



Universidade do Algarve

*Estudo do efeito da salinidade e concentração de ferro
no crescimento e conteúdo lipídico da estirpe de
microalga CTP4*

Ivo José Azevedo Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia
Marinha

Mestrado em Biologia Marinha

Orientadores:

Prof. Doutor João Varela

Prof.^a Doutora Luísa Barreira

Faro, Maio, 2014



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias
Centro de Ciências do Mar (CCMAR)

Estudo do efeito da salinidade e concentração de ferro no crescimento e conteúdo lipídico da estirpe de microalga CTP4

Ivo José Azevedo Monteiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha

Orientadores:

Prof. Doutor João Varela

Prof.^a Doutora Luísa Barreira

Localização:

CCMAR - MarBiotech - Universidade do Algarve,
Campus de Gambelas, 8005-139 Faro – Portugal, Edifício 7

Faro, Maio, 2014

Título: Estudo do efeito da salinidade e concentração de ferro no crescimento e conteúdo lipídico da estirpe CTP4

Autor: Ivo José Azevedo Monteiro

Orientação científica do trabalho: Prof. Doutor João Varela
Prof^a. Doutora Luísa Barreira

Contacto do autor: ivojmonteiro@gmail.com

Local: Faro

Ano: 2014

“Copyright” – Ivo José Azevedo Monteiro, nº 46296, UAlg, FCT

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

O conteúdo desta dissertação de mestrado é da exclusiva responsabilidade deste autor

(Ivo José Azevedo Monteiro)

We are like dwarfs sitting on the shoulders of giants. We see more, and things that are more distant, than they did, not because our sight is superior or because we are taller than they, but because they raise us up, and by their great stature add to ours.

John of Salisbury – Bishop of Chartres (1159)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos Professores João Varela e Luísa Barreira por me terem acolhido no seio do seu grupo de trabalho, pela orientação e conhecimentos transmitidos, bem como afeto e dedicação manifestados para comigo.

Ao Hugo Pereira, por ter sido um mestre, talvez um irmão mais velho, que sem desprimor pelos meus orientadores, o coloco ao mesmo nível. Foi incansável em esforços, mostrou-se sempre disponível e permitiu-me um à-vontade necessário para trabalhar sem constrangimentos.

À Doutora Luísa Custódio, por ser o “quarto” vértice deste “triângulo”, pela sua orientação na parte da biomedicina e, pela sua boa disposição diária.

À Eunice, a minha companheira de aventuras e desventuras, sempre presente, sempre pronto para “irmos”, mesmo desconfiada do sucesso final. Obrigado por tentares ajudar-me a não sair da órbita do racional. É bom partilhar um projeto de vida contigo. Amo-te.

À minha família, sem vocês nada disto teria sido possível, mesmo que por vezes tanto tenha custado, sacrifícios, pequenas coisas, grandes coisas, como no dia em que me foram levar a um sítio novo. Nesse dia muita coisa mudou, sabia que ia perder muitos acontecimentos, vivenciei outros, é verdade, mas não apagam os que perdi, é o anacronismo da vida. A criança cresceu, daqui a pouco vai para a universidade ser “médica” e sinto que não brigámos o suficiente. Amo-vos a todos.

Aos meus “amigos de laboratório”, às Marias, a Carolina e o “Kaktas”, leia-se Doutor Katkam, o melhor químico da Índia no Algarve e um grande Benfiquista.

À que um dia foi conhecida por Lisboa e hoje “apenas” é a Sara, por discutir comigo, pelos momentos partilhados, por ser uma grande amiga.

À dona do Jimbas, ou seja a Catarina, por ter feito comida na sua “machine”, quando uma pessoa estava com fome e, convidar as pessoas para ir trabalhar para sua casa ou seja ver um filme e dormir um bocado no sofá.

À técnica superior Vera Gomes, pela sua amizade e disponibilidade para emprestar “unidades de processamento”, sempre úteis em processos mais complexos e ideias menos claras.

À técnica superior Doutora Cláudia Florindo pela dedicação, conhecimento transmitido, frontalidade e boa disposição contagiante.

Ao técnico superior Doutor André Mozes, pela simpatia e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Aos técnicos superiores Dra. Filomena Rita e Dr. Miguel Madureira, pela simpatia, material disponibilizado e dicas oferecidas.

Aos meus amigos, não só, mas principalmente Diogo, Rúben, Carla, Eva, e ultimamente Catarina. Apesar de alguns destes, “inadvertidamente”, não perderem uma oportunidade para tentarem-me “distrair” enquanto eu “tentava” terminar a escrita da tese.

Resumo

Atualmente, as microalgas são consideradas uma potencial fonte de biomassa para produção de biocombustíveis devido à sua capacidade de acumular grandes quantidades de lípidos, quando submetidas a condições desfavoráveis de crescimento. Estes lípidos podem ser convertidos em biocombustíveis com semelhanças aos derivados do petróleo. Com esta dissertação pretendeu-se estudar a resposta a diferentes condições de cultivo, em termos de expressão lipídica, por parte da estirpe CTP4, uma microalga verde previamente isolada de uma amostra ambiental. As diferentes condições testadas, nomeadamente o aumento da concentração de ferro (0,5 mM), eliminação do ferro do cultivo, aumento da salinidade (75 e 100) e depleção de nutrientes foram aplicadas após a cultura ter atingido a fase estacionária. Os dados obtidos mostraram que apenas a depleção de nutrientes foi efetiva na acumulação de lípidos (20% do peso seco da biomassa). Em termos qualitativos esta biomassa adequa-se à produção de biodiesel devido ao fato da cadeia carbonada dos ácidos gordos ser entre C₁₅-C₂₅. Em relação aos ácidos gordos insaturados, toda eles possuíam cadeias entre C₁₆ a C₁₈, com duas ou menos cadeias duplas. Avaliou-se, como objectivo secundário, a presença de compostos bioativos relacionados com a neuroprotecção, nomeadamente com a capacidade de inibir a butirilcolinesterase e quelar metais (ferro e o cobre). Os melhores resultados foram obtidos à concentração de 10 mg mL⁻¹ com os extratos de hexano e acetato de etilo na atividade quelante do ferro (90%) e cobre (55%), respectivamente. Este conjunto de experiências abre portas a novos ensaios para testar o potencial desta estirpe como fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis e para sua utilização numa biorrefinaria.

Palavras chave: biocombustíveis; depleção de nutrientes; lípidos; microalgas; bioatividades.

Abstract

Currently, microalgae are considered a potential source of biomass for biofuel production because of their ability to accumulate large amounts of lipids, when subjected to unfavorable growing conditions. These lipids can be converted into biofuels with similarities to petroleum derivatives. The purpose of this dissertation is to study the response to different culture conditions, in terms of lipid contents, by the strain CTP4, a green microalga previously isolated from an environmental sample. The different test conditions, namely the increase of iron concentration (0.5 mM) , elimination of iron from the culture, increased salinity (75 and 100) and nutrient depletion were applied after the culture had reached stationary phase. The data showed that only the depletion of nutrients was effective in lipid accumulation (20 % of dry weight). Qualitatively, this biomass is suitable for biodiesel production due to the fact that the carbon chain of the fatty acids lies between C₁₅ - C₂₅. Unsaturated fatty acids corresponded to C₁₆ to C₁₈ molecules with two or fewer double bonds. As a secondary objective, the presence of bioactive compounds related to neuroprotection, in particular the ability to inhibit butyrylcholinesterase and chelating metals (iron and copper) was assessed. The best results were obtained at a concentration of 10 mg mL⁻¹ in hexane and ethyl acetate extracts concerning the chelating activity for iron (90%) and copper (55%), respectively. Taken together, these results open doors to further research for testing the potential of this strain as a source of biomass for biofuel production and its use in a biorefinery.

Keywords: biofuels; nutrient depletion; lipids; microalgae, neuroprotective bioactivity.

Lista de abreviaturas

Ac.	Acetato de etilo
Ace.	Acetona
ACh	<i>Acetylcholine</i> – Acetilcolina
AChE	<i>Acetylcholinesterase</i> – Acetilcolinesterase
Acil-CoA	Acil-coenzima A
ACoAase	Acil-CoA carboxilase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase – 5' adenosina monofosfato-proteína ativada cinase
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> – Adenosina trifosfato
BChE	<i>Butyrylcholinesterase</i> – Butirilcolinesterase
DAG	Diacilglicerol
DAT	<i>Diacylglycerol acyl transferase</i> – Diacilglicerol acil transferase
DIC	<i>Differential interference contrast</i> – Contraste de interferência diferencial
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
DPX	Distyrene plasticizer xylene – Xileno de diestireno plastificante
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> – Ácido etilenodiaminotetraacético
FA	<i>Fatty acid</i> – Ácidos gordos
FAME	<i>Fatty acid methyl ester</i> – Éster metílico de ácidos gordos
FAS	<i>Fatty acid synthase</i> – Sintase de ácidos gordos
FFA	<i>Free fatty acid</i> – Ácidos gordos livres
FITC	Fluorescein isothiocyanate – Isotiocianato de fluoresceína

G-3-P	Glycerol-3-phosphate – glicerol-3-fosfato
G-3-PAT	<i>Cytosolic glycerol-3-phosphate acyl transferase</i> – Gliceraldeído-3-fosfato acil transferase citosólica
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> – Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
Hex.	Hexano
KAS III	<i>3-ketoacyl ACP synthase III</i> – 3-cetoacil ACP sintase III
LEOA	Laboratório experimental de organismos marinhos
LPAAT	<i>Lyso-phosphate acid acyl transferase</i> – Ácido lisofosfatídico acil transferase
MCoA:PTAT	Malonil-CoA:proteína transportadora de acilo transferase
Met.	Metanol
MToe	<i>Million tonne oil equivalente</i> – Milhões de toneladas equivalentes de petróleo
N-	Condição de cultivo iniciada em depleção de nutrientes
n.a.	Não aplicável
n.d.	Não detetado
N-[100]	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes a uma salinidade de 100
N-[75]	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes e uma salinidade de 75
N-[Fe-]	Condição de cultivo iniciada em depleção de nutrientes e ferro quelado
N-[Fe+]	Condição de cultivo iniciada em depleção de nutrientes e ferro a 0,5 mM
N+	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes
N+[100]	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes a uma salinidade de 100

N+[75]	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes e uma salinade de 75
N+[Fe-] quelado	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes e ferro
N+[Fe+]	Condição de cultivo iniciada em repleção de nutrientes e ferro a 0,5 mM
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> – Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina
p.e.	Por exemplo
PAP	<i>Phosphatidic acid phosphatase</i> – Ácido fosfatídico fosfatase
PI	<i>Polarity Index</i> – Índice de polaridade
REL	Retículo endoplasmático liso
sin.	Designações taxonómicas sinónimas
TAG	<i>Triacylglycerol</i> – Triacilglicerol
u.a.	Unidades arbitrárias
VN	Vermelho do Nilo

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Panorama energético mundial	1
1.2 Biocombustíveis	2
1.3 Microalgas	4
1.3.1 Produção de biomassa	9
1.3.2 Lípidos para a produção de biodiesel e biojetfuel	10
1.3.3 Estratégias de valorização de biomassa	15
1.3.4 Extratos bioativos como co-produtos de valor comercial acrescentado (neuroproteção)	17
1.4 Estratégias de otimização da produção de lípidos	19
1.5 CTP4	20
1.6 Objetivos do trabalho	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Material biológico e condições de cultivo	22
2.1.1 Meio de cultura	22
2.1.2 Cultivo da estirpe CTP4	23
2.2 Determinação de taxas de crescimento e produtividade da estirpe CTP4 em termos de biomassa	23
2.2.1 Concentração celular	24
2.2.2 Peso seco	25
2.2.3 Densidade ótica	25

2.3	Stresses e produção de lípidos	26
2.3.1	Determinação de lípidos por gravimetria.....	29
2.3.2	Determinação de lípidos por vermelho do Nilo (VN)	30
2.3.3	Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	31
2.4	Microscopia ótica	34
2.5	Métodos de analíticos de detecção de nutrientes no cultivo	34
2.5.1	Determinação da concentração de nitratos.....	34
2.6	Determinação de bioatividades	35
2.6.1	Recolha e liofilização de biomassa	35
2.6.2	Preparação de extratos	36
2.6.3	Atividade quelante de cobre	36
2.6.4	Atividade quelante de ferro	37
2.6.5	Inibição da butirilcolinesterase	37
2.7	Tratamento estatístico dos dados	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1	Correlação entre os parâmetros de crescimento e a densidade ótica	40
3.2	Correlação entre fluorescência de vermelho do Nilo e conteúdo lipídico	42
3.2.1	Curva de crescimento.....	44
3.2.2	Indução lipídica.....	47
3.2.3	Perfil de ácidos gordos	52
3.3	Deteção de corpos lipídicos por microscopia de fluorescência	56
3.4	Bioatividades	58
3.4.1	Atividade inibitória da atividade da BChE	58
3.4.2	Atividade quelante de metais (cobre e ferro)	60
4	CONCLUSÃO	64
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
6	ANEXOS	I

Índice de figuras

Figura 1.1 Consumo mundial de energia. A) Consumo energético mundial desde 1965 até 2012, em milhões de toneladas de equivalentes de petróleo (MToe). B) Proporção da energia total consumida no ano 2012, por fonte. Adaptado de BP (2013).....	1
Figura 1.2 A célula como produtora de metabolitos passíveis de se transformar em biocombustíveis. A utilização do prefixo bio- antes do nome do produto está ligado à sua proveniência biológica.....	7
Figura 1.3 Métodos e processos para produzir diferentes biocombustíveis a partir de biomassa de microalgas. Os 4 principais processos de conversão de biomassa dividem-se em conversão termoquímica, conversão bioquímica, extração e combustão direta da biomassa seca. Cada um destes processos pode ser conduzido por vários métodos, p.e., transesterificação, e dar origem a diferentes combustíveis p.e., biodiesel.	8
Figura 1.4 Modelos de fotobiorreactores: A) Mangas plásticas (polietileno), cultivo da CTP4 nas instalações do LEOA (fotografia original) B) Fotobiorreator tubular (retirado de www.wageningenur.nl ; 2009).....	10
Figura 1.5 Modelo simplificado da biossíntese de ácidos gordos e TAG em microalgas. FFA - ácidos gordos livres; REL - retículo endoplasmático liso; FAS - sintase de ácidos gordos; ACoAT – acil-CoA carboxilase; MCoAACPT - malonil-CoA:proteína transportadora de acilo transferase; G-3-P - glicerol-3-fosfato; PA – ácido fosfatídico; DAG – Diacilglicerol; LPAAT - ácido liso-fosfatídico acil transferase; PAP - ácido fosfatídico fosfatase; DAT - diacilglicerol acil transferase; GC3FAT - glicerol-3-fosfato acil transferase citosólica e; ACP – proteína transportadora de acilo.....	12
Figura 1.6 Transesterificação dos triacilgliceróis com metanol (adaptado de Fukuda et al. 2001, Chisti, 2007.).	15
Figura 1.7 Exemplo de modelo ideal de biorrefinaria, onde toda a biomassa é valorizada e a energia necessária para os processos envolvidos é obtida a partir do próprio cultivo.....	17
Figura 2.1 Esquema experimental. O cultivo iniciou-se ($\approx 2 \times 10^5$ cel. mL) numa unidade de 4 L durante 11 dias. Após atingir a fase estacionária ($\approx 3 \times 10^6$ cel. mL) a cultura foi dividida por 30 tubos de ensaio, com 10 condições diferentes (N+, N+Fe-, N+Fe+, N+[75], N+[100], N-, N-Fe-, N-Fe+, N-[75], N-[100]) em triplicado, usando-se 80 mL por tubo de ensaio. Cada uma das condições foi preparada em simultâneo e depois dividida pelos 3 replicados. Foram recolhidas amostras (2 mL) todos os dias para medir a DO e a fluorescência do VN para determinar a massa da biomassa e lípidos. Ao 17º dia as culturas (66 mL) foram recolhidas para que a biomassa fosse transesterificada de modo a determinar o perfil lipídico para cada condição.	28
Figura 2.2 Programação da temperatura GS-MS para separação ésteres metílicos. Adaptado de Pereira (2009).....	32
Figura 3.1 Reta de calibração entre a densidade ótica e a concentração celular da estirpe CTP4, nas fases exponencial e estacionária (n = 58; p < 0,001).	40
Figura 3.2 Reta de calibração entre a densidade ótica (750 nm) e o peso seco (mg.L^{-1}) para a estirpe CTP4, nas fases exponencial e estacionária (n = 50; p = 0,001).	41
Figura 3.3 Curva de calibração entre o método colorimétrico de vermelho do Nilo e os lípidos totais da estirpe CTP4, obtidos através do métodos gravimétrico de Bligh & Dyer (1959; n = 20; p < 0,001).	43
Figura 3.4 Curva de crescimento (CC) da estirpe CTP4 em meio Algal sem imposição de stress (n = 3).	45
Figura 3.5 Curvas de crescimento em peso seco da CTP4 e concentração de nitratos no meio de cultura. PS [N-] – Culturas onde os nutrientes foram adicionados apenas no início do cultivo; PS [N+] Culturas em que ocorreu readição de nutrientes ao 11º dia de cultivo; [NO ₃] [N-] Concentração	

de nitratos nas culturas em que não ocorreu readição de nutrientes; [NO ₃] [N+] Concentração de nitratos nas culturas em que ocorreu readição de nutrientes (n = 3).	46
Figura 3.6 Conteúdo lipídico da biomassa por percentagem de lípidos em peso seco (% m. m ⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11º dia do cultivo bifásico, o qual é renomeado como dia 0 (da 2ª fase de cultivo). Condições: (N-) depleção de nutrientes; (N+) readição de nutrientes. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados do mesmo dia, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial (n = 3; p < 0,05).	48
Figura 3.7 Conteúdo lipídico da biomassa por percentagem de lípidos em peso seco (% m. m ⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11º dia. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados das condições N+[Fe-], N+[Fe+], N+[75] e N+[100] em relação ao controlo N+, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial (n = 3; p < 0,05)..	49
Figura 3.8 Conteúdo lipídico da biomassa por percentagem de lípidos em peso seco (% m. m ⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11º dia. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados das condições N-[Fe-], N-[Fe+] N-[75] e N-[100] em relação ao controlo N-, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial (n = 3; p < 0,05).	50
Figura 3.9 Imagens obtidas por microscopia de fluorescência, utilizando o fluorocromo salvatocrómico BODIPY 505/515 para marcar os lípidos em células de CTP4, resultantes das diferentes incubações realizadas durante 17 dias em cultivo bifásico, com imposição das condições N-, N+, [Fe-] N-; [Fe-] N+; [Fe+] N-, [Fe] N+, [75] N-, [75] N+, [100] N-, [100] N+. As imagens em fundo cinzento resultam da imagem combinada do DIC com a fluorescência do BODIPY e as imagens em fundo preto correspondem apenas à fluorescência do BODIPY (barra de escala = 5 µm).	57
Figura 3.10 Atividade quelante de ferro (%) dos extratos de acetona (Ace.), metanol (Met.), acetato de etilo (A.E.) e hexano (Hex. da biomassa cultivada em concentração de ferro alta (0,05 mM) N+ [Fe+], e readição de nutrientes após atingir a fase estacionária N+ e depleção de nutrientes N-. Testados a 3 concentrações diferentes 1, 5, 10 mg. mL ⁻¹ . As letras indicam diferenças significativas entre as condições testadas, para o mesmo extrato e concentração, utilizando o teste de Tukey para p < 0,05 (n = 6). EDTA foi utilizado como controlo positivo.	62
Figura 3.11 Atividade quelante de ferro (%) dos extratos de acetona, metanol, acetato de etilo e hexano da biomassa cultivada em concentração de ferro alta (0,05 mM) N+ [Fe+], depleção de nutrientes N- e readição de nutrientes após atingir a fase estacionária. Testados a 3 concentrações diferentes 1, 5, 10 mg. mL ⁻¹ . As letras indicam diferenças significativas entre as condições testadas, para o mesmo extrato e concentração, utilizando o teste de Tukey para p < 0,05 (n = 6). = 6). EDTA foi utilizado como controlo positivo.	63

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Comparação entre algumas fontes de biodiesel. Adaptado de Demirbas (2011).	4
Tabela 2.1 Constituição da solução-mãe (concentrada 1000 x) do meio de cultura Algal modificado (Pereira, 2009).	22
Tabela 2.2 Rectas de calibração dos ésteres metílicos analisados, respetivo coeficiente de correlação (r ²) e tempo de retenção em GC-MS.	33
Tabela 3.1 Perfil de ácidos gordos das diferentes culturas, após 17 dias de cultivo, em cultivo bifásico, em que as condições foram impostas ao 11º dia. N-, depleção de nutrientes; N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 (n = 3). Os	

<i>resultados a negrito representam diferenças significativas entre os pares de resultados N- E N+ (p < 0,05)</i>	54
Tabela 3.2 <i>Adequação do perfil lipídico para a produção de bioquerosene, após 17 dias de cultivo, em cultivo bifásico, em que as condições foram impostas ao 11º dia. N-, depleção de nutrientes; N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 (n = 3).</i>	55
Tabela 3.3 <i>Atividade inibitória da BChE, para os diferentes extractos condições de cultivo e concentrações (n = 6)</i>	60
Tabela 6.1 <i>Quantidade de biomassa (g. L⁻¹) e lípidos (mg. L⁻¹) produzidos durante a incubação e produtividade média destes parâmetros durante a segunda fase do cultivo, em termos de dias. I</i>	
Tabela 6.2 <i>Conteúdo de lípidos na biomassa em % de lípidos por peso seco, após a imposição de condições de stress em culturas da estirpe CTP4 a qual se iniciou ao dia 11. N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 (n = 3). II</i>	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama energético mundial

Atualmente a problemática associada à procura energética mundial figura entre os temas de maior importância para a comunidade internacional. Com o aumento populacional e o fenómeno da globalização, criou-se uma crescente necessidade energética. Esta é preenchida principalmente por combustíveis fósseis, os quais representam aproximadamente 80% do consumo anual de energia no mundo (Figura 1.1; Demirbas & Demirbas, 2010; European Environmental Agency, 2011; International Energy Agency, 2011). Perspetiva-se, assim, um escalar na competição por estes recursos limitados, caso os padrões atuais de produção e consumo de energia se mantenham (Hannon *et al.*, 2010).

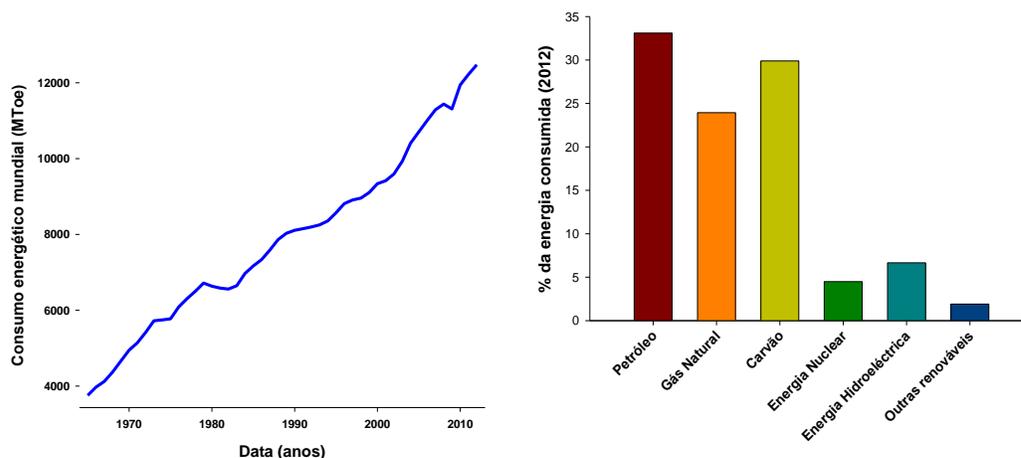


Figura 1.1 Consumo mundial de energia. A) Consumo energético mundial desde 1965 até 2012, em milhões de toneladas de equivalentes de petróleo (MToe). B) Proporção da energia total consumida no ano 2012, por fonte. Adaptado de BP (2013).

Uma das principais preocupações é o setor dos transportes, o qual representa a segunda maior fatia de consumo de energia à escala mundial, sendo este fortemente dependente de combustíveis fósseis líquidos. Estes, formados essencialmente a partir do petróleo (Greene *et al.*, 2006), encontram-se apenas em algumas partes do globo e em reservas que se podem esgotar a curto-médio prazo (Schenk *et al.*, 2008). Ainda que existam duas correntes divergentes, a

realista/pessimista e a otimista, ambas apontam para que nos próximos 20 anos se atinja o pico máximo da extração mundial de petróleo convencional (Greene *et al.*, 2006; Guseo, 2011). O cenário menos pessimista perspectiva que a tecnologia vai evoluir e permitir a extração de combustíveis fósseis a partir de fontes não convencionais de petróleo (p.e., areias betuminosas). Contudo esta solução ainda não é real em termos de rentabilidade económico-energética aos olhos da tecnologia atual (Tsoskounogloua *et al.*, 2008), nem parece ser viável em termos ambientais (Verbruggen & Al Marchohi, 2010). A diminuição das reservas e distribuição geográfica de petróleo trazem consigo o problema de assentarmos o motor da nossa sociedade num recurso finito, cujo fim tem o potencial de criar distúrbios sociais e desigualdades económicas (Gouveia, 2011). Para além destes fatores, a utilização de combustíveis fósseis acarreta a emissão de uma elevada quantidade de CO₂ para a atmosfera, a qual corresponde a cerca de 98% das emissões mundiais (Demirbas & Demirbas, 2010). Este aumento da concentração atmosférica de CO₂ aparentemente está relacionado com o aumento do efeito estufa, acidificação dos oceanos e alterações climáticas mundiais (Brierley & Kingsford 2009; Ridgwell & Valdes, 2009; Shyakhter *et al.*, 1995). Desta forma urge não só encontrar uma fonte de energia renovável eficiente que consiga não só substituir os combustíveis fósseis, mas também ter a capacidade de limitar as emissões de carbono para atmosfera.

1.2 Biocombustíveis

Os combustíveis fósseis líquidos são a fonte mais eficaz e quase exclusivamente utilizada no sistema rodoviário, aéreo e marítimo a nível mundial (Greene *et al.*, 2006). Quando comparadas com estes, as outras opções apresentam desvantagens, como o elevado custo, difícil armazenamento e principalmente a baixa densidade energética (quantidade de energia por unidade de volume ou massa). As baterias são tidas como uma das principais alternativas para o sistema rodoviário, mas face à tecnologia atual seria impraticável mover aviões, navios ou, mesmo, camiões, desta maneira. A densidade energética das baterias atuais, tanto em termos de massa como volume, situa-se duas ordens de

grandeza abaixo da dos combustíveis fósseis (Fischer *et al.*, 2009). Para além disso, como os motores atuais de combustão interna são baseados, em geral, na utilização de hidrocarbonetos, é de todo o interesse que a fonte alternativa não exija a substituição dos mesmos (Guzzella & Sciarretta, 2007).

Nesta perspetiva, nasceram os biocombustíveis, uma forma de energia renovável produzida a partir de biomassa. Apesar do sistema de classificação não ser consensual, levando mesmo alguns autores a optarem por o ignorar, classificam-se os biocombustíveis em gerações de acordo com a sua origem e tecnologias utilizadas na transformação da biomassa. As duas primeiras estão relacionadas com plantas terrestres e matéria animal (Cunha *et al.*, 2013; Furimsky, 2012; Schenk *et al.*, 2008; Suali & Sarbatly, 2011; Vancov *et al.*, 2012). Assim, os biocombustíveis de 1ª geração englobam aqueles obtidos a partir de culturas vegetais utilizadas na alimentação, gordura animal e óleos alimentares usados. Por sua vez, os biocombustíveis de 2ª geração correspondem a matéria vegetal terrestre não edível (Naik *et al.*, 2010) como material lignocelulósico, resíduos da agricultura e silvicultura, bem como culturas não alimentícias (Carriquiry *et al.*, 2011; Larson, 2008). Contudo, os biocombustíveis de 1ª geração têm o potencial de criar novos problemas, sobretudo no mercado alimentar, inflacionando os preços dos alimentos e colocando em causa a segurança alimentar nos países em desenvolvimento, já que a biomassa vegetal da qual são produzidos depende de terrenos aráveis e água doce, competindo com as florestas por espaço e conduzindo ao desflorestamento (Shenk *et al.*, 2008). Por sua vez, os de 2ª geração, um pouco devido à diversidade da sua natureza, apresentam custos de produção duas a três vezes superiores aos do gásóleo, onde se incluem o transporte, a transformação, interferência nos ciclos biogeoquímicos e reciclagem de nutrientes no solo. Para além disso, não conseguem dar resposta à procura energética mundial (REN 21, 2012). Usando o óleo de palma como exemplo, seria necessário cultivar uma área equivalente a aproximadamente 24% de toda a área cultivável nos Estados Unidos da América para suprir 50% da sua necessidade energética anual na área dos transportes (Tabela 1.1; Demirbas, 2011).

Tabela 1.1 Comparação entre algumas fontes de biodiesel. Adaptado de Demirbas (2011).

Cultura	Rendimento em óleo (L/ha/ano)	Área necessária (M.ha)*	Porcentagem da atual área cultivada dos E.U.A necessária*
Milho	1772	1540	846
Soja	446	594	326
Colza	1190	223	122
<i>Jatropha</i>	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Óleo de palma	5950	45	24
Microalgas (70% de óleo em peso seco)	136900	2	1.1
Microalgas (30% de óleo em peso seco)	58700	4.5	2.5

* Para suprimir 50% das necessidades energéticas de 50% dos transportes no E.U.A. (Chisti, 2007)

Para além destas duas gerações, existem uma terceira e, mais recentemente, uma quarta geração. Apesar de não existir unanimidade, considera-se que a terceira se refere simplesmente ao processamento de biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis, enquanto a quarta se relaciona com o conceito da célula como “fábrica”, utilizando a bioengenharia, nos processos metabólicos, como base do processo (Kagan, 2010). Este conceito visa a diminuição de etapas em todo o processo através da produção dos metabolitos pretendidos, como por exemplo lípidos para a produção de biodiesel, e a sua excreção para o meio, não sendo necessário a recolha dos microrganismos e consequente processamento da biomassa (Lü *et al*, 2011).

1.3 Microalgas

O termo “microalga” representa, num sentido lato, uma larga variedade de organismos frequentemente fotossintéticos, na sua maioria aquáticos, desde procariontes a eucariontes, com uma grande diversidade morfológica e diferentes filogenias. No sentido mais estrito refere-se apenas a eucariontes (Barsanti & Gualteri, 2006), forma utilizada aqui em diante nesta dissertação. Podem ser encontradas em quase todo o planeta, onde coocorram água e luz, tanto em ambientes de água salgada como doce, distribuindo-se desde os desertos até ao

oceano Ártico (Parker *et al.*, 2008). Normalmente unicelulares (p.e., *Chloromonas* sp.), de diâmetro inferior a 2 mm, podem existir espécies que se apresentam na forma colonial (p.e., *Volvox* sp.), e com (p.e., *Tetraselmis* sp.) ou sem mobilidade (p.e., *Chlorella* sp.; Barsanti & Gualteri, 2006).

A fotossíntese tem uma base comum em todas as microalgas fotoautótroficas e plantas, diferindo nos pigmentos envolvidos na captura da luz. O complexo antena, complexo proteico onde ocorre a absorção de luz e a direciona para o fotossistema II, pode ser constituído por diferentes pigmentos. No caso das clorófitas é igual ao das plantas (clorofila *a* e *b*), mas o mesmo não acontece em outros *taxa*. Por exemplo, nas rodófitas (algas vermelhas), existe a presença de um pigmento acessório (ficoeritrina), que permite a captura de fótons de diferente comprimento de onda (Moroney & Ynakvez, 2009). Para além disto, emersas em meio aquático e de estrutura unicelular simples, toda a superfície celular está habilitada a capturar luz e a permitir trocas com o meio, existindo assim um acesso mais fácil e eficiente a nutrientes e água (Sheehan *et al.*, 1998). Tal resulta numa maior eficiência fotossintética e taxa de crescimento, em relação às plantas e macroalgas (Shenk *et al.*, 2008). Além de existirem microalgas fotoautótroficas existem também espécies heterótroficas e mixótroficas (Cheirsilp & Torpee, 2012) assim como microalgas (dinoflagelados) que sobrevivem após o roubo de cloroplastos (cleptoplastidia).

A nível taxonómico, o termo microalga não representa uma verdadeira divisão, mas um conjunto polifilético de microrganismos, resultante, em parte, de várias endossimbioses (Stoecker *et al.*, 2009). Podem ser parafiléticas com macroalgas, ocorrendo em diferentes filos tanto as formas macro- como microscópicas (Barsanti & Gualteri, 2006). Atualmente encontram-se cerca de 35 mil espécies de microalgas descritas, para além de todas as estirpes isoladas ou criadas em laboratório (Borowitzka, 2013).

Ao longo dos últimos anos, as microalgas têm sido investigadas para utilização comercial em diferentes aplicações, incluindo a produção de energia (Mata *et al.*, 2010; Spolaore *et al.*, 2006). Atualmente a produção mundial de

microalgas, incluindo cianobactérias, ronda as 10 mil toneladas por ano, sendo a quase totalidade centrada em espécies dos géneros *Arthrospira* (sin. *Spirulina*), *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (Griffiths *et al.*, 2011 a), existindo ainda assim outras que são alvo de grande atenção e objeto de vários estudos como espécies pertencentes ao género *Tetraselmis* (Bondioli *et al.*, 2012, Goes *et al.*, 1995).

Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa de microalgas não apresentam impacto no mercado alimentar, nem na desflorestação, pois não necessitam obrigatoriamente de terra arável ou água doce para a sua produção (Dismukes *et al.*, 2008; Pereira, 2009).

Segundo Shenk *et al.* (2008) as microalgas apresentam potencial para serem utilizadas de diferentes formas para a produção de biocombustíveis desde a combustão direta da biomassa seca, à produção de hidrogénio, que pode sofrer combustão ou ver a sua energia potencial química convertida diretamente em energia eléctrica através de células de combustível (Figura 1.2; Liu *et al.*, 2013). Podem ainda ser fermentadas (glícidos) para produção de etanol (Hoa *et al.*, 2013; Quang *et al.*, 2012) ou submetidas a digestão anaeróbia para produção de biogás (Mairet *et al.*, 2011; Sialve *et al.*, 2009). Não obstante, uma das mais promissoras perspectivas reside na capacidade que algumas espécies apresentam para acumular lípidos na sua biomassa, que podem ser transformados em biocombustível (Kalpesh *et al.*, 2012). Os biocombustíveis obtidos a partir da componente oleaginosa da biomassa podem ser utilizados para substituir o gasóleo (biodiesel) ou o querosene (bioquerosene; Shenk *et al.*, 2008).

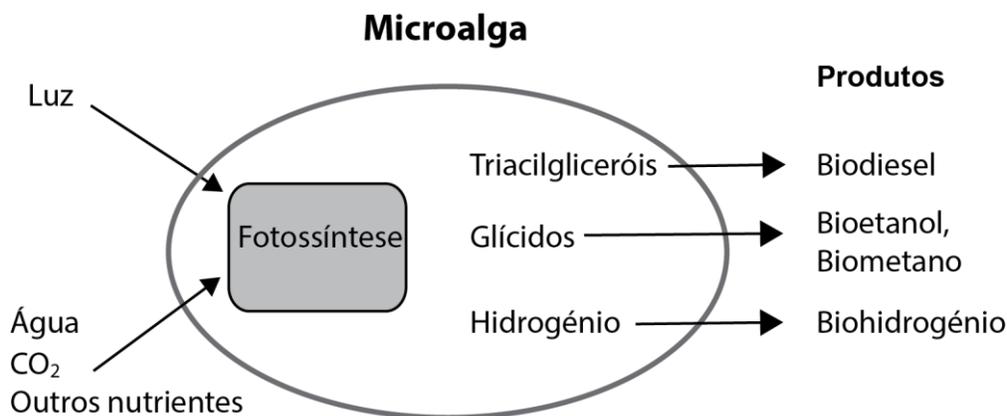


Figura 1.2 A célula como produtora de metabolitos passíveis de se transformar em biocombustíveis. A utilização do prefixo bio- antes do nome do produto está ligado à sua proveniência biológica.

As microalgas apresentam diversas vantagens relativamente a outras fontes de biocombustíveis: I) conseguem sintetizar e acumular largas quantidades de triacilgliceróis (TAG), que em alguns casos pode ser superior a 70% do seu peso seco (Liang *et al.*, 2010) II) têm altas taxas de crescimento, podendo dobrar a sua biomassa entre 1 a 3 vezes por dia (Hu *et al.*, 2008); III) permitem o cultivo em água salgada, o que reduz a competição por água doce; (Li *et al.*, 2008); IV) podem ser cultivadas em áreas não cultiváveis, como desertos, pois não necessitam de solo (Hu *et al.*, 2008); V) podem ser cultivadas em águas residuais, como esgotos agrícolas, municipais ou industriais, tendo o benefício acrescido de realizarem a biorremediação destas águas (Chiunnasamy *et al.*, 2009); VI) podem sequestrar CO₂ produzido pelas emissões de fábricas, mitigando o efeito de estufa (Demirbas, 2011); VII) produzem coprodutos de valor adicionado como hidrogénio, proteínas ou pigmentos, entre outros (Hu *et al.*, 2008); VIII) podem crescer em sistemas otimizados como fotobiorreactores durante todo o ano e ter uma produção anual 50 vezes superior à das plantas terrestres (Sualy & Sarbatly, 2012); IX) necessitam de uma área de cultivo significativamente menor do que as plantas superiores (Tabela 1.1 Demirbas, 2011). Contudo, atualmente a sua produção a nível comercial permanece impraticável, devido aos elevados custos de produção, principalmente quando comparados com os combustíveis fósseis (Chisti, 2007 B; Sun *et al.*, 2011).

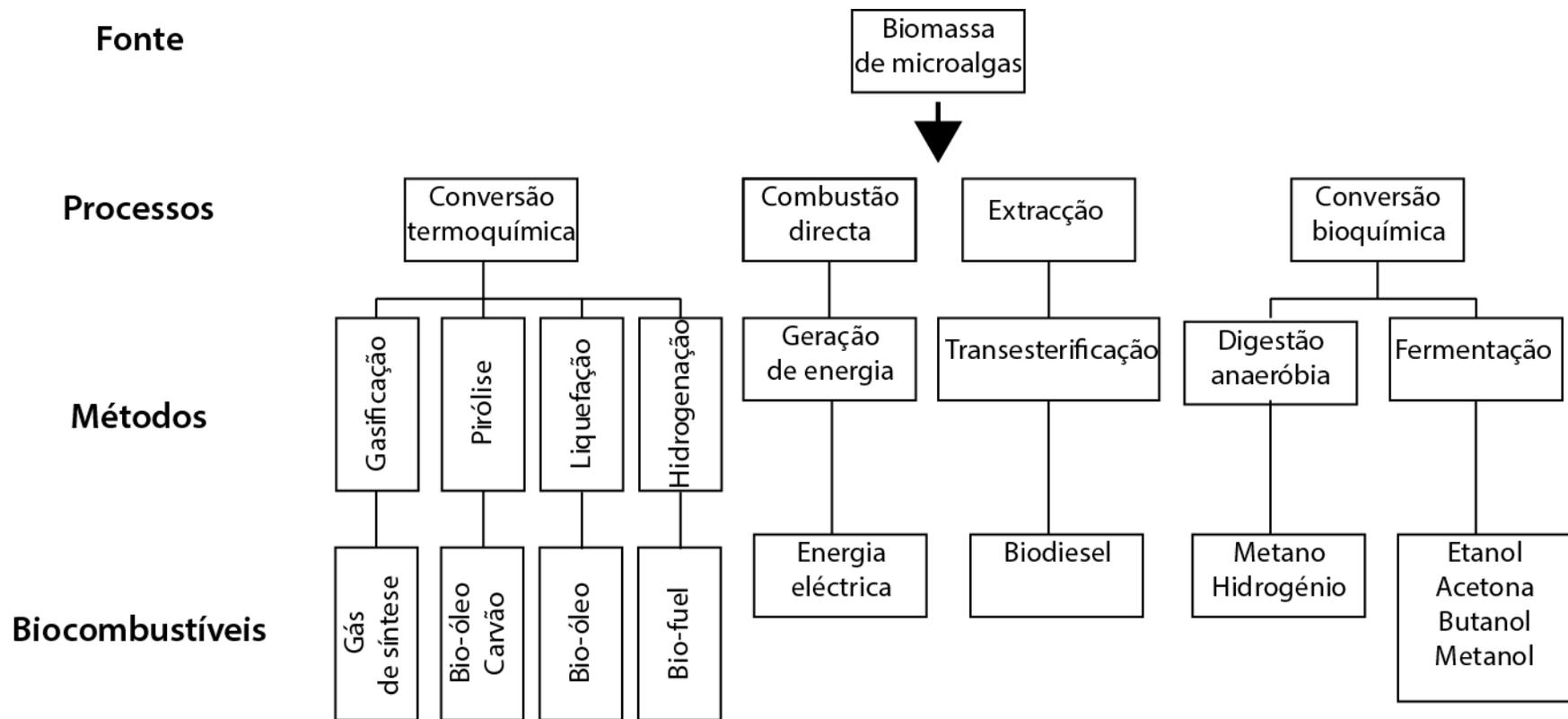


Figura 1.3 Métodos e processos para produzir diferentes biocombustíveis a partir de biomassa de microalgas. Os 4 principais processos de conversão de biomassa dividem-se em conversão termoquímica, conversão bioquímica, extração e combustão directa da biomassa seca. Cada um destes processos pode ser conduzido por vários métodos, p.e., transesterificação, e dar origem a diferentes combustíveis p.e., biodiesel.

1.3.1 Produção de biomassa

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou fechados, com efeito significativo no custo de produção. Estes apresentam características bastante diferentes. Os sistemas abertos são, basicamente, lagos artificiais ou tanques abertos, onde ocorre contacto direto com a atmosfera exterior (Ugwu *et al.*, 2008; Suali & Sarbatly, 2012). Em relação ao cultivo em sistemas fechados, este é conduzido em fotobiorreactores, sistemas de cultivo axénicos ou monoalgais, que permitem o cultivo de microalgas a longo termo (Chisti, 2007b; Grima *et al.*, 1999). De diferentes formas e níveis tecnológicos (Ugwu *et al.*, 2008), os sistemas fechados podem ir desde simples mangas plásticas (Figura 1.4 A), aos modernos e considerados os mais produtivos fotobiorreactores tubulares (Figura 1.4 B), passando por outros modelos com uma grande diversidade de formas (Chisti, 2007a; Pereira, 2009). Em comparação, os sistemas fechados apresentam maior produtividade e qualidade da biomassa, enquanto os sistemas abertos são menos dispendiosos em termos económicos e energéticos, para além de nos sistemas fechados se poder modular as condições de cultivo em função do produto desejado (p.e., estimulando a produção de carotenóides). Tal é mais difícil em sistemas abertos, onde o cultivo está condicionado à utilização de apenas algumas espécies (p.e., *Dunaliella salina*), mais robustas e resistentes às pressões bióticas, como contaminações por outros organismos que podem levar ao colapso da cultura, e abióticas (p.e., temperatura, salinidade; Borowitzka, 1999; Demirbas, 2011; García-González, *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).



Figura 1.4 Modelos de fotobiorreactores: A) Mangas plásticas (polietileno), cultivo da CTP4 nas instalações do LEOA (fotografia original) B) Fotobiorreator tubular (retirado de www.wageningenur.nl; 2009).

1.3.2 Lípidos para a produção de biodiesel e biojetfuel

As microalgas apresentam na sua composição bioquímica essencialmente proteínas, glícidos e lípidos, com quantidades relativas variáveis, dependendo da espécie e condições de crescimento. Podendo representar mais de 50% da biomassa, os lípidos assumem um papel importante na estrutura e funções da célula. Os lípidos são um conjunto de moléculas com diferentes estruturas químicas, podendo dividir-se em dois grupos principais: polares (p.e., fosfoglicerolípido e glicosilglicerolípido) e apolares (p.e., acilgliceróis, esteróides, ácidos gordos livres, hidrocarbonetos, ceras e ésteres; Gushina & Harwood 2013). Do ponto de vista da produção de biocombustíveis nem todos os lípidos apresentam o mesmo interesse. Normalmente os lípidos que se procuram são os triacilgliceróis (TAG), uma forma de acilgliceróis utilizados como estruturas de armazenamento de energia e carbono (Rosenberg *et al.*, 2008), enquanto os restantes lípidos têm normalmente outras funções como, p.e., estruturais e transdução de sinal (Gushina & Harwood 2006).

Nas moléculas de TAG, o glicerol está ligado a três ácidos gordos, que por sua vez consistem numa cadeia de carbonos não ramificada. Estes são classificados de acordo com o número de carbonos e grau de insaturação, ou seja, o número de ligações duplas presentes na cadeia. Cadeias saturadas não apresentam ligações

duplas, enquanto cadeias monoinsaturadas apresentam uma cadeia dupla e a designação de polinsaturadas aplica-se às que apresentam mais do que uma ligação dupla (Hu *et al.*, 2008).

Para a produção de biocombustíveis, o perfil de TAG deve ser maioritariamente composto por moléculas que contenham ácidos gordos saturados ou monoinsaturados, uma vez que os polinsaturados diminuem a qualidade do combustível, por formarem mais facilmente polímeros e óxidos, aumentando a quantidade de detritos após a combustão (Demirbas, 2009).

1.3.2.1 Biossíntese *de novo* de ácidos gordos e triacilgliceróis em microalgas

O mecanismo de síntese lipídica nas microalgas pensa-se que ocorra, tal como nas plantas, em dois organitos (Figura 1.5): cloroplasto e retículo endoplasmático liso (REL). A síntese de cada ácido gordo inicia-se no cloroplasto a partir de uma molécula de acetil-coenzima A (CoA), resultante principalmente da fotossíntese, à qual se vão juntando moléculas de malonil-proteína transportadora de acilo (malonil-ACP). Após a formação de ácidos gordos, estes podem ser transformados em TAG no REL (Hu *et al.*, 2008).

A acetil-CoA tem um papel fundamental na síntese de lípidos, pois é a precursora da malonil-ACP e intervém diretamente várias vezes neste processo. Sob mediação da acetil-CoA carboxilase, dá origem a malonil-CoA. A substituição do grupo CoA pela ACP é promovida, por sua vez, pela malonil-CoA:ACP transferase (Guschina & Harwood, 2013).

Segundo Hu *et al.* (2008), a próxima transformação ocorre através da síntese de ácidos gordos (FAS), um complexo enzimático que catalisa uma série de condensações que envolvem o grupo malonil da malonil-ACP, utilizando acil-ACP ou acetil-CoA como aceitadores de carbonos. Da primeira condensação, catalisada pela enzima de condensação 3-cetoacil-ACP sintase III (KAS III), resulta um produto com uma cadeia de 4 carbonos. Uma segunda enzima de condensação, a 3-cetoacil-ACP sintase I (KAS I), atua sobre essa cadeia,

alongando-a, resultando numa cadeia de 6 a 16 carbonos. Após cada uma destas condensações ocorrem três reações obrigatórias associadas, que acrescentam 2 carbonos à cadeia. O 3-cetoacil-ACP (KAS), produto de cada uma das condensações, é reduzido pela enzima 3-cetoacil-ACP redutase, sendo desidratado pela hidroxiacil-ACP desidrogenase e reduzido pela enzima enoil-ACP redutase. O alongamento dos ácidos gordos termina com a remoção do grupo acilo da ACP, através da acil-ACP tioesterase que hidrolisa a acil-ACP e liberta os ácidos gordos, podendo estes passar diretamente para glicerol-3-fosfato ou monoacilglicerol-3-fosfato. Os ácidos gordos comumente produzidos por esta via são os C16 e C18, sempre saturados.

A formação de ácidos gordos insaturados ocorre a partir dos ácidos gordos saturados formados através da atuação da enzima esteroil-ACP dessaturase, que tem a capacidade de introduzir ligações duplas na cadeia.

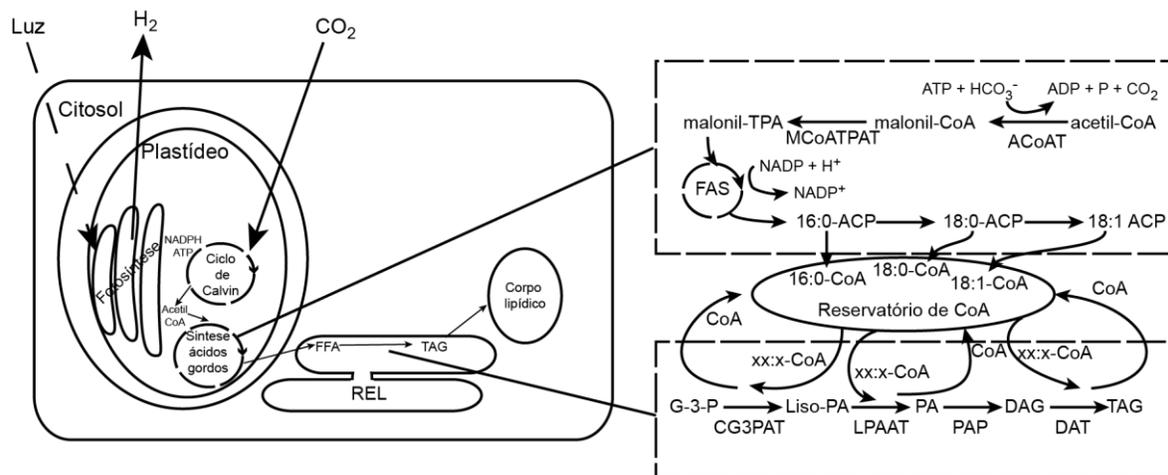


Figura 1.5 Modelo simplificado da biossíntese de ácidos gordos e TAG em microalgas. FFA - ácidos gordos livres; REL - retículo endoplasmático liso; FAS - sintase de ácidos gordos; ACoAT - acil-CoA carboxilase; MCoAACPT - malonil-CoA:proteína transportadora de acilo transferase; G-3-P - glicerol-3-fosfato; PA - ácido fosfatídico; DAG - Diacilglicerol; LPAAT - ácido liso-fosfatídico acil transferase; PAP - ácido fosfatídico fosfatase; DAT - diacilglicerol acil transferase; GC3FAT - glicerol-3-fosfato acil transferase citosólica e; ACP - proteína transportadora de acilo.

A passagem para o glicerol-3-fosfato e conversão em TAG ocorre no REL, com os ácidos gordos a ligarem-se às posições 1 e 2 do glicerol, resultando em ácido fosfatídico (PA). Este ao sofrer desfosforilação pela fosfatidato fosfohidrolase (FF)

perde o grupo fosfato e permite a ligação de um último ácido gordo, finalizando assim a síntese de TAG (Dahlqvist *et al.*, 2000; Guschina & Harwood, 2013). Após a formação dos TAG estes aglomeram-se em corpos lipídicos no citoplasma (Figura 1.5) ou no próprio cloroplasto (p.e. em *Dunaliella salina*).

1.3.2.2 Fatores abióticos que influenciam a biossíntese de lípidos em microalgas

Apesar das grandes quantidades de TAG encontrados em algumas espécies, tal normalmente não se verifica em condições ótimas de crescimento (Hu *et al.*, 2008). A biossíntese e acumulação de grandes quantidades de TAG ocorrem quando são impostas condições de stress, por estímulo químico (p.e., depleção de nutrientes) ou físico (p.e., aumento da temperatura de cultivo), que sozinhos ou em conjunto, podem produzir alterações consideráveis na composição dos ácidos gordos (Praveenkumar *et al.*, 2012).

a) Depleção de nutrientes

A disponibilidade de nutrientes é um dos fatores mais importantes para o crescimento e proliferação das microalgas. A sua carência causa invariavelmente a diminuição da divisão celular, mas pode também levar a um aumento da produção de lípidos e modificar o perfil de ácidos gordos (Praveenkumar *et al.*, 2012). Apresenta-se como uma manipulação ideal; em última análise, basta esperar que a cultura consuma todos os nutrientes do meio e entre em depleção.

O azoto tem sido associado como o nutriente chave para incrementar a produção de TAG nas microalgas, apesar de estudos com outros nutrientes terem revelado algum tipo de incremento lipídico (Hu *et al.*, 2008; Reitan *et al.*, 1994). Segundo Guarnieri *et al.* (2011), existe a suprarregulação da maioria dos componentes da biossíntese de ácidos gordos e TAG durante a exaustão de azoto, levando a um enfoque na produção lípidos neutros e acumulação sob a forma de TAG. Por outro lado, o complexo enzimático 5' adenosina monofosfato-proteína ativada cinase (AMPK), proposto como responsável pela β -oxidação de

ácidos gordos, é subregulada nestas condições, o que pode estar ligado à diminuição do catabolismo sobre os TAG.

b) Adição de ferro em excesso

A importância do ferro no crescimento das microalgas tem vindo a ser observado por diversos investigadores, mas, não obstante ser um dos fatores limitantes ao crescimento das microalgas na natureza (Edwards *et al.*, 2004), o seu efeito no crescimento em cultivos de microalgas é pouco conhecido, tal como o seu efeito na produção de metabolitos como os lípidos. No entanto, Liu *et al.* (2008) levaram a cabo uma experiência onde demonstraram que no cultivo de *Chlorella vulgaris* a adição de ferro produz efeitos, tanto a nível de crescimento celular, como na acumulação de lípidos. Os resultados sugerem que existe uma deficiência na biodisponibilidade de ferro nos meios de cultivo, para esta alga, e que a partir de uma determinada concentração o ferro induz a acumulação de lípidos.

c) Aumento da salinidade

A salinidade pode afetar o crescimento e a composição celular das microalgas e cada estirpe tem uma condição ideal de salinidade diferente (Gouveia, 2011). Em resposta a um aumento de salinidade as microalgas produzem metabolitos, como o β -caroteno (Ben-Amotz & Avron, 1983), que as protegem de lesões causadas pelo sal de modo a manterem a pressão osmótica (Rao *et al.*, 2007). Zhu *et al.* (2007) demonstrou que o perfil lipídico pode ser modulado por alteração da salinidade.

1.3.2.3 *Produção de biodiesel*

Os lípidos extraídos a partir das microalgas não podem ser utilizados como biocombustível sem, antes, sofrerem uma transformação de modo a baixar a sua viscosidade e aumentar a volatilidade, para que apresente as características de combustão adequadas ao motor em questão (p.e., biodiesel em motores a gasóleo; Pereira, 2009).

Atualmente o processo de transesterificação é o mais utilizado para a produção de biodiesel onde as três moléculas de ácido gordo de cada TAG são esterificadas em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME; Ferrão-Gonzales *et al.*, 2011). Os TAG reagem com um álcool de cadeia curta (p.e., metanol ou etanol), na presença de um catalisador, como o hidróxido de sódio ou de potássio (Atadashi *et al.*, 2011) e, por cada TAG produzem-se 3 FAME (biodiesel) e 1 molécula de glicerol (Figura 1.6).

A conversão de TAG em FAME é na realidade uma sequência de reações reversíveis: os TAG são convertidos em diacilgliceróis, os diacilgliceróis em monogliceróis, e os monogliceróis em FAME (Fukuda *et al.*, 2001, Chisti 2007). Desta forma o álcool deve ser adicionado em excesso para favorecer a reação no sentido da produção da transesterificação (Fukuda *et al.*, 2001).

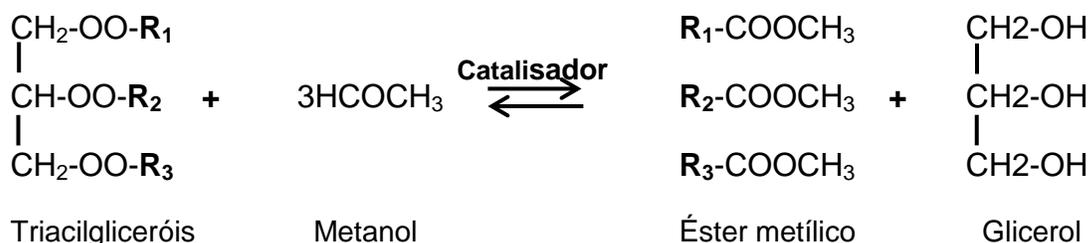


Figura 1.6 Transesterificação dos triacilgliceróis com metanol (adaptado de Fukuda *et al.* 2001, Chisti, 2007.).

Um outro processo, o hidrotratamento apresenta-se como bastante promissor, ainda que numa fase embrionária (Ardiyanti *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). O biocombustível produzido desta forma, resulta da adição de hidrogénio aos lípidos, na presença de um catalisador (Zhang *et al.*, 2013; Fonseca, 2008).

1.3.3 Estratégias de valorização de biomassa

A viabilidade da produção de biocombustíveis (baseados em lípidos) a partir de microalgas vai depender, pelo menos, num futuro próximo, da valorização do

cultivo em diferentes campos. Numa perspectiva ampla, outros componentes da biomassa das microalgas como, glícidos, proteínas ou pigmentos podem ser transformados em produtos refinados para inúmeras aplicações, rações, alimentação humana, farmacêutica, entre outras (Yen *et al.*, 2013). Por outro lado, as microalgas podem prestar serviços de grande importância, como a sua utilização no tratamento de águas residuais (Kothari *et al.* 2012) ou em processos de biorremediação (Matsunaga *et al.*, 1999).

Muitas das técnicas descritas estão direcionadas apenas para a obtenção de um produto. Normalmente isto significa que todo o resto da biomassa se perde ou fica inutilizável para a produção de compostos mais valiosos (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013).

1.3.3.1 Biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria, apesar de não ser novo, ganhou especial importância com o desenvolvimento dos biocombustíveis, em especial daqueles derivados de microalgas. O termo biorrefinaria serve para descrever a produção integrada de diferentes produtos, incluindo biocombustíveis, e outros compostos bioquímicos a partir de uma qualquer biomassa (Figura 1.7; Li *et al.*, 2008). Uma biorrefinaria baseada na biomassa de microalgas pode tornar a produção de biocombustíveis viável economicamente, aumentando o rendimento energético e/ou valorizando a biomassa através da produção de compostos de alto valor (Gouveia, 2011; Pulz & Gross, 2004).

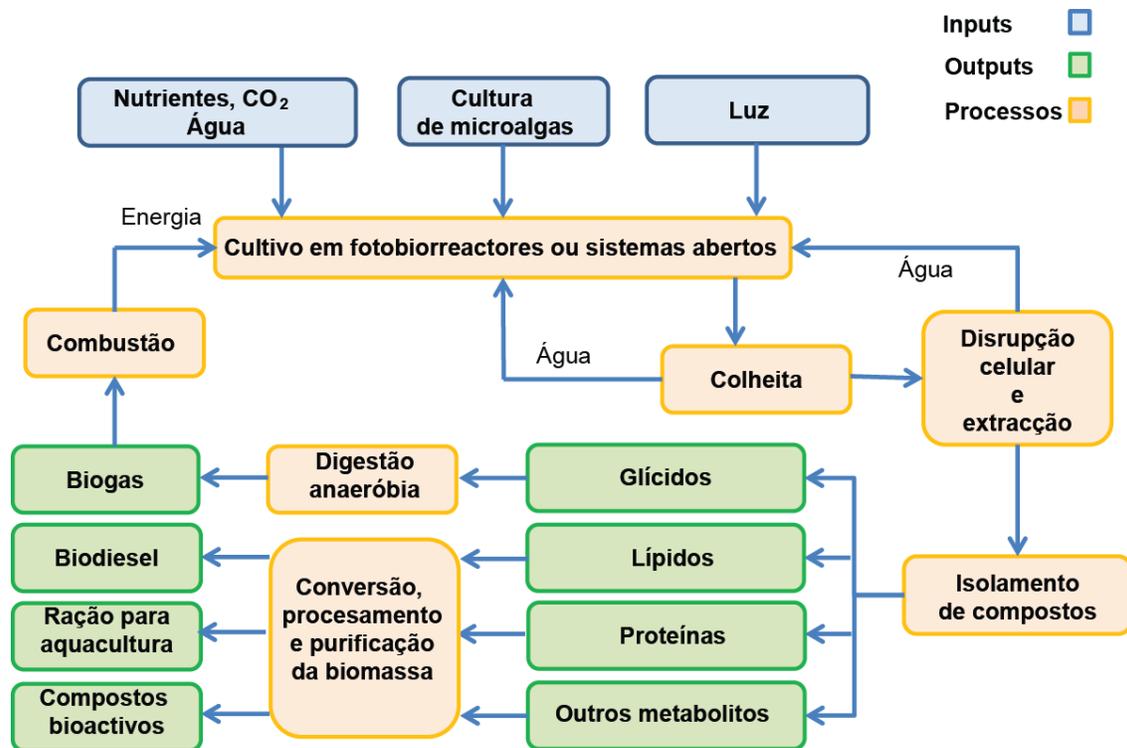


Figura 1.7 Exemplo de modelo ideal de biorrefinaria, onde toda a biomassa é valorizada e a energia necessária para os processos envolvidos é obtida a partir do próprio cultivo.

O grande entrave à biorrefinaria está em como separar diferentes fracções sem danificar as restantes, especialmente, as mais valiosas ou com maior mercado. Tendo em conta factores como a energia e gastos associados, as técnicas que possam ser desenvolvidas para resolver este problema devem apontar a um grande número de produtos finais, em quantidade e com qualidade (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013).

1.3.4 Extratos bioativos como co-produtos de valor comercial acrescentado (neuroproteção)

Uma das fracções mais valorizadas da biomassa é toda aquela que possa ser utilizada na saúde humana. Com o aumento da esperança média de vida, incrementou a incidência de doenças neurológicas relacionadas com o envelhecimento, nomeadamente a doença de Alzheimer e Parkinson. Deste modo, a procura de compostos com atividade neuroprotetora também tem se tornado

mais atual (Custódio *et al.*, 2013). Encontrar compostos com este tipo de atividade biológica em microalgas pode viabilizar o seu cultivo comercial para a produção de biocombustíveis.

Estima-se que 5% das pessoas com mais de 65 anos sofra da doença de Alzheimer, número que sobe para 25% a partir dos 80 anos (Bullock, 2004) Camps *et al.*, 2000). É uma doença neurológica degenerativa progressiva, causadora de demência, que representa entre 50 a 60% dos casos nesta condição em pessoas maiores de 65 anos (Filho *et al.*, 2006). Não existe cura, apenas tratamentos que retardam a progressão da doença. Neste sentido é uma das patologias que desperta maior interesse da comunidade científica internacional.

Apesar dos fatores de iniciação da doença de Alzheimer não estarem esclarecidos, verificou-se uma relação com a redução de acetilcolina (ACh), um neurotransmissor fulcral na atividade do sistema nervoso humano (Weinreb *et al.*, 2011). Responsáveis pela hidrólise da ACh, as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) estão ligadas ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, reduzindo a concentração ACh na fenda sináptica (Custódio *et al.*, 2012a). A utilização de inibidores destas enzimas têm demonstrado resultar num aumento da concentração da ACh, traduzindo-se numa melhoria das funções cognitivas dos pacientes, abrandando a progressão da doença de Alzheimer (Mukherjee *et al.*, 2007). Contudo, os fármacos atuais encontram-se associados a efeitos negativos no organismo, especialmente vômitos, náuseas, diarreia e perda de apetite, podendo levar a eventos de anorexia (Kavirajan & Schneider, 2007).

Para além da ACh, também alguns metais, como o cobre e, em especial, o ferro, que estão ligados ao desenvolvimento da doença de Alzheimer e também de Parkinson (Custódio *et al.*, 2012b; Marx, 2001; Sparks & Schreus, 2003; Weinreb *et al.*, 2011). O ferro está envolvido em vários processos que ocorrem no sistema nervoso central como a neurotransmissão ou a mielinização, para além dos processos mais gerais como a síntese de DNA ou o transporte de electrões mitocondrial (Benarroch, 2009). Contudo, está também ligado a outros processos relacionados com a progressão da doença de Alzheimer como a deposição de

placas β -amilóides nos tecidos nervosos ou promoção da reacção de Fenton, o que poderá provocar stress oxidativo nas células nervosas (Benarroch, 2009; Gaeta & Hider, 2005; Weinreb *et al.*, 2011). Segundo Sparks & Schreus (2003), o cobre também parece estar relacionado com a acumulação de placas β -amilóides na doença de Alzheimer. Os agentes quelantes de metal poderão assim ajudar na prevenção da oxidação e acumulação de placas β -amilóides nos tecidos nervosos, permitindo o decréscimo da concentração destes metais no organismo e em particular no cérebro (Hider *et al.*, 2008; Hider *et al.*, 2011; Zatta *et al.*, 2009).

1.4 Estratégias de otimização da produção de lípidos

A concretização das microalgas como fonte de biomassa para a produção de biodiesel depende em muito da produção primária da cultura e da quantidade de lípidos presentes na biomassa (Sharma *et al.*, 2012), onde fatores genéticos desempenham um fator chave (Borowitzka, 2013). O apuramento das espécies ou estirpes com maior potencial, para produção em larga escala, é essencial para que o biodiesel se torne uma realidade. Técnicas de isolamento de espécies por citometria de fluxo, como a desenvolvida por Pereira *et al.* (2011), devem ser consideradas para a incrementação lipídica de culturas, pois permitem a seleção de genótipos com maior aptidão para a produção e acumulação de lípidos. Existem, no entanto, outras formas de incrementar a produção lipídica, como mutagénesis química aleatória (Anandarajah *et al.*, 2012), imposição de condições de stress fisiológico no cultivo (Kalpesh *et al.*, 2012), aplicação de técnicas de engenharia genética (Courchesne *et al.*, 2009) ou por optimização das condições de cultivo. Como descrito por Gouveia (2011), as principais condições que afetam uma cultura são geralmente diversos aspetos ligados à luz (p.e., intensidade luminosa e fotoperíodo; Brow *et al.*, 1996; Khotimchenko *et al.*, 2005; Mock & Koon 2002; Wiley, 2009), temperatura (Zhu *et al.*, 1997), concentração de oxigénio e dióxido de carbono (Yo *et al.*, 2013), pH (Guckert & Cooksey, 1990), salinidade (Takagi & Yoshida 2006), concentração de nutrientes (Chen *et al.*, 2011), biodisponibilidade de carbono e minerais, fragilidade da célula, concentração celular, dinâmica de fluídos, trocas gasosas, químicos tóxicos, presença de

agentes patogénicos, predação e competição. A alteração de um ou mais destes parâmetros pode impor uma condição de stress à cultura.

Sob stress, as culturas de microalgas tem tendência para cessar a divisão celular e canalizar os recursos para a via de síntese e acumulação de macromoléculas de proteção ou reserva, como os lípidos (Přibyl *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2007). Para maximizar o rendimento, estas condições apenas devem ser induzidas apenas quando a cultura atingir a fase estacionária, para que exista o maior número de células possível (cultivo bifásico) sem que haja um retardamento do seu crescimento. Da imposição de stress também pode resultar uma modificação do perfil ácidos gordos (Boussiba *et al.*, 2012; Chisti, 2007b; Roessler, 1990; Sharma *et al.*, 2012).

1.5 CTP4

Isolada previamente pelo grupo MarBiotech a microalga CTP4 demonstrou, através de resultados obtidos anteriormente, ter a capacidade para acumular cerca de 20% do seu peso seco em lípidos, quando cultivada em águas residuais em sistema monofásico. Para além da acumulação de lípidos na biomassa, resultados preliminares indicaram que esta estirpe é resistente a factores abióticos adversos (p.e., elevada salinidade, presença de compostos tóxicos e elevada intensidade luminosa), potencialmente interessantes para a área dos biocombustíveis. Técnicas de biologia molecular, utilizando sequências do gene que codifica o RNA ribossomal 18S, identificaram a CTP4 como pertencente à classe *Chlorophyceae*.

1.6 Objetivos do trabalho

Tendo em conta o conhecimento que existe sobre a utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis, um dos principais objectivos deste trabalho passa por determinar condições que possam incrementar a produção e acumulação de lípidos pela CTP4, onde as condições testadas são:

- Depleção de nutrientes
- Aumento da salinidade (de 37 para 75 ou 100)
- Aumento da concentração de ferro (de 0,02mM para 0,5 mM)
- Depleção total do ferro no cultivo

O outro objectivo principal passa por perceber a compatibilidade destes lípidos para a produção de um biocombustível, através da determinação do perfil de ácidos gordos da CTP4 para as diferentes condições testadas.

Ao encontro de uma estratégia de valorização da biomassa, os objectivos secundários passaram pela procura de bioatividades relacionadas com a neuroproteção, nomeadamente:

- Capacidade quelante de ferro
- Capacidade quelante de cobre
- Capacidade de inibição da butirilcolinesterase

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico e condições de cultivo

Para este estudo, utilizámos uma alga denominada CTP4, que foi isolada da Ria Formosa por citometria de fluxo pelo grupo MarBiotech.

2.1.1 Meio de cultura

O meio de cultura Algal utilizado teve como base o meio de cultura descrito por Fábregas *et al.* (1984). Constituído por 3 soluções (

Tabela 2.1), preparadas em separado e juntas após a autoclavagem, o meio concentrado foi adicionado ao cultivo na proporção de 1:1000.

Tabela 2.1 Constituição da solução-mãe (concentrada 1000 x) do meio de cultura Algal modificado (Pereira, 2009).

Composto	Concentração
Solução de macronutrientes	
NaNO ₃	2 M
KH ₂ PO ₄	100 mM
Solução de micronutrientes	
EDTA-Na	6,4 mM
ZnCl ₂	1 mM
ZnSO ₄ .H ₂ O	1 mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1 mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1 mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
Solução de ferro	
FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mM
EDTA-Na	20 mM

2.1.2 Cultivo da estirpe CTP4

A pré cultura da CTP4 foi realizada em recipientes plásticos de 5 L num câmara climatizada Aralab Fitoclima s 600 PL clima plus 400. As culturas foram mantidas sob arejamento constante, luz continua a $100 \mu\text{mol fotões. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C . A salinidade do cultivo foi mantida igual à da ria Formosa, ≈ 37 .

Para a determinação de bioatividades relacionadas com a atividade neuroprotectora, a estirpe em estudo foi cultivada sob 3 condições diferentes em fotobiorreactores plásticos (mangas) com aproximadamente 100 L de volume de cultura. Estes cultivos foram realizados em ambiente interior com regime de luz contínua ($\approx 100 \mu\text{mol fotões. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a uma temperatura de $\approx 25^{\circ}\text{C}$ e arejamento constante, no laboratório experimental de organismos marinhos da Universidade do Algarve (LEOA). As condições escolhidas foram: **I)** depleção de nutrientes; **II)** readição de nutrientes; e **III)** aumento da concentração de ferro 0,5 mM com readição de nutrientes.

2.2 Determinação de taxas de crescimento e produtividade da estirpe CTP4 em termos de biomassa

A primeira tarefa realizada foi a medição do crescimento da estirpe CTP4 em termos de concentração celular (CC) e peso seco (PS), adquirindo em simultâneo a densidade ótica (DO) do cultivo, ao longo do tempo. Isto permitiu traçar uma curva de calibração entre a CC e o PS com a DO do cultivo, correlacionando-os através de uma função matemática. Tornou-se assim possível estimar a CC e o PS através da aquisição da DO, diminuindo os processos envolvidos, a quantidade de amostra necessária e o tempo despendido.

Para o efeito, incubaram-se 2 culturas da CTP4 em recipientes plásticos de 5 L num câmara climatizada Aralab Fitoclima s 600 PL clima plus 400 até atingirem a fase estacionária, acompanhando o seu crescimento com amostragens a cada dois dias. Em cada amostragem determinaram-se os

seguintes parâmetros: I) Concentração celular, com contagem do número de células em câmaras de *Neubauer*, II) DO (540 e 750 nm); e III) Peso seco por gravimetria.

A produtividade foi calculada em função da taxa de crescimento específico (1) e tempo de duplicação máximo (2). Os valores utilizados para o cálculo foram retirados dos segmentos onde se atingiram os valores máximos da CC.

(1)

$$\mu(d^{-1}) = \frac{\ln(CC_b/CC_a)}{\Delta t_{ab}}$$

onde μ representa a taxa de crescimento a que uma cultura cresce, CC_a e CC_b são dois valores de concentração celular (células por mL; cel. mL⁻¹), na curva de crescimento, escalados segundo o tempo em que $a < b$ e Δt_{ab} representa a diferença de tempo decorrida entre os dois tempos (a e b), em dias.

(2)

$$g(d) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

calculado a partir da taxa de crescimento específico (μ) representa o tempo que demora a duplicação do número de células, neste caso durante o período de crescimento máximo.

2.2.1 Concentração celular

A concentração celular (cel mL⁻¹) foi obtida através da contagem celular, por microscopia ótica em câmaras de *Neubauer*. As contagens foram feitas em quadruplicado usando 5 campos de contagem da câmara de *Neubauer* (1 mm²), por amostra. Foram feitas as diluições necessárias para que o número de células contadas em cada contagem se situe entre 30 e 300 células. Cada contagem corresponde a um volume total de 0,5 mm³. Assim, a concentração celular foi calculada através da equação (3):

(3)

$$CC \text{ (cel. mL}^{-1}\text{)} = \frac{N^{\circ} \text{ cel. } 10^3}{\text{Volume da contagem (0,5 mm}^3\text{)}}$$

2.2.2 *Peso seco*

Para estimar o peso seco, utilizamos filtros de microfibras de vidro com uma porosidade de 1,2 μm (VWR 516-0869). Os filtros foram previamente lavados com 10 mL de água Milli-Q, para eliminar partículas que se pudessem soltar com a filtração, e deixados a secar, numa estufa a 60°C, durante 24 horas. Após a secagem, foram colocados no exsiccador durante 10 minutos, pesados, e de seguida filtrou-se através dos mesmos 10 mL de amostra. Após a filtragem de cada amostra, o filtro foi lavado com 10 mL de formiato de amónio, para lavar o sal que se possa ter acumulado durante a filtração e, colocado a secar durante 3 dias na estufa a 60°C, ou até se obter um peso constante. Repetiu-se o procedimento de pesagem. O cálculo do peso seco em biomassa foi efetuado por subtração do peso do filtro ao peso do filtro com biomassa, dividindo pelo volume filtrado (4). Os resultados expressam-se em mg.L^{-1} .

(4)

$$PS \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Massa}_{\text{Filtro + Biomassa}} \text{ (mg)} - \text{Massa}_{\text{Filtro}} \text{ (mg)}}{\text{Volume filtrado (L)}}$$

2.2.3 *Densidade ótica*

A DO foi medida em placas de 96 poços, fazendo-se 3 repetições por amostra, e utilizando 250 μL de cultura por poço. Os resultados foram lidos num espectrofotómetro (BioTek Sinergy 4) aos comprimentos de onda 540 e 750 nm. Após as calibrações, os resultados da DO foram utilizados para estimar a concentração celular e peso seco.

2.3 Stresses e produção de lípidos

Após a fase estacionária, dentro de recipientes plásticos com 4 L de meio Algal, as culturas foram transferidas para tubos de 80 mL e colocadas em fitoclimas (Aralab Fitoclima s 600 PL clima plus 400), onde as condições de luz, temperatura e humidade são controladas. As culturas foram submetidas a condições de stress, nomeadamente: **I)** manipulação da concentração de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA}$) a concentrações de 0,02 mM (concentração igual à do meio de cultura; controlo negativo), 0 ([Fe-]) ou 0,5 mM ([Fe+]); **II)** Diferentes salinidades - 37 (salinidade próxima da água do mar; controlo negativo), 75 ([75]) e 100 ([100]). Ambas as condições de stress foram feitas em triplicado. **III)** O efeito da depleção de nutrientes foi avaliado em conjunto com os outros dois, ao replicarmos as condições anteriores com e sem readição de meio de cultura (Figura 2.1).

Cada condição foi produzida num balão de mistura de 250 mL dos quais se retiraram 80 mL para cada um dos replicados, à exceção da depleção de nutrientes (N-) que não necessitou de qualquer tipo de alteração à condição da cultura inicial.

- Depleção de nutrientes (N-) – Ocorreu pelo consumo dos nutrientes através da própria cultura.
- Repleção de nutrientes (N+) – Foi produzida pela readição de nutrientes (1:1000 da solução concentrada de meio Algal) à cultura no balão de mistura.
- Aumento da concentração de ferro [Fe+] – Conseguiu-se através da adição de uma solução de cloreto de ferro (III) e EDTA ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA}$ a 0,5 M) na proporção de 1:1000, ao cultivo.
- Quelação do ferro [Fe-] – Ocorreu pela adição de 4,2 mg de deferoxamina (DFB; Sigma-Aldrich) em pó, directamente no meio de cultivo.
- Aumento da salinidade para 75 [75] – Aconteceu com a adição de 3,8 g de cloreto de sódio (NaCl).

- Aumento da salinidade para 100 [100] – Semelhante à condição anterior, resultou da adição de 6,3 g cloreto de sódio.

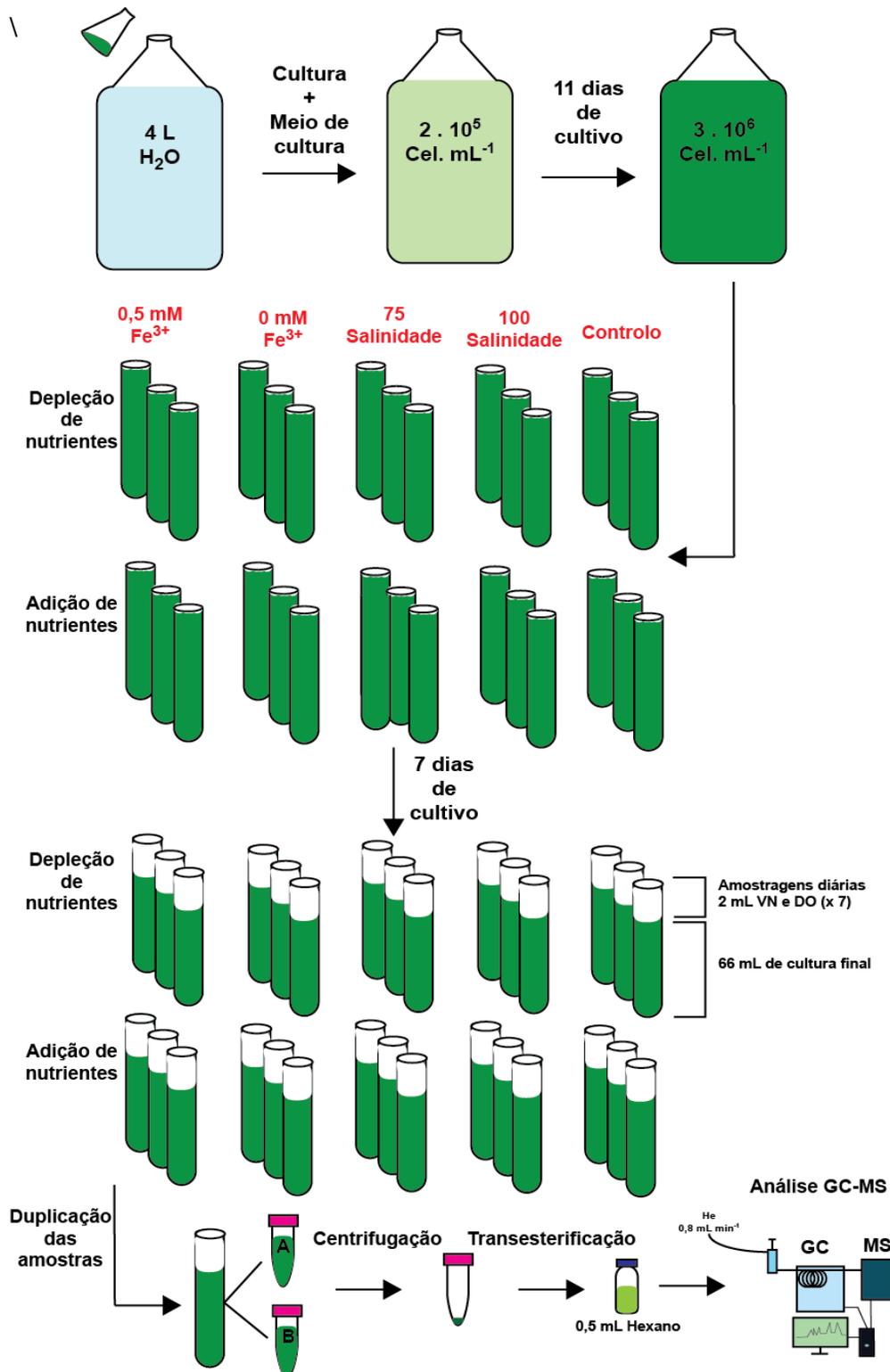


Figura 2.1 Esquema experimental. O cultivo iniciou-se ($\approx 2 \times 10^5$ cel. mL) numa unidade de 4 L durante 11 dias. Após atingir a fase estacionária ($\approx 3 \times 10^6$ cel. mL) a cultura foi dividida por 30 tubos de ensaio, com 10 condições diferentes (N+, N+Fe-, N+Fe+, N+[75], N+[100], N-, N-Fe-, N-Fe+, N-[75], N-[100]) em triplicado, usando-se 80 mL por tubo de ensaio. Cada uma das condições foi preparada em simultâneo e depois dividida pelos 3 replicados. Foram recolhidas amostras (2 mL) todos os dias para medir a DO e a fluorescência do VN para determinar a massa da biomassa e lípidos. Ao 17º dia as culturas (66 mL) foram recolhidas para que a biomassa fosse transesterificada de modo a determinar o perfil lipídico para cada condição.

2.3.1 Determinação de lípidos por gravimetria

A determinação de lípidos totais foi efectuada através de uma versão do método descrito por Bligh & Dyer (1958), modificada pelo Centro de Aquacultura de Trondheim. Esta determinação foi utilizada para calibrar os valores de fluorescência do vermelho do Nilo (VN). Neste método, os lípidos são extraídos através de uma extração química (metanol) e física recorrendo a um homogeneizador IKA Ultra-Turrax (T10 Basic). Os lípidos ficam diluídos em clorofórmio, podendo, assim, ser quantificados por gravimetria.

A biomassa (50 mL de cultura) previamente centrifugada em tubos de 50 mL, a 8000 g, durante 10 minutos, foi transferida para tubos de vidro, após ter sido ressuspendida em 0,8 mL de água destilada. Dentro do tubo de derivatização adicionou-se 2 mL de metanol e um de clorofórmio e, em seguida homogeneizou-se, em gelo, com o homogeneizador durante 1 minuto (1 ciclo). O segundo ciclo iniciou-se com a adição de 1 mL de clorofórmio e homogeneizou-se durante 30 segundos. O último ciclo (terceiro) decorreu com a adição de 1 mL de água destilada e homogeneização novamente por 30 segundos.

Após os 3 ciclos de extração as amostras foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 5000 g durante 10 minutos, de forma a separar bem as fases (solução aquosa de metanol e solução de clorofórmio) e permitir que os lípidos migrem totalmente para a fase do clorofórmio. Finda esta parte, a fase de clorofórmio foi passada quase na totalidade para um novo tubo, para que a amostra lipídica fosse a mais “limpa” possível. A partir destes tubos foi feita a recolha de 800 µL da solução de lípidos em clorofórmio de cada amostra, para tubos de pesagem de lípidos.

Os tubos de pesagem de lípidos (TPL) foram previamente secos em banho seco a 60°C por 12 horas, postos 1 hora a arrefecer no exsiccador e, pesados numa microbalança. Este procedimento voltou a ser repetido, após as amostras terem sido colocadas no tubo. A massa de lípidos foi dada pela diferença entre a massa inicial e a massa final do TPL (5).

(5)

$$\text{Lípidos totais (m. m}^{-1}\text{)} = \frac{(m_{TPL\ final} - m_{TPL\ inicial}) \times Vol.\text{Clorofórmio}}{\frac{Vol.\text{Clorofórmio evaporado}}{\text{Peso seco da biomassa}}}$$

a partir desta equação, obtém-se um rácio massa por massa ($m\ m^{-1}$), que permite relacionar a quantidade de lípidos com a fluorescência do vermelho do Nilo na amostra, onde: $m_{TPL\ final}$ é o do conjugado das massas do TPL com a massa da amostra (lípidos); $m_{TPL\ inicial}$ é o valor da massa do TPL apenas; $Vol.\text{Clorofórmio}$ é o volume total de clorofórmio (2mL) utilizado para extrair os lípidos da fase aquosa de metanol; $Vol.\text{Clorofórmio evaporado}$ (800 μL) corresponde ao volume de clorofórmio utilizado para encher o TPL e; $\text{Peso seco da biomassa}$ representa o valor da massa da biomassa utilizada na amostra.

2.3.2 Determinação de lípidos por vermelho do Nilo (VN)

A determinação de lípidos por fluorimetria seguiu o protocolo estabelecido por Chen *et al.* (2009) com algumas modificações. Utilizou-se uma solução de vermelho do Nilo, um fluorocromo que se liga aos lípidos e permite estabelecer uma medida em relação à quantidade desta classe de biomoléculas presente na amostra.

Uma solução de VN a uma concentração final de 1 μM em 25% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada (250 μL) a uma placa de 96 poços, à qual se acrescentaram as amostras (50 μL) em quadruplicado. De seguida incubou-se no leitor de placas a 37°C a 100 r.p.m. e procedeu-se à leitura usando um comprimento de onda de excitação a 485 nm e de emissão a 525 nm.

Os controlos negativos utilizados foram: I) 250 μL de solução de VN misturada com 50 μL de água; II) 300 μL de meio de cultura; III) 300 μL de água salgada.

Para realizar a calibração com os lípidos totais, pelo método gravimétrico, as amostras utilizadas foram diluídas 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 (v/v) em água destilada e uma amostra não diluída (1:1).

2.3.3 Determinação do perfil de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

O procedimento para a determinação do perfil de ácidos gordos corresponde a uma modificação do protocolo descrito por Pereira (2009). A biomassa resultante da centrifugação de 36 mL de cultura foi transferida, em duplicado, para tubos de derivatização. Adicionou-se 2 mL de uma solução de derivatização, composta por metanol e cloreto de acetilo (20:1, v/v). De modo a provocar a disrupção das células, as amostras foram homogeneizadas (IKA Ultra-Turrax T10 Basic) a frio, em 2 ciclos de 60 e 30 s, respectivamente. Com a disrupção das células completa, adicionou-se 1 mL de hexano, incubando as amostras num banho a 100°C durante uma hora para concluir a derivatização.

As amostras foram arrefecidas em gelo durante 10 minutos, transferidas para tubos de centrifuga, utilizando-se 1 mL de água destilada para lavar os tubos de derivatização. Adicionou-se 3 mL de hexano a cada amostra e estas foram agitadas durante 60 s e centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos para permitir a separação de fases. A fase orgânica (hexano-lípidos) foi recolhida para um tubo de vidro, repetindo-se o processo, a partir do passo de adição de hexano, até a fase orgânica não apresentar cor. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Concluído o processamento de todas as amostras, adicionou-se sulfato de sódio anidro para remover alguma água que se pudesse encontrar na fase orgânica. O sulfato de sódio na presença de água agrega-se até que esta seja toda sequestrada. De modo a remover o sal insolúvel resultante da adição de sulfato de sódio em excesso, filtraram-se as amostras com um filtro de seringa ($\phi = 0,45 \mu\text{m}$) para novos tubos de vidro, onde foram concentradas com um jato suave de azoto gasoso. Os extratos obtidos (fração total de lípidos) foram ressuspensos em 500 μL de hexano para cromatografia preparativa (Merck) e

transpostos para tubos de cromatografia. Devido à elevada concentração do extrato foi necessário diluir algumas amostras, de forma proteger o equipamento do excesso de material não volátil.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por GC-MS num cromatógrafo Agilent Technologies (6890 Network GC System, 5973 Detector Seletivo de Massas Inertes). A separação dos compostos obteve-se através da utilização de um programa de temperatura específico para ésteres metílicos (Figura 2.2). Este inicia-se a 60°C, mantendo esta temperatura durante o primeiro minuto, aumentando de seguida até aos 120°C em dois minutos, continuando a aumentar gradualmente até aos 250°C, durante 26 minutos, elevando-se 20°C no minuto seguinte e mantendo-se a subir durante 12 minutos até atingir os 300°C.

Foram injetados 1 µL de cada amostra ressuspendida, numa coluna DB-5MS (Agilent Tech; comprimento: 25 m; ø interno: 0,250 mm; espessura de filme: 0,25 µm), usando-se o hélio como gás arrastador a 0,8 mL min⁻¹.

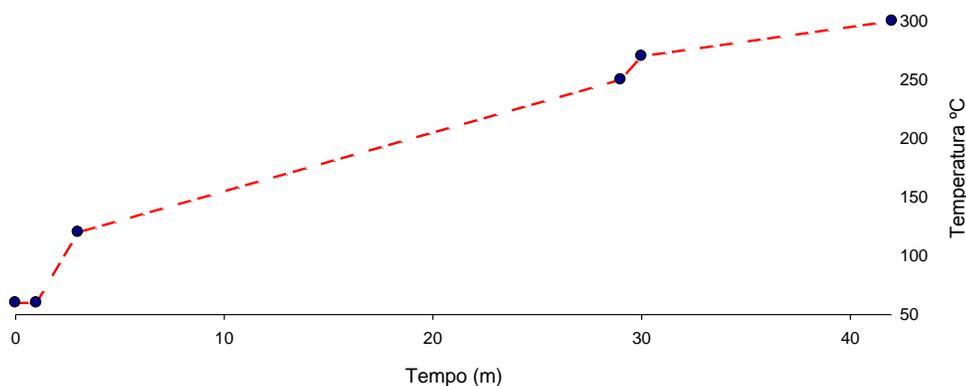


Figura 2.2 Programação da temperatura GS-MS para separação ésteres metílicos. Adaptado de Pereira (2009).

Como padrão utilizou-se uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco 37 FAME Mix; Tabela 2.2) que serviu para identificar e quantificar os ésteres metílicos das amostras. A identificação dos diferentes compostos foi realizada através dos tempos de retenção e confirmada por comparação dos espectros de massa obtidos para os diferentes picos com os existentes na base

de dados da NIST (National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce). A quantificação dos ésteres metílicos foi feita recorrendo a rectas de calibração elaboradas individualmente (Tabela 2.2), usando 4 diluições do padrão original (1:72, 1:50, 1:25, e 1:10).

Tabela 2.2 Rectas de calibração dos ésteres metílicos analisados, respetivo coeficiente de correlação (r^2) e tempo de retenção em GC-MS.

Composto	Curva de calibração	r^2	Tempo de retenção (min)
C15:1	$A = 1,355 \cdot 10^8 m - 2,548 \cdot 10^5$	0,9982	16,672
C15:0	$A = 1,673 \cdot 10^8 m - 1,528 \cdot 10^5$	0,9967	16,933
C16:1	$A = 1,433 \cdot 10^8 m - 2,675 \cdot 10^5$	0,9969	18,482
C16:0	$A = 1,894 \cdot 10^8 m - 8,272 \cdot 10^4$	0,9941	18,915
C17:1	$A = 1,514 \cdot 10^8 m - 2,902 \cdot 10^5$	0,9979	20,414
C17:0	$A = 1,633 \cdot 10^8 m - 1,854 \cdot 10^5$	0,9969	20,830
C18:3n6	$A = 1,380 \cdot 10^8 m - 3,397 \cdot 10^5$	0,9996	21,723
C18:2n6c	$A = 7,425 \cdot 10^7 m - 2,886 \cdot 10^5$	0,9988	22,043
C18:1n9c	$A = 7,220 \cdot 10^8 m - 6,830 \cdot 10^5$	0,9957	22,181
C18:1n9t	$A = 7,220 \cdot 10^8 m - 6,830 \cdot 10^5$	0,9957	22,307
C18:0	$A = 1,996 \cdot 10^8 m - 1,562 \cdot 10^5$	0,9951	22,677
C20:4n6	$A = 1,266 \cdot 10^8 m - 3,014 \cdot 10^5$	0,9992	24,907
C20:5n3	$A = 1,408 \cdot 10^8 m - 3,397 \cdot 10^5$	0,9989	25,003
C20:3n3	$A = 1,320 \cdot 10^8 m - 3,045 \cdot 10^5$	0,9998	25,240
C20:2n6	$A = 1,518 \cdot 10^8 m - 2,969 \cdot 10^5$	0,9988	25,595
C20:1n9	$A = 3,605 \cdot 10^8 m - 5,001 \cdot 10^5$	0,9970	25,702
C20:0	$A = 2,145 \cdot 10^8 m - 2,823 \cdot 10^5$	0,9956	26,159
C21:0	$A = 1,928 \cdot 10^8 m - 2,734 \cdot 10^5$	0,9986	27,803
C22:6n3	$A = 1,221 \cdot 10^8 m - 3,793 \cdot 10^5$	0,9999	28,065
C22:2	$A = 1,396 \cdot 10^8 m - 3,122 \cdot 10^5$	0,9995	28,888
C22:1n9	$A = 1,788 \cdot 10^8 m - 3,320 \cdot 10^5$	0,9964	28,972
C22:0	$A = 2,126 \cdot 10^8 m - 2,665 \cdot 10^5$	0,9945	29,359
C23:0	$A = 1,997 \cdot 10^8 m - 2,032 \cdot 10^5$	0,9977	30,491
C24:1n9	$A = 1,694 \cdot 10^8 m - 2,270 \cdot 10^5$	0,9977	31,369
C24:0	$A = 2,179 \cdot 10^8 m - 1,647 \cdot 10^5$	0,9965	31,684

A – área do pico obtida no cromatograma; m – massa do ácido gordo em μg . O r^2 corresponde ao coeficiente de correlação de cada recta.

2.4 Microscopia ótica

As imagens microscópicas das amostras foram realizadas num microscópio Zeiss AXIOMAGES Z2, com uma máquina fotográfica coolSNapHQ2 acoplada e, controlado pelo software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). Baseada no método descrito por Cooper *et al.* (1999), as células foram marcadas com o marcador vital BODIPY 505/515 (4,4 difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3^a,4^a-diazas-indacene, Life Technologies Europe BV, Porto, Portugal). As amostras foram marcadas com BODIPY a uma concentração final de 1 μ M, misturadas durante um minuto e, incubadas no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida transferiu-se 10 μ L de cada uma das amostras para lâminas, sendo estas cobertas com lamelas e seladas com DPX (Xileno de diestileno plastificante, VWR). A observação foi realizada na objetiva de 64 x, e as imagens de fluorescência obtidas através do filtro Zeiss 38 He (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) para isotiocianato de fluoresceína (FITC) e as imagens de luz transmitida foram obtidas com recurso a contraste de interferência diferencial (DIC). O tratamento de imagens foi realizado com recurso ao programa Image J (Research Service Branch, NIH, Bethesda, MD).

2.5 Métodos de analíticos de detecção de nutrientes no cultivo

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) e todos os reagentes utilizados tinham nível analítico. As culturas foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos para separar toda a biomassa e matéria particulada remanescente.

2.5.1 Determinação da concentração de nitratos

Para determinar a depleção de nutrientes na água calculámos a concentração de nitratos. Utilizando uma coluna de cádmio reduziu-se os nitratos a nitritos, sendo depois os nitritos determinados pelo método de Griess-Ilosvay (1858). Neste método, os iões nitrito formam um composto diazóico com a

sulfanilamida (10 g.L^{-1}) em meio ácido (em HCl a 1,2 N) que reage com bicloreto N-(1-naftil)-etilenodiamina (1 g.L^{-1}), formando um composto de cor rosa quantificado por espectrofotometria a 540 nm.

De cada amostra foram recolhidos 20 mL repartidos por 4 tubos de ensaio, aos quais se adicionou 5 mL de solução tampão de cloreto de amônia (NH_4Cl , pH 8,5) a 10 g.L^{-1} , sendo a solução resultante agitada num agitador vórtex. O conteúdo do primeiro tubo de cada uma das amostras foi passado pela coluna e desprezado. Dos seguintes replicados, foram desprezados os primeiros 5 mL e recolhidos os segundos. Adicionaram-se 0,2 mL de solução de sulfanilamida, deixando-se reagir durante 5 minutos e adicionando-se em seguida 0,2 mL de bicloreto N-(1-naftil)-etilenodiamina. Transpôs-se o conteúdo dos tubos de ensaio para placas de 96 poços (3 repetições por tubo) e leu-se a 540 nm após meia hora.

A correlação entre a fluorescência e a quantidade de nitratos determinou-se através da utilização de uma solução padrão de nitrato de potássio (KNO_3) a diferentes concentrações (0, 10, 20, 50, 70 e $100 \mu\text{M NO}_3$).

2.6 Determinação de bioatividades

2.6.1 Recolha e liofilização de biomassa

Após a conclusão do tempo de cultivo (17 dias), suspendeu-se o arejamento e esperou-se 24 horas para que a biomassa sedimentasse e diminuísse o volume de cultura recolhida para cerca de 15 L. A recolha foi efectuada para recipientes de 5 L, sendo a cultura transferida para tubos de centrifuga de 500 mL e centrifugada a 5000 g durante 10 minutos. A biomassa resultante foi transferida para tubos de 50 mL e liofilizada durante 5 dias.

2.6.2 Preparação de extratos

A partir da biomassa obtida para cada uma das 3 condições de cultivo, prepararam-se 4 extratos diferentes, sendo utilizados solventes com polaridades e propriedades de extração diferentes, nomeadamente: acetona (PI = 5.1), metanol (PI = 5.1), acetato de etilo (PI = 4.4) e hexano (PI = 0.1). Cada extrato foi preparado a partir de 3 mg de biomassa liofilizada usando 120 mL de solvente. Após a homogeneização em gelo com um homogeneizador IKA Ultra-Turrax (T10 basic) em 3 ciclos de 2 minutos, a extração ocorreu à temperatura ambiente durante 12 horas, com agitação constante. Os extratos foram filtrados (Whatman nº4) e concentrados num evaporador rotativo sob atmosfera de pressão reduzida, a 40°C. Após secagem completa sob um jato suave de azoto, os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO, VWR) à concentração de 25 mg.mL⁻¹ e guardados a 4°C.

2.6.3 Atividade quelante de cobre

A atividade quelante do cobre foi determinada através de complexometria usando violeta de pirocatecol (Sigma-Aldrich). Para este ensaio foram utilizadas 3 concentrações diferentes, dos extratos produzidos, em DMSO: 1, 5 e 10 mg.mL⁻¹. A determinação foi realizada em placas de 96 poços de fundo plano e fizeram-se 6 replicados.

Adicionou-se por esta ordem, a cada poço, 200 µL de solução tampão de acetato de sódio a 50 mM (pH 6), 100 µL de sulfato de cobre (CuSO₄), 30 µL de extrato e por fim, 6 µL de violeta de pirocatecol (4 mM em solução tampão). A cor da solução do complexo de violeta de pirocatecol com o metal, foi observada a 632 nm (Biotek Synergy 4). Os resultados foram calculados em relação à percentagem de inibição em relação ao controlo negativo, contendo apenas DMSO ao invés de extracto (6). Como controlo positivo substituiu-se o extrato por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, VWR). O controlo da cor foi obtido através da leitura da absorvância dos extratos na ausência de violeta de pirocatecol.

(6)

$$AQ_{Cu} \% = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{c.cor}}{Abs_{c.neg.}} \times 100 \right)$$

onde: AQ_{Cu} – actividade quelante do cobre na amostra; $Abs_{amostra}$ – absorvância da amostra no comprimento de onda de 632nm; $Abs_{c.cor}$ – absorvância do controlo da cor a 632 nm; $Abs_{c.neg.}$ – Absorvância do controlo negativo.

2.6.4 Actividade quelante de ferro

A actividade quelante do ferro determinou-se pela formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina. O desenho experimental foi igual ao da actividade quelante do cobre (concentrações dos extratos e replicados). A cada poço foram adicionados 200 μ L de água destilada, 30 μ L de extrato e 30 μ L de solução de $FeCl_2$ a 0,1 $mg.mL^{-1}$. Após uma incubação de 30 minutos, adicionou-se 12,5 μ L de uma solução aquosa de ferrozina (40 mM) e aguardou-se 10 minutos. A absorvância foi medida a 562 nm (Biotek Synergy 4) e os resultados da actividade quelante, de cada extracto, expressos em percentagem da absorvância do controlo negativo, contendo DMSO em vez de extracto (7). No controlo positivo utilizou-se novamente o EDTA em substituição do extrato. O controlo da cor foi obtido através da absorvância do extratos na ausência de ferrozina.

(7)

$$AQ_{Fe} \% = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{c.cor}}{Abs_{c.neg.}} \times 100 \right)$$

na qual AQ_{Fe} - actividade quelante do ferro na amostra; $Abs_{amostra}$ - absorvância da amostra no comprimento de onda de 562nm; $Abs_{c.cor}$ - absorvância do controlo da cor a 562 nm; $Abs_{c.neg.}$ – Absorvância do controlo negativo.

2.6.5 Inibição da butirilcolinesterase

A capacidade de inibir a actividade da enzima BChE dos diferentes extratos foi testada através do método colorimétrico descrito por Orhan *et al.* (2007). Para

medir esta bioatividade utilizámos extratos às concentrações 0,2, 1 e 2 mg. mL⁻¹. Para o efeito, adicionou-se numa placa de 96 poços uma solução tampão com 140 µL de fosfato de sódio a 0,1 mM (pH 8,0), 20 µL de extrato nas diferentes concentrações (em sextuplicado) e 20 µL de uma solução de BChE (0,28 U.mL⁻¹). Incubou-se durante 15 minutos a 37°C. Foram em seguida adicionados 10 µL de acetilcolina (ACh) (4 mg.mL⁻¹) e 20 µL de DTNB (ácido ditionitrobenzóico, SIGMA-ALDRICH; 1,2 g.mL⁻¹). A hidrólise da ACh, catalisada pela BChE, foi observada pela formação do anião 5-tio-2-nitrobenzoato, medindo a absorvância a 412 nm (Biotek Synergy 4). Os resultados foram calculados em função da inibição da enzima BChE, numa solução de controlo negativo contendo DMSO em vez de extracto (8). A galantamina foi usada como controlo positivo à concentração de 1 mg.mL⁻¹. O controlo da cor dos extratos foi realizado na ausência da BChE.

(8)

$$AI_{BChE} \%(\text{inibição}) = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{c.cor}}{Abs_{c.neg.}} \times 100 \right)$$

onde: AI_{BChE} %(inibição) - actividade inibitória enzima BChE em percentagem de inibição; Abs_{amostra} - absorvância da amostra no comprimento de onda de 562nm; Abs_{c.cor} - absorvância do controlo da cor a 562 nm; Abs_{c.neg.} - Absorvância do controlo negativo.

2.7 Tratamento estatístico dos dados

Os ensaios foram conduzidos em triplicado, exceptuando os ensaios relacionados com as bioatividades que foram realizados em sextuplicado e os resultados foram representados através das médias dos replicados e desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$). Os dados foram sujeitos a análise de variância (*one way* ANOVA e *factorial* ANOVA) para determinar a significância das diferenças entre tratamentos e interações, através do programa STATISTICA para o Windows (versão 7.0) e através do pacote estatístico do Excel (versão 2010). As diferenças significativas entre médias foram analisadas através do teste de Tukey.

Considerou-se um grau de significância de 95%, diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

3 Resultados e discussão

3.1 Correlação entre os parâmetros de crescimento e a densidade ótica

Neste primeiro ensaio foram relacionados a concentração celular ou o peso seco com a densidade ótica de diferentes culturas de CTP4 em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 3.1; Figura 3.2). Os cultivos utilizados nesta calibração decorreram durante 15 dias, dois deles foram suplementados com nutrientes ao 11º dia, altura em que a CC pareceu estabilizar. Foram utilizados dois comprimentos de onda diferentes, 750 e 540 nm, dos quais se escolheu aquele que apresentava maior coeficiente de correlação para ambas as calibrações (750 nm).

A relação obtida entre a CC e a DO de uma cultura de CTP4 pode ser observada na Figura 3.1 que é, traduzida pela equação (9).

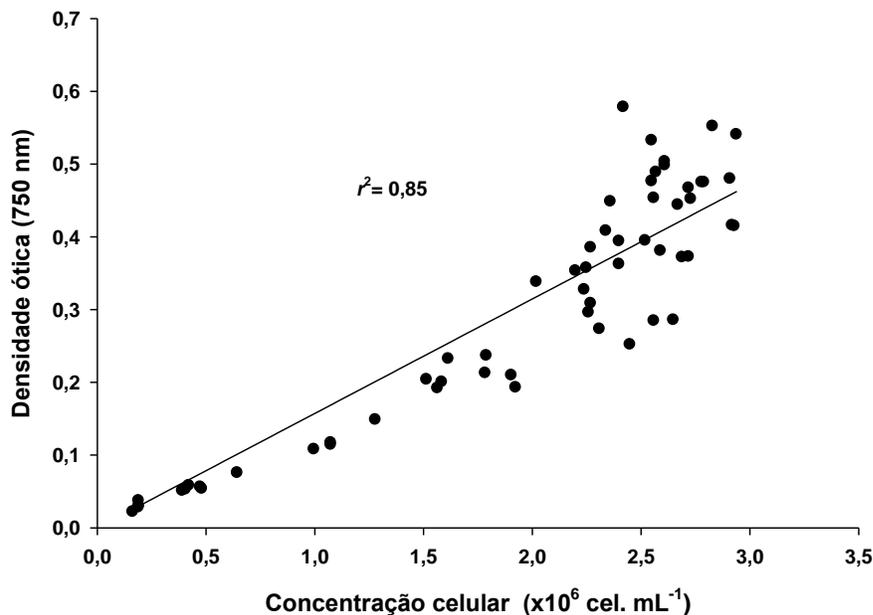


Figura 3.1 Reta de calibração entre a densidade ótica e a concentração celular da estirpe CTP4, nas fases exponencial e estacionária ($n = 58$; $p < 0,001$).

Apesar de existir alguma dispersão para os valores mais altos de CC a relação obtida é significativa ($p < 0,001$).

(9)

$$CC = \frac{DO_{750}}{1,57 \times 10^{-7}}$$

A relação entre o PS e a DO (Figura 3.2) também demonstrou ser significativa ($p < 0,001$) e a equação obtida (10), tal como a anterior, corresponde a uma relação linear.

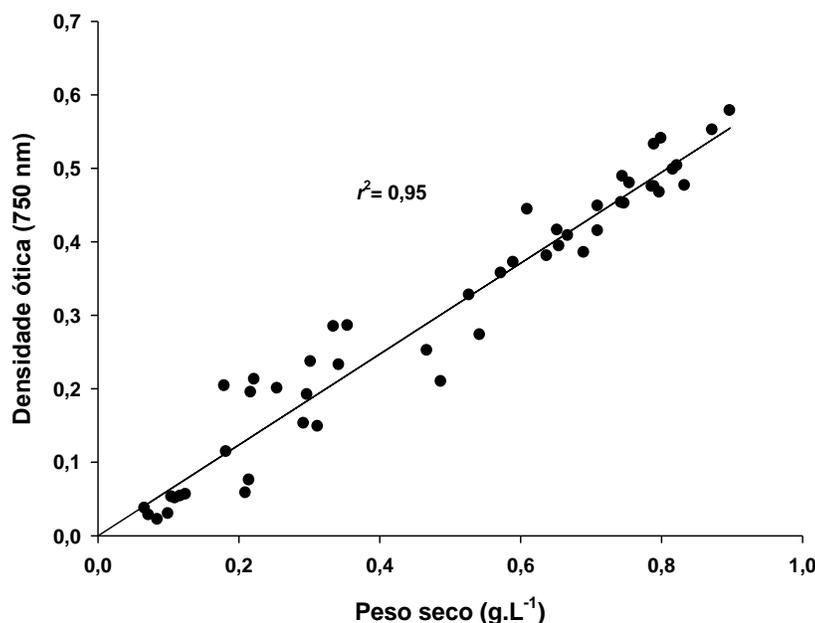


Figura 3.2 Retas de calibração entre a densidade óptica (750 nm) e o peso seco (mg.L^{-1}) para a estirpe CTP4, nas fases exponencial e estacionária ($n = 50$; $p = 0,001$).

(10)

$$\text{P. S. (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{D. O._{750}}{9,48 \times 10^{-1}}$$

Neste caso, para a estirpe CTP4 escolheram-se dois comprimentos de onda fora dos picos de absorvância correspondentes aos pigmentos principais das clorófitas. Este é um aspecto importante, pois torna-se difícil obter uma correlação

significativa entre a DO e os parâmetros de crescimento se existir absorvância por parte de pigmentos (e/ou subestruturas celulares) cuja concentração possa variar ao longo do tempo de cultivo e das condições do meio (Ramos *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2003). Em microrganismos fotoautotróficos, não são conhecidos pigmentos que apresentem picos de absorvância a 750 nm. A 540 nm pode ocorrer absorvância por parte da ficoeritrina mas este pigmento ocorre quase unicamente em cianobactérias e algas vermelhas (Barsanti & Gualteri, 2006).

Desta forma, na CTP4, a absorvância medida a 540 e 750 nm deve-se sobretudo a fenômenos de refração, dependentes do tamanho e complexidade celular (Rocha *et al.*, 2003), o que explica a dispersão observada nos valores mais elevados da CC, ao contrário do PS, onde a linearidade se mantém. Neste caso, embora a cultura tenha atingido a fase estacionária, o PS continuar a aumentar, acompanhado pela DO, devido provavelmente a mudanças na morfologia da célula e na sua relação com a luz.

Outro fator que pode influenciar a densidade ótica da cultura é o desenvolvimento de outros microrganismos, mais propriamente bactérias. Apesar de se ter usado um sistema unialgal, a cultura não se apresenta completamente axénica. Permitiu-se o desenvolvimento de bactérias facilitadoras do cultivo, naturalmente em simbiose com a espécie estudada, e que produzem vitaminas necessárias ao desenvolvimento desta, não sendo assim necessário suplementar o cultivo com estes nutrientes. Pelo grau de significância dos resultados a interferência, que possa existir, não parece suficiente para afetar significativamente as correlações.

3.2 Correlação entre fluorescência de vermelho do Nilo e conteúdo lipídico

Para que se pudesse utilizar o método colorimétrico de VN, como medida do conteúdo lipídico da CTP4, foi necessário calibrar com um método gravimétrico, neste caso o de Bligh & Dyer modificado. A calibração ocorreu a partir de 4 culturas com diferentes concentrações de lípidos após atingirem a fase

estacionária. A correlação obtida entre a fluorescência de VN e conteúdo lipídico foi significativa ($p < 0,001$), podendo o método ser utilizado no decorrer do trabalho experimental para estimar os níveis lipídicos da estirpe CTP4.

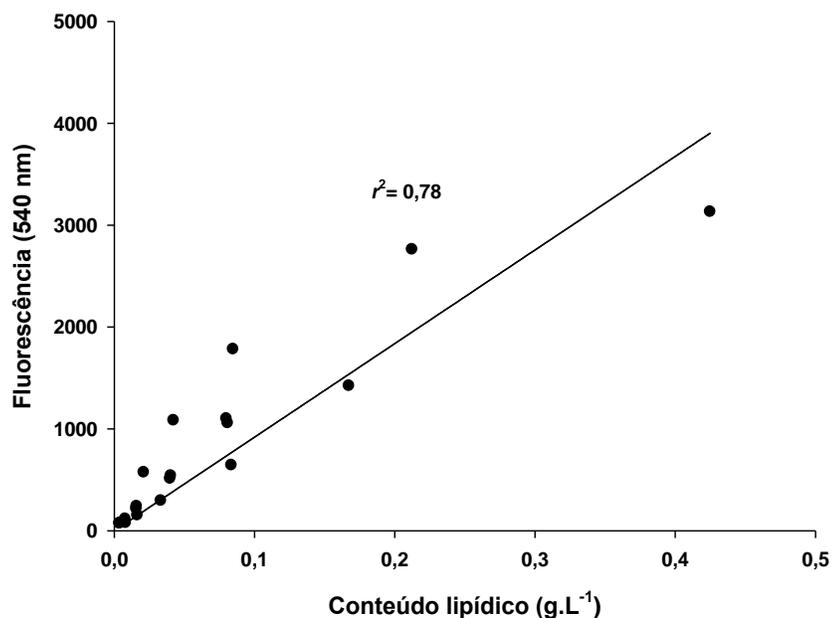


Figura 3.3 Curva de calibração entre o método colorimétrico de vermelho do Nilo e os lípidos totais da estirpe CTP4, obtidos através do métodos gravimétrico de Bligh & Dyer (1959; $n = 20$; $p < 0,001$).

A equação (11) descreve a relação entre os valores fluorescência emitidos a 540 nm (Fl_{540}) e a concentração de lípidos (CL) g. L⁻¹.

(11)

$$CL = \frac{Fl_{540}}{9187,5}$$

Através de um ensaio preliminar, verificou-se que a relação entre a concentração de lípidos determinada por fluorescência e gravimetria diferia conforme as células estavam na fase exponencial ou estacionária. Dentro da própria fase exponencial, concluiu-se que diferentes correlações são estabelecidas ao longo desta. A explicação pode estar relacionada com CC da biomassa. Como demonstrado por Chen *et al.* (2009) a fluorescência do VN é dependente da CC da amostra. Este fator implica que a relação entre

fluorescência do VN e o método gravimétrico possa sofrer alterações ao longo do crescimento. Nos resultados de Chen *et al.* (2009) a variabilidade destas alterações vai-se dissipando com o aumento da CC.

Temos ainda de considerar a variabilidade associada ao método gravimétrico utilizado, que implica a realização de diferentes passos complicados como extração, separação e concentração, onde pode ocorrer perda de lípidos (Kumari *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 1998).

3.2.1 Curva de crescimento

Com base nas correlações entre os valores de CC e PS com DO ($p < 0,001$), utilizou-se a DO como medida para caracterizar o crescimento da CTP4 em meio Algal. As medições foram realizadas a cada dois dias, exceptuando a segunda amostragem (t_1), a qual realizou-se no dia seguinte ao inóculo (t_0). Utilizaram-se 3 cultivos, crescidos em simultâneo às mesmas condições.

A curva de crescimento em termos de CC determinou-se durante 12 dias de crescimento (Figura 3.4). O cultivo iniciou-se a uma concentração de aproximadamente 2×10^5 cel.mL⁻¹ e atingiu a fase estacionária a uma concentração de 3×10^6 cel.mL⁻¹ ao 11º dia de cultivo. Durante o intervalo de tempo entre T0 (o início da incubação) e T1 (1º dia) não ocorreu um verdadeiro período de latência, uma vez que as células iniciaram o crescimento imediatamente após a adição do inóculo. As amostragens seguintes foram realizado com intervalos de 2 dias.

A taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{max} = 0,36$ dias⁻¹) ocorreu entre o 3º e 5º dias de incubação, com uma taxa de duplicação celular correspondente de 1,9 dias; menor do que a taxa de duplicação celular média ([T0:T11] = 5,0 dias) que representa o período em que a cultura necessitava de menos tempo para duplicar a CC.

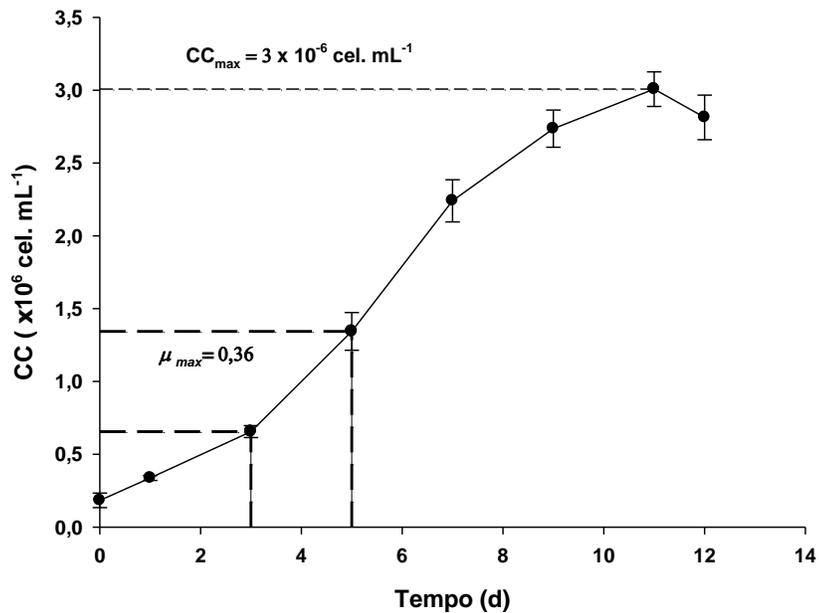


Figura 3.4 Curva de crescimento (CC) da estirpe CTP4 em meio Algal sem imposição de stress ($n = 3$).

A curva de crescimento em concentração de biomassa (g. L^{-1}) foi traçada em função da concentração de nitratos no meio, durante os 17 dias de cultivo bifásico. Ao 11º dia de cultivo foram readicionados nutrientes (meio Algal) a uma unidade experimental ($n = 3$), à mesma concentração inicial (1:1000), enquanto a outra unidade foi deixada em depleção de nutrientes (Figura 3.5). Podemos observar que existe uma taxa de recolha inicial de azoto elevada ($0,97 \text{ mM. d}^{-1}$) durante os dois primeiros dias, levando à exaustão de nitratos do meio. Após a readição de nutrientes esta taxa foi mais elevada ($1,47 \text{ mM. d}^{-1}$), mas apenas durante um dia e nunca levando à exaustão de azoto do meio.

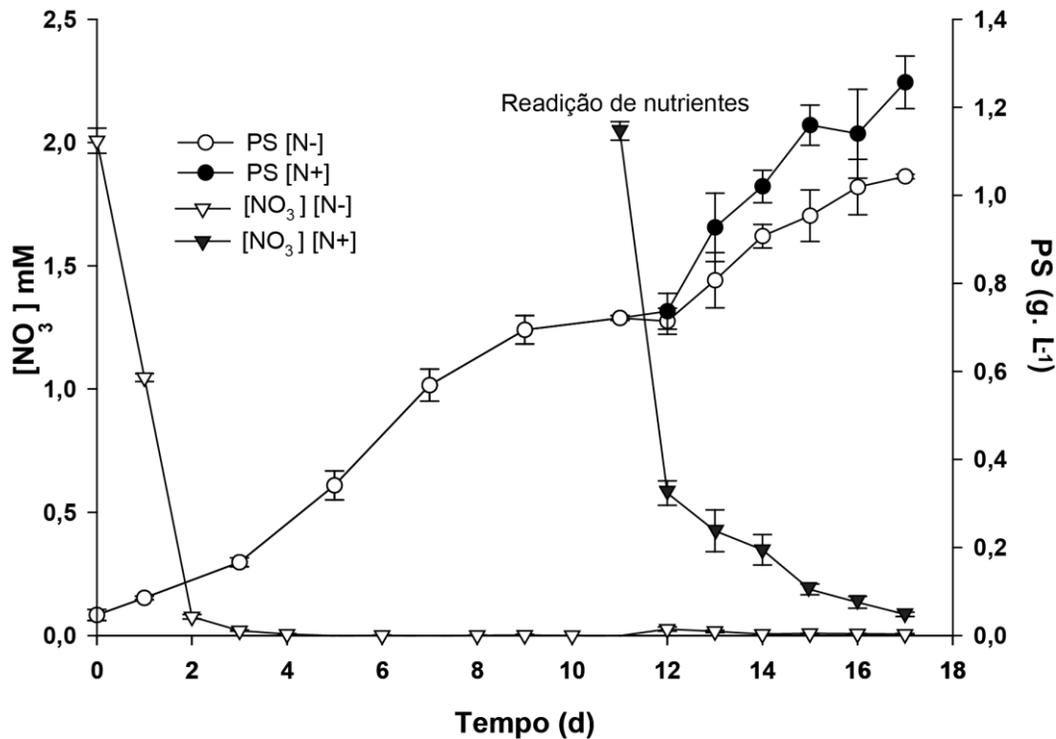


Figura 3.5 Curvas de crescimento em peso seco da CTP4 e concentração de nitratos no meio de cultura. PS [N-] – Culturas onde os nutrientes foram adicionados apenas no início do cultivo; PS [N+] Culturas em que ocorreu readição de nutrientes ao 11º dia de cultivo; [NO₃] [N-] Concentração de nitratos nas culturas em que não ocorreu readição de nutrientes; [NO₃] [N+] Concentração de nitratos nas culturas em que ocorreu readição de nutrientes ($n = 3$).

Quando se compara, a concentração de nitratos no meio com a concentração de biomassa, constata-se que variam de forma inversa, mas não ao mesmo ritmo. As células continuam em crescimento exponencial após o meio ter entrado em exaustão de azoto, durante 8 dias. Isto pode estar relacionado com alguma capacidade para a CTP4 reter e concentrar azoto em reservatórios internos (Guarnieri *et al.*, 2011). Um dos reservatórios intracelulares de azoto mais acessíveis é a clorofila. Contudo, este pigmento é essencial para o processo fotossintético e consequentes fluxos metabólicos para o crescimento e acumulação de lípidos (Stephenson *et al.*, 2010). Li *et al.* (2008a) observaram numa espécie de clorófito que o consumo de clorofila pode ocorrer até certos níveis sem grande problema para os fluxos metabólicos. A microalga foi capaz de acumular clorofila em excesso quando o azoto era abundante no meio servindo também como reservatório de azoto. Existe ainda a possibilidade da microalga conseguir hidrolisar constituintes da parede celular, como a quitina, a qual é um

polímero de *N*-acetilglucosamina, e mobilizar o azoto deste polissacárido para o crescimento (Eckardt, 2010; Gerken *et al.*, 2013; Guarnieri *et al.*, 2011).

A readição de nutrientes causou um novo aumento da biomassa, acompanhado pela maior taxa de consumo de nitratos do meio. A maior quantidade de biomassa em relação ao momento inicial, pode explicar este consumo de azoto instantâneo mais rápido. Possivelmente o azoto foi novamente canalizado para a produção de biomassa. Tal sugere que a quantidade de nutrientes no meio pode ser uma limitação ao crescimento do cultivo. No caso do ensaio com depleção de nutrientes, o aumento de biomassa observado pode estar relacionado com o aumento de lípidos na biomassa.

3.2.2 Indução lipídica

Os resultados da indução lipídica provêm das culturas submetidas às diferentes condições (N+; N-; N+[Fe-]; N-[Fe-]; N+[Fe+]; N-[Fe+]; N+[75]; N-[75]; N+[100]; N-[100]) durante 6 dias, obtidas a partir de um inóculo crescido durante 11 dias, que segundo a curva de crescimento (Figura 3.4) encontrava-se na fase estacionária. Na Tabela 6.2 podemos observar a resposta da cultura em termos da quantidade de lípidos na biomassa (% m. m⁻¹) ao longo dos 7 dias da segunda fase do crescimento bifásico, em que se impôs as condições de stress, após uma primeira fase de crescimento sem imposição de stress.

A Figura 3.6 mostra o efeito da depleção de nutrientes na acumulação de lípidos na estirpe CTP4. Pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na quantidade relativa de lípidos partir do 2º dia de indução de stress entre os dois tratamentos diferentes: depleção de nutrientes (N-) ou repleção de nutrientes (N+). A diferença aumentou gradualmente ao longo dos 6 dias de incubação e as culturas sujeitas a depleção de nutrientes atingiram o dobro do conteúdo lipídico ($18,9 \pm 0,9$ %) em relação às culturas sujeitas a readição de nutrientes ($8,1 \pm 1,1$ %; Figura 3.6). O conteúdo de lípidos final das culturas em repleção de nutrientes não mostrou um incremento significativo em

relação à condição inicial ($7,3 \pm 0,5 \%$), enquanto para a depleção de nutrientes o aumento foi de 2,5 vezes a quantidade inicial.

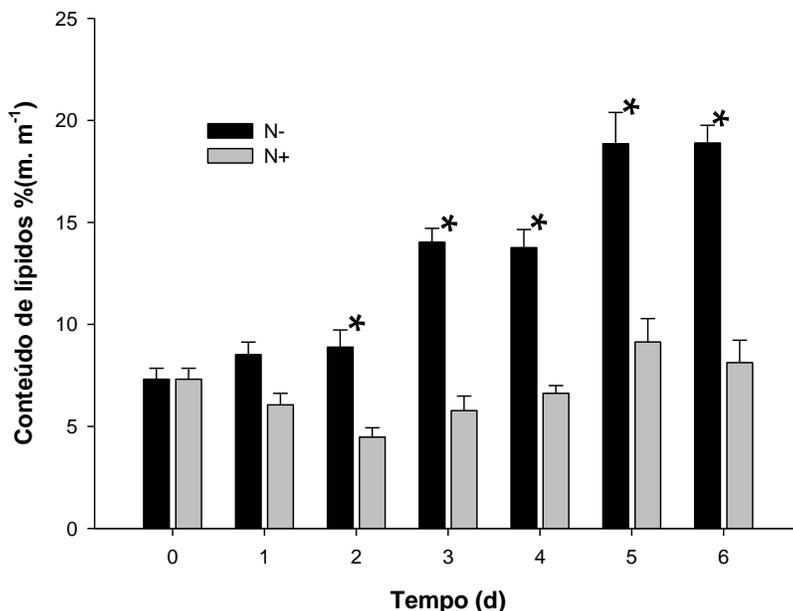


Figura 3.6 Conteúdo lipídico da biomassa por porcentagem de lipídios em peso seco (% m. m⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11^o dia do cultivo bifásico, o qual é renomeado como dia 0 (da 2^a fase de cultivo). Condições: (N-) depleção de nutrientes; (N+) readição de nutrientes. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados do mesmo dia, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial ($n = 3$; $p < 0,05$).

As outras 4 condições, [Fe-], [Fe+], [75] e [100], foram testadas em função da depleção e repleção de nutrientes, ou seja, N-[Fe-], N-[Fe+], N-[75], N-[100], N+[Fe-], N+[Fe+], N+[75] e N+[100] (Figura 3.7 e Figura 3.8). Quando comparadas com o controlo as condições em repleção de nutrientes (Figura 3.7), verifica-se que apenas o aumento de salinidade para 75 parece resultar numa pequena indução lipídica, atingindo no último dia um valor de 11,1% contra um conteúdo lipídico das células controlo de 8,5%, diferença esta que se mostrou significativa ($p < 0,05$). As outras condições não mostraram qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controlo e à concentração inicial lipídica.

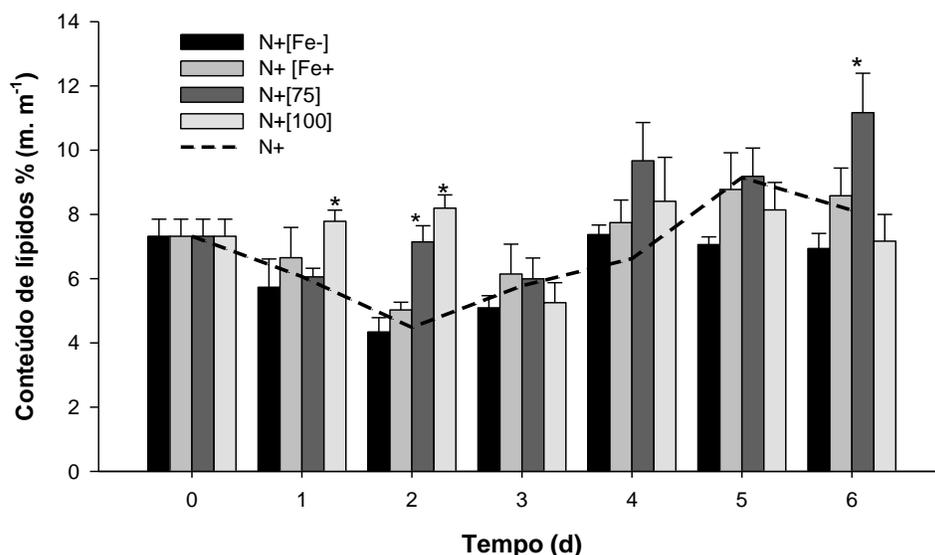


Figura 3.7 Conteúdo lipídico da biomassa por percentagem de lípidos em peso seco (% m. m⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11^o dia. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados das condições N+[Fe-], N+[Fe+], N+[75] e N+[100] em relação ao controlo N+, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial ($n = 3$; $p < 0,05$).

A comparação das diferentes condições em depleção de nutrientes mostrou um comportamento semelhante em todas as culturas (Figura 3.8), exceptuando o 5^o dia de incubação onde a cultura [100] apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controlo. Contudo, ao invés do que sucedeu com as culturas em que houve readição de nutrientes, no último dia não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

A alteração da concentração de ferro no cultivo mostrou igualmente não surtir efeito na acumulação de lípidos por parte da cultura. Tanto a depleção como o aumento da concentração de ferro (0,5 mM) no cultivo resultaram em culturas com conteúdos lipídicos estatisticamente iguais entre si e as culturas de controlo ($p > 0,05$) para depleção de repleção de nutrientes.

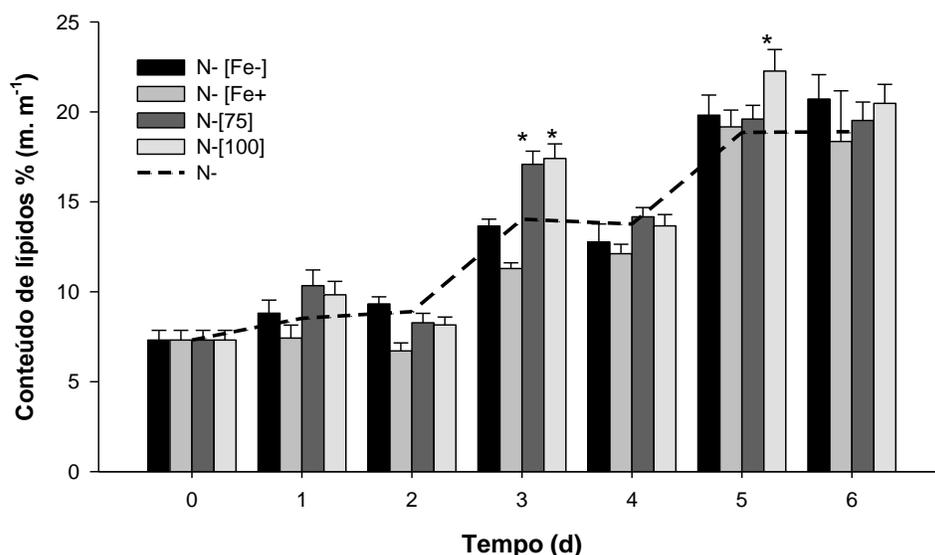


Figura 3.8 Conteúdo lipídico da biomassa por porcentagem de lípidos em peso seco (% m. m⁻¹), após a manipulação das condições de cultivo ao 11^o dia. Os asteriscos representam diferenças significativas entre resultados das condições N-[Fe-], N-[Fe+] N-[75] e N-[100] em relação ao controle N-, para as duas condições testadas, segundo o teste de Tukey para ANOVA fatorial ($n = 3$; $p < 0,05$).

A bibliografia relata extensivamente que em depleção de nutrientes, sob condições fóticas e na presença de dióxido de carbono, a maioria das microalgas acumulam lípidos (Xin *et al.*, 2010). Esta condição verificou-se neste trabalho, sendo o único fator que demonstrou aumentar consistentemente a quantidade de lípidos na biomassa. A depleção de azoto no meio, demonstrada anteriormente, pode ter sido a chave desta acumulação de lípidos, pois esta condição figura como uma das principais causa-efeito na acumulação de lípidos em microalgas (Sharma *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013). A falta de azoto na célula provoca a cessação dos processos metabólicos de síntese de proteínas necessários para o crescimento da cultura. Assim o excesso de carbono proveniente da fotossíntese é canalizado para substâncias de reserva como TAG ou amido (Figura 1.5; Scott *et al.*, 2010).

O aumento da salinidade do cultivo em relação às condições ótimas de cultivo, dentro dos valores halotolerância do *taxa*, é amplamente referenciada como sendo um promotor da síntese de lípidos (Sharma *et al.*, 2012). Esta condição pode produzir stress osmótico e stress iônico nas células, levando à

produção de metabolitos de protecção contra os efeitos do sal e que servem também como reguladores da pressão osmótica. Os resultados obtidos com a estirpe CTP4 não são completamente conclusivos, pois o incremento lípidos observada para a condição [75] em repleção de nutrientes não se deu consistentemente ao longo do tempo, à exceção do último dia, e na condição mais severa de salinidade [100] não se observou qualquer diferença significativa com o controlo. Por outro lado, temos que o aumento da quantidade de lípidos em depleção de nutrientes se deu consistentemente a todas as condições entre o 3º e o 5º dia, apesar de no final o conteúdo lipídico ser igual ao das células controlo. Isto pode significar que não existe um efeito cumulativo entre os fatores aumento de salinidade e a depleção de nutrientes. Uma das explicações poderá ser relacionada com o fato de um aumento de salinidade de 35 para 100 não ser suficientemente severo para induzir um aumento de lípidos. P.e., a microalga *Dunaliella salina* suporta salinidades de pelo menos duas vezes maiores do que máxima testada (Azachi *et al.* 2008).

Há muito que o efeito do ferro no crescimento das microalgas é conhecido (Benrenfeld *et al.*, 2006), mas só há pouco tempo tem sido associada ao aumento lipídico em microalgas (Concas *et al.*, 2014). Liu *et al.* (2008) demonstraram que o aumento da concentração de ferro no cultivo pode ao mesmo tempo aumentar a produtividade de lípidos totais e a de biomassa. Estes resultados foram reforçados pelo modelo matemático criado e testado por Concas *et al.* (2014). Neste trabalho não foram encontradas evidências dos resultados obtidos por estes autores (Tabela 6.1; Figura 3.7; Figura 3.8). Não existe ainda um modelo explicativo que relacione os processos metabólicos envolvidos de modo a compreender os efeitos descritos por estes autores. Por outro lado os autores apenas mostraram os seus resultados em função de fluorescência de VN que se liga a todos os lípidos, sejam eles neutros ou não, inclusive pigmentos. Alguns ensaios realizadas pelo MarBiotech indiciam que o VN ao ligar-se a carotenóides provoca um efeito cumulativo na fluorescência sobrevalorizando os resultados obtidos (Wu *et al.*, 2011).

A capacidade da CTP4 continuar a acumular lípidos quando em depleção de nutrientes, mesmo quando está exposta a condições extremas, como as estudadas, apresenta vantagens que podem ser exploradas para a produção de biocombustíveis. No cultivo em sistemas abertos por vezes recorre-se à imposição de condições abióticas adversas para impedir as contaminações biológicas (Ugwu *et al.* 2008; Borowitzka, 2013) e são necessárias espécies flexíveis como a CTP4 (J. Varela, comunicação pessoal).

3.2.3 Perfil de ácidos gordos

Os diferentes perfis de FAME obtidos (Tabela 3.1) mostram as alterações que ocorreram na síntese e acumulação de ácidos gordos, para as diferentes condições de cultivo. Identificaram-se 7 FAME diferentes (Tabela 3.1), nomeadamente aos que correspondem aos ácidos hexadecadienóico (C16:2), palmitoleico (C16:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), oleico (C18:1c), eláidico (C18:1f) e esteárico (C18:0). Para além destes, em algumas amostras, mais concentradas, foi possível detectar o ácido merístico (C14:0), tal como nas condições, N+, N+[75] e N+[100] não foi possível detectar o C18:0. Os ácidos gordos identificados são comumente encontrados em clorófitas (Hu *et al.* 2008).

O perfil obtido para as diferentes condições demonstrou uma preponderância de C16:0 e C18:2, em todas as condições, representando em conjunto mais de 65% do total de FAME. O C16:0 é um dos ácidos gordos que costuma aparecer em maior proporção no perfil lipídico de microalgas, o que não acontece com o C18:2, normalmente em concentrações mais baixas (Talebi *et al.*, 2013).

Os resultados indicam-nos que o efeito mais consistente ocorreu pela depleção de nitratos. Em relação aos cultivo N+ a depleção de nutrientes promoveu um aumento da abundância relativa de C16:0 e um consequente decréscimo de C18:2, excepto no tratamento com salinidade a 75, no qual não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a depleção e suplementação de nitratos. Em consequência, a depleção de nutrientes favorece a formação de

ácidos gordos saturados (SFA), aumentando a quantidade destes em relação aos polinsaturados (PUFA). Estes resultados são consistentes com os obtidos por diversos autores (Guarnieri et al., 2011; Stephenson et al., 2010). A grande diferença está no ácido gordo insaturado C18:2 que diminui a sua quantidade quando ocorre a depleção de nutrientes.

A condição [100] foi aquela em que a depleção de nutrientes mais promoveu a formação de SFA ($53,6 \pm 1,1\%$), com resultados significativamente diferentes das restantes ($p < 0,05$).

A diminuição do C18:2 e aumento do C16:0 pode estar ligada à falta de azoto necessário para a expressão das enzimas envolvidas no alongamento da cadeia de carbono (Figura 1.5; Hu et al, 2008). Está provado para plantas que pode existir a inibição das enzimas ligadas ao alongamento de ácidos gordos, levando à expressão de cadeias mais curtas (Trenkamp *et al.*, 2004)

Tabela 3.1 Perfil de ácidos gordos das diferentes culturas, após 17 dias de cultivo, em cultivo bifásico, em que as condições foram impostas ao 11º dia. N-, depleção de nutrientes; N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 ($n = 3$). Os resultados a negrito representam diferenças significativas entre os pares de resultados N- E N+ ($p < 0,05$)

FAME	Condições									
	N-	N+	[Fe-] N-	[Fe-] N+	[Fe+]N-	[Fe+]N+	[75]N-	[75]N+	[100]N-	[100]N+
C16:2	4,2 ± 0,6	5,1 ± 0,6	4,5 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,2 ± 0,4	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,6	4,8 ± 0,5	2,2 ± 0,5	4,4 ± 0,7
C16:1	7,7 ± 1,4	8,3 ± 1,5	8,2 ± 0,7	8,9 ± 0,9	9,6 ± 1,1	9,5 ± 0,5	5,9 ± 1,3	5,6 ± 0,7	6,1 ± 1,8	7,2 ± 1,7
C16:0	46,9 ± 1,5	39,4 ± 1,2	45,6 ± 1,5	38,7 ± 2,1	47,1 ± 0,9	36,0 ± 0,9	45,2 ± 3,4	42,3 ± 0,2	52,1 ± 1,0	41,0 ± 2,6
C18:2	23,8 ± 2,6	31,2 ± 2,0	24,0 ± 1,4	31,1 ± 2,9	22,4 ± 2,1	33,4 ± 1,2	28,0 ± 3,2	28,1 ± 2,7	19,3 ± 2,4	33,9 ± 4,8
C18:1c	16,2 ± 0,8	14,7 ± 1,1	15,8 ± 0,6	14,9 ± 0,6	15,9 ± 0,7	13,7 ± 0,2	14,7 ± 0,8	15,7 ± 0,9	19,6 ± 1,4	14,7 ± 1,3
C18:1t	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1
C18:0	0,3 ± 0,1	n.d.	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,4	n.d.	1,0 ± 0,5	n.d.
Σ SFA	47,2 ± 1,5	39,3 ± 1,2	46,4 ± 1,5	39,2 ± 2,1	47,3 ± 0,9	36,2 ± 0,9	45,5 ± 3,4	43,5 ± 0,2	52,6 ± 1,1	40,1 ± 2,6
Σ MUFA	24,8 ± 1,6	24,4 ± 1,9	25,0 ± 0,9	25,3 ± 1,1	26,3 ± 1,3	24,9 ± 0,6	21,1 ± 1,5	22,7 ± 1,2	26,0 ± 2,3	22,5 ± 2,1
Σ PUFA	28,0 ± 2,7	36,3 ± 2,1	28,6 ± 1,5	35,6 ± 3,0	26,4 ± 2,1	38,9 ± 1,2	33,5 ± 3,2	33,8 ± 2,9	21,4 ± 2,5	37,4 ± 4,8

n.d. Não detetado

A comparação dos perfis de ácidos gordos com o perfil de hidrocarbonetos dos combustíveis fósseis em relação à cadeia de carbonos indica uma perfeita adequação para a produção de biodiesel (C15-C25). Toda a fracção de FAME adquirida encontrava-se dentro do intervalo C16 a C18, para qualquer uma das condições estudadas. Além disso, não foram detectados PUFA de 4 ou mais cadeias duplas, desadequados para a produção de biocombustíveis, pela susceptibilidade que apresentam de sofrer oxidação durante o seu armazenamento (Chisti, 2007). A única grande alteração qualitativa que ocorre no perfil acontece com a depleção de nutrientes a qual favorece a formação de ácido hexadecanóico em detrimento de octadecadienóico, sem implicações conhecidas para a produção de biodiesel (C15-C25). Contudo, como os dados indicam (Tabela 3.2) parte dos ácidos gordos produzidos pela CTP4 adequam-se ao perfil de bioquerosene, que pode ser utilizado como combustível para aviões. Os dados indicam que a modulação do perfil de ácidos gordos pela depleção de nutrientes favorece a fracção da biomassa disponível para produzir bioquerosene. Apenas na condição de salinidade 75 não se comprovaram diferenças significativas entre N- e N+ ($p > 0,05$). Todos os outros resultados N- são estatisticamente iguais.

Tabela 3.2 Adequação do perfil lipídico para a produção de bioquerosene, após 17 dias de cultivo, em cultivo bifásico, em que as condições foram impostas ao 11º dia. N-, depleção de nutrientes; N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 ($n = 3$).

Condição		Bioquerosene C9-C16	
C	N ⁻	58,85	± 2,16
	N ⁺	52,68	± 2,04
[Fe-]	N ⁻	58,62	± 1,70
	N ⁺	52,17	± 2,29
[Fe+]	N ⁻	60,60	± 1,43
	N ⁺	51,11	± 1,04
[75]	N ⁻	56,42	± 3,69
	N ⁺	54,18	± 0,87
[100]	N ⁻	59,96	± 2,09
	N ⁺	51,45	± 3,11

3.3 Detecção de corpos lipídicos por microscopia de fluorescência

Através de microscopia de fluorescência, foi possível observar a morfologia da estirpe CTP4, na fase final da incubação. As imagens obtidas apresentaram o maior nível de fluorescência no canal FITC, quando marcadas com BODIPY, confirmando a presença de diversos corpos lipídicos, em todas as amostras. (Figura 3.9).

Podem observar-se vários pontos fluorescentes, correspondentes aos corpos lipídicos, marcados com BODIPY, confirmado pelo conjugado das imagens obtidas através do sistema de contraste de interferência diferencial (DIC) e filtro FITC. A abundância destes corpos lipídicos difere entre as amostras com e sem depleção de nutrientes. Em condições de depleção de nutrientes o número de corpos lipídicos é maior do que nos casos onde existiu a readição de nutrientes. Estes resultados mantêm-se consistentes entre as outras diferentes condições, sem grandes alterações entre elas (Figura 3.9). Contudo, estes dados não foram testados e esta análise deve ser qualificada como qualitativa e não quantitativa.

Os controlos negativos realizados sem o marcador BODIPY confirmaram os resultados de fluorescência obtidos. Os corpos lipídicos estão perfeitamente delimitados e a fluorescência de fundo é bastante baixa e não interfere com as observações.

Em conclusão, estas micrografias demonstram a acumulação de corpos lipídicos na biomassa, o que confirma os resultados obtidos com os métodos de quantificação de lípidos utilizados. Estes corpos lipídicos são organitos encontrados essencialmente em eucariontes que servem como reserva temporária de carbonos de alta densidade energética (Chapman & Ohlrogge 2012). Em microalgas a depleção de nutrientes provoca uma acumulação destes corpos (Wang *et al.*, 2009) .

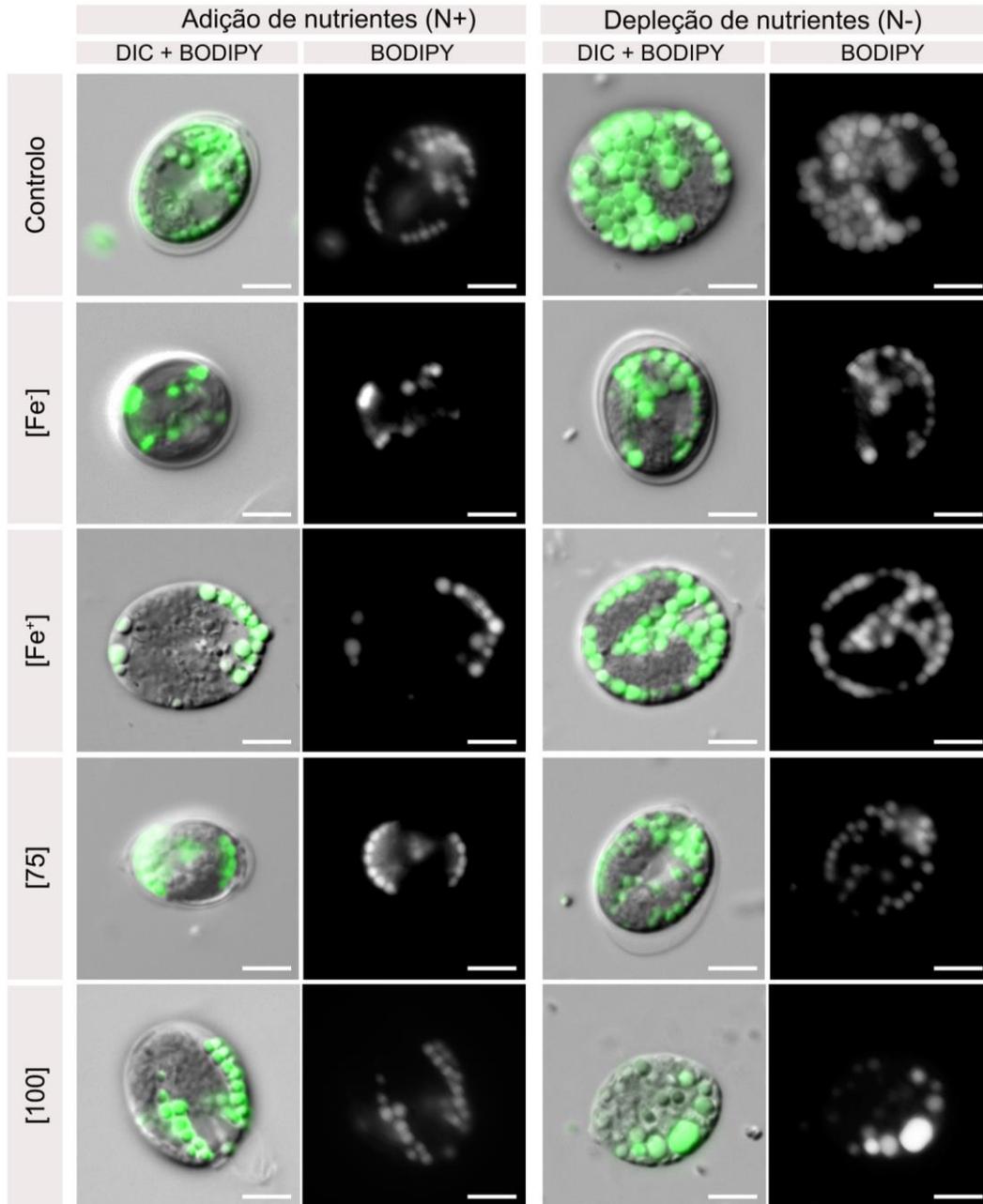


Figura 3.9 Imagens obtidas por microscopia de fluorescência, utilizando o fluorocromo salvatocrómico BODIPY 505/515 para marcar os lípidos em células de CTP4, resultantes das diferentes incubações realizadas durante 17 dias em cultivo bifásico, com imposição das condições N-, N+, [Fe-] N-; [Fe-] N+; [Fe+] N-, [Fe] N+, [75] N-, [75] N+, [100] N-, [100] N+. As imagens em fundo cinzento resultam da imagem combinada do DIC com a fluorescência do BODIPY e as imagens em fundo preto correspondem apenas à fluorescência do BODIPY (barra de escala = 5 µm).

O tamanho dos corpos lipídicos aparentam ter diferenças no tamanho e forma quando submetidos a salinidade 100 com depleção de nutrientes. Isto pode estar associado ao efeito provocado na expressão de algum gene que codifica as proteínas envolvidas na estruturação das gotas lipídicas (Horn *et al.*, 2013).

3.4 Bioatividades

A biomassa para o estudo das bioatividades foi obtida a partir do cultivo de CTP4 em mangas de 100 L. Foram testadas 3 condições diferentes: N-[Fe+] aumento da concentração de ferro para 0,5 mM; N- depleção de nutrientes e N+ readição de nutrientes após a fase estacionária. As condições N- e N+ foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos na indução de lípidos, tendo em conta que a depleção de nutrientes foi o único vector que provou resultar numa acumulação de TAG na biomassa. A condição [Fe+] foi escolhida pela natureza dos ensaios a realizar, ligados à capacidade de quelar metais. Como a CTP4 mostrou capacidade de crescer sob condições de concentração elevada de ferro, poderia ser expectável que quando cultivada nestas condições produzisse algum tipo de metabolito com a capacidade quelante.

Os extratos testados resultaram de 4 diferentes solventes: acetona e acetato de etilo, polares e apróticos com um índice de polaridade 5,1 e 4,4 respetivamente; metanol, polar e prótico com um índice de polaridade 5,1; e hexano, apolar, com um índice de polaridade 0,1. Esta estratégia permite a extração de compostos com diferentes características.

3.4.1 Atividade inibitória da atividade da BChE

O efeito dos extractos da CTP4 foram testados na inibição da BChE (Tabela 3.3). A capacidade de inibir esta enzima, envolvida nos processos ligados à doença de Alzheimer, é um dos principais focos de estudo na área das doenças degenerativas. Os principais fármacos aprovados para curar a doença de Alzheimer, como a tacrina ou a galantamina, utilizada neste estudo como controlo

positivo, apresentam problemas de bioviabilidade e efeitos colaterais ligados principalmente ao sistema digestivo (Custódio *et al.*, 2012).

De acordo com Vinutha *et al.* (2007) a atividade da BChE pode classificar-se em forte (>50% inibição) moderada (30-50% de inibição), fraca (5-30% de inibição) ou nula (<5 % de inibição). Apenas 3 extratos de hexano, destacados na Tabela 3.3, apresentaram resultados correspondentes a uma atividade moderada sobre a BChE, sem diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). Todos os outros extratos apresentaram uma atividade fraca ou nula. A galantamina usada como controlo positivo a 1 mg. mL^{-1} apresentou atividade inibitória de 80,3%.

As concentrações do extratos utilizadas neste ensaio (2,5; 1,25; e 0,25 mg. mL^{-1}) tiveram de ser mais baixas do que as inicialmente previstas e utilizadas nos outros dois ensaios (10; 5; e 1 mg. mL^{-1}). Esta necessidade relacionou-se com os altos valores de absorvância obtidos no extrato que provocaram grande interferência nas leituras da atividade. Muito provavelmente tal está relacionado com a presença de clorofila *a* na amostra, o que poderá resultar em elevada absorvância no comprimento de onda utilizado (412 nm; Griffiths *et al.*, 2011 b). Mesmo após as diluições a interferência por parte de pigmentos que foram co-extraídos ainda foi significativa, revelando uma forte limitação do método sob estas condições experimentais

Semelhante ao descrito por Custódio *et al.* (2012 a), os extratos de hexano apresentaram os melhores valores. Das 4 microalgas testadas por este autor (*Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella minutissima* e *Rhodomonas salina*), 3 apresentaram cerca de 80 % de atividade inibitória, muito acima do valor mais alto obtido para a CTP4, mas para concentrações de 10 mg. mL^{-1} . À concentração de 1 mg. mL^{-1} os resultados de Custódio *et al.* (2012a) situam-se ao mesmo nível dos obtidos neste ensaio para a concentração de 1,25 mg mL^{-1} . Esta semelhança entre resultados indica poder existir um composto comum, ou uma família de compostos apolares com capacidade para inibir a BChE, presente em clorófitas.

Tabela 3.3 Atividade inibitória da BChE, para os diferentes extractos condições de cultivo e concentrações ($n = 6$).

	Concentrações	Metanol	Acetona	Acetato de Etilo	Hexano
N-[Fe+]	0,25 mg. mL ⁻¹	-1,12 ± 0,06	1,30 ± 0,13	-2,42 ± 0,09	-3,94 ± 0,16
	1,25 mg. mL ⁻¹	-16,33 ± 1,40	13,50 ± 1,15	16,60 ± 0,79	33,46 ± 3,17
	2,5 mg. mL ⁻¹	-38,74 ± 2,79	0,63 ± 0,04	3,63 ± 0,33	8,84 ± 0,93
N+	0,25 mg. mL ⁻¹	6,92 ± 0,58	-7,80 ± 0,66	0,26 ± 0,02	-3,89 ± 0,17
	1,25 mg. mL ⁻¹	19,68 ± 2,01	9,77 ± 1,13	19,95 ± 0,47	30,24 ± 1,00
	2,5 mg. mL ⁻¹	20,99 ± 2,31	-5,46 ± 0,39	4,26 ± 0,53	18,12 ± 1,03
N-	0,25 mg. mL ⁻¹	5,20 ± 0,33	-3,01 ± 0,29	-1,68 ± 0,15	-4,03 ± 0,18
	1,25 mg. mL ⁻¹	19,68 ± 1,89	0,12 ± 0,02	12,81 ± 1,22	24,10 ± 3,13
	2,5 mg. mL ⁻¹	13,44 ± 0,70	-30,61 ± 1,87	-8,06 ± 0,59	30,70 ± 2,19

Os valores negativos obtidos no ensaio para diversos extratos podem estar ligados à interferência da absorvância apresentada pelo extracto. Por outro lado, pode ser fruto de uma reação de algum composto presente na biomassa com a enzima. A presença de compostos tiólicos na biomassa pode reduzir diretamente o DTNB e criar falsos negativos, sem a presença da enzima (Dohnal *et al.*, 2013; Hermanson, 2013). Uma abordagem diferente deve ser levada em consideração, incluindo uma extração sequencial, utilizando os mesmos solventes, deixando para último o hexano, viste ser o que apresenta o melhor resultado.

3.4.2 Atividade quelante de metais (cobre e ferro)

As atividades quelante de cobre (Cu²⁺) e ferro (Fe²⁺) foram avaliadas e comparadas com um composto quelante conhecido, EDTA (Figura 3.10; Figura 3.10). Os extratos mostraram capacidade para quelar ambos os metais, sendo a atividade sobre o ferro a mais potente. A atividade foi maior quanto maior a concentração dos extratos para quase todas as condições.

Os resultados da atividade quelante de cobre mostram existir uma afinidade com os solvente polares, tendo uma atividade máxima registada para os extratos

de acetona (55,5%) da cultura N+[Fe+] e metanol (51,9%) e acetato de etilo (54,3%) da cultura N+, à concentração de 10 mg mL⁻¹. Resultados significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos do EDTA (79,4%). Comparados com outro trabalho publicado em microalgas (Custódio *et al.*, 2012a) existe semelhança para os resultados nos extratos metanólicos de *Mychonastes homosphaera* (syn. *Chlorella minutissima*; $53,5 \pm 2,2\%$) e superiores aos de *Tetraselmis chuii* ($43,7 \pm 2,4\%$) e *Rhodomonas salina* ($44,6 \pm 1,0\%$), a 10 mg. L⁻¹. Por outro lado estas microalgas mostraram superior atividade quelante de cobre em extratos de hexano.

A CTP4 mostrou uma grande capacidade para quelar ferro apresentando atividade superior a 60% em quase todos os extratos com concentração de 10 mg. mL⁻¹. Os resultados mais altos foram obtidos para os extratos de acetato de etilo ($89,8 \pm 5,3\%$) e N+ [Fe+] de hexano ($89,3 \pm 3,4\%$). Em relação aos resultados que Custódio *et al.* (2012a) obteve, temos atividade inferior à demonstrada pelas microalgas nesse estudo. Em extracto de hexano à concentração de 1 mg.mL⁻¹. todas apresentaram atividade próxima dos 100%, superior inclusive à do EDTA ($95,2 \pm 3,2\%$). Isto não invalida que os nossos resultados tenham sido muito positivos, pois estamos a lidar com extratos e não com compostos puros. .

A atividade quelante presente nos diferentes extratos sugere que esteja distribuída por diversos compostos de diferentes naturezas químicas, polares e não polares. Nas fracções polares esta atividade pode dever-se à presença de compostos fenólicos, capazes de se ligarem a metais de transição (Megías *et al.*, 2009). Enquanto a atividade apresentada pela fracção não polar pode estar ligada à presença de carotenóides como o β -caroteno, que se sabe poderem apresentar atividade quelantes de metais (Raposo *et al.* 2013)

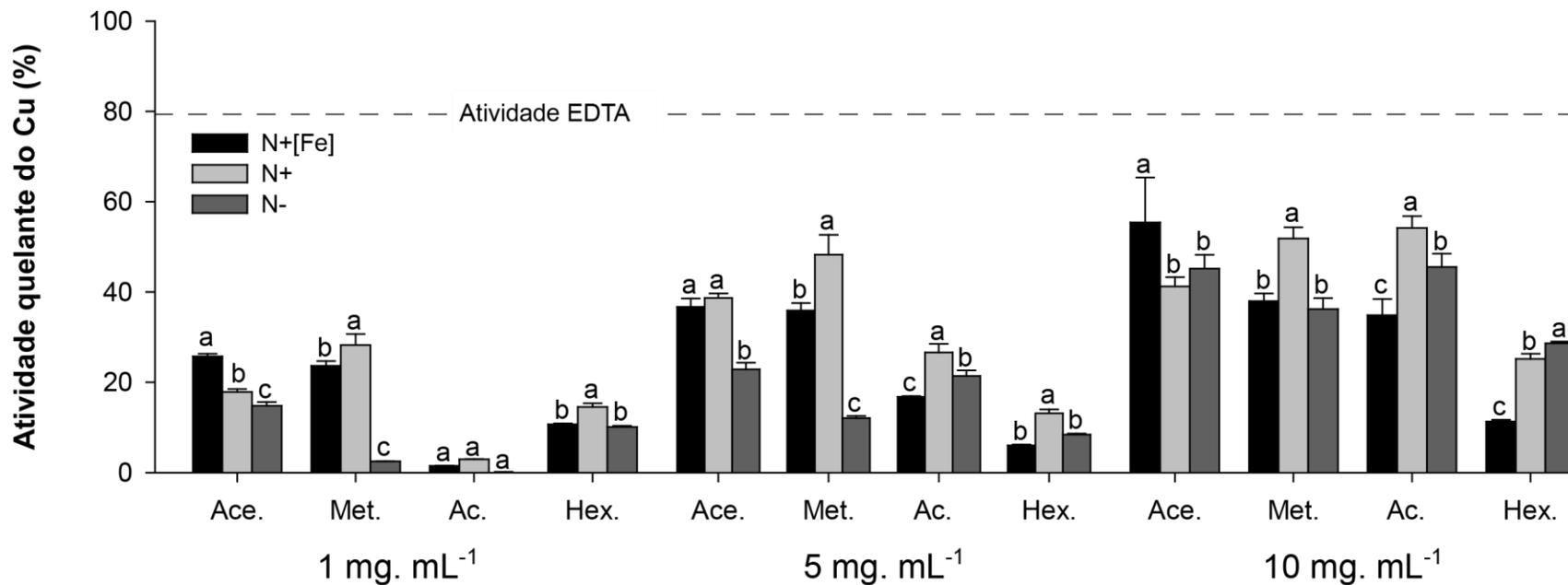


Figura 3.10 Atividade quelante de ferro (%) dos extratos de acetona (Ace.), metanol (Met.), acetato de etilo (A.E.) e hexano (Hex. da biomassa cultivada em concentração de ferro alta (0,05 mM) N+ [Fe+], e readição de nutrientes após atingir a fase estacionária N+ e depleção de nutrientes N-. Testados a 3 concentrações diferentes 1, 5, 10 mg. mL⁻¹. As letras indicam diferenças significativas entre as condições testadas, para o mesmo extrato e concentração, utilizando o teste de Tukey para $p < 0,05$ ($n = 6$). EDTA foi utilizado como controlo positivo.

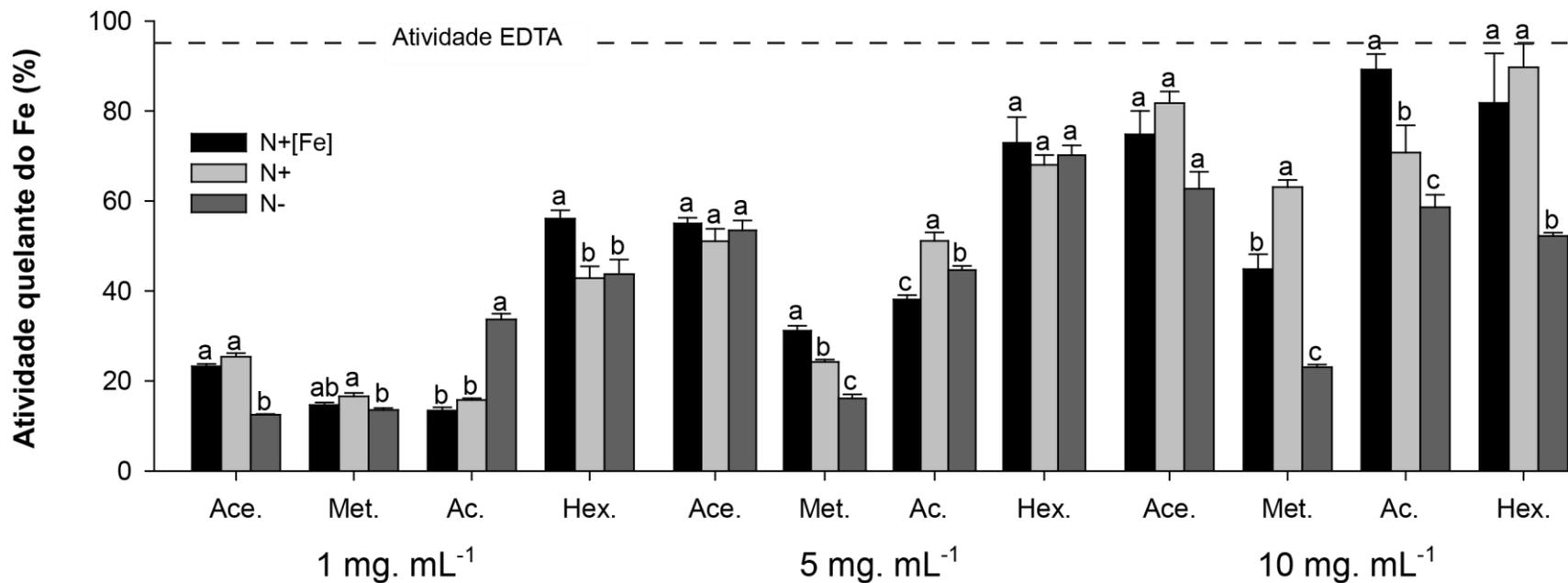


Figura3.11 Atividade quelante de ferro (%) dos extratos de acetona, metanol, acetato de etilo e hexano da biomassa cultivada em concentração de ferro alta (0,05 mM) N+ [Fe+], depleção de nutrientes N- e readição de nutrientes após atingir a fase estacionária. Testados a 3 concentrações diferentes 1, 5, 10 mg. mL⁻¹. As letras indicam diferenças significativas entre as condições testadas, para o mesmo extrato e concentração, utilizando o teste de Tukey para $p < 0,05$ ($n = 6$). EDTA foi utilizado como controlo positivo.

4 Conclusão

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de diferentes estímulos químicos, na expressão e acumulação de lípidos, na estirpe CTP4. Técnicas similares têm sido estudadas, com vista à produção de microalgas como biomassa para biocombustíveis. Os resultados obtidos permitiram perceber de que forma estes agentes (depleção de nutrientes, mudança na concentração de ferro, e aumento da salinidade) influenciam a quantitativa e qualitativamente o perfil lipídico.

A capacidade da CTP4 para acumular lípidos na biomassa sob a forma de TAG foi comprovada. Em depleção de nutrientes a CTP4 conseguiu acumular $\approx 20\%$ do seu peso seco em lípidos, ao fim de 17 dias de cultivo. Essa capacidade não foi afectada em meio hipersalino 75 e 100 de salinidade, a concentrações elevadas de ferro (0,5 mM) e em depleção de ferro. Micrografias sob DIC e após coloração com BODIPY mostraram a acumulação de TAG em corpos lipídicos dentro das células confirmando os resultados.

O perfil de ácidos gordos da CTP4 mostrou ser moldado pela depleção de nutrientes aumentando a concentração de C16:0 e diminuindo o grau de insaturação. Os ácidos gordos presentes no perfil enquadraram-se no perfil requerido para a produção de biodiesel, podendo ainda uma fracção, cerca de 60%, ser utilizada como bioquerosene quando cultivada em depleção de nutrientes.

Alguns extratos da biomassa apresentaram alguma das bioatividades testadas. Alguns extratos de hexano mostraram uma atividade moderada (30-50%) na inibição da BChE e ocorreram sob as três condições testadas. A atividade quelante de cobre teve os melhores resultados nos extratos N+[Fe+] de acetato de etilo, [N+] acetona E [N+] metanol, atingindo mais de 50% de atividade. A atividade quelante de ferro foi o ensaio para o qual ocorreram os resultados mais fortes, atingido uma atividade quelante de aproximadamente 90% para os

extratos N+[Fe+] de acetato de etilo e N+ de hexano a 10 mg. mL⁻¹. De uma forma geral as atividade quelantes testadas funcionaram em função da concentração dos extratos.

A partir do trabalho desenvolvido para a realização desta dissertação de mestrado, foi possível determinar que a CTP4 apresenta algumas características com potencial para a produção de biocombustíveis como, a tolerância a condições abióticas extremas, capacidade de acumular lípidos sob a forma de TAG e um perfil lipídico adequado à produção de biodiesel. Porém, a acumulação de lípidos verificada ainda não é suficiente para se apresentar como uma real solução. Por outro lado, os resultados obtidos na atividades quelante de cobre e ferro criam expectativas sobre o potencial farmacológico presente na CTP4.

É necessário continuar a investigação sobre esta microalga. Encontrar uma forma de aumentar a quantidade de lípidos na biomassa deve ser o principal objectivo. Para isto é necessário compreender todo o mecanismo de biossíntese de ácidos gordos da CTP4 incluindo análises à genómica, proteómica e transcriptómica.

5 Referências bibliográficas

- Anandarajah, K., Mahendrapurumal, G., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy*. **96**, 371-377
- Ardiyanti, A. R., Gutierrez, A., Honkela, M. L., Krause, A. O. I., Heeres, H. J. (2011) Hydrotreatment of wood-based pyrolysis oil using zirconia-supported monoand bimetallic (Pt, Pd, Rh) catalysts. *Applied Catalysis A: General*. **407**, 56-66
- Atadashi, I. M., Aroua, M.K., Aziz, A.A. (2011) Biodiesel separation and purification: A review. *Renewable Energy*. **36**, 437-443
- Azachi, M., Sadka, A., Fisher, M., Goldshlag, P., Gokham, I., Zamir, A. (2002) Sal induction of fatty acid elongase and membrane lipid modifications in the extreme halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*. **129**, 1320-1329
- Barbosa, M. J., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J., Wijffels, R. H. (2003) Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology and Bioengineering*. **82**, 170-179
- Beardall, J. & Raven, J. A. (2013) Limits to phototrophic Growth in Dense Culture: CO₂ supply and Light *in* Microalgae for Biofuels and Energy. Borowitzka, M. A. & Moheimani, N. R. (Ed.). *Springer*. ISBN 978-94-007-5479-9
- Behrenfel, M. J., Worthington, K., Sherrel, R. M., Chavez, F. P., Strutton, P., McPhaden, M., Shea, D. M. (2006) Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics. *Nature*. **442**, 1025-1028
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983) On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. **72**, 593-597
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G., Thomas, W. H. (1985) Chemical Profile of Selected Species of Microalgae with Emphasis on Lipids. *Journal of Phycology*. **21**, 72-81
- Benarroch, E. E. (2012) Brain iron homeostasis and neurodegenerative disease. *Neurology*. **72**, 1436-1440
- Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Zittelli, G. C., Bassi, Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D., Tredici, M. R. (2012) Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F6M-M33 *Bioresource Technology*. **114**, 567-572
- Borowitzka, M. A. (2013) Species and Strain Selection *in* Microalgae for Biofuels and Energy. Borowitzka, M. A. & Moheimani, N. R. (Ed.). *Springer*. ISBN 978-94-007-5479-9

- Borowitzka, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. **70**, 313-321
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., Richmond, A. (1987) Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*. **12**, 37–47
- Brand-williams, W., Cuvelier, M. E., Bersect, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. **28**, 25-30
- Brierley, A. S. & Kingsford, M. J. (2009) Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. *Current Biology*. **19**, 602-614
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A. (1996) Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*. **32**, 64–73
- Bullock, R. (2004) Future directions in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert opinion on investigational drugs*. **13**, 303-314
- Camps, P., El Achab, R., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J. E., Vivas, N. M., Barril, X., Orozco, M., Luque, F. J. (2000) New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of medicinal chemistry*. **43**, 4657-4666
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, P. M., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., Pinto, E. (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry Physiology*. **146**, 60-78.
- Carriquiry, M. A., Du, X., Timilsina, G. (2011) Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy*. **39**, 4222-4234
- Chapman, K. D. & Ohlrogge, J. B. (2012) Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**, 2288-2294
- Cheirsilp, B. & Torpee, S., (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*. **110**, 510-516
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S., Salley, S.O. (2011) Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. **102**, 1649–1655
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009) A high Throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*. **77**, 41-47

- Chisti, Y. (2007a) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. **26**, 126-131
- Chisti, Y. (2007b) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. **25**, 294-306
- Chiunnasamy, S., Ramakriashnan, B., Bhatnagar, A., Das, K.C. (2009) Biomass Production Potencial of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. **10**, 518-532
- Concas, A., Steriti, A., Pisu, M., Cao, G. (2014) Comprehensive modeling and investigation of the effect of iron on the growth rate and lipid accumulation of chlorella vulgaris cultured in a batch photobioreactors. *Bioresource Technology*. **153**, 340-350
- 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
- Croft, M. T., Warren, M. J., Smith, A. G. (2006) Algae Need Their Vitamins. *Eukariotic Cell*. **5**, 1175-1183
- Cunha, A., Feddern, V., De Prá, M. C., Higarashi, M. M., de Abreu, P.G., Coldebella, A. (2013) Synthesis and characterization of ethylic biodiesel from animal fat wastes. *Fuel*. **105**, 228-234
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C.V., Pereira H., Barreira, L., Albericio F., Varela., J. (2012 a) Microalgae of different phyla display antioxidante, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*. **131**, 134-140.
- Custódio, L., Ferreira, A. C., Pereira, H., Silvestre L., Vizento-Duarte, C., Barreira, L., Rauter, A. P., Alberício. F., Varela., J. (2012 b) The marine Halophytes *Carpobrotus edulis* L. and *Arthrocnemum macrostachyum* L. are potential sources of nutritionally important PUFA's and metabolites with antioxidant, metal chelanting and anticholinesterase inhibitory activities. *Botanica Marina*. **55**, 281-288
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Rauter, A. P., Alberício, F., Varela, J. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*. DOI: 10.1007/s10811-013-0098-0
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. and Stymne, S. (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 6487–6492

- Danquah, M.K., Gladman, B., Moheimani, N., Forde, G.M. (2009) Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. *Chemical Engineering Journal*. **151**, 73-78
- Demirbas A. (2010) Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. **51**. 2738-2749
- Demirbas, A. & Demirbas, M. F. (2010) *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer. **ISBN** 978-1-84996-049-
- Demirbas, A. (2009) Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Applied Energy*. **86**, 108-117
- Demirbas, A. (2011) Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*. **88**, 3541-3547
- Dismukes, G. C., Carrieiri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., Posewitz, M. C. (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. **19**, 235-240
- Doana, Q. C., Moheimani, N. R., Mastrangelo, A. J., Lewis, D. M. (2012) Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass and Bioenergy*. **46**, 79-88
- Dohnal, V., Dohnalova, L., Jun, D., Kuka, K. (2013) Selective Monitoring of Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase by Flow Injection Analyses with Mass Spectrometric Detection. *Military Medical Science Letters*. **82**, 120-125
- Edwards, A. M., Platt, T., Sathyendranath, S. (2004) The high-nutrient, low-chlorophyll regime of the ocean: limits on biomass and nitrate before and after iron enrichment. *Ecological Modelling*. **171**, 103-125
- Eckardt, N. A. (2010) The *Chorella* Genome: Big Surprises from a Small Package. *Plant Cell*. **22**, 2924
- Fábregas J., Abade J., Herrero C., Cabezas B. V., Veiga M. (1984) Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in a batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*. **42**, 207-215
- Ferrão-Gonzales, A.D., Véras, I.C., Silva, F.A.L., Alvarez, H.M., Moreau, V.H. (2011) Thermodynamic analysis of the Kinetics reactions of the production of FAMES and FAEE using Novozyme 435 as catalyst. *Fuel Processing Technology*. **92**, 1007-1011
- Filho, J. M. B., Medeiros, K. C. P., Diniz, F. F. M., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., da-Cunha, E. V. L., Almeida, J. R. G. S., Quintans-Júnior, L. J. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacologia*. **16**, 258-285

- Fischer, M., Werber, M., Schwartz, P. V. (2009) Batteries: Higher energy density than gasoline? *Energy Policy*. **37**, 2639-2641
- Fonseca D. (2008) *Biomass to liquid biofuels processes*. MSs Thesis. FEUP/Algafuel, Porto
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **92**, 405-416
- Furimsky, E. (2012) Hydroprocessing challenges in biofuels production. *Catalysis Today*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.11.008>
- Gaeta, A & Hider, R. (2005) The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *British Journal of Pharmacology*. **146**, 1041-1059
- Gao, Y., Yang, M., Wang, C. (2013) Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource Technology*. **147**, 484-491
- García-González, M., Moreno, J., Cañavate, J. P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J., Guerrero, M. G. (2003) Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of applied Phycology*. **15**, 177-184
- Garg, S., Li, Y., Wang, L., Schenk, P.M. (2012) Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity. *Bioresouce Technology*. **121**, 471-474
- Gerken, H. G., Donohoe, B., Knoshaug, E. P. (2013) Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*. **237**, 239-253
- Goes, J.I., Handa, N., Taguchi, S., Hama, T., Saito, H., (1995) Impact of uv radiation on the production patterns and composition of dissolved free and combined amino acids in marine phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. **17**, 1337–1362
- Gouveia, L. (2011) *Microalgae as Feedstock for Biofuels*. Springer. **ISBN** 978-3-642-17996-9
- Greene, D. L., Hopson, J. L., Li, J. (2006) Have we run out of oil yet? Oil peaking analysis from an optimist's perspective. *Energy Policy*. **34**, 515-531
- Gressel, J. (2008) Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*. **174**, 246-263
- Griffiths, M. J., Dicks, R. G., Richardson, C., Harrison, S. T. L. (2011 a). Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel, Biodiesel in Feedstocks and Processing Technologies. Stoytcheva, M. & Montero, G. (Ed.). *InTech*. **ISBN:** 978-953-307-713-0,. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-feedstocks-and-processing->

technologies/advantages-and-challenges-of-microalgae-as-a-source-of-oil-for-biodiesel

Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., Harrison, S. T. L. (2011 b) Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*. **85**, 119-123

Grima, M. E., Fernández, F.G.A., Camancho, F.G., Chisti, Y. (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*. **70**, 231-247

Guarnieri, M. T., Nag, A., Smolinski, S. L., Darzins, A., Seibert, M., Pienkos, P. T. (2011) Examination of Triacylglycerol Biosynthetic Pathways via *De Novo* Transcriptomic and Proteomic Analyses in an Unsequenced Microalga. *PLoS ONE*. **6**, e25851

Guckert, J. B. & Cooksey, K. E. (1990) Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology*. **26**, 72–79.

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. **45**, 160-186

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. (2013) Algal Lipids and Their Metabolism in Microalgae for Biofuels and Energy. Borwitzka, M. A. & Moheimani, N. R. (Ed.). *Springer*. ISBN 978-94-007-5479-9

Guseo, R. 2011 Worldwide cheap and heavy oil productions: A long-term energy model. *Energy Policy*. **39**, 5572-5577

Guzzella & Sciarretta (2007) Vehicle propulsion systems, 2nd. Ed., Springer Verlag

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. (2012) Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review *Biotechnology Advances*. **30**, 709-732

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, J., Rasala, B., Mayfield, S. (2010) Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels*. **1**, 763-784

Harwood, J. L. & Guschina, I. A. (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*. **91**, 679-684

Hermanson, G. T. (2013) Bioconjugate Techniques (III Ed.) *Elsevier*. ISBN: 978-0-12-382239-0

Hider, R. C., Ma Y, Molina-Holgado F., Gaeta, A., Roy, S. (2008), Iron chelation as a potential therapy for neurodegenerative disease. *Biochemical Society Transactions*. **36**, 1304-1308

- Hider, R. C., Roy, S., Ma, Y. ., Kong, X. L., Preston, J. (2011) The potential application of iron chelators for the treatment of neurodegenerative diseases. *Metallomics*. **3**, 239-249
- Ho, S-H., Huang, S-W., Chen, C-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J-S. (2013) Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technologies*. **135**, 191-198
- Horn, P. J., James, C. N., Gidda, S. K., Kilaru, A., Dyer, J. M., Mullen, R. T., Ohlrogge, J. B., Chapman, K. D. (2013) *Plant Physiology*. **162**, 1926-1936
- 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.
- Jorquera, O., Kiperstock, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., Ghirardi, M. L. (2010) Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open photobioreactors. *Bioresource Technology*. **101**, 1406-1413
- Kagan, J. (2010) Third and Fourth Generation Biofuels: Technologies, Markets and Economies Through 2015, GTM research Report. *Greentech Media*.
- Kalpesh, K. S., Schuhmann, H., Schenk, P. M. (2012) High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*. **5** 1532-1553
- Kavirajan, H. & Schneider, S. L. (2007) Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta analysis of randomised controlled trials. *Lancet neurology*. **6**, 782-792
- Khotimchenko, S. V. & Yakovleva, I. M. (2005) Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*. **66**, 73–79
- Kothari, R., Pathak, V. V., Kumar, V., Singh, D. P. (2012) Experimental growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresource Technology*. **116**, 466-470
- Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B. (2011) Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Analytical Biochemistry*. **415**, 134-144
- Lakaniemi, A.-M., Inthihar, V. M., Tuovinen, O. H., Puhakka, J. A. (2012) Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial biotechnology*. **5**, 69-78
- Larson, E. (2008) Biofuel Production Technologies: Status, Prospects, and Implications for Trade and Development, *United Nations Conference on Trade & Development*, **New York & Geneva**

- Lee, S. J., Yoon, B.-D., Oh, H.-M. (1998) Rapid method for the determination of lipid content from green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*. **12**, 553-556
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N. (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog*. **24**, 815–820:
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., Yesuf, J., Trushenski, J., Blackburn, J. W. (2010) Use of sweetsorghumjuice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresource Technology*. **101**, 3623–3627
- Liu, C-H., Chang, C-Y., Liao, Q., Zhu, X., Liao, C-F., Chang, J-S. (2013) Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.104>
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. **99**, 4717-4722
- Lordan, S., Ross, R. P., Stanton, C., (2011) Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Marine Drugs*. **9**, 1058-1100
- Lü, J., Sheahan, C., Fu, P. (2011) Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy & Environmental Science*. **4**, 2451-2466
- Mairet, F., Bernard, O., Ras, M., Lardon, L., Steyer, J-P. (2011) Modeling anaerobic digestion of microalgae using ADM1. *Bioresource Technology*. **102**, 6823-6829
- Marx, J. (2003) Possible Role for Environmental Copper in Alzheimer's Disease. *Science*. **301**, 905
- 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
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A. (1999) Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology*. **70**, 33-38
- Megías, C., Pastor-Cavada, E., Torres-Fuentes C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Jua, R., Pastor, J., Vioque, J. (2009) Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *European Food Research and Technology*. **230**, 353-359
- Mock, T., Kroon, B. M. A. (2002) Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—ii: The significance of lipids under light limited growth in antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*. **61**, 53–60

Moroney, J. V. & Ynalvez, R. A. (2009) Algal Photosynthesis in Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000322.pub2

Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J. (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. **14**, 289-300

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**, 578-597

Nisha, A., Sankar, K. U., Venkateswaran, G. (2012) Supercritical CO₂ of Mortierella alpine cell oil: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*. **133**, 220-226

Pangestuti, R., Kim, S-K. (2011) Neuroprotective effects of marine algae. *Marine Drugs*. **9**, 803-818

Pereira H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek E., Engelen, A., Varela, J. (2012) Marine macroalgae as a source of polyunsaturated fatty acids for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*. **10**, 1920–1935

Pereira, H. (2009) *Desenvolvimento e optimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala*. MSc Thesis. Universidade do Algarve

Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C.V., Custódio, L., Varela, J. (2011) Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnology for biofuels*. **4**, 61.

Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., Thajuddin, N. (2012) Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: *Evaluation for biodiesel production*. *Biomass & Bioenergy*. **37**, 60–66.

Přibyl, P., Cepák, V., Zachleder, V. (2012) Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Bioenergy and Biofuels*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **94**, 549-561

Pulz, O. & Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65**, 635-648

Ramos, A., Coesel, S., Marques, A., Rodrigues, M., Baumgartner, A., Noronha, J., Rauter, A., Brening, B., Varela, J. (2008) Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* *Lcy-β* gene encoding a functional lycopene β-cyclase. *Applied Microbiology for Biotechnology*. **79**, 819-828

- Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., Ravishankar, G. A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*. **98**, 560-564
- Raposo, M. F. J., Morais, R. M. S. C., Morais, A. M. M. B. (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*. **93**, 479-486
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., Olsen, Y. (1994) Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*. **30**, 972–979.
- REN 21 (2012) Renewables 2012 Global status report.
- Ridgwell A., Valdes, P. J. (2009) Climate and climate change. *Current Biology*. **19**, 563-566
- Rocha, J. M. S., Garcia, J. E. C., Henriques, M. H. F. (2003) Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis daditana*). *Biomolecular Engineering*. **20**, 237-242
- Roessler, P.G. (1990) Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology*. **26**, 393–399
- Rosenberg, J. N., Oylier, J.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M. J., (2008) A green light engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. **19**, 430-436
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.R., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, J.H. (2008) Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Resources*. **1**, 20,-43
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., Smith, A. G. (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. **21**, 277–286.
- Shakhter, A., Valverde, L. J., Wilson, R. (1995) Integrated risk Analysis of global climate change. *Chemosphere*. **30**, 1585-1618
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., (2009) Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*. **27**, 409–416
- Sparks, D. L. & Schreus, B. G. (2003) Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **100**, 11065-11069
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101**, 87–96.

- Suali, E., Sarbatly, R. (2012) Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **16**, 4316-4342
- Stoecker, D. K., Johson, M. D., de Vargas, C., Not, F. (2009). Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquatic Microbial Ecology*. **57**: 279-310
- Sun, A; Davis, R.; Starbuck, M.; Ben-Amotz, A.; Pate, R.; Pienkos, P. T. (2011). Comparative costs analyse of algal oil production for biofuels. *Energy*. **36**: 5169-5179
- Takagi, M. & Yoshida, T. (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Biotechnology*. **101**, 223–226
- Talebi, A. F., Monhtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar. M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H., H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S. M., Bakhtiari, S. (2013) Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*. **2**, 258-267
- Thompson, G.A. (1996) Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1302**, 17–45.
- Trenkamp, S., Martin, W., Tiejtjen, K. (2004) Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid enlongases from Arabidopsis Thalina by different herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 11903-11908
- Tsoskounoglou, M., Ayeridesb, G., Tritopouloub, E. (2008) The end of cheap oil: Current status and prospects. *Energy Policy*. **36**, 3797-3806
- Ugwu, C. U., Aoyagi. H., Uchiyama H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Biouresource Technology*. **99**, 4021-4028
- Vancov, T., Alston, A.-S., Brown, T., McIntosh, S. (2012) Use of Ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels. *Renewable Energy*. **45**, 1-6
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M. (2013) Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology*. **135**, 142-149
- Verbruggen, A., Al Marchohi, M. (2010) Views on peak oil and its relation to climate change policy. *Energy Policy*. **38**, 5572-5581
- Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R., Rhadika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., Deepak, M. (2007) Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **109**, 359-363
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C. Q. (2008) CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **79**, 707-718

- Wang, Z. T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., Goodenough U. (2009) Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukariotic Cell*. **8**, 1856-1868
- Weinreb, O., Mandel, S., Bar-Am, O., Amit, T. (2011) Iron-chelating backbone coupled with monoamine oxidase inhibitory moiety as novel pluripotential therapeutic agents for Alzheimer's disease: a tribute to Moussa Youdim. *Journal of Neural Transmission*. **118**, 479-492
- Wells, M. L., (2003) The level of iron enrichment required to initiate diatom blooms in HNLC waters. *Marine Chemistry*. **82**, 101-114
- Wiley, P. S. (2009) Photosynthetic and Oxidative Stress in the Green Alga *Dunaliella tertiolecta*: The Effects of UV-B and UV-A Radiation. Ph.D. Thesis, University of New Hampshire, USA
- Wu, H., Volponi, V. N., Oliver, A. E., Parikh, A. N., Simmons, B. A., Singh, S. (2011) In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, 3809-3814
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a fresh water microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*. **101**, 5494-500
- Yen, H.-W., Hu, I.-C., Chen, C.-Y., HO, S.-H., Lee, D.-J., Chang, J.-S. (2013) Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*. **135**, 166-174
- Yoo, C., Choi, G-G., Kim, S-C., Oh, H-M. *Ettlia* sp. YC001 high growth rate and lipid content under high CO₂. *Bioresource technology*. **127**, 482-487
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, Sensi, S. L. (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. **30**, 346-355
- Zhang, X., Wang, T., Ma, L., Zhang, Q., Jiang, T. (2013) Hydrotreatment of bio-oil over Ni-based catalyst. *Bioresource Technology*. **127**, 306-313
- Zhu, C., Lee, Y., Chao, T. (1997) Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* tk1. *Journal of Applied Phycology*. **9**, 451–457.
- Zhu, L.Y., Zhang, X.C., Ji, L., Song, X.J., Kuang, C.H. (2007) Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*. **42**, 210–214.

6 Anexos

Tabela 6.1 Quantidade de biomassa (g. L^{-1}) e lípidos (mg. L^{-1}) produzidos durante a incubação e produtividade média destes parâmetros durante a segunda fase do cultivo, em termos de dias.

	Biomassa (t17) g. L^{-1}	Produtividade média biomassa (t11-t17) $\text{g. L}^{-1} \text{d}^{-1}$	Quantidade de lípidos (t17) mg. L^{-1}	Produtividade média lípidos (t11-t17) $\text{mg. L}^{-1} \text{d}^{-1}$
N-	1,04 ± 0,01	0,29 ± 0,00	197,1 ± 8,9	32,8 ± 0,9
N+	1,26 ± 0,06	0,33 ± 0,01	102,2 ± 12,9	17,0 ± 1,0
N-[Fe-]	1,05 ± 0,05	0,30 ± 0,01	218,2 ± 10,7	36,4 ± 1,0
N+[Fe-]	1,18 ± 0,05	0,32 ± 0,01	82,0 ± 4,4	13,7 ± 0,6
N-[Fe+]	1,07 ± 0,02	0,30 ± 0,00	196,7 ± 30,1	32,8 ± 1,3
N+[Fe+]	1,27 ± 0,08	0,33 ± 0,01	108,9 ± 8,7	18,1 ± 1,2
N-[75]	0,92 ± 0,02	0,27 ± 0,00	180,5 ± 9,0	30,1 ± 0,7
N+[75]	1,09 ± 0,04	0,30 ± 0,01	122,1 ± 12,6	20,3 ± 1,0
N-[100]	0,79 ± 0,00	0,25 ± 0,00	161,1 ± 8,2	26,8 ± 0,8
N+[100]	0,98 ± 0,03	0,28 ± 0,00	70,1 ± 8,0	11,7 ± 0,8

Tabela 6.2 Conteúdo de lípidos na biomassa em % de lípidos por peso seco, após a imposição de condições de stress em culturas da estirpe CTP4 a qual se iniciou ao dia 11. N+, adição de nutrientes; [Fe-] quelação do ferro; [Fe+] adição de ferro na concentração final de 0,5 mM; [75], aumento da salinidade de 37 para 75; [100], aumento da salinidade de 37 para 100 ($n = 3$).

Condições		Tempo (d)						
		11	12	13	14	15	16	17
Controlo	N ⁻	7,3 ± 0,5	8,5 ± 0,6	8,9 ± 0,8	14,0 ± 0,7	13,8 ± 0,9	18,9 ± 1,5	18,9 ± 0,9
	N ⁺	7,3 ± 0,5	6,1 ± 0,6	4,5 ± 0,5	5,8 ± 0,7	6,6 ± 0,4	9,1 ± 1,1	8,1 ± 1,1
[Fe-]	N ⁻	7,3 ± 0,5	8,8 ± 0,7	9,3 ± 0,4	13,6 ± 0,4	12,8 ± 1,0	19,8 ± 1,1	20,7 ± 1,4
	N ⁺	7,3 ± 0,5	5,7 ± 0,9	4,3 ± 0,4	5,1 ± 0,4	7,4 ± 0,3	7,1 ± 0,2	6,9 ± 0,5
[Fe+]	N ⁻	7,3 ± 0,5	7,4 ± 0,7	6,7 ± 0,4	11,3 ± 0,3	12,1 ± 0,5	19,2 ± 0,9	18,4 ± 2,8
	N ⁺	7,3 ± 0,5	6,7 ± 0,9	5,0 ± 0,2	6,1 ± 0,9	7,7 ± 0,7	8,8 ± 1,1	8,6 ± 0,9
[75]	N ⁻	7,3 ± 0,5	10,3 ± 0,9	8,3 ± 0,5	17,1 ± 0,7	14,2 ± 0,5	19,6 ± 0,8	19,5 ± 1,0
	N ⁺	7,3 ± 0,5	6,1 ± 0,3	7,1 ± 0,5	6,0 ± 0,7	9,7 ± 1,2	9,2 ± 0,9	11,1 ± 1,2
[100]	N ⁻	7,3 ± 0,5	9,8 ± 0,7	8,2 ± 0,4	17,4 ± 0,8	13,7 ± 0,6	22,3 ± 1,2	20,5 ± 1,0
	N ⁺	7,3 ± 0,5	7,8 ± 0,3	8,2 ± 0,4	5,3 ± 0,6	8,4 ± 1,4	8,1 ± 0,9	7,2 ± 0,8