerada de metanol/clorofórmio (2:1), homogeneizando-se no agitador Ultra Turrax. De seguida, juntou-se 4 ml de uma solução saturada de cloreto de sódio e posteriormente clorofórmio/água milli-Q (1:1). A cada adição de solvente homogeneizaram-se as soluções com Ultra Turrax durante 5 minutos. O homogeneizado resultante foi colocado no banho de ultrasons cerca de 10 minutos. Filtrou-se a amostra sob vácuo e transferiu-se o filtrado para uma ampola de decantação. Após o processo de decantação, recolheu-se a fase

inferior (orgânica) filtrando-se através de papel de filtro com sulfato de sódio anidro para um balão de fundo de pêra, previamente tarado. Após evaporação do clorofórmio no evaporador rotativo com banho termostaticado, pesou-se o balão de fundo de pêra numa balança Mettler Toledo AT200 (d=0,1 mg). O cálculo do teor de gordura da amostra foi efectuado pela seguinte expressão:

$$\text{Gordura (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100 \quad \text{em que,}$$

m_1 – massa do balão e do resíduo (fase orgânica filtrada) (g)

m_2 – massa do balão (g)

m_3 - massa da amostra (g)

2.6.2 Determinação e quantificação de ácidos gordos

A determinação de ácidos gordos foi concretizada segundo o método de transesterificação por catálise ácida (Cohen *et al.*, 1988). As amostras liofilizadas foram moidas e transferiu-se 60 mg para um tubo de vidro de rosca com capacidade de 15 ml. A esta quantidade de amostra foi adicionado 50 µl de uma solução padrão interno 21:0 (10 mg ml⁻¹) e 5 ml da mistura de cloreto de acetilo:metanol na proporção 1:19, agitando-se os tubos no vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram colocados num banho a 80°C por 1 hora e depois de arrefecidos adicionou-se 1 ml de água mili-Q e 2 ml de n-heptano, agitando-se novamente no vórtex. Centrifugou-se durante 5 minutos a 2000g e recolheu-se a fase orgânica (onde se encontram os ésteres metílicos de ácidos gordos) para um *vial*, filtrando por uma coluna de algodão e sulfato de sódio anidro. Efectuou-se a análise de ácidos gordos pela injeção de 2 µl no cromatógrafo de fase gasosa (GC) Varian CP-3800. A corrida do cromatograma tem uma duração de 40 minutos. Os cromatogramas obtidos forneceram a identificação dos tempos de retenção dos ácidos gordos, por comparação com o padrão PUFA nº3 (óleo comercial) da Sigma, e a percentagem de cada ácido gordo presente na amostra. Também foi feita a quantificação mássica da amostra por comparação com a área do padrão interno injectado, através da seguinte fórmula:

$$\text{Ácido gordo (mg/g)} = \frac{A * M_P}{A_P * M_A}$$

A = Área do pico do ácido gordo;

M_p = Massa do padrão interno 21:0 (mg);

A_p = Área do pico do padrão interno;

M_A = Massa da amostra (g).

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Características da biomassa de *Ankistrodesmus fusiformis* e

Scenedesmus sp.1

Ao longo do crescimento das culturas, a principal alteração observada macroscopicamente foi a mudança de cor (Figura 8). Na fase exponencial, as culturas de *A.fusiformis* possuíam uma coloração verde-claro apresentando um tom ligeiramente amarelado. Quando o crescimento atingiu a fase estacionária, estas culturas adquiriram uma cor amarela-esverdeada que se tornou cada vez mais amarela e escura nos dias seguintes. Relativamente a *Scenedesmus* sp.1, as culturas apresentaram uma coloração verde-claro na fase exponencial. Na fase estacionária de *Scenedesmus* sp.1, a coloração tornou-se mais forte e escura, acabando por desvanecer com o passar dos dias.

Scenedesmus sp.1 demonstrou tendência à agregação celular, e conseqüentemente para sedimentar, sendo necessária a agitação de cada amostra para contagem ao microscópio.

Nos primeiros dias de cultivo das duas microalgas, as culturas apresentavam na sua maioria células individuais, observando-se durante o crescimento exponencial um grande aumento de colónias de células. Em *Scenedesmus* sp.1, foram observadas maioritariamente colónias constituídas por duas e quatro células, enquanto que em *A.fusiformis* o número de células nas colónias foi muito variável (Figura 9a, b). A biomassa liofilizada das microalgas resultou num pó com coloração idêntica à evidenciada nas culturas no momento da colheita.

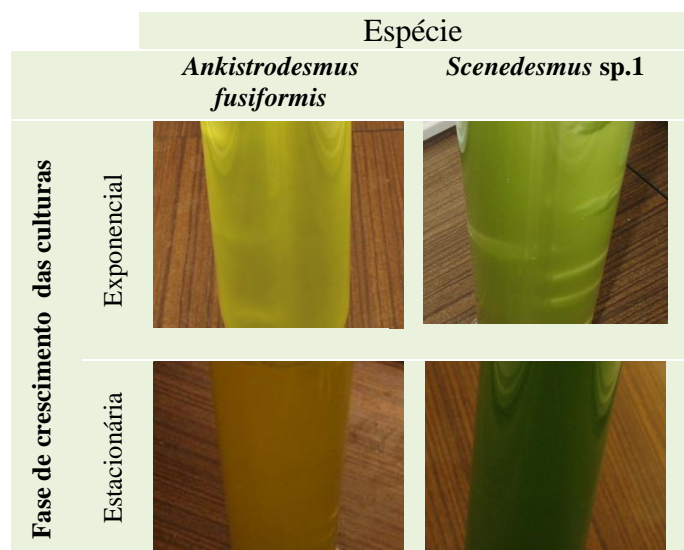


Figura 8- Alteração da coloração das culturas nas duas clorófitas estudadas e nas duas fases de crescimento analisadas.

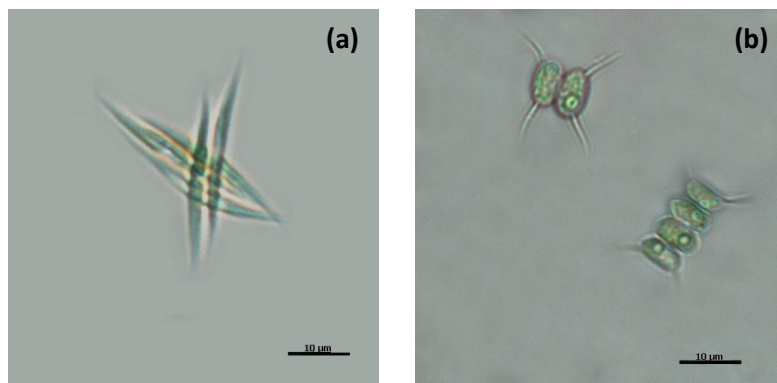


Figura 9- Observação ao microscópio Olympus BX 50, numa ampliação de 400x, da espécie *Ankistrodesmus fusiformis* (a) e *Scenedesmus* sp.1 (b).

3.2 Crescimento das culturas microalgais

A partir das contagens celulares realizadas diariamente calculou-se a concentração celular das várias culturas das duas espécies (Figura 10). Em geral, o crescimento das culturas das microalgas foi exponencial até ao 6^o-8^o dia de cultivo, evidenciando-se em *A.fusiformis* uma maior dispersão das curvas após esse dia. Nas culturas de *Scenedesmus* sp.1, nomeadamente S1 e S2, verificou-se uma fase de declínio nos últimos dias de cultivo. No crescimento das culturas de *A.fusiformis* não se observou esta fase. Embora o inóculo das culturas tenha sido mantido sob condições diferentes das usadas no cultivo, as curvas de crescimento para as duas clorófitas não mostraram fase de adaptação (lag) ou quando mostraram (essencialmente em *Scenedesmus* sp.1), esta apresentou-se curta. Nos dias de colheita das culturas, a maior concentração celular registada em *A.fusiformis* foi $1,01 \times 10^7$ cél ml⁻¹ (cultura A9) e a menor correspondeu a $2,78 \times 10^6$ cél ml⁻¹ (cultura A4); enquanto que em *Scenedesmus* sp.1, o valor mais elevado de concentração celular foi $3,57 \times 10^7$ cél ml⁻¹ (cultura S5) e o menor foi $2,30 \times 10^7$ cél ml⁻¹ (cultura S4).

Para além da contagem celular ao microscópio, o crescimento das culturas também foi analisado através do peso seco determinado gravimetricamente e através da leitura da densidade óptica a 540 nm no espectrofotómetro. O valor máximo de peso seco observado nas culturas de *A.fusiformis* foi de 1 g L^{-1} (cultura A7; dia 18) (Figura 11); enquanto que em *Scenedesmus* sp.1 foi $1,18 \text{ g L}^{-1}$ (cultura S1; dia 14) (Figura 12).

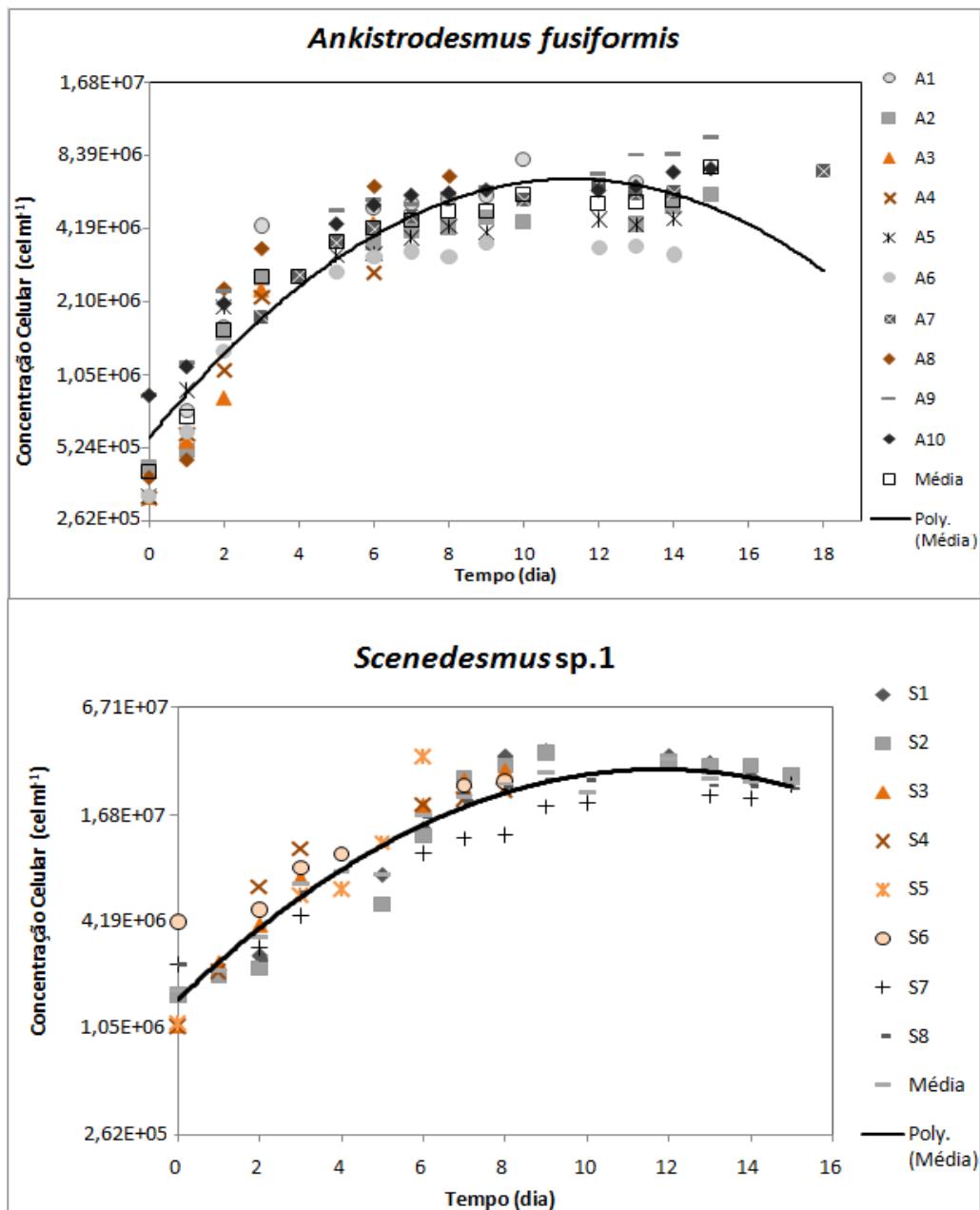


Figura 10- Curvas de crescimento das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* e de *Scenedesmus sp.1* (escala em logaritmo de 2). Nota: os símbolos em tons escuros correspondem às culturas colhidas na fase estacionária; a simbologia em tons de laranja está associada às culturas colhidas na fase exponencial.

A relação existente entre os métodos utilizados na determinação do crescimento das culturas foi estabelecida utilizando análises de regressão linear (Figuras 11, 12). Foi observada uma boa relação linear entre os métodos utilizados. Entre os valores de peso seco determinados gravimetricamente e a concentração celular conseguida através de contagens ao microscópio, determinou-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,65 e 0,85 para

A.fusififormis e *Scenedesmus* sp.1, respectivamente (Figuras 11, 12). A relação linear estabelecida entre os valores de densidade óptica, lidos a 540 nm no espectrofotómetro, e a concentração celular mostrou os seguintes valores para R^2 : 0,91 para *A.fusififormis* e 0,85 para *Scenedesmus* sp.1 (Figuras 11, 12).

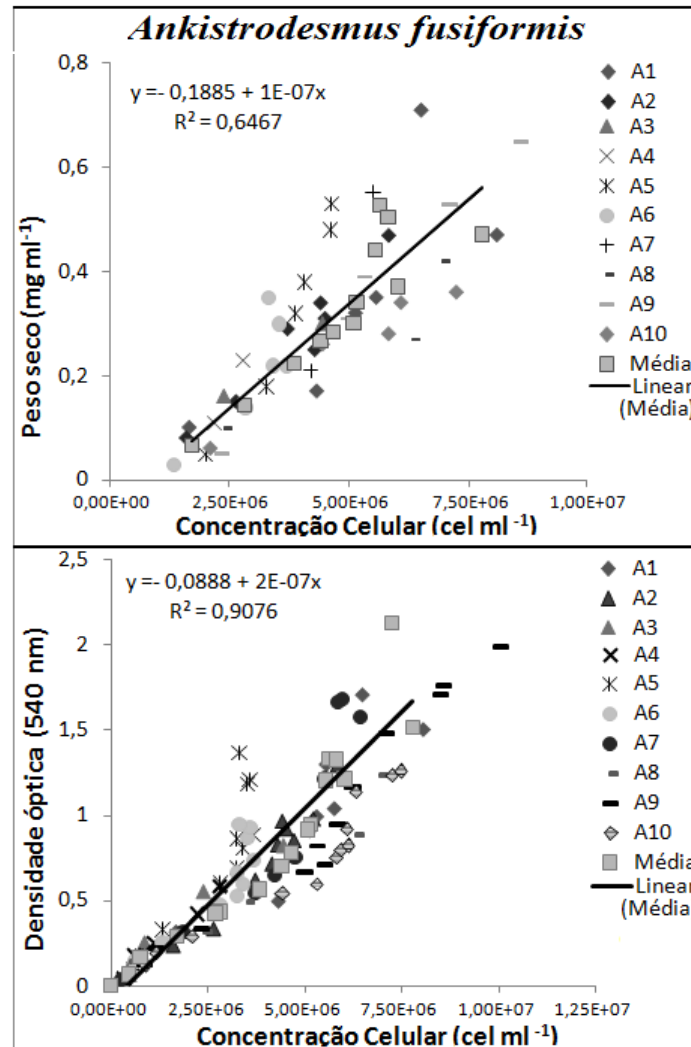


Figura 11 – Relação linear entre métodos utilizados para a determinação do crescimento das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis*.

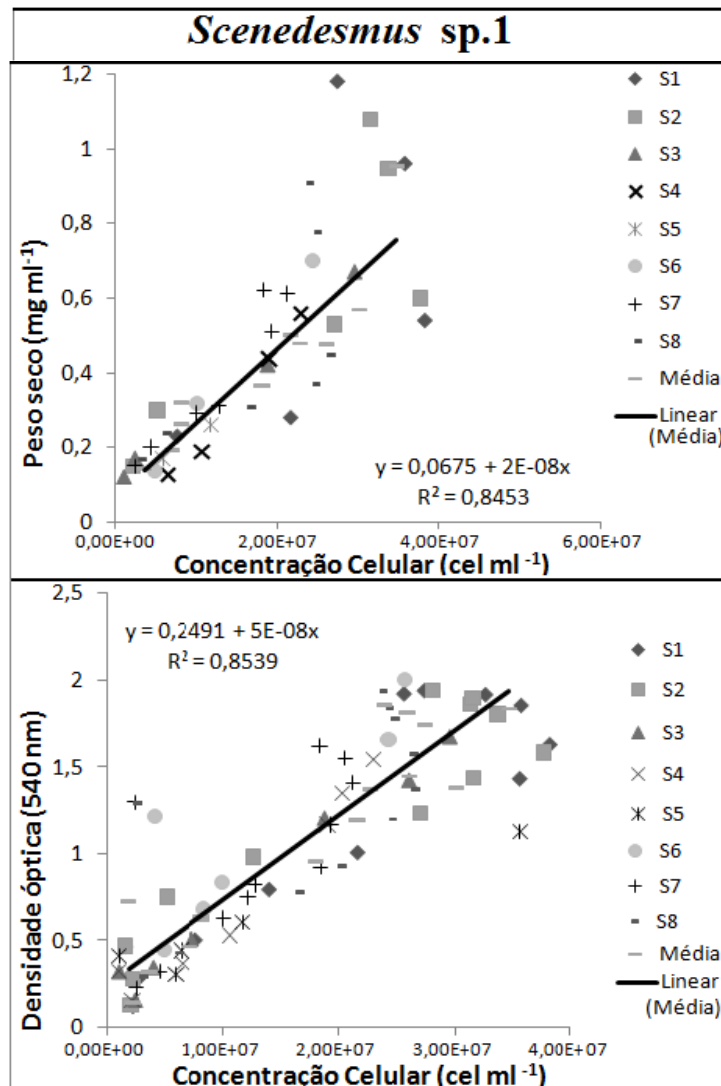


Figura 12 – Relação linear entre métodos utilizados para a determinação do crescimento das culturas de *Scenedesmus sp.1*.

Uma vez observada uma relação linear significativa entre os métodos de análise do crescimento, a taxa de crescimento das culturas foi determinada tanto em relação à concentração celular como em relação ao peso seco. Evidenciaram-se elevadas taxas de crescimento das culturas, observando-se valores não muito diferentes entre as duas espécies em estudo (Tabela 5). A taxa de crescimento média observada em *A.fusififormis* correspondeu a 0,631 cel ml⁻¹d⁻¹ e a 0,362 g L⁻¹d⁻¹. Em *Scenedesmus sp.1*, foram registados os seguintes valores médios para a taxa de crescimento: 0,600 cel ml⁻¹d⁻¹ e a 0,312 g L⁻¹d⁻¹. Uma maior disparidade foi observada entre os valores máximos registados entre as duas microalgas, nomeadamente em relação ao peso. *A.fusififormis* apresentou uma taxa máxima de 0,841 cel

ml⁻¹d⁻¹ e de 0,593 g L⁻¹d⁻¹. *Scenedesmus* sp.1 para apresentou uma taxa máxima de 0,868 cel ml⁻¹d⁻¹ e de 0,414 g L⁻¹d⁻¹.

Tabela 5- Valores mínimos (Mín), máximos (Máx) e médios (Méd) das taxas de crescimento e respectivos tempos de geração, relativos à concentração celular (cel ml⁻¹ dia⁻¹) e ao peso seco (g L⁻¹ dia⁻¹). Nota: encontra-se mencionada entre parêntesis a cultura onde se registou o respectivo valor.

Espécie		<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>			<i>Scenedesmus</i> sp.1				
Taxas de crescimento	(cel ml ⁻¹ d ⁻¹)	Máx	(A1) 0,841	Tempo de geração (dia)	1,19	Máx	(S2) 0,868	Tempo de geração (dia)	1,152
		Mín	(A3) 0,371		2,69	Mín	(S7) 0,411		2,435
		Méd	0,631		1,812	Méd	0,600		1,802
	(g L ⁻¹ d ⁻¹)	Máx	(A9) 0,593	1,687	Máx	(S3) 0,414	2,418		
		Mín	(A5) 0,223	4,481	Mín	(S7) 0,193	5,183		
		Méd	0,362	3,048	Méd	0,312	3,464		

O cultivo das microalgas foi realizado em regime *batch*, o que permitiu observar o típico padrão dinâmico do crescimento de acordo com uma curva sigmóide. A fase de declínio, observada após a fase estacionária do crescimento, foi evidenciada em *Scenedesmus* sp.1 mas não em *A.fusiformis*. A hipótese de falta de nutrientes essenciais no meio de cultura e/ou a ocorrência da redução da eficiência fotossintética devido ao efeito de ensombramento sustenta a observação de uma fase de declínio em *Scenedesmus* sp.1 (Stein, 1973; Andersen, 2005; Skenk *et al.*, 2008). De facto, culturas desta espécie possuíram concentrações celulares mais elevadas relativamente a *A.fusiformis*, e conseqüentemente, um maior efeito de auto-ensombramento. Relativamente aos nutrientes essenciais no meio de cultura, o azoto e o fósforo são considerados os nutrientes principais no crescimento. A maioria da literatura incide-se no estudo dos efeitos do constituinte essencial de todas as proteínas funcionais e estruturais nas células de algas, o azoto. Vários estudos verificam a sua importância fulcral no crescimento, observando-se taxas de crescimento e conteúdo proteico muito mais baixos em culturas quando em meio com pouco azoto (*e.g.* Piorreck *et al.*, 1984; Thomas *et al.*, 1984; Hu, 2004; Verma *et al.*, 2010).

A satisfatória relação linear estabelecida entre os métodos de análise do crescimento, permitiu interpretar os valores de produtividade das culturas através da contagem celular e do peso seco. As elevadas taxas de crescimento observadas em *A.fusiformis* e em *Scenedesmus*

sp.1 corroboram com a constatação que vários autores fazem relativamente à obtenção de elevada produtividade de biomassa no cultivo de microalgas em fotobiorreactores fechados, nomeadamente quando existe arejamento e agitação (Tredici, 2004; Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010). Interessa salientar que economicamente é importante manter elevadas produtividades a elevadas concentrações celulares, o que constitui um desafio em culturas *batch* devido à queda da pressão osmótica causada pelo metabolismo de nutrientes e ao efeito de ensombramento anteriormente mencionado (Chisti, 2007; Morais & Costa, 2007; Sckenk *et al.*, 2008).

3.3 – Análise pigmentar das culturas

3.3.1 Cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC)

A análise efectuada em HPLC permitiu separar, identificar e quantificar os pigmentos fotossintéticos presentes em *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1. Este método envolveu as culturas A9, A10, S7 e S8 e para cada uma retiraram-se duas réplicas na fase exponencial e na fase estacionária do crescimento. Nas culturas A9 e A10 foram colhidas amostras no 6º e no 13º dia de cultivo, enquanto que nas culturas S7 e S8 o mesmo foi concretizado ao 3º e 10º dia de cultivo (Figura 13). No decorrer do trabalho experimental, observou-se uma maior facilidade de extracção dos pigmentos em *A.fusiformis* do que em *Scenedesmus* sp.1.

Das amostras analisadas por HPLC foram detectados e identificados 13 picos correspondentes a pigmentos e/ou produtos de degradação de pigmentos. No decurso da análise dos cromatogramas apresentados na Figura 14, obtidos de amostras colhidas na fase estacionária, observaram-se picos com elevada área para a clorofila *a*, clorofila *b* e luteína. Este último pigmento eluiu quase em simultâneo com a zeaxantina.

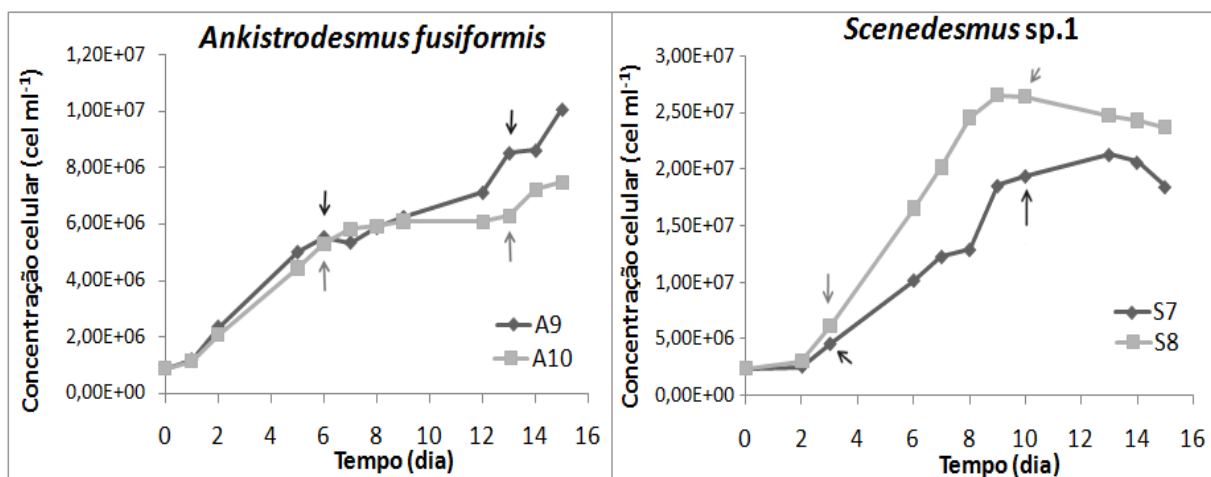


Figura 13 – Crescimento das culturas utilizadas na análise por HPLC, evidenciando os dias em que foram colhidas amostras (setas)

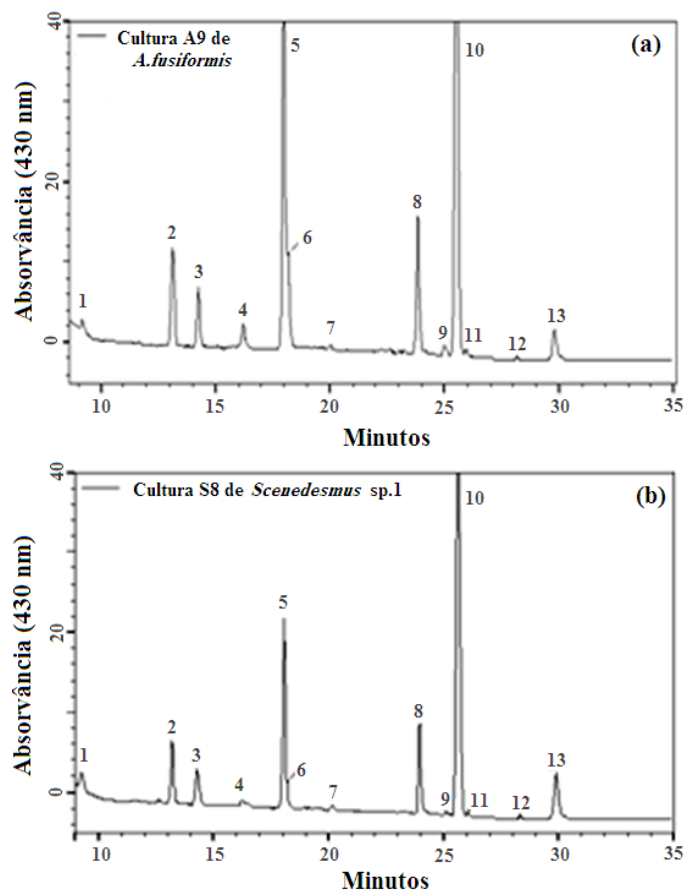


Figura 14 – Exemplos de cromatogramas obtidos de amostras colhidas na fase estacionária, para *Ankistrodesmus fusiformis* (a) e para *Scenedesmus sp.1* (b). A identificação dos diversos picos é apresentada na Tabela 5.

Em *A.fusiformis*, todos os pigmentos identificados na fase estacionária foram observados também na fase exponencial, à exceção de astaxantina. A concentração máxima dos pigmentos identificados nesta espécie foi registada em culturas colhidas na fase estacionária, excluindo a clorofila *a*, epímero da clorofila *a* e β -caroteno. Foi evidenciada uma maior concentração da clorofila *a* na fase exponencial, registando-se assim o maior valor para este pigmento, 1,592 mg L⁻¹ (Tabela 6). Nas duas fases do crescimento, observaram-se em *A.fusiformis*, quantidades mais elevadas de clorofila *a* relativamente a *Scenedesmus* sp.1. A razão das xantofilas (neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína e zeaxantina) em relação à clorofila *a* mostrou ser inferior à concentração da clorofila *a*, principalmente na fase exponencial (Figura 15).

Em *Scenedesmus* sp.1, foi observado na fase estacionária uma maior concentração de todos os pigmentos. Na fase exponencial desta espécie não se detectou clorofilide *a*, zeaxantina, alómero e epímero da clorofila *a* e feofitina *a* (Tabela 6). Tal como *A.Fusiformis*, *Scenedesmus* sp.1 não exibiu astaxantina na fase exponencial. Nesta fase do crescimento, verificou-se uma concentração mais elevada de xantofilas comparativamente à concentração de clorofila *a*. Com o aumento da clorofila *a* na fase estacionária observou-se redução da concentração das xantofilas (Figura 15).

Entre as duas clorófitas, foram encontradas maiores discrepâncias dos valores de concentração máxima em zeaxantina, clorofilas *a* e *b*.

Tabela 6 – Identificação dos picos nas duas clorófitas, tempos médios de retenção dos pigmentos nas culturas colhidas na fase exponencial (Exp) e na fase estacionária (Est), e concentração máxima dos pigmentos identificados com a respectiva fase onde foi registada (- não detectado).

Pico n°	Pigmento	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>		<i>Scenedesmus</i> sp.1			
		Tempo médio de retenção (min)		Concentração máx (mg L ⁻¹)	Tempo médio de retenção (min)		Concentração máx (mg L ⁻¹)
		Exp	Est		Exp	Est	
1	Clorofilide <i>a</i>	9,30	9,26	0,108 (Est)	-	9,49	0,120 (Est)
2	Neoxantina	13,30	13,22	0,094 (Est)	13,12	13,14	0,089 (Est)
3	Violaxantina	14,42	14,33	0,065 (Est)	14,22	14,18	0,069 (Est)
4	Anteraxantina	15,92	16,04	0,029 (Est)	16,15	16,13	0,016 (Est)
5	Luteína	18,19	18,08	0,425 (Est)	17,89	17,89	0,419 (Est)
6	Zeaxantina	18,41	18,29	0,064 (Est)	-	18,07	0,018 (Est)
7	Astaxantina	-	19,97	0,014(Est)	-	19,87	0,013 (Est)
8	Clorofila <i>b</i>	24,06	23,94	0,363 (Est)	23,70	23,84	0,484 (Est)
9	Alómero da clorofila <i>a</i>	25,08	25,03	0,016 (Est)	-	24,88	0,012 (Est)
10	Clorofila <i>a</i>	25,72	25,61	1,592 (Exp)	24,41	25,04	1,347 (Est)
11	Epímero da clorofila <i>a</i>	26,16	26,06	0,013 (Exp)	-	25,85	0,018 (Est)
12	Feofitina <i>a</i>	28,45	28,54	0,048 (Est)	-	28,28	0,083 (Est)
13	β -caroteno	30,04	29,93	0,060 (Exp)	29,70	29,84	0,066 (Est)

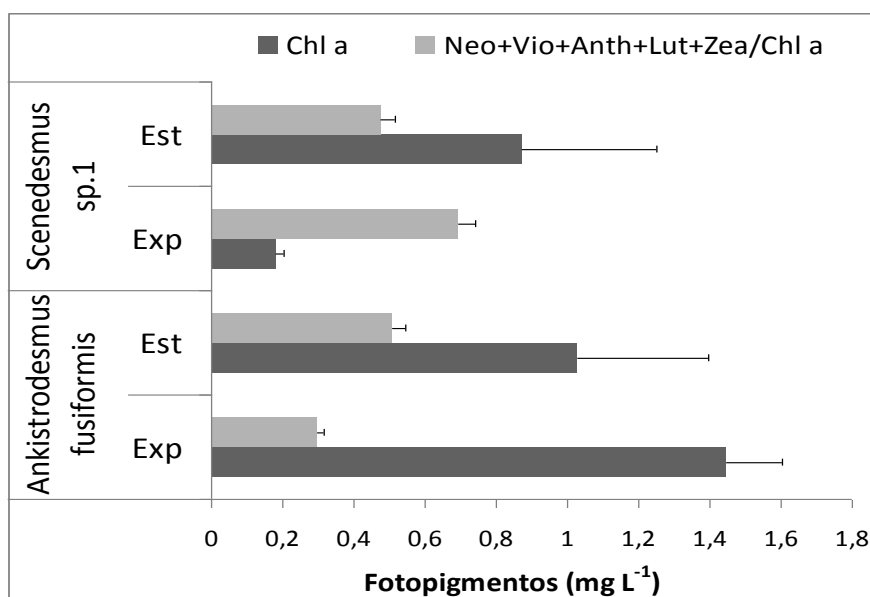


Figura 15- Comparação, entre fases e espécies, da concentração de clorofila *a* e da razão da soma da concentração de neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina *versus* concentração da clorofila *a*.

Os pigmentos identificados nas duas clorófitas em estudo encontram-se de acordo com os esperados presenciar nestas microalgas (Lobban *et al.* 1988; Jeffrey *et al.*, 1997; Schagerl *et al.*, 2003). Com o aumento do número de células na cultura e conseqüente auto-ensombreamento, as culturas sofreram fotoaclimatização. Este processo é visível pelo escurecimento das células, devido ao aumento do conteúdo pigmentar (Dubinsky & Stambler, 2009). Contudo, observou-se mais clorofila *a* e β -caroteno na fase exponencial de *A.fusiformis*. A presença de mais β -caroteno na fase exponencial desta espécie indica necessidade de protecção dos centros de reacção devido a excitação excessiva.

A ocorrência de astaxantina, apenas na fase estacionária das duas espécies, sugere a possibilidade das células destas clorófitas estarem limitadas em azoto (Jeffrey *et al.*, 1997). A clorofilide *a* e a feofitina *a* detectadas podem ser também interpretadas como artefactos devido ao armazenamento ou preparação das amostras. Estes produtos de degradação da clorofila *a* foram identificados com uma maior quantidade em *Scenedesmus* sp.1, espécie onde realmente se verificou uma maior dificuldade na extracção de pigmentos devido à sua parece celular ser muito resistente (Wiltshire *et al.*, 2000).

A zeaxantina, violaxantina e anteraxantina são pigmentos acessórios que providenciam protecção foto-oxidativa, fazendo parte do ciclo de xantofilas nas clorófitas. Este ciclo consiste em epoxidações reversíveis estimuladas por fracas intensidades luminosas e a desepoxidações por intensidades elevadas. Quando o equilíbrio das reacções se encontra

deslocado para a desepoxidação, significa que zeaxantina é superior a anteraxantina e violaxantina (Müller *et al.* 2001; Eonseon *et al.*, 2003; Dubinsky & Stambler, 2009). A quantidade superior de zeaxantina observada em *A.fusififormis*, relativamente a *Scenedesmus* sp.1, sugere uma maior redução de excitação do centro de reacção de PSII pela dissipação do excesso de energia de excitação via amortecimento (“*quenching*”) não-fotoquímico. Na fase estacionária de *Scenedesmus* sp.1, violaxantina mostrou uma concentração superior à de zeaxantina e anteraxantina, o que significa que a irradiância absorvida foi mais baixa do que a que é requerida para a saturação da fotossíntese (Eonseon *et al.*, 2003; Vonshak & Torzillo 2004).

Comparativamente a *Scenedesmus* sp.1, em *A.fusififormis* obtiveram-se valores máximos de concentração mais elevados para luteína e para os pigmentos do ciclo das xantofilas (excepto violaxantina). A presença destes pigmentos, nomeadamente a luteína, pigmento no qual se registou 0,425 mg L⁻¹, comprova a coloração verde ligeiramente amarelada evidente nas culturas de *A.fusififormis*.

3.3.2 Espectrofotometria

Com o auxílio do espectrofotómetro foi analisada a concentração das clorofilas *a* e *b* ao longo do crescimento das microalgas (Figura 16, 17). Em *A.fusififormis* observou-se aumento de clorofila *a*, embora as culturas A5, A6, A9 e A10 tenham mostrado alguma variabilidade nos resultados em determinados dias da cultura. Evidenciou-se uma diminuição da concentração de clorofila *a* por célula ao longo do crescimento. Quanto à clorofila *b*, foram encontrados baixos valores de concentração e observou-se um aumento muito ligeiro do pigmento durante o cultivo de *A.fusififormis*. A presença de clorofila *b* por célula diminuiu muito ligeiramente ao longo do crescimento e foi observada grande dispersão dos pontos. A produção de clorofila *a* e *b*, nas culturas e por célula, ao longo do tempo de cultivo de *Scenedesmus* sp.1, foi semelhante à observada nas culturas de *A.fusififormis*. Nas culturas das duas clorófitas foram obtidas concentrações de clorofila *a* entre 0,5 e 3,5 mg L⁻¹. Foram determinadas menores concentrações das clorofilas por célula em *Scenedesmus* sp.1, o que é natural, dado o menor tamanho das células desta espécie. Nesta espécie, observou-se reduzida linearidade entre a quantidade dos pigmentos e os dias de cultivo.

No caso de *Scenedesmus* sp.1, os resultados obtidos por espectrofotómetro estiveram de acordo com os conseguidos por HPLC, evidenciando-se maior quantidade de clorofila *a* e *b* na fase estacionária do crescimento. Quanto a *A.fusififormis*, a análise realizada por

espectrofotometria permitiu verificar que a concentração de clorofila *a* aumentava de forma não gradual ao longo do tempo, com maior quantidade na fase estacionária. Isto contraria o que foi observado pela análise realizada por HPLC. Contudo se analisarmos com atenção o gráfico presente na Figura 16, concluímos que nas culturas em que se determinou a concentração dos pigmentos por HPLC (cultura A9 e A10; nos dias 6 e 13) quantificou-se também por espectrofotometria maior quantidade de clorofila *a* no dia 6 do que no dia 13. Isto significa, que as culturas estudadas por cromatografia não são representativas do que geralmente acontece nas culturas de *A.fusiformis* no que concerne a este pigmento (clorofila *a*).

Relativamente à clorofila *a* e aos feopigmentos *a* determinados pelas equações de Lorenzen (1967), os feopigmentos *a* apresentaram uma variação proporcional com a quantidade de clorofila *a* (Figura 17), ocorrendo uma maior degradação dos pigmentos nos dias em que o crescimento das culturas começa a cessar, no final da fase exponencial e nos últimos dias de cultivo. Comparando as duas microalgas, observou-se uma maior dispersão dos valores de concentração de clorofila *a* em *Scenedesmus* sp.1. Foram verificados valores superiores de feopigmentos *a* em *A.fusiformis*.

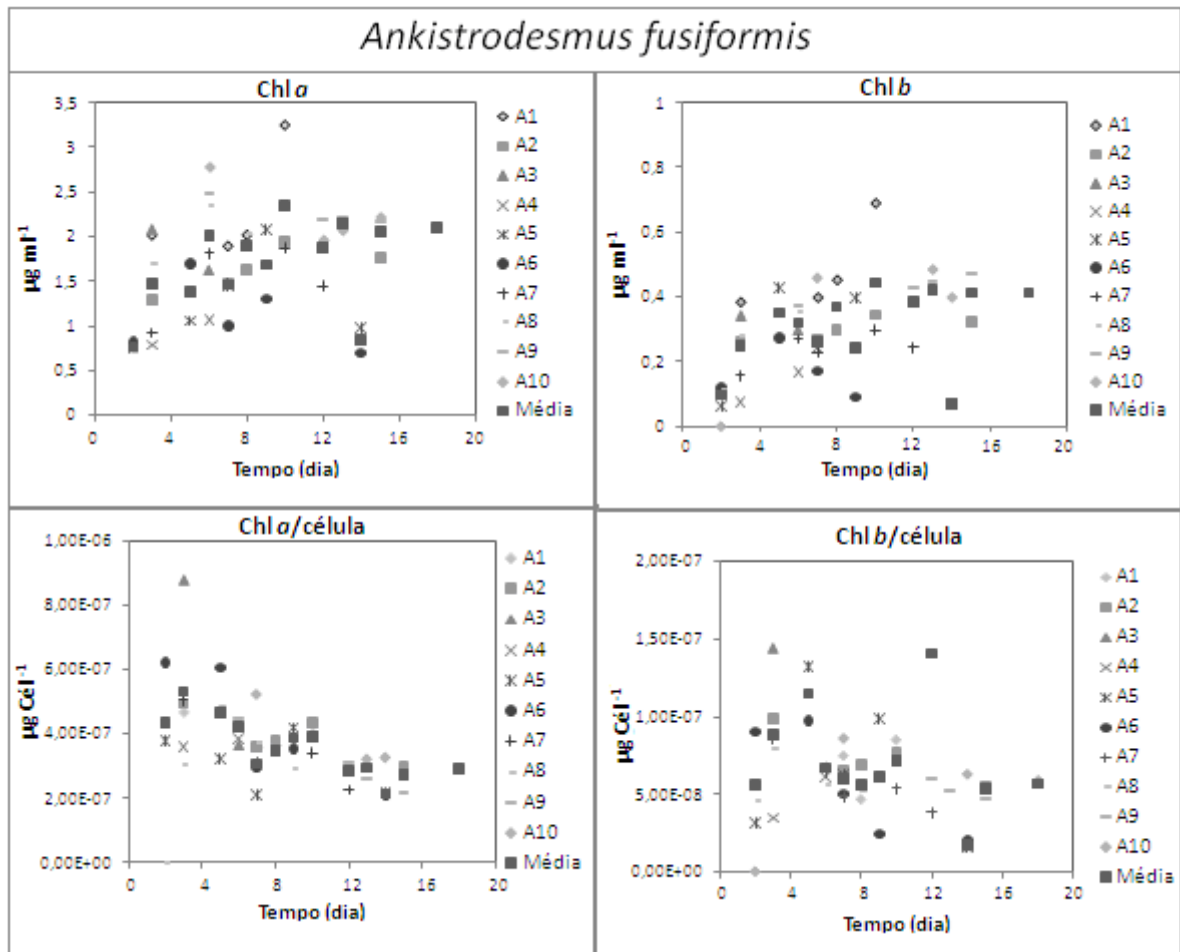


Figura 16 – Resultados da concentração de Chl *a* e Chl *b* ($\mu\text{g ml}^{-1}$), e concentração destes pigmentos por célula ($\mu\text{g Cel}^{-1}$), ao longo dos dias de cultivo de *Ankistrodesmus fusiformis*.

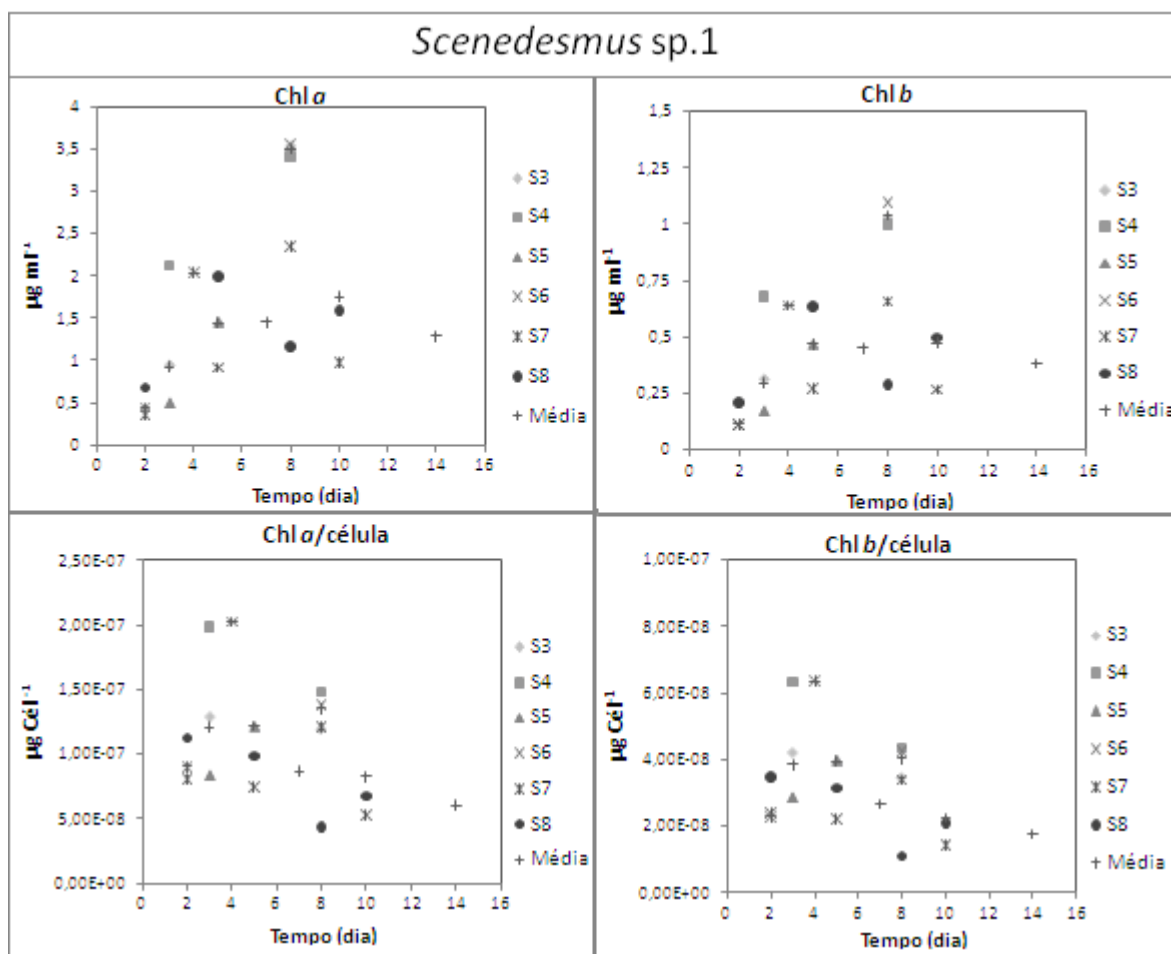


Figura 17 – Resultados da concentração de Chl *a* e Chl *b* ($\mu\text{g ml}^{-1}$), e concentração destes pigmentos por célula ($\mu\text{g Cel}^{-1}$), ao longo dos dias de cultivo de *Scenedesmus sp.1*.

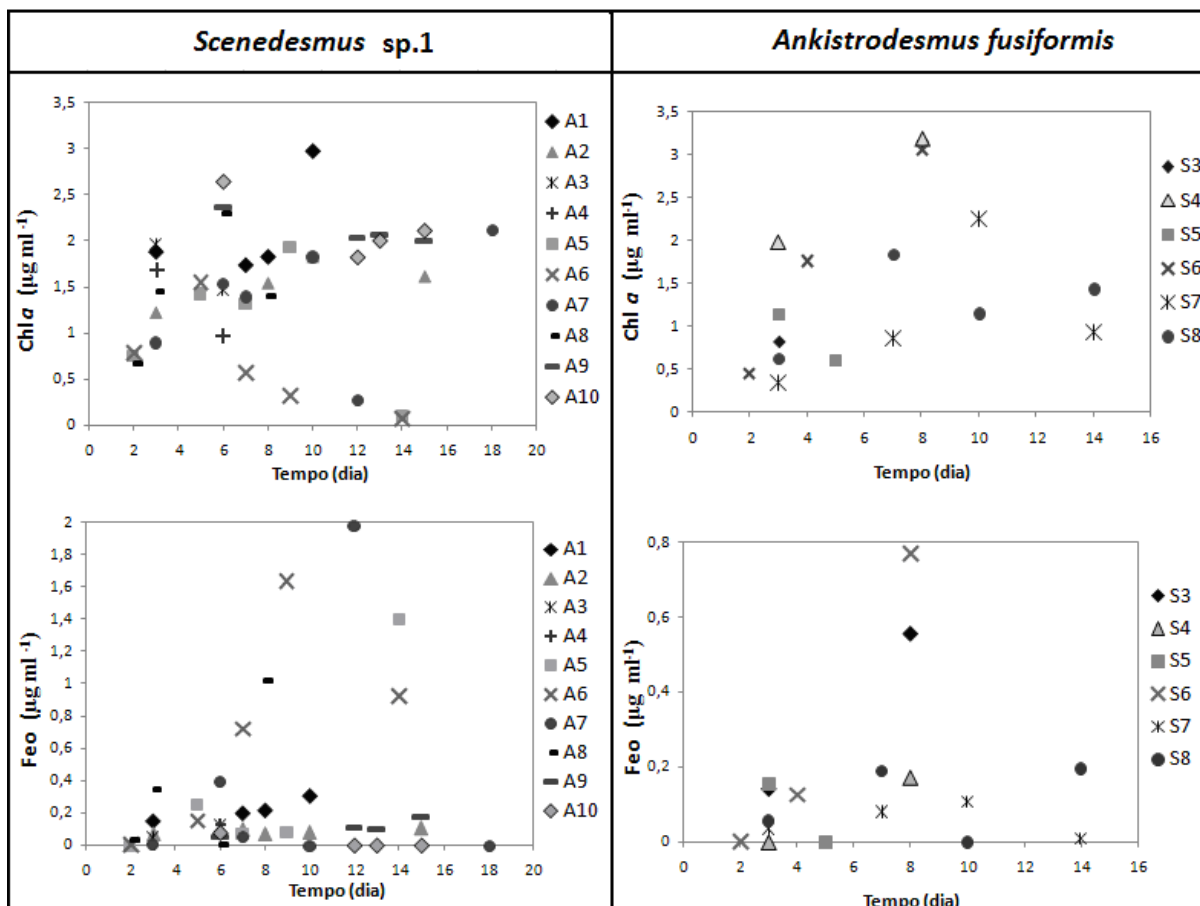


Figura 18- Variação da Chl *a* e Feo em relação aos dias de cultivo, em *Ankistrodesmus fusiformis* e em *Scenedesmus sp.1*. Nota: Chl *a* e Feo determinados pelas equações de Lorenzen (1967).

3.3.3 Comparação entre espectrofotometria e HPLC

Com as duas metodologias utilizadas, espectrofotometria e cromatografia líquida, foram comparados os seguintes pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b*, β -caroteno e astaxantina (Figura 19). Os valores medidos por espectrofotometria foram significativamente sobrestimados em relação aos obtidos por cromatografia, excepto a clorofila *b* (sobrestimação de cerca de 40% em ambas as clorófitas) que representa o pigmento identificado em menor quantidade. A clorofila *a* em *A.fusiformis* foi sobrestimada em 48% e em *Scenedesmus sp.1* 60%. Quanto a β -caroteno e astaxantina, foi verificada uma sobrestimação de cerca de 97%, nas duas microalgas em estudo. Ainda que observadas estas discrepâncias, os valores obtidos por espectrofotometria variaram proporcionalmente com os determinados por HPLC. Em cada espécie e em cada fase do crescimento, foram identificados por espectrofotometria quantidades muito semelhantes de β -caroteno e astaxantina. *Scenedesmus sp.1* exibiu quantidades inferiores de β -caroteno e astaxantina na fase exponencial, comparativamente a

A.fusififormis. Verificou-se maior desvio-padrão nos valores médios obtidos para *Scenedesmus* sp.1, principalmente com os valores determinados com o auxílio do espectrofotómetro.

Através da análise realizada por HPLC, determinaram-se quantidades mais reduzidas para astaxantina e β -caroteno. Como já verificado no tópicio 3.3.1, astaxantina não foi identificada na fase exponencial de *A.fusififormis* e *Scenedesmus* sp.1. Em *Scenedesmus* sp.1, β -caroteno foi detectado na fase exponencial, embora numa concentração muito vestigial, $0,003 \text{ mg L}^{-1}$, não se conseguindo evidenciar na Figura 19.

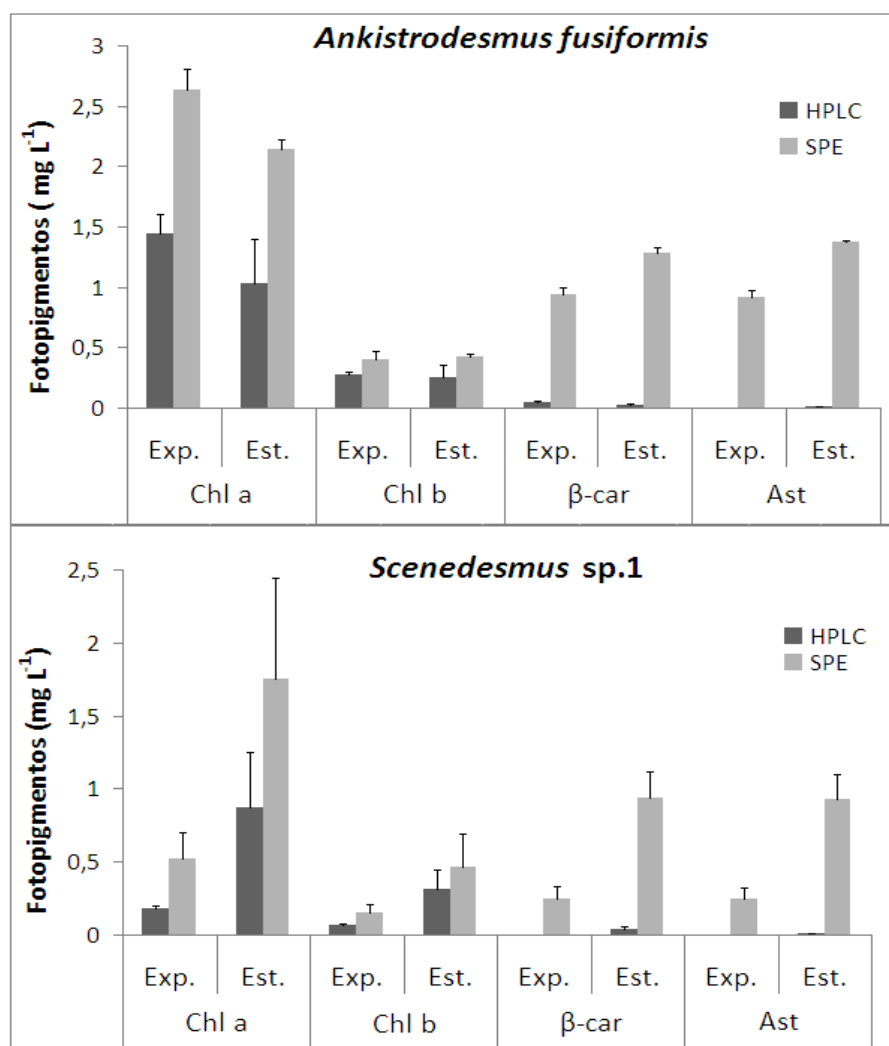


Figura 19 – Concentração dos fotopigmentos na fase exponencial (Exp) e fase estacionária (Est) das microalgas, determinada através do espectrofotómetro (SPE) e por cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC). Os valores de Chl a apresentados correspondem aos obtidos pela equação de Jeffrey & Humphrey (1975) (desvio padrão inerente aos valores médios observados; n=4).

Através do método de HPLC e do método de espectrofotometria, obtiveram-se valores fiáveis para as concentrações dos pigmentos. O método de espectrofotometria é adequado principalmente para análises de rotina, quando é necessário um vasto número de replicados. Embora a análise por HPLC seja mais demorada e cara, esta metodologia é conhecida como mais exacta e fidedigna na medição da clorofila *a*. Isto porque a técnica de HPLC é mais vantajosa que as outras, na medida que todos os pigmentos e seus respectivos produtos de degradação são possíveis de separar e quantificar correctamente. Como tal, foi verificada sobrestimação dos valores de concentração obtidos com o espectrofotómetro. Em relação à clorofila *a*, encontra-se bem documentado a sobrestimação dos valores de clorofila *a*, determinados pela equação de Jeffrey & Lorenzen (1975), e os valores dos feopigmentos *a* através das equações de Lorenzen (1967) (Lobban *et al.* 1988; Andersen, 2005).

3.4 Produção primária e Parâmetros fotossintéticos

3.4.1 Parâmetros fotossintéticos

Registaram-se curvas P-E, onde se determinaram os parâmetros fotossintéticos $rETR_{max}$ (taxa relativa máxima de transferência de electrões), F_v/F_m (eficiência quântica máxima do fotossistema II) e α (coeficiente máximo de utilização da luz – declive inicial da curva). Com o passar dos dias de cultivo, observou-se um decréscimo destes parâmetros fotossintéticos (Figura 20), observando-se uma relação linear significativa entre os parâmetros e o tempo. Foi evidenciado um maior decréscimo de $rETR_{max}$, F_v/F_m e α na espécie de *Scenedesmus*. No entanto, o decréscimo destes parâmetros não foi gradual ao longo dos dias de cultivo das duas espécies (Figura 21). Em geral, a variabilidade dos parâmetros durante o cultivo de *A.fusiformis* e de *Scenedesmus* sp.1 foi muito semelhante. Foi registada uma maior variação de $rETR_{max}$ e uma menor variação de α . A variação máxima (entre o valor médio máximo e o médio mínimo registados) observada em *A.fusiformis*, para $rETR_{max}$ foi de 80%, para α foi 60% e para F_v/F_m 40%. Em *Scenedesmus* sp.1, os valores de $rETR_{max}$ variaram no máximo 85%, de α variaram 80% e para F_v/F_m variaram 40% (Figura 21). De notar que o valor máximo observado para os parâmetros nas culturas de *Scenedesmus* sp.1, verificou-se no quarto dia.

Comparando as duas espécies em estudo, foi observado em *A.fusiformis* valores maiores de $rETR_{max}$ (442) a uma intensidade de luz saturante (E_k) de $689 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

(Tabela 7). Registrou-se para α o mesmo valor máximo de 0,69 nas duas espécies. O menor valor para este parâmetro foi obtido no final do cultivo de *Scenedesmus* sp.1. Relativamente à eficiência quântica do PSII, observaram-se valores superiores para *Scenedesmus* sp.1.

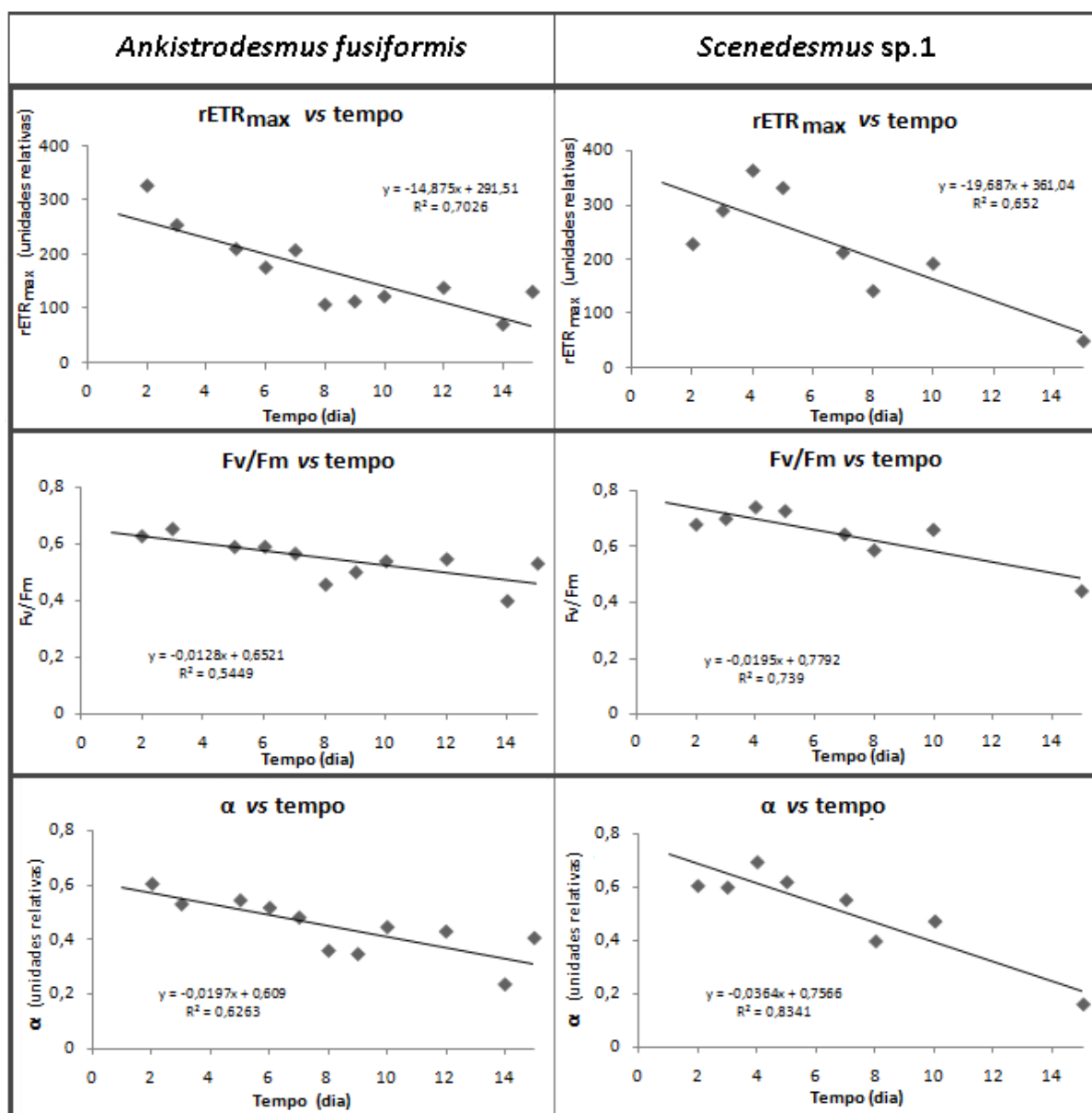


Figura 20- Valores médios dos parâmetros fotossintéticos obtidos das curvas P-E conseguidas através do fluorómetro PAM. rETR_{max} – taxa relativa máxima de transferência de electrões; Fv/Fm – eficiência quântica máxima do fotossistema II; α – coeficiente máximo de utilização da luz (declive inicial da curva).

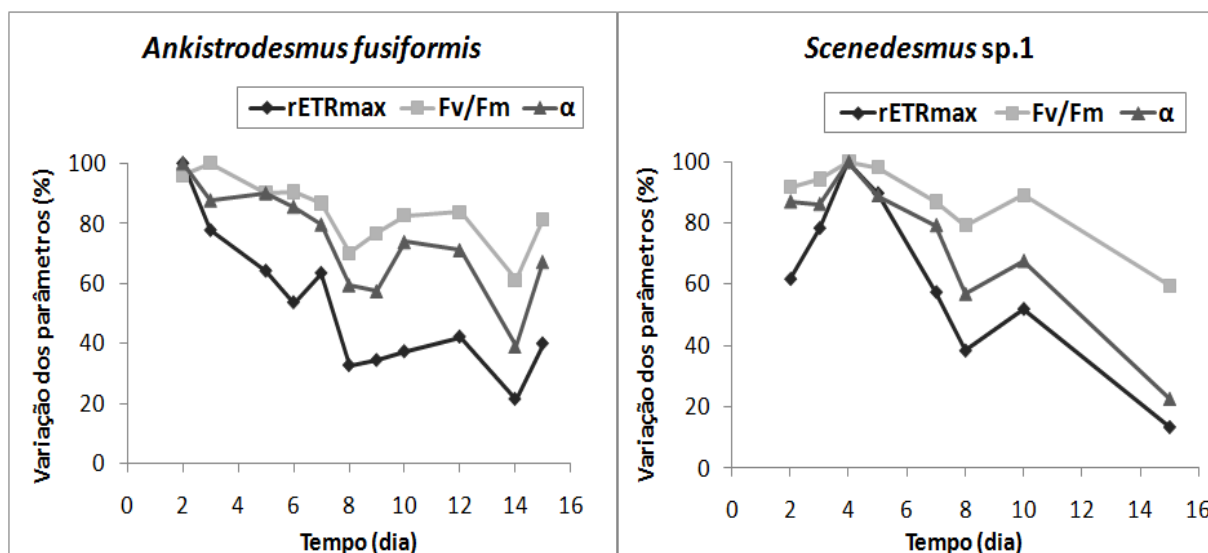


Figura 21 – Valores médios de variação dos parâmetros fotossintéticos rETR_{max}, Fv/Fm e α ao longo dos dias de cultivo das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus sp.1*.

Tabela 7- Valores máximos (Máx) e mínimos (Mín) registados para os parâmetros fotossintéticos nas duas algas verdes.

Parâmetro fotossintético	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	<i>Scenedesmus sp.1</i>
	Máx- Mín	Máx- Mín
rETR _{max}	442– 52	378– 48
Fv/Fm	0,69 - 0,33	0,74– 0,43
E _k	689 - 125	592– 132
α	0,69 – 0,21	0,69– 0,10

Através de fluorescência, com auxílio do PAM (pulse-amplitude-modulation), é possível determinar de uma forma rápida, simples e não invasiva, o estado fisiológico das microalgas (Schreiber *et al.*, 2000). Os resultados dos parâmetros fotossintéticos medidos com o PAM encontram-se expressos em unidades relativas, porque para estimar valores absolutos seria preciso calcular outra variável, i.e. coeficiente de absorção das antenas fotossintéticas (“*cross absorption coefficient*”).

Durante o cultivo das duas espécies de algas verdes, observou-se variação dos parâmetros rETR_{max}, α , Fv/Fm, mas com tendência a diminuir com os dias, tal como seria de esperar em culturas em regime *batch* em que os nutrientes começam a escassear. Durante o crescimento das microalgas em regime *batch* ocorre uma progressiva transição de condições com elevada luminosidade para condições de baixa luz, pelo que as microalgas exibem características de aclimação a elevada luz e posteriormente a baixa luz (Grobellar *et al.*,

1996; Sakshaug *et al.*, 1997). Visto isto, é expectável a variabilidade dos parâmetros fotossintéticos durante o cultivo de *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1. À medida que o crescimento das microalgas continuou sob agitação, as células foram progressivamente sujeitas a modulações luz/escuro, desde modulações iniciais ligeiras a ciclos de luz/escuro até condições em que o período de escuridão se tornou mais longo que o período de luminosidade. Nestas condições, os parâmetros $rETR_{max}$, α e Fv/Fm foram diminuindo. A variação máxima de Fv/Fm ao longo dos dias de cultivo foi semelhante nas duas clorófitas. No entanto, observou-se um decréscimo maior de $rETR_{max}$ e α em *Scenedesmus* sp.1, isto porque, as culturas desta espécie se tornaram mais escuras tornando menor a penetração da luz. Segundo Schenk *et al.* (2008), culturas de algas cuja coloração é verde escura possuem grandes complexos de antena do fotossistema II (LHCII), de forma a compensar a reduzida penetração da luz durante cultivo em fotobioreactores e aumentar α e $rETR_{max}$.

Os valores máximos de Fv/Fm (Tabela 7), observados no início do cultivo das duas espécies, encontram-se de acordo com a constatação de que nas algas verdes o parâmetro Fv/Fm varia de 0,65 a 0,80 (Schreiber *et al.*, 2000). Registaram-se valores máximo e mínimo de Fv/Fm para *Scenedesmus* sp.1 mais elevados do que para *A.fusiformis*. Masojídek *et al.* (1999, 2004) constatou que valores de Fv/Fm diminuem quando as culturas de microalgas estiveram sujeitas a elevada irradiância. Esta observação sustenta o facto de se terem registado valores mais elevados deste parâmetro em *Scenedesmus* sp.1, visto que as culturas possuíram uma maior concentração celular, o que significa que as células tiveram uma menor exposição à luminosidade comparativamente a *A.fusiformis*. Deste modo, Fv/Fm tem sido assumida como um índice de fotoinibição (β) (Vonshak & Torzillo, 2004) e segundo Genty *et al.* (1989), a diminuição de Fv/Fm pode estar correlacionada com a redução na eficiência quântica da evolução do oxigénio ou da fixação de carbono. A redução de Fv/Fm também pode ser resultado de stress em nutrientes. Vários trabalhos apontam o stress de nutrientes como a principal fonte de decréscimo de Fv/Fm (*e.g.* Parkhill *et al.*, 2001). No estudo levado a cabo por Parkhill *et al.* (2001) verificou-se que sob condições de deficiência em nutrientes (como ocorre em culturas *batch*), Fv/Fm diminuía, reflectindo o grau de stress de nutrientes.

Relativamente aos valores máximos observados para $rETR_{max}$, valores superiores foram obtidos para *A.fusiformis*. Uma hipótese que poderá justificar estes valores, corresponde à melhor penetração da luz nestas culturas, que tal como Schenk *et al.* (2008) verifica, culturas com uma coloração verde claro vivo parecem possuir pequenos LHCII e uma melhor penetração da luz. Estes autores consideram vantajoso a utilização de espécies com pequenos LHCII na produção de biodiesel. Segundo Vonshak & Torzillo (2004), o

pequeno tamanho da antena pode ser obtido através da aclimação de células a elevada luminosidade em laboratório. Paralelamente a isto, E_k pode ser um conveniente indicador do estado de fotoaclimação (Sakshaug *et al.*, 1997). Observando os valores obtidos para este parâmetro fotossintético, conclui-se que *A.fusiformis* teve uma maior amplitude de variação quando analisando o valor máximo e mínimo registado, *i.e.* foi mais susceptível de fotoaclimação.

A análise realizada com o auxílio do PAM permitiu acompanhar o estado fisiológico das microalgas em estudo e embora não se tenham verificado grandes diferenças nas duas microalgas entre os resultados obtidos para $rETR_{max}$, α e F_v/F_m , pode se concluir que, quando perspectivando a produção lipídica na fase estacionária do crescimento, *A.fusiformis* poderá ser uma espécie mais útil para crescer em laboratório, uma vez que ocorre menor diminuição de $rETR_{max}$ e α durante o crescimento desta espécie comparativamente a *Scenedesmus* sp.1.

3.4.2 Medição da Produção Fotossintética

A medição da produção fotossintética das culturas foi efectuada através da utilização de dois métodos, o método do carbono 14 e o método do oxigénio. Ambos pressupõem a medição do carbono incorporado ou do oxigénio produzido em recipientes de volume fixo, ao fim de um determinado tempo de incubação, sob condições de luz e temperatura controladas.

Para a incubação das amostras, foi necessário proceder à diluição das amostras, dado que os níveis de concentração celular das culturas, além de causarem auto-ensombramento, são muito superiores às concentrações celulares do fitoplâncton para as quais estas metodologias são normalmente aplicadas. Assim, para *A.fusiformis* fez-se uma diluição de 1:6 e de 1:5, para o método de oxigénio (cultura A9) e de carbono (cultura A8), respectivamente. Para *Scenedesmus* sp.1 fez-se uma diluição de 1:6 e de 1:7, para o método de oxigénio (cultura S5) e de carbono (cultura S6), respectivamente. As diluições foram efectuadas com a adição de água destilada.

Os resultados, das culturas diluídas utilizadas na determinação da produtividade primária, relativos ao peso seco, à concentração de clorofila *a*, ao número de células por mililitro e às razões da concentração de clorofila *a* por peso seco, concentração de clorofila *a* por célula e número de células por peso seco, são apresentados na Tabela 8. O método de Winkler e do ^{14}C foram apenas executados uma vez para cada espécie, em culturas que se encontravam na fase exponencial do crescimento.

Tabela 8- Características da biomassa de cada cultura utilizada nos dias em que foram efectuadas as medições com o método de oxigénio e o método do ^{14}C , nas duas microalgas em estudo. A concentração da Chl *a* corresponde à determinada pela equação de Jeffrey & Humphrey (1975).

<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>						
	Peso seco (Ps) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Células (Cél ml^{-1})	Chl <i>a</i> Ps $^{-1}$ ($\mu\text{g Chla mg}^{-1}$)	Chl <i>a</i> Cél $^{-1}$ ($\mu\text{g Chla Cél}^{-1}$)	Cél Ps $^{-1}$ ($\text{Cél } \mu\text{g}^{-1}$)
Método de O ₂	58,33	0,24	$9,2 \times 10^5$	4,11	$2,61 \times 10^{-7}$	$1,58 \times 10^4$
Método do ^{14}C	54	0,41	$1,3 \times 10^6$	7,59	$3,15 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^4$
<i>Scenedesmus sp.1</i>						
	Peso seco (Ps) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Células (Cél ml^{-1})	Chl <i>a</i> Ps $^{-1}$ ($\mu\text{g Chla mg ps}^{-1}$)	Chl <i>a</i> Cél $^{-1}$ ($\mu\text{g Chla Cél}^{-1}$)	Cél Ps $^{-1}$ ($\text{Cél } \mu\text{g}^{-1}$)
Método de O ₂	43,33	0,42	$2,0 \times 10^6$	9,69	$2,10 \times 10^{-7}$	$4,62 \times 10^4$
Método do ^{14}C	45,71	0,34	$1,4 \times 10^6$	7,44	$2,43 \times 10^{-7}$	$3,06 \times 10^4$

A relação fotossíntese - luz (P-E) obtida para as duas espécies através do método de oxigénio encontra-se representada na Figura 22a, b. Observou-se que as duas espécies obtiveram o valor máximo de produção perto dos $100 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os resultados conseguidos para *A.fusiformis* e *Scenedesmus sp.1* foram semelhantes em todos os parâmetros fotossintéticos determinados. *Scenedesmus sp.1* possuiu uma maior produtividade líquida (PPL) ($75 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e *A.fusiformis* uma maior produtividade bruta (PPB), dado que a maior taxa de respiração foi evidenciada nesta última espécie ($R = -24,7 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Quando determinada a capacidade fotossintética por clorofila *a* ($P^{\text{B}}_{\text{máx}}$, $\mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chla})^{-1}\text{h}^{-1}$) verificou-se que o valor mais elevado foi observado em *Scenedesmus sp.1* a uma menor intensidade de luz saturante (Tabela 10). A taxa de respiração normalizada para a clorofila *a* (R^{B}) foi de $-8,3$ e $-5,2 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chla})^{-1} \text{ h}^{-1}$ para *A.fusiformis* e *Scenedesmus sp.1*, respectivamente. Para *Scenedesmus sp.1*, intensidades luminosas a partir de $100 \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foram excessivamente elevadas, causando fotoinibição. Este fenómeno foi menos evidente em *A.fusiformis*.

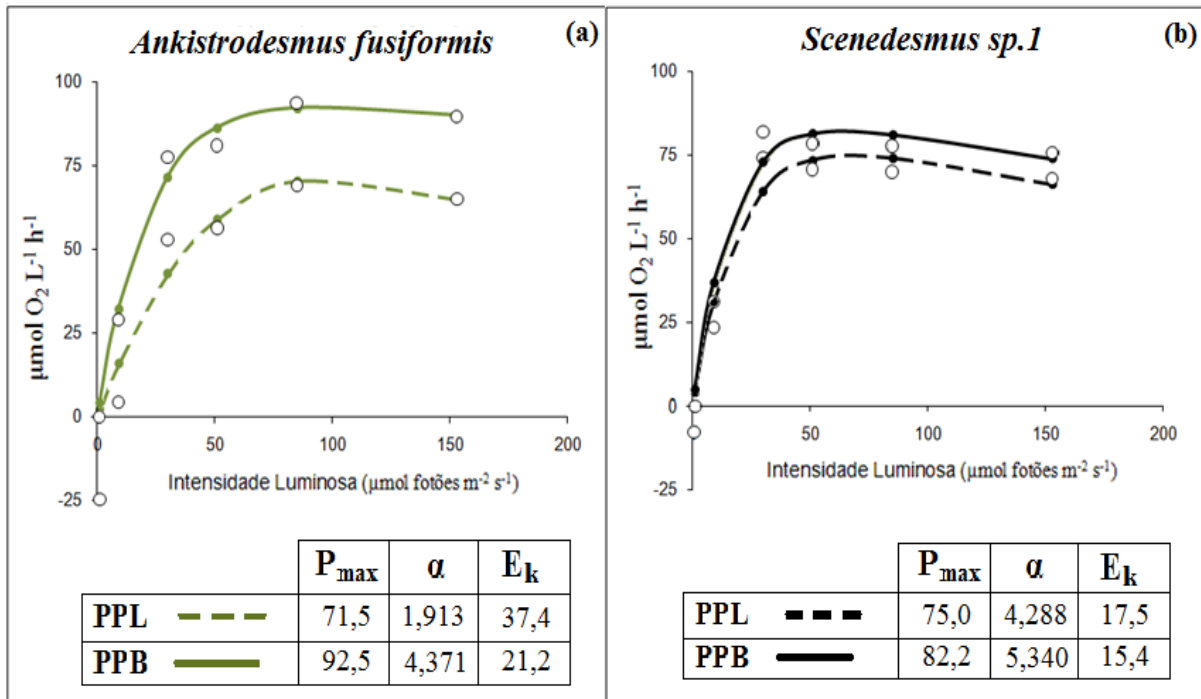


Figura 22- Curvas P-E obtidas para a cultura de *Ankistrodesmus fusiformis* (a) e de *Scenedesmus sp.1* (b) através da medição do oxigênio dissolvido em amostras submetidas a incubação a diferentes intensidades luminosas. Ambos os gráficos possuem os valores obtidos para os parâmetros fotossintéticos. Duas curvas são apresentadas: uma referente à produtividade primária líquida determinada (PPL, linha a tracejado) e a outra à produtividade primária bruta (PPB, linha contínua).

Para o cálculo da taxa da produção primária com o método do ^{14}C foi necessário determinar a massa do carbono inorgânico dissolvido total (W) presente nas amostras a analisar. Para isto, foi imprescindível a determinação do pH, da alcalinidade do carbonato (Alc) e do carbono inorgânico dissolvido total (C_{total}) (Tabela 9). As curvas P-E das duas clorófitas mostram resultados semelhantes para os parâmetros fotossintéticos (Figura 23). Uma maior produção primária foi evidenciada em *A.fusiformis*, correspondendo o seu valor máximo a $944,5 \text{ mg C m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ($=78,7 \text{ } \mu\text{mol C L}^{-1}\text{h}^{-1}$) a uma intensidade luminosa de aproximadamente $150 \text{ } \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Quanto a *Scenedesmus sp.1*, o P_{max} correspondeu a $798,7 \text{ mg C m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ($= 66,6 \text{ } \mu\text{mol C L}^{-1}\text{h}^{-1}$) alcançada perto dos $100 \text{ } \mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Contudo, a capacidade fotossintética por unidade de biomassa ($P_{max}^B, \text{ } \mu\text{mol C (mg Chl}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1}$) determinada foi mais elevada para *Scenedesmus sp.1* (Tabela 10).

Tabela 9- Valores determinados de pH , alcalinidade do carbonato (Alc), do carbono inorgânico dissolvido total (C_{total}) e da massa do carbono inorgânico dissolvido total (W), para as duas clorófitas em estudo.

Espécie	pH	Alc (meq L ⁻¹)	C_{total} (meq L ⁻¹)	W (mg C m ⁻³)
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	7,2	1,5	1,6	19,6
<i>Scenedesmus sp.1</i>	9,6	1,3	1,2	14,2

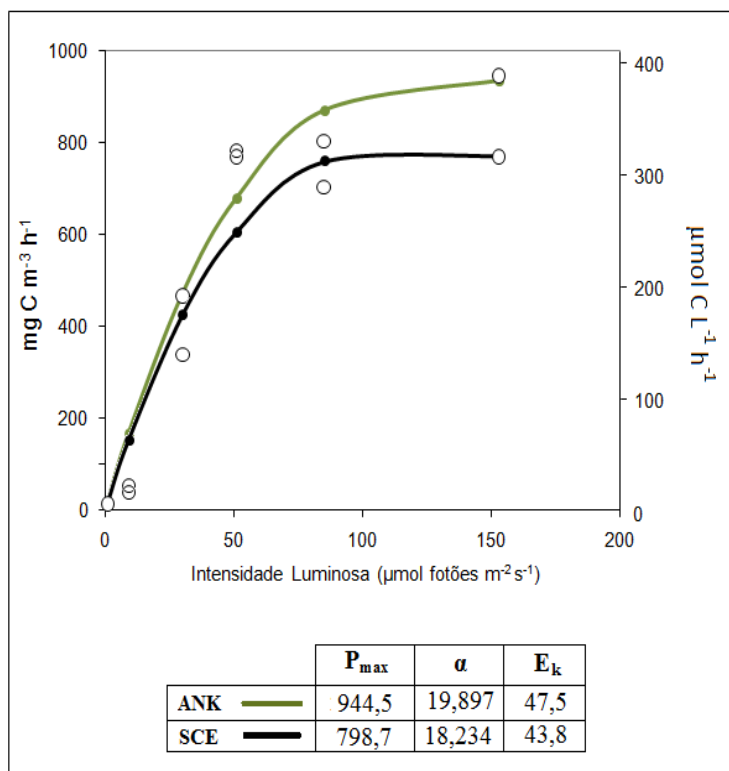


Figura 23 – Relação da taxa fotossintética, conseguida pelo método de ¹⁴C, e a intensidade luminosa para *Ankistrodesmus fusiformis* (ANK) e *Scenedesmus sp.1* (SCE). Os resultados podem ser interpretados em mg C m⁻³ h⁻¹ ou em μmol C L⁻¹ h⁻¹.

A legenda apresenta os parâmetros fotossintéticos determinados com os resultados nas unidades mg C m⁻³ h⁻¹.

Tabela 10- Valores determinados para produtividade máxima normalizada para Clorofila *a* (P_{max}^B , μmol O₂ ou C (mg Chl*a*)⁻¹h⁻¹) e restantes parâmetros fotossintéticos passíveis de determinação com o modelo utilizado de Platt *et al.* (1980). Apresentação dos resultados das duas metodologias efectuadas.

Parâmetros fotossintéticos e respectivas unidades		<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>			<i>Scenedesmus sp.1</i>		
		Método de Winkler		Método do ¹⁴ C	Método de Winkler		Método do ¹⁴ C
		PPL	PPB		PPL	PPB	
P_{max}^B	μmol O ₂ ou μmol C (mg Chl <i>a</i>) ⁻¹ h ⁻¹	24,0	31,0	165,5	52,0	57,0	225,4
α^B	μmol O ₂ ou μmol C (mg Chl <i>a</i>) ⁻¹ h ⁻¹ (μmol fotões m ⁻² s ⁻¹) ⁻¹	0,642	1,464	3,431	2,972	3,702	5,048
E_k	μmol fotões m ⁻² s ⁻¹	37,3	21,2	48,2	17,5	15,4	44,7

Ao estabelecer uma relação linear entre os resultados obtidos pelo método de oxigénio e pelo método de Winkler, observou-se que esta é altamente significativa, nomeadamente em *A.fusiformis* (Figura 24). O coeficiente fotossintético determinado foi 0,21 e 0,16 para *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, respectivamente.

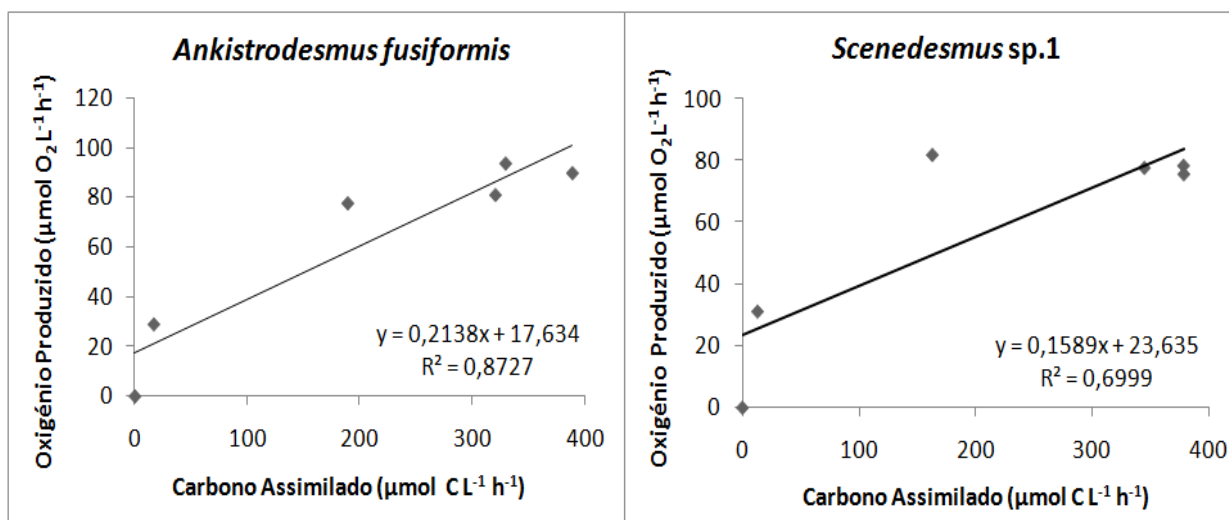


Figura 24 – Relação linear entre os resultados obtidos com o método de Winkler e com o método do ^{14}C . Nota: o declive da equação da recta representa o coeficiente fotossintético.

Nas curvas P-E registadas com os resultados obtidos pelo método de oxigénio para as duas espécies, observaram-se valores muito semelhantes para os parâmetros fotossintéticos P_{max} , α e E_k . Maior produtividade líquida foi obtida em *Scenedesmus* sp.1 e evidenciou-se fotoinibição nas curvas P-E. Por outro lado, uma maior respiração foi evidenciada em *A.fusiformis*, o que conduziu à determinação de valores mais elevados para a produção primária bruta. Segundo Grobbelaar *et al.* (1996) as células aclimatadas a elevada luz possuem elevadas taxas de respiração no escuro. Deste modo, a observação de uma maior taxa de respiração em *A.fusiformis* sugere que a cultura analisada desta espécie estava mais aclimatada à luz presente no cultivo. Esta conclusão corrobora com o que foi concluído no tópico 3.4.1 e com o facto de se observar fotoinibição nas curvas P-E de *Scenedesmus* sp.1 e não em *A.fusiformis*. Aquando da determinação dos valores obtidos pelo método de oxigénio normalizados para clorofila *a*, também foi observado um $P_{\text{max}}^{\text{B}}$ mais elevado para *Scenedesmus* sp.1 a uma intensidade de luz saturante muito reduzida ($17,5 \mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$), obtendo-se um valor para α^{B} muito mais elevado nesta espécie, comparativamente a *A.fusiformis*. Isto sugere que sob baixa irradiância, os valores mais elevados de α^{B} registados

em *Scenedesmus* sp.1 ocorreram de forma a melhorar a eficiência de utilização da luz, tal como é constatado em Dubinsky & Stambler (2009).

Ao analisar os resultados conseguidos através do método do ^{14}C , observa-se um valor mais elevado de produtividade em *A.fusiformis* (cultura A8) ($944,5 \text{ mg C m}^{-3}\text{h}^{-1} = 0,9 \text{ mg C L}^{-1}\text{h}^{-1}$) a uma E_k e α mais elevados. Mas quando avaliando a capacidade fotossintética das duas espécies, observou-se um valor mais elevado em *Scenedesmus* sp.1 ($P_{\text{max}}^{\text{B}} = 225,4 \text{ } \mu\text{mol C (mg Chla)}^{-1}\text{h}^{-1}$) do que em *A.fusiformis* ($165,5 \text{ } \mu\text{mol C (mg Chla)}^{-1}\text{h}^{-1}$). A ocorrência de amortecimento não-fotoquímico pelos pigmentos fotoprotectivos em *A.fusiformis* constitui uma hipótese para a observação da diminuição de α^{B} e $P_{\text{max}}^{\text{B}}$ e o aumento de E_k (Sakshaug *et al.*, 1997). Para a determinação das taxas de produtividade primária foi necessário medir o pH das culturas das clorófitas. O pH registado para *A.fusiformis* já tinha sido antes verificado em estudos como o de Thomas *et al.* (1984) e o de Tadros (1985). Quanto ao pH mais elevado medido em *Scenedesmus* sp.1, este pode ser efectivamente verificado em espécies deste género, tal como *S.quadricauda*, que possui grande potencial para crescer acima de pH 8. Isto sugere uma maior eficiência de utilização de iões HCO^{-3} como fonte de carbono para a fotossíntese (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Durante as poucas horas de incubação das amostras, é expectável a alcalinidade não se alterar, mas o pH pode sofrer variações (Vollenweider, 1974).

As taxas fotossintéticas obtidas através do método de Winkler e do método de ^{14}C foram reconciliadas com a determinação do coeficiente fotossintético (razão molar entre o oxigénio produzido e o carbono assimilado). Nas duas clorófitas, evidenciaram-se taxas fotossintéticas mais elevadas quando utilizando o método do ^{14}C , levando a coeficientes fotossintéticos baixos (Figura 24) comparativamente aos valores que geralmente se verificam em culturas de algas (Vollenweider, 1974; Williams & Robertson, 1991). De facto, o método de oxigénio e do ^{14}C medem a taxa de diferentes reacções e isto nem sempre leva a resultados concordantes, tal como é constatado em alguns trabalhos (*e.g.* Williams *et al.*, 1979; Andersen & Sand-Jensen, 1980; Williams & Robertson, 1991). Não existe muita literatura em que se façam comparações entre a tomada de ^{14}C com a fotossíntese bruta e líquida medida pela evolução de oxigénio, e existe muita incerteza sobre o que realmente é determinado com a utilização do método de Steemann Nielsen (1952) (Williams *et al.*, 2002; Staehr & Birkeland, 2006; Beardall *et al.*, 2009). Autores como Williams *et al.* (2002) e Andersen (2005) consideram que a assimilação de ^{14}C se aproxima da fotossíntese bruta quando as incubações são curtas. Quando as incubações são mais longas (24 horas), a fotossíntese está mais próxima da líquida. Visto isto, os resultados obtidos da assimilação de ^{14}C neste trabalho, em que o

tempo da incubação esteve entre as 2 e as 3 horas, representaram a produtividade primária bruta. Como tal, na determinação do coeficiente fotossintético (PQ) também se utilizou a produção primária bruta medida pelo método de Winkler.

Portanto, nas duas clorófitas, valores muito mais elevados foram registados com o método do ^{14}C relativamente ao método de oxigénio, determinando-se um valor baixo para o coeficiente fotossintético, o que indica que talvez tenha ocorrido uma sobrestimação da taxa de assimilação de carbono e/ou subestimação do oxigénio produzido. Segundo Williams & Robertson (1991) a subestimação da produção primária bruta determinada pelo método de oxigénio pode ser causada pelo aumento da respiração induzida pela irradiância. Isto devido à ocorrência de reacções de Mehler, reacções oxigenase da RUBPc (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase) (Falkowski & Raven, 1997; Hancke *et al.*, 2008). A possibilidade de aumento de temperatura, associado com elevada irradiância, também poderá ter levado à subestimação da taxa de produção de oxigénio, tal como é verificado no estudo de Hancke *et al.* (2008). Uma outra fonte de erro muito comum no método de Winkler corresponde à presença de ar ou bolhas de oxigénio dentro dos frascos (Vollenweider, 1974). Quanto aos resultados respectivos à taxa de carbono assimilado, o método do ^{14}C é muito sensível, permitindo medir baixa biomassa e tornando-o mais exacto e fidedigno (*e.g.* Irwin, 1991; Williams *et al.*, 2002). Deste modo, uma maior diluição das amostras poderia ter sido realizada. Artefactos associados com as incubações, o impacto de processos metabólicos não directamente relacionados com a fotossíntese (*e.g.* carboxilação) e o pressuposto de que a respiração é equivalente na luz e no escuro, podem ter causado uma possível sobrestimação dos valores de carbono assimilado (Vollenweider, 1974; Sakshaug *et al.*, 1997).

Na actividade resultante no final da experiência também é necessário ter em conta os nutrientes presentes. Vários estudos concluíram que quando a fonte de azoto é nitrato, os valores de PQ obtidos são superiores aos determinados quando a fonte é a amónia (*e.g.* Williams *et al.*, 1979; Irwin, 1991). Também valores de PQ podem ser mais elevados segundo a concentração de azoto presente (Andersen & Sand-jensen, 1980). Posto isto, o aumento da razão C:N leva à diminuição de PQ, tal como é constatado por Williams *et al.* (1979). Esta pode constituir uma hipótese para os resultados de produtividade primária observados em *A.fusififormis* e *Scenedesmus* sp.1.

Resumidamente, observou-se uma maior capacidade fotossintética em *Scenedesmus* sp.1, quer quando analisando os resultados obtidos pelo método de Winkler, quer pelo método do ^{14}C . No entanto, esta espécie parece não aclimatar-se a elevada irradiância tão bem quanto *A.fusififormis*, pelo que as curvas P-E de *Scenedesmus* sp1 sugerem uma maior ocorrência de

fotoinibição. Todavia, os resultados obtidos entre as duas clorófitas não foram muito discrepantes e ambos os métodos, Winkler e do ^{14}C , são vulneráveis a erros. Enquanto que o método de Winkler é um método considerado vantajoso na medida que facilmente, bem como rapidamente, pode ser realizado no campo, e permite determinar a produção primária líquida (PPL), a produção primária bruta (PPB) e a respiração, o método ^{14}C é considerado o mais preciso e correcto, levando a resultados mais exactos.

3.5 Produção de lípidos nas microalgas

3.5.1 Conteúdo lipídico total

Os resultados do conteúdo lipídico nas duas espécies em estudo, com a respectiva quantidade de biomassa seca analisada, encontram-se na Tabela 11. A percentagem lipídica total nas duas espécies é semelhante. Assim como entre as fases de crescimento para *Scenedesmus* sp.1. Na fase estacionária, em *A.fusiformis* ocorreu uma maior produção lipídica do que em *Scenedesmus* sp.1, que por sua vez possui um conteúdo lipídico mais elevado na fase exponencial (18,3 %). Visto que o método aplicado está certificado para uma matriz diferente (músculo de peixe) e conseqüentemente, para outras quantidades de biomassa, tornou-se necessária uma quantidade mínima de aproximadamente 400 mg para a análise do conteúdo lipídico. Deste modo, e porque também foi utilizada biomassa para a determinação do perfil de ácidos gordos, não foi possível quantificar os lípidos totais na fase exponencial de *A.fusiformis*. De modo a obter um valor de biomassa susceptível de ser analisado, juntou-se biomassa de dois ou mais replicados, excepto duas culturas (S1 e S2) de *Scenedesmus* sp.1 colhidas na fase estacionária. O conteúdo lipídico total obtido nestas duas culturas foi de 7,4% e 8,7% para S1 e S2, respectivamente.

Tabela 11- Conteúdo lipídico total das clorófitas nas fases de crescimento, presente numa determinada quantidade de biomassa seca, obtida da junção ou não de replicados.

Espécie	Fase do crescimento	Nº de Replicados	Peso da amostra analisada (g)	Lípidos totais (%)
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	Exponencial	-	-	-
	Estacionária	6	0,447	17,1
<i>Scenedesmus sp.1</i>	Exponencial	2	0,429	18,3
		2	0,402	14,9
	Estacionária	1	0,401	7,4
		1	0,405	8,7

Em vários estudos (*e.g.* Lee *et al.*, 1998; Widjaja *et al.*, 2009) é observada uma maior eficácia de extracção com a combinação de metanol e clorofórmio, sendo por isso o método de Bligh & Dyer (1959) o mais frequentemente utilizado. Em *Scenedesmus sp.1*, os valores obtidos são consensuais com a percentagem de lípidos que pode estar presente na composição química de microalgas deste género (Becker, 2004). Na fase estacionária desta espécie, verificou-se uma diferença significativa entre os valores obtidos com apenas um replicado (cultura S1, 7,4%; cultura S2, 8,7%) e o valor determinado pela junção de dois replicados (14,9%). A observação desta diferença é sustentada pelo facto da colheita nas culturas S1 e S2 ter sido realizada quando estas já se encontravam numa fase de declínio do crescimento. Quanto aos resultados obtidos entre as fases do crescimento de *Scenedesmus sp.1*, não se verificou aumento do conteúdo lipídico total na fase estacionária como consta em estudos como o de Piorreck *et al.* (1984), Kilham *et al.* (1997) e Griffiths & Harrison (2009), onde se comprova a acumulação de lípidos em meio com deficiência em azoto em algas verdes (incluindo algumas espécies do género *Scenedesmus* e *Ankistrodesmus*). No entanto, um trabalho mostrou que realmente ocorre diminuição do conteúdo lipídico total na fase estacionária, exactamente na mesma espécie de *Scenedesmus* utilizada neste estudo (Projecto “Microalgas”, resultados não publicados). As clorófitas mostram uma grande variedade de respostas relativamente à deficiência em azoto e a resposta da produtividade da biomassa à limitação em nutrientes varia bastante entre espécies (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Rodolfi *et al.* 2009). Além disto, a deficiência em azoto pode nem sempre resultar num aumento do conteúdo lipídico total mas na alteração da composição lipídica (Borowitzka & Borowitzka, 1988; Hu *et al.*, 2008). Dentro do mesmo género (*e.g.* *Chlorella*) foram

encontradas algumas espécies que acumulavam amido na carência de azoto, enquanto que outras acumulavam lípidos neutros (Hu *et al.*, 2004). Esta pode ser uma hipótese para explicar a diminuição do conteúdo lípido total observado na fase estacionária de *Scenedesmus* sp.1.

Relativamente a *A.fusififormis*, o conteúdo lipídico determinado na fase estacionária apresenta um valor mais baixo do que o obtido no estudo de Ben-Amotz *et al.* (1985) para *Ankistrodesmus* sp., onde se verificou que a deficiência em azoto levou a um aumento de 24,5% a 40,3%. Esta diferença pode ser devida ao facto dos resultados no estudo de Ben-Amotz *et al.* (1985) terem sido obtidos com a indução directa de deficiência em nitrato, enquanto que a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 9 foram de culturas em regime *batch*. Tadros (1985), ao estudar culturas de *Ankistrodesmus* sp. em regime *batch*, verificou que, no 14º dia de cultura, o azoto se encontrava esgotado no meio e que o conteúdo lipídico tinha atingido um valor máximo de 28,1%. Este valor corresponde a um resultado mais próximo do determinado na fase estacionária de *A.fusififormis*. De todos os nutrientes avaliados, a limitação de azoto tem um maior efeito no metabolismo lipídico em algas, e é importante ter em consideração que a produção lipídica numa espécie varia segundo a concentração de azoto no meio de cultura e segundo a resposta da própria espécie em relação à deficiência em azoto (Piorreck *et al.*, 1984; Tadros, 1985; Hu *et al.*, 2008).

A taxa de crescimento e o conteúdo lipídico são dois parâmetros essenciais quando se pretende fazer uma selecção racional de microalgas com elevada produção de lípidos, visando a produção de biodiesel (Griffiths & Harrison, 2009). Neste trabalho não foi possível concluir como o conteúdo lipídico total variava em função da taxa de crescimento das espécies, visto que não foi possível discriminar o conteúdo lipídico total nos vários replicados. Contudo, com os dois valores obtidos para apenas um replicado de *Scenedesmus* sp.1 na fase estacionária, verificou-se que uma maior taxa de crescimento esteve associada a uma maior produção lipídica (Tabela 14). Autores de referência acreditam que a grande demanda metabólica de elevado conteúdo lipídico necessita de taxa de crescimento lento (*e.g.* *Botryococcus* spp.) (Piorreck *et al.*, 1984; Borowitzka & Borowitzka, 1988). Porém, várias microalgas com elevada taxa de crescimento e produtividade conseguem produzir elevados conteúdos lipídicos (Sheehan *et al.*, 1998; Griffiths & Harrison, 2009).

A disponibilidade de nutrientes é apenas um entre vários factores que influenciam o metabolismo de lípidos e ácidos gordos, como exemplo a temperatura e luminosidade (Verma *et al.*, 2010). De forma a melhor compreender o metabolismo lipídico em *A.fusififormis* e *Scenedesmus* sp.1, seria importante num trabalho futuro estudar o efeito destas variáveis no conteúdo lipídico, a composição química das células ao longo do crescimento, bem como o

conhecimento da quantidade de carbono fixado e as quantidades de nutrientes, em especial o azoto e fósforo, presentes no meio de cultura.

3.5.2 Perfil de ácidos gordos na composição do extracto lipídico

Foi determinado o perfil de ácidos gordos na composição do extracto lipídico das culturas das clorófitas e os resultados representam as médias dos valores obtidos em percentagem relativa e em mg/g de peso seco (ps) (Figura 25 e 26). Os resultados obtidos em percentagem relativa de ácidos gordos totais encontram-se de acordo com os obtidos em mg/g de biomassa seca. Porém, na microalga *Scenedesmus* sp.1, observaram-se algumas diferenças entre os resultados, especificamente em C18:2n6, C18:3n3, C18:4n3, Sn3 e Sn6. Verificou-se aumento destes ácidos gordos na fase estacionária quando os resultados estão em mg/g e exactamente o contrário nos valores obtidos em percentagem. Como tal, o valor registado para o total de ésteres metílicos (em mg/g) para *Scenedesmus* sp.1 na fase exponencial foi menor que o determinado na fase estacionária. Quanto a *A.fusiformis*, em ambas as fases o total de ésteres metílicos foi muito aproximado (Figura 27). Maior credibilidade deverá ser dada aos resultados em percentagem relativa de ácidos gordos totais, porque com estes valores são eliminados os erros associados ao peso de amostras e ao padrão interno.

As Figuras 25 e 26 possibilitam observar que para ambas as espécies e nas duas fases de crescimento predominam o ácido palmítico (16:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido α -linolénico (18:3n3). Para as duas microalgas, constatou-se que os valores máximos registados correspondem ao ácido oleico na fase estacionária. Na fase estacionária de *A.fusiformis*, o ácido oleico apresentou uma percentagem relativa de $37,8 \pm 6,9$ e $63 \pm 27,9$ mg/g de biomassa seca. Em *Scenedesmus* sp.1, na fase estacionária, foram observados os seguintes valores para o ácido oleico: $38,2 \pm 2,4$ % e $97,3 \pm 39$ mg/g.

Em *A.fusiformis* foi evidente o aumento da quantidade de C16:0 e C18:1 na fase estacionária. Na fase exponencial desta espécie, foi observada uma maior quantidade de ácidos gordos ómega3 (Sn3) (32,4 %; 58,7 mg/g), devido essencialmente à presença de C18:3n3 e C18:4n3 (ácido estearidónico). Quanto ao somatório de ácidos gordos ómega6 (Sn6), nas duas fases de crescimento, foram observados valores inferiores relativamente a Sn3. Determinaram-se quantidades semelhantes de ácidos gordos ómega6, incluindo sobretudo C18:2n6 (ácido linoleico), na fase exponencial e estacionária. Paralelamente a isto, também foi tida em conta a razão Sn3/Sn6, índice que pode ser considerado para estimar o valor nutricional das microalgas (Sánchez *et al.*, 2000). O maior valor obtido para a razão

Sn3/Sn6 foi registado na fase exponencial de *A.fusiformis* (=6,2). Relativamente à presença de ácidos gordos com mais de 18 carbonos, foram identificadas quantidades muito reduzidas e apenas em algumas culturas. Nas duas fases de crescimento, foram detectados C20:4n3 (ácido eicosatetraenóico) e C22:6n3 (ácido docosaheptaenóico, DHA) em *A.fusiformis*. Na fase estacionária desta microalga foi também possível quantificar C20:5n3 (ácido eicosapentaenóico, EPA) e C22:5n3 (ácido docosapentaenóico), em apenas uma cultura (ver **Tabela 12** em anexo). Ao contrário das restantes culturas de *A.fusiformis*, a cultura A7 foi colhida após 18 dias, de modo a compreender possíveis alterações no conteúdo lipídico. Contudo, a biomassa não foi suficiente para esta análise, pelo que algumas observações podem ser feitas quando analisando o perfil lipídico determinado na cultura A7 e comparando com o obtido nas outras culturas. Verificou-se na cultura A7 a maior quantidade determinada de ácido oleico (45,2 %) e a percentagem de C18:3n3 esteve muito próxima do valor mínimo observado para este ácido gordo (Tabela 13).

Em *Scenedesmus* sp.1 verificou-se o aumento da quantidade de C16:0 e C18:1 na fase estacionária (Figuras 25 e 26). Na fase exponencial desta espécie, foi encontrada uma maior quantidade de ácidos gordos ómega3 (Sn3) (30 %), devido essencialmente à presença de C18:3n3 e C18:4n3, e uma maior quantidade de ácidos gordos ómega 6 (Sn6) (8%), incluindo sobretudo C18:2n6. O maior valor observado para o índice Sn3/Sn6 (=3,7) foi observado na fase exponencial. Ácidos gordos com mais de 18 carbonos foram detectados em *Scenedesmus* sp.1, embora em quantidades quase nulas: C20:4n6 (ácido araquidónico) na fase exponencial (na cultura S2) e na fase estacionária (nas culturas S2 e S8) (ver Tabela 12 em anexo).

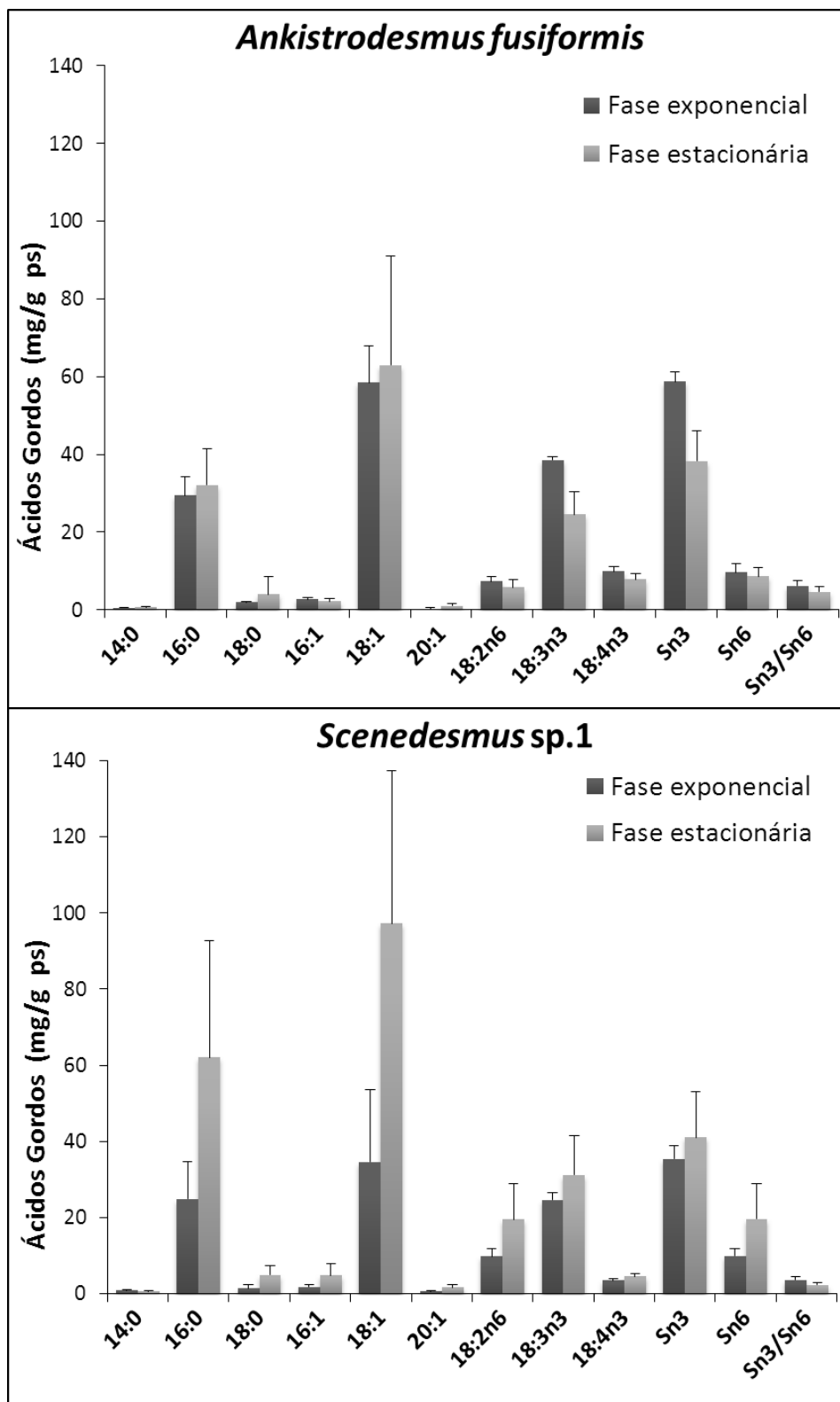


Figura 25 – Perfil de ácidos gordos encontrado nas culturas colhidas na fase exponencial e estacionária das duas clorófitas em estudo. Resultados em mg/g de peso seco. (desvio padrão inerente aos valores médios; n=9 para *A.fusiformis*; n=8 para *Scenedesmus* sp.1; a cultura A1 de *A.fusiformis* não entrou na análise).

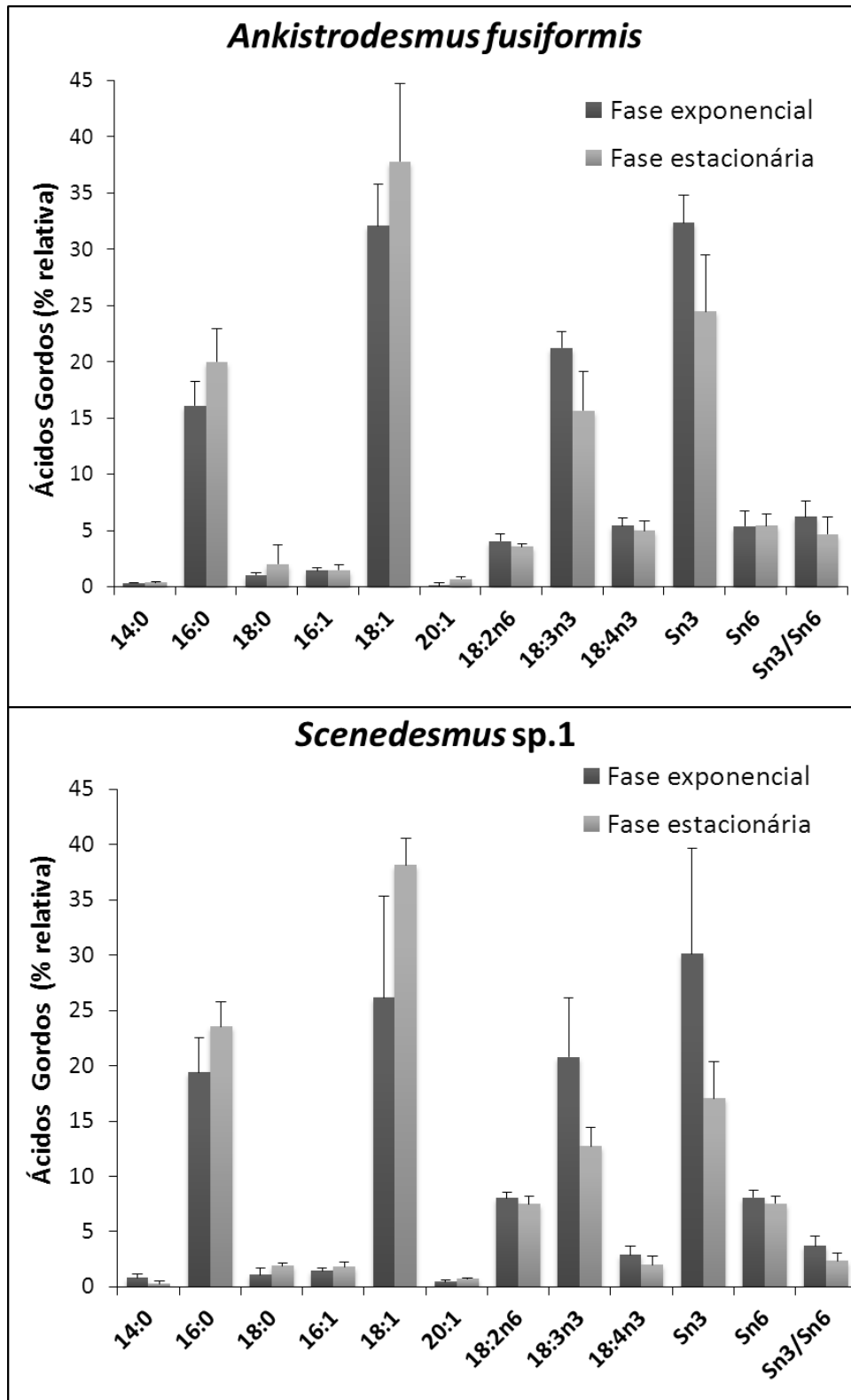


Figura 26 – Perfil de ácidos gordos encontrado nas culturas colhidas na fase exponencial e estacionária das duas clorófitas em estudo. Resultados em percentagem relativa de ácidos gordos. (desvio padrão inerente aos valores médios; n=9 para *A.fusiformis*; n=8 para *Scenedesmus sp.1*; a cultura A1 de *A.fusiformis* não entrou na análise).

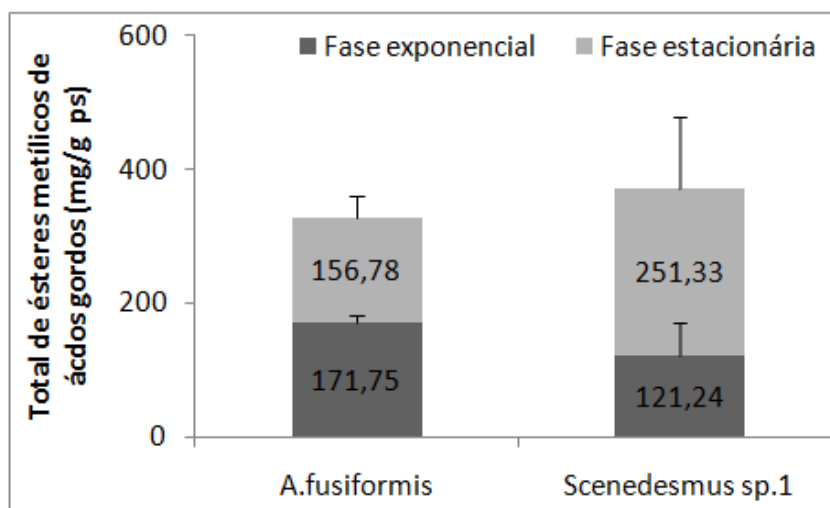


Figura 27- Totalidade de ésteres metílicos de ácidos gordos obtidos nas duas fases de crescimento para *Anastrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus sp.1*.

Tabela 13- Registo da temperatura no dia da colheita das culturas (T, °C), taxa de crescimento ($\text{cel L}^{-1} \text{d}^{-1}$; $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e percentagem relativa dos ácidos gordos predominantes em *Anastrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus sp.1*.

	Cultura	T (°C)	Taxa de crescimento		C16:0	C18:1	C18:3n3
			$\text{cel L}^{-1} \text{d}^{-1}$	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$			
<i>Anastrodesmus fusiformis</i>	A1	27,6	0,84	0,42	-	-	-
	A2	26,9	0,57	0,46	23,45	31,81	14,56
	A3	23,8	0,37	0,30	14,7	27,8	22,9
	A4	23,8	0,38	0,35	18,6	34,3	20,3
	A5	22,1	0,65	0,22	16,6	39,5	14,7
	A6	22,1	0,48	0,24	17,9	40,3	17,4
	A7	24,5	0,78	0,23	18,7	45,2	12,7
	A8	21,3	0,75	0,36	15,1	34,1	20,5
	A9	25,7	0,45	0,59	19,6	42,9	12,6
	A10	25,7	0,44	0,44	23,8	27,1	21,9
<i>Scenedesmus sp.1</i>	S1	24,5	0,74	0,26	25,77	36,83	11,78
	S2	24,5	0,87	0,36	24,98	39,84	11,35
	S3	26,9	0,48	0,41	21,25	31,82	16,54
	S4	26,9	0,48	0,35	18,65	22,44	21,41
	S5	23,8	0,86	0,31	15,3	15,0	28,1
	S6	23,6	0,46	0,41	22,4	35,3	17,1
	S7	24,7	0,41	0,19	20,8	35,5	15,2
	S8	24,7	0,51	0,20	22,6	40,5	12,5

Deste modo, foi possível conhecer que tipo de ácidos gordos predominou na fase exponencial e estacionária do crescimento (Figura 28). Na fase estacionária, em ambas as

espécies, evidencia-se uma maior percentagem relativa de ácidos gordos saturados (SFA, *saturated fatty acids*) e de ácidos gordos mono-insaturados (MUFA, *monounsaturated fatty acids*). Os PUFA são observados em maior quantidade na fase exponencial nas duas clorófitas. Os ácidos gordos ómega 3 altamente insaturados (n3-HUFA, *highly unsaturated fatty acids*) encontraram-se em percentagens vestigiais, sendo detectados na fase exponencial das duas clorófitas mas sobretudo na fase estacionária de *A.fusiformis*. Na fase estacionária de *Scenedesmus* sp.1 não foram detectados n3-HUFA.

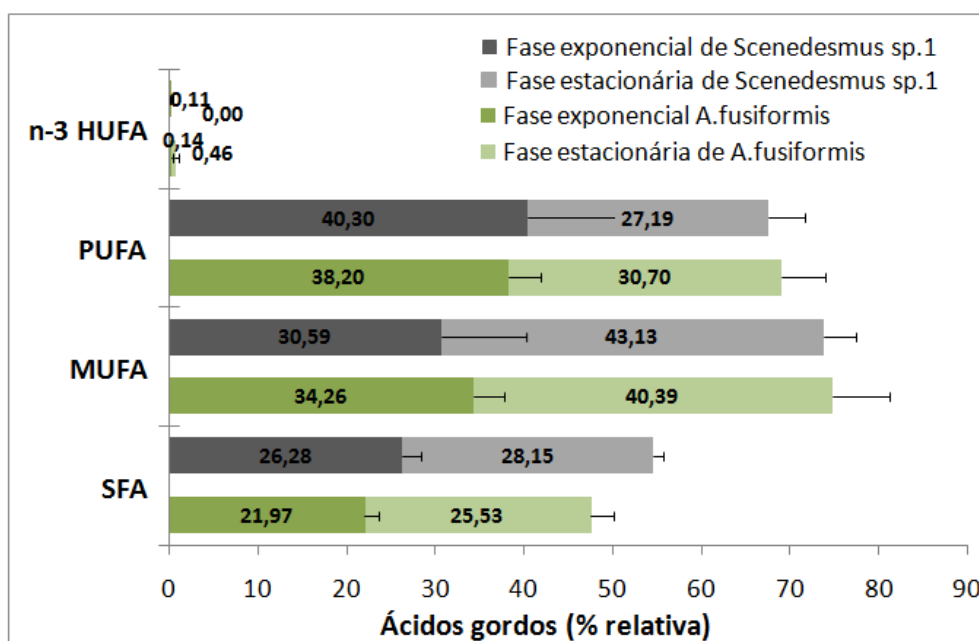


Figura 28- Resultados em percentagem relativa de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poli-insaturados (PUFA) e altamente insaturados da família omega3 (n-3 HUFA), registados nas duas fases de crescimento e em ambas as clorófitas.

Na análise do perfil lipídico das amostras de *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 observou-se a dominância do ácido palmítico (16:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido α -linolénico (18:3n3). O predomínio destes ácidos gordos nas clorófitas em estudo já tinha sido descrito na literatura (*e.g.* Borowitzka & Borowitzka, 1988; Sheehan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009). A presença de C16:0 e C18:1 como constituintes principais destas algas, faz com que estas espécies sejam consideradas adequadas para a produção de biodiesel de grande qualidade conforme mencionado nos trabalhos de Gouveia & Oliveira (2009) e Mandal & Mallick (2009). Porém, interessa dar atenção aos PUFAs encontrados, porque ácidos gordos poli-insaturados com mais de quatro ou cinco ligações duplas são susceptíveis a oxidação durante o armazenamento, reduzindo a aceitabilidade do óleo para a

produção de biodiesel (Chisti, 2007). Deste modo, o facto de se ter observado uma maior quantidade de ácidos gordos ómega 3 invés de ácidos gordos ómega 6, sugere uma vantagem na escolha destas microalgas em estudo para produção de biodiesel, sendo também associado a um maior valor nutritivo. Com a determinação dos resultados do quociente Sn3/Sn6, foi possível verificar que a biomassa *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 produzida em cultura pode ter uma qualidade nutricional aceitável, uma vez que os valores do quociente encontram-se dentro dos considerados aceitáveis (Sánchez *et al.*, 2000). *A.fusiformis* mostrou possuir um valor nutritivo mais elevado que *Scenedesmus* sp.1.

Como verificado neste estudo e constatado por Borowitzka & Borowitzka (1988) e Kilham *et al.* (1997) para as clorófitas, raramente ocorre produção de ácidos gordos com mais de 18 carbonos. A maior produção destes ácidos gordos ocorreu na fase estacionária de *A.fusiformis* e foram ácidos gordos ómega3, sendo por isso verificada uma maior percentagem relativa de n3-HUFA. Na fase exponencial de *Scenedesmus* sp.1 foram determinados principalmente PUFAs, devido às quantidades registadas de C18:3n3, C18:2n6, C18:4n3. Em *A.fusiformis*, na fase exponencial, foi observada uma maior quantidade de PUFAs, embora a percentagem de MUFAs tenha sido muito próxima desta. Na fase estacionária das clorófitas foi evidente a predominância de MUFAs, contribuindo para estes valores a presença sobretudo C18:1, e o aumento de SFAs. Estes resultados encontram-se de acordo com o trabalho de Piorreck *et al.* (1984), em que se evidenciou a produção de grandes quantidades de lípidos polares e PUFAs de C16 e C18 na fase exponencial de algas verdes (entre elas *Scenedesmus obliquus*) e a predominância de ácidos gordos C18:1 e C16:0 na fase estacionária. Outros estudos também verificaram que da transição da fase exponencial para a estacionária resultava o aumento simultâneo das proporções relativas dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados (essencialmente 16:0 e 18:1) e diminuição na proporção dos PUFAs nos lípidos totais (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Hu *et al.* 2008). Quando analisando os resultados da cultura A7 de *A.fusiformis* (cultura colhida no 18º dia de cultivo) observou-se a maior percentagem de C18:1 e a percentagem de C18:3n3 esteve muito próxima do valor mínimo. Estas observações corroboram com o que fora dito anteriormente e com o que é constatado por autores como Piorreck *et al.* (1984) e Ben-Amotz *et al.* (1985), que verificam o aumento de C18:1 com a diminuição de azoto nas culturas.

Em suma, o estudo do perfil lipídico de *A.fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 permitiu verificar um metabolismo lipídico semelhante nestas microalgas. Verificou-se que ambas as espécies possuem uma aceitável qualidade nutricional e do óleo, visando a produção de biodiesel.

Capítulo 4 – Conclusões

O uso de microalgas como fonte de biodiesel adquire grande relevância na medida em que o mundo se confronta com uma crise energética devido à depleção dos recursos finitos do petróleo e outros combustíveis fósseis. A grande vantagem destes microorganismos como matéria-prima na produção de combustíveis renováveis biodegradáveis reside no facto das consequentes emissões de CO₂ corresponderem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa. Para que seja possível a implementação de biodiesel a partir de microalgas no mercado, vários estudos têm que ser realizados no sentido de tornar o cultivo, a colheita e o processamento da biomassa mais rentável. Visando isto, surgiu este trabalho, que se incidiu fundamentalmente no cultivo de duas clorófitas unicelulares promissoras de elevada acumulação de conteúdo lipídico, *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1. A determinação do sequestro de carbono (medição da produtividade primária) e da produção lipídica foram os objectivos principais. Assim, foi avaliado o crescimento, o conteúdo pigmentar e o estado fisiológico das espécies durante o crescimento. Por conseguinte, da presente dissertação, podem ser destacadas as seguintes conclusões:

O cultivo em fotobioreactores fechados das microalgas unicelulares, *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, permitiu uma elevada produtividade da biomassa. Verificou-se, nas duas espécies, satisfatória relação linear entre os métodos de análise do crescimento: contagem celular, leitura da densidade óptica e determinação do peso seco de amostra. A ocorrência de arejamento e agitação durante o cultivo favoreceu o crescimento e foram atingidas elevadas concentrações celulares (principalmente em *Scenedesmus* sp.1), como é evidenciado nas curvas de crescimento. Ao analisar estas curvas, observou-se fase de declínio nas culturas de *Scenedesmus* sp.1. A taxa de crescimento média observada em *A.fusiformis* correspondeu a 0,631 cel ml⁻¹d⁻¹ e a 0,362 g L⁻¹d⁻¹; em *Scenedesmus* sp.1 correspondeu a 0,600 cel ml⁻¹d⁻¹ e a 0,312 g L⁻¹d⁻¹.

Por HPLC confirmou-se a classe taxonómica a que *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 pertencem, verificando-se a presença dos seguintes pigmentos: clorofilas *a* e *b*, neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina e β-caroteno. A clorofila *a*, *b* e a luteína corresponderam aos pigmentos identificados em maior concentração. Em geral, foi

registada maior concentração de pigmentos na fase estacionária do que na fase exponencial. Zeaxantina não foi identificada na fase exponencial de *Scenedesmus* sp.1 e astaxantina verificou-se apenas na fase estacionária das duas espécies. A análise comparativa entre os resultados conseguidos através do espectrofotómetro e por HPLC, permitiu verificar a sobrestimação dos valores das concentrações dos pigmentos quando utilizando o espectrofotómetro. Deverão ser considerados os resultados obtidos por HPLC, uma vez que este método permite separar, identificar e quantificar os pigmentos e seus respectivos produtos de degradação, fornecendo resultados mais fidedignos.

A partir de curvas P-E registadas com o auxílio de PAM e ajustadas com o modelo Platt *et al.* (1980), observou-se durante o crescimento uma diminuição não gradual dos parâmetros fotossintéticos $rETR_{max}$, α e F_v/F_m em *A.fusififormis* e *Scenedesmus* sp.1. Em *Scenedesmus* sp.1 verificou-se um decréscimo maior de $rETR_{max}$ e α , registando-se valores inferiores destes parâmetros nesta espécie. Esta observação corrobora com o facto de ter sido evidenciado apenas nesta espécie uma fase de declínio nas curvas de crescimento nos últimos dias de cultivo. Os valores registados para E_k durante o crescimento mostraram que *A.fusififormis* foi mais susceptível a fotoaclimação. Embora não se tenham verificado grandes diferenças entre os resultados obtidos para $rETR_{max}$, α e F_v/F_m , conclui-se que, quando perspectivando a produção lipídica na fase estacionária do crescimento, *A.fusififormis* poderá ser uma espécie mais útil para crescer em laboratório.

A aplicação das metodologias de determinação da produtividade primária, método de oxigénio e método do ^{14}C , permitiram verificar uma elevada e maior capacidade fotossintética em *Scenedesmus* sp.1, $P_{max}^B = 57 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$ e $225,4 \mu\text{mol C} (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$, comparativamente a *Ankistrodesmus fusiformis*, $P_{max}^B = 31 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$ e $165,5 \mu\text{mol C} (\text{mg Chl}a)^{-1}\text{h}^{-1}$. Em *Scenedesmus* sp.1 foram determinados valores mais elevados para α^B e em *Ankistrodesmus fusiformis*, valores mais elevados para E_k . Porém, os resultados obtidos entre as duas clorófitas não foram muito discrepantes e em ambas as clorófitas foi observado um reduzido PQ, que poderá estar relacionado com vários aspectos associados com as vantagens e desvantagens de cada metodologia.

A produção lipídica de *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 mostrou ser semelhante, quer observando os resultados obtidos para o conteúdo lipídico quer pelo perfil de ácidos gordos da composição do extracto lipídico. Verificou-se em *Ankistrodesmus fusiformis* 17,1% de lípidos totais na fase estacionária; em *Scenedesmus* sp.1 o conteúdo

lipídico total mais elevado observado foi de 18,3% e 14,9% na fase exponencial e na fase estacionária, respectivamente. Estes resultados mostram-se inferiores aos observados noutros estudos, mas muito permanece por ser compreendido acerca da produção lipídica destas espécies, *i.e.*, toda a influência das condições de cultura que possibilite maximizar a produtividade quer em biomassa como em óleo. A análise do perfil de ácidos gordos na composição do extracto lipídico das culturas permitiu observar que nas duas espécies e nas duas fases de crescimento em estudo (exponencial e estacionária) predominavam o ácido palmítico (16:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido α -linolénico (18:3n3). Constatou-se que os valores máximos registados corresponderam a C18:1 na fase estacionária, quer em *Ankistrodesmus fusiformis* ($37,8 \pm 6,9$ %; $63 \pm 27,9$ mg/g ps) quer em *Scenedesmus* sp.1 ($38,2 \pm 2,4$ %; $97,3 \pm 39$ mg/g ps). A presença de C16:0 e C18:1 como constituintes principais destas algas, faz com que estas espécies sejam consideradas adequadas para a produção de biodiesel de grande qualidade. O facto de se ter observado uma maior quantidade de ácidos gordos ómega 3 invés de ácidos gordos ómega 6, também sugere uma vantagem na escolha destas microalgas em estudo para produção de biodiesel, sendo também associado a um maior valor nutritivo (Sn3/Sn6). Verificou-se que ambas as clorófitas possuem valor nutritivo, principalmente *Ankistrodesmus fusiformis*.

Nas condições de cultura em que foram estudadas as clorófitas *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1, verifica-se que as duas microalgas possuem um semelhante potencial para a produção de biodiesel. Porém, quando analisando os resultados relativos à capacidade de assimilação de carbono e os valores obtidos no estudo da produção lipídica, conclui-se que a espécie *Scenedesmus* sp.1 colhida na fase exponencial talvez corresponda a uma melhor opção. Futuramente, mais estudos deverão ser concretizados de forma a compreender melhor o metabolismo lipídico de *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1 e a otimizar as condições de cultura destas microalgas, visando uma maior produção lipídica e um maior sequestro de carbono.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

- Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível online em: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&session=abv4:5D6698611afae063C3VNVIYF6540. Acesso 25/1/2010.
- Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível online em: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44102&session=abv4:5D66EFB8161f22F00BLWQY50DE66. Acesso 25/1/2010.
- Andersen, J.M., Sand-Jensen, K. (1980) Discrepancies between the O₂ and ¹⁴C methods for measuring phytoplankton gross photosynthesis at low light levels. *OIKOS* 35:359-364.
- Andersen, R.A. (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press., London.
- Badger, M. (2003) The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynthesis Research* 77: 83–94.
- Basha, S.A., Gopal, K.R., Jebaraj, S. (2009) A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:1628–1634.
- Becker, W. (2004) Microalgae in Human and Animal Nutrition. *In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Richmond, A.(ed.), 312-351, Blackwell Publishing, Oxford.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. (1985) Chemical profile of selected species of macroalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology*. 21: 72-81.
- Beardall, J., Ihnken, S., Quigg, A. (2009) Gross and Net Primary Production: Closing the Gap between Concepts and Measurements. *Aquatic Microbial Ecology* 56:227-239.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (1988) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press: Cambridge.
- Brotas, V., Plante-Cuny, M.R. (1996) Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins. Choix d'un protocole d'analyse par HPLC. *Oceanologica Acta* 19(6) : 623-633.
- Chisti, Y. (2006) Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering and Management Journal* 5(3): 261-274.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294–306.
- Cohen, Z., Von Shak, A., Richmond, A., (1988) Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *Journal of Phycology* 24: 328-332.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C.Q. (2009) Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of Biotechnology*. 141: 31-41.
- Deng, X., Li, Y., Fei, X. (2009) Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research* 3(13): 1008-1014.
- Dubinsky, Z., Stambler, N. (2009) Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology* 56:163-176.
- Eriksen, N.T. (2008) The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* 30:1525–1536.

- Eonseon, J., Polle, J.E.W., Lee, H.K, Hyun, S.M., Chang, M. (2003) Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(2): 165-174.
- Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., Mackenzie, F.T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V., Steffen, W. (2000) The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science* 290: 291-296.
- Falkowski, P.G., Raven, J. A. (1997) Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science, Oxford.
- Gameiro, C.A.L.P. (2009) Fitoplâncton do estuário do tejo (Portugal): dinâmica sazonal, interanual e produção primária. Tese de Doutorado na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. A. (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation and evolution. *Annual Review of Plant Biology* 56: 99–131.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 269–274.
- Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2000) Algae. Prentice Hall: Upper Saddle River, N.J., USA.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21: 493-507.
- Grobbelaar, J., Nedbal, L., Tichy, V. (1996) Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photo acclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of Applied Phycology* 8: 335–343.
- Guillard, R.R.L. Division rates. (1973) *In*: Stein, Handbook of Phycological Methods. 289-311.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160–186.
- Hancke, K., Hancke, T.B., Olsen, L.M., Johnsen, G., Glud, R.N. (2008) Temperature effects on photosynthesis-light responses measured by O₂ production, Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence and ¹⁴C assimilation. *Journal of Phycology* 44:501-514.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D. (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS* 103(30):11206-11210.
- Hu, Q. (2004) Environmental Effects on Cell Composition. *In*: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Richmond, A.(ed.), 83-93, Blackwell Publishing, Oxford.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-639.
- Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W., Chen, G. (2009) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87(1): 38-46.
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. (2007) CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12: 573-608.
- Irwin, B. (1991) Coulometric measurement of primary production, with comparison against dissolved oxygen and ¹⁴C methods in a seasonal study. *Marine Ecology Progress Series* 71: 97-102.

- IEA, International Energy Agency (2009) CO₂ emissions from fuel combustion Highlights. Disponível online em: <http://www.iea.org/co2highlights/CO2highlights.pdf>. Acesso 20/2/2010.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁, and c₂ in higher plants, algae and Natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167:191-194.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (1997) Phytoplankton pigments in oceanography. Monographs on oceanographic methodology. Unesco publishing.
- Khan, S.A., Rashmi, Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C. (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13: 2361-2372.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Goulden, C.E., Lynn, S.G. (1997) Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38: 591-596.
- Kraay, G.W., Zapata, M., Veldhuis, M.J.W. (1992) Separation of chlorophylls c₁, c₂, and c₃ of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance Liquid Chromatography. *Journal of Phycology* 28: 708-712
- Komárek, J., Fott, B. (1983) Chlorophyceae (Grünalgen). Chlorococcales. In: Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie (Huber-Pestalozzi, ed.). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung 7: 1-1044.
- Lal, R. (2008) Carbon sequestration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:815-830.
- Lee, S.J., Yoon, B.D., Oh, H.M. (1998) Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12: 553-556.
- Lee, R.E. (2008) Phycology, 4th edition. Cambridge University Press.
- Lobban, C.S., Chapman, D.J., Kremer, B. (1988) Experimental Phycology, a laboratory manual. Cambridge University Press.
- Lorenzen, C.J. (1967) Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12: 343 - 346.
- Lorenzen, C.J., Jeffrey, S.W. (1980) Determination of chlorophyll in seawater. Report of intercalibration tests. *Unesco Technical papers in marine science* 35: 21.
- Mandal, S., Mallick, N. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 281-291.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M., Kopecký, J., Bernardini, P., Sacchi, A., Komenda, J. (1999) Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophylls cycle. *Planta* 209:126-135.
- Masojídek, J., Koblížek, M., Torzillo, G. (2004) Photosynthesis in Microalgae. In: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Richmond, A. (ed.), 20-39, Blackwell Publishing, Oxford.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.
- Morais, M.G., Costa, J.A.V. (2007) Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management* 48: 2169-2173.
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.

- Nichols, H.W., Bold, H.C. (1965) *Trichosarcina polymorpha* gen. nov. et sp. nov. *Journal of Phycology* 1: 34-38.
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 957-970.
- Parkhill, J.P., Maillet, G, Cullen J.J. (2001) Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology* 37: 517-529.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. (1984) A manual on chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press.
- Patil, V., Tran, K.Q., Giseirod, H.R. (2008) Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal Molecular Sciences* 9:1188-1195.
- Piorreck, M., K.H. Baasch, Pohl, P. (1984) Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23(2): 207-216.
- Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G. (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687-701.
- Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 287-293.
- Raven, J. (2006). Sensing inorganic carbon: CO₂ and HCO₃⁻. *Biochemical Journal* 396: e5-e7.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., et al. (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(1):100-112.
- Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P.G., Kiefer, D.A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J., Takahashi, M. (1997) Parameters of photosynthesis : definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research* 19 (11): 1637-1670.
- Sánchez, S., Martínez, M.E., Espinola, F. (2000) Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal* 6:13-18.
- Schagerl, M., Pichler, C., Donabaum, K.(2003) Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2. Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales. *Annales de Limnologie- International Journal of Limnology* 39(1):49-62.
- Schreiber, U., Bilger, W., Hormann, H., Neubauer, C. (2000) Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (Raghavendra, A.S. ed), 320-334. Cambridge University Press, U.K.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* 1: 20-43.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998) A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from Algae. *National Renewable Energy Laboratory, Report: NREL/TP-580-24190*.
- Staehr, P.A., Birkeland, M. J. (2006) Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *Phycologia* 45(6): 468-656.
- Stein, J.R., (1973) *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Steemann Nielsen, E. (1952) The use of radio-active carbon (C¹⁴) for measuring organic production in the sea. *Journal du Council Internationale pour l'Exploration de la Mer* 18:117-140.

- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd edition. *Bulletin Fisheries research board of Canada* 167: 1-311.
- Tadros, M.G. (1985) Screening and characterizing oleaginous microalgal species from the southeastern United States. *In: Aquatic Species Program Review: Proceedings of the March 1985 Principal Investigators' Meeting*, Solar Energy Research Institute, Golden, Colorado, SERI/CP- 231-2700.
- Thomas, W.H., Tornabene, T.G., Weissman, J. (1984) Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. SERI/STR-231-2207.
- Tredici, M.R. (2004) Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. *In: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A.(ed.), 178-214, Blackwell Publishing, Oxford.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A., Mishra, B.N. (2010) Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology* 9(10):1402-1411.
- Vollenweider, R.A. (1974) A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook 12, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, London.
- Vonshak, A., Torzillo, G. (2004) Environmental Stress Physiology. *In: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A. (ed.), 57-82, Blackwell Publishing, Oxford.
- Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H. (2009) Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40: 13-20.
- Williams, P.J.LeB, Raine, R.C.T., Bryan, J.R. (1979) Agreement between the ¹⁴C and oxygen methods of measuring phytoplankton production: reassessment of the photosynthetic quotient. *Oceanologica Acta* 2: 411-416.
- Williams, P.J.LeB, Robertson, J.E. (1991) Overall planktonic oxygen and carbon dioxide metabolisms: the problem of reconciling observations and calculations of photosynthetic quotients. *Journal of Plankton Research* 13:153-169.
- Williams P.J.LeB, Thomas, D.N., Reynolds, C.S. (2002) Phytoplankton productivity: carbon assimilation in marine and freshwater ecology. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Wiltshire, K.H., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H. (2000) Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology* 34:119-126.
- Winkler, L. (1888). Die Bestimmung des in Wasser Gelösten Sauerstoffes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 21: 2843–2855.

Tabela 3 – Composição do meio de cultivo BBM (*Bold's Basal Medium*) utilizado para o crescimento de *Ankistrodesmus fusiformis* e *Scenedesmus* sp.1. Nota: a solução de metais vestigiais deve ser autoclavada antes de ser adicionado no meio de cultura.

Retirado de: Nichols, H. W. and Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. Et sp. Nov. J. Phycol. 1: 34-38.

Componentes	Solução Stock (g L⁻¹. dH₂O)	Quantidade usada (ml)
<i>Macronutrientes</i>		
NaNO ₃	25	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.5	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.5	10
K ₂ HPO ₄	7.5	10
KH ₂ PO ₄	17.5	10
NaCl	2.5	10
<i>Solução de Metais vestigiais</i>		1
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44	
MoO ₃	0.71	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57	
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49	
<i>Solução de Boro</i>		1
H ₃ BO ₃	11.42	
<i>Solução alcalina de EDTA</i>		1
EDTA	50	
KOH	31	
<i>Solução ácida de ferro</i>		1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98	
H ₂ SO ₄		1

Tabela 12 – Percentagens relativas de ácidos gordos identificados nas culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* e de *Scenedesmus* sp.1 (-, não detectado; NI, não identificado).

Ácido gordo	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>									<i>Scenedesmus</i> sp.1							
	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
14:0	0,45	0,32	0,35	0,34	0,37	0,37	0,30	0,33	0,57	0,10	0,13	0,38	1,11	1,15	0,49	0,58	0,34
16:0	23,45	14,72	18,55	16,62	17,85	18,67	15,09	19,57	23,81	25,77	24,98	21,25	18,65	15,31	22,42	20,82	22,62
18:0	1,32	0,98	0,98	1,24	1,18	5,45	1,23	2,13	0,86	2,01	2,05	1,51	0,70	0,40	1,62	1,53	1,94
16:1	2,20	1,42	1,69	1,24	1,42	0,98	1,26	1,01	2,00	2,47	1,54	1,57	1,64	1,54	1,04	1,69	1,47
18:1	31,81	27,81	34,31	39,48	40,28	45,22	34,12	42,89	27,06	36,83	39,84	31,82	22,44	15,04	35,29	35,45	40,54
20:1	0,64	0,36	0,00	0,85	0,39	0,51	0,00	1,06	0,64	0,62	0,78	0,60	0,45	0,11	0,53	0,61	0,70
18:2n6	3,91	4,38	3,33	3,45	3,23	3,59	4,51	3,90	3,46	8,05	8,00	7,52	8,30	8,61	7,56	6,50	7,44
18:3n3	14,56	22,91	20,31	14,75	17,37	12,70	20,54	12,63	21,88	11,78	11,35	16,54	21,41	28,08	17,08	15,20	12,53
18:4n3	6,14	5,73	4,70	5,18	4,74	3,95	5,90	4,19	5,87	1,45	1,45	2,47	3,50	3,57	2,03	3,11	2,03
20:4n6 - AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	0,06	0,08
20:4n3	-	0,23	-	0,28	0,25	-	0,18	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20:5n3 - EPA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-
22:5n3	2,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-
22:6n3-DHA	0,94	0,42	-	0,43	-	-	-	0,58	0,55	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn3	24,53	34,95	30,20	23,73	26,57	19,22	31,96	19,90	32,90	15,12	14,50	22,94	30,94	43,32	23,16	21,85	16,58
Sn6	6,12	6,21	3,86	6,15	4,70	4,13	6,08	6,85	4,69	8,05	8,00	7,52	8,30	8,85	7,56	6,55	7,52
Sn3/Sn6	4,02	5,63	7,82	3,86	5,73	4,65	5,28	2,91	7,02	1,88	1,81	3,05	3,73	4,90	3,06	3,33	2,21
Outros SFA	3,69	5,32	3,87	4,54	3,71	2,40	4,18	1,98	2,29	1,76	1,44	4,27	5,86	6,56	3,41	3,89	2,63
Outros MUFA	0,37	0,70	0,43	0,64	0,42	0,47	0,69	0,24	0,52	5,09	4,23	4,19	4,98	0,81	0,29	0,41	0,24
Outros PUFA	6,09	7,92	6,12	6,44	5,86	3,88	7,43	6,04	6,96	3,10	2,68	4,58	6,82	15,23	7,69	7,53	6,43
SFA	28,92	21,35	23,75	22,74	23,11	26,88	20,81	24,01	27,53	29,65	28,60	27,42	26,33	23,42	27,94	26,82	27,53
MUFA	35,02	30,29	36,43	42,21	42,52	47,18	36,07	45,20	30,21	45,00	46,39	38,18	29,51	17,50	37,15	38,17	42,95
PUFA	31,64	41,60	34,45	30,52	31,45	24,12	38,56	27,54	38,94	24,38	23,48	31,12	40,02	55,68	34,37	32,40	28,51
n-3 HUFA	0,94	0,42	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,58	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00
NI	4,42	6,77	5,37	4,53	2,93	1,81	4,57	3,25	3,31	0,96	1,53	3,28	4,14	3,40	0,54	2,61	1,01