



Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas

Catarina Alexandra da Silva Rosado Correia

2013



*Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o
cultivo de microalgas marinhas*

Catarina Alexandra da Silva Rosado Correia

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação do Doutor Sérgio Leandro e
coorientação da Engenheira Victória Del Pino e Doutora Carla Tecelão

2013

Título: Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas

Copyright© Catarina Alexandra da Silva Rosado Correia

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria 2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a 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.

Agradecimentos

Em memória dos meus avôs.

Às minhas avós, padrinhos, tia Aurora e prima Inês, pelo bom humor e amparo ao longo de todo este percurso.

Aos meus amigos, Diana Póvoa, João Roque dos Santos, Sandra Teixeira e Vasco Porém, pela amizade de anos e pelos momentos de descontração que proporcionam.

À segunda edição de MBRM, pelo ambiente e pessoas fantásticas que são. Isto é o futuro!

À Catarina Barraca e Francisco Aguilar, pelo vosso maravilhoso mau feitio que tanto me diverte.

Aos mestres Márcia Caramalho, Raquel Teixeira, Rita Sousa e Tiago Simões, pela ajuda prestada e por me acolherem tão bem no mundo do LBO, especialmente na GC Team.

Aos técnicos, em especial ao Eng. Pedro Ramalho, pelos conselhos e resmunguices.

À Sónia Cotrim Marques, por toda a ajuda dada com os PCA's.

À Necton e aos seus colaboradores, pela oportunidade, receção calorosa e apoio dado ao longo de todo o estágio.

Às minhas orientadoras, Victória del Pino e Carla Tecelão, por toda a paciência e tempo dispensado no decorrer deste trabalho.

Ao meu orientador, Sérgio Leandro, pelos valores humanos e científicos transmitidos ao longo dos anos.

A todos os que, de uma maneira ou outra, se sentiram envolvidos neste trabalho.

A ti, Daniel, pela paciência e ajuda neste período.

Aos meus pais, que estiveram sempre comigo ao longo de todo o percurso. Sem eles nada disto seria concretizável!

Muito obrigada!

Resumo:

A melhoria da qualidade do alimento fornecido em aquaculturas, nomeadamente de microalgas, é um fator de elevada importância. As microalgas são um grupo heterogéneo de formas de vida, que incluem vários e distintos géneros, porém, poucos são os explorados ao nível da biotecnologia ou aquacultura. Dois dos géneros mais estudados e com aplicação nestas áreas são *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp., em virtude do seu perfil nutricional. Para o melhorar, são utilizadas diferentes estratégias de manipulação, principalmente ao nível das condições de cultivo, como a composição do meio de cultivo.

O presente trabalho teve com objetivo identificar um meio de cultivo adequado à produção das espécies *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. e que permita (1) Obter elevadas taxas de crescimento (2) atingir elevada produtividade (3) reduzir ao máximo o uso de cobalto (4) diminuição custos produção.

Para tal, efetuou-se o crescimento das duas microalgas em quatro meios de cultivo com perfis de micronutrientes distintos – NutriBloom (NB), NutriBloom sem cobalto (NB s/Co), Simplex (S) e Sea Mineral Solution (SMS) – e controlou-se o crescimento e a evolução do perfil bioquímico nas fases de crescimento exponencial e estacionária. As proteínas foram determinadas segundo o método de Lowry (1951), os hidratos de carbono pelo método de Dubois (1956), os lípidos totais pelo método de Bligh and Dyer modificado (1959) e o perfil em ácidos gordos por cromatografia gasosa, tal como Lepage & Roy (1986).

Relativamente ao crescimento de *Nannochloropsis* sp., os meios S e SMS proporcionaram uma fase lag mais pronunciada do que o verificado nos meios NB e NB s/Co. Os meios NB e NB s/Co apresentaram maior número de células e peso seco em relação a S e SMS, no entanto existiram diferenças estatisticamente significativas a nível do peso seco. O meio NB s/Co apresentou maior produtividade volumétrica em biomassa. Na fase exponencial, o meio NB s/Co apresentou maior teor proteico e o meio SMS o maior conteúdo lipídico e de ácidos gordos polinsaturados (PUFA's). Na fase estacionária, o meio S apresentou o maior conteúdo lipídico, no entanto o meio NB apresentou maior percentagem de proteínas e de ácidos gordos polinsaturados PUFA's.

Em ambas as fases de crescimento, o meio NB apresentou maior percentagem de hidratos de carbono.

Para *Tetraselmis* sp., a duração da fase lag foi semelhante em todos os meios. Em relação à fase exponencial, o meio S foi o que apresentou a fase mais curta e o meio SMS foi o que exibiu a fase exponencial mais longa. Este último meio foi o que registou os melhores resultados a nível do número de células, do tempo de duplicação e da produtividade volumétrica em biomassa. Na fase exponencial, o meio S apresentou valores de proteínas superiores e o meio SMS apresentou maior percentagem de lípidos e PUFA's. Na fase estacionária, o meio NB foi o que proporcionou maior percentagem de proteínas, hidratos de carbono e lípidos, no entanto o meio S foi o que contribuiu para uma maior percentagem de PUFA's.

As discrepâncias das concentrações de micronutrientes nos diferentes meios utilizados explicam as variações obtidas nos perfis bioquímicos das duas microalgas, especialmente as variações de ferro, cobre, cobalto e molibdénio.

Palavras-chave: Micronutrientes, perfil bioquímico, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*

Abstract:

In aquaculture, food quality improvement – especially microalgae's – is mandatory. Microalgae are an heterogeneous group, which includes various and distinct taxa. Still, few genders are actively used and explored in biotechnology and aquaculture, due to lack of requirements. Two of the well-studied microalgae on these areas are *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp., due to their highly nutritional profile. Despite their naturally high profile, improvements are required, and it can be achieved through culture condition manipulation, changing, for instance, culture medium's composition.

This work aims at identifying a less expensive culture medium for large scale production of the species previously mentioned, which allows (1) high growth rates (2) attain high productivity (3) remove or decrease cobalt's concentration in the final medium formulation and (4) decrease production cost.

The two selected microalgae were cultured in four distinct medium, with different micronutrient addition – NutriBloom (NB), NutriBloom without cobalt (NB s/Co), Simplex (S) e Sea Mineral Solution (SMS) – and its biochemical profile were measured through two different growth stages: logarithmic and stationary states. Crude proteins were obtained using Lowry's method (1951), sugar through Dubois's method (1956), total lipid by Bligh and Dyer (1959), and fatty acid according to Lepage & Roy (1986).

Nannochloropsis sp. cultured in S and SMS mediums presented a higher lag phase to the one verified in NB or NBs/Co. Dry weigh is equal in NB e NB s/Co and Cell number through time culture has not showed differences statistically relevant between mediums, though NB and NB s/Co presented higher values than the others. In logarithmic phase, NB s/Co presented the higher protein content, SMS the higher lipid and polynsaturated fatty acids (PUFA's) percentage. In stacionary phase, S medium showed higher lipid percentage, nevertheless, NB medium presented the higher content of protein and PUFA's. In both phases, NB medium had the higher sugar content.

In *Tetraselmis* sp., lag phase was similar between mediums, and S had a shorter logarithmic phase than the others. SMS had better results than the others, achieving

Abstract

higher cell number, productivity and less duplication time. In logarithmic phase, this medium also had the higher lipid and PUFA's percentage. S medium showed higher protein content. In stationary phase, NB medium presented more proteins, lipid and sugars. S medium had better PUFA's percentage.

Differences between micronutrient concentrations explain the verified variations the two microalgae's biochemical profile, peculiarly iron, copper, cobalt and molybdenum variations.

Key-words: Biochemical profile, micronutrients, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Investigação em ambiente empresarial.....	2
1.2	Necton, S.A.....	3
1.3	Microalgas em aquacultura.....	4
1.4	Condições de cultivo.....	9
1.5	Perfil bioquímico.....	15
2.	Objetivos.....	21
3.	Materiais e Métodos.....	23
3.1	Condições de cultivo.....	23
3.2	Medição dos parâmetros de crescimento.....	24
3.2.1	Densidade ótica.....	25
3.2.2	Contagem celular.....	26
3.2.3	Peso seco.....	27
3.3	Recolha, embalagem e transporte de amostras.....	28
3.4	Métodos analíticos.....	29
3.4.1	Preparação das amostras.....	29
3.4.2	Extração e quantificação de proteína bruta.....	29
3.4.3	Extração e quantificação de hidratos de carbono.....	30
3.4.4	Extração e quantificação de lípidos totais.....	32
3.4.5	Perfil de ácidos gordos.....	32
3.5	Análise estatística.....	34
4	Resultados.....	35
4.1	<i>Nannochloropsis sp.</i>	35
4.2	<i>Tetraselmis sp.</i>	46

Índice

5. Discussão	59
5.1 Crescimento e produtividade	59
5.2 Proteína bruta.....	62
5.3 Hidratos de carbono.....	63
5.4 Lípidos totais	65
5.5 Ácidos gordos	66
5.6 Qualidade nutricional	67
6. Conclusões e perspectivas futuras	69
7. Bibliografia.....	71
Anexos.....	81

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema simplificado da cadeia trófica marinha, onde o fitoplâncton se apresenta como base da mesma e produtor primário [Adaptado de FAO, 1996].....	4
Figura 2 - Representação esquemática de <i>Nannochloropsis sp.</i> Adaptado de Van den Hoek <i>et al.</i> , (1996).....	7
Figura 3 - Representação esquemática de <i>Tetraselmis sp.</i> Adaptado de Laing (1991)....	8
Figura 4 - Estrutura dos ácidos gordos DHA e EPA. [Retirado de: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/omega-3-fatty-acids.html]	18
Figura 5- Evolução do número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS. Os valores representam a média dos triplicados dos números obtidos nesses dias.....	36
Figura 6 – Curva de calibração de <i>Nannochloropsis sp.</i> , com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=540\text{nm}$ e do número de células por mililitro, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS.	37
Figura 7 – Crescimento de <i>Nannochloropsis sp.</i> avaliado em função da concentração celular (células.mL^{-1}) - ■ - e do peso seco (g.L^{-1}) -□- ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS. Os valores representam a média dos triplicados.....	38
Figura 10 - Percentagem de lípidos totais obtida nos diferentes meios de cultivo em <i>Nannochloropsis sp.</i> . A percentagem é relativa a 100mg de peso seco. A barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.	42
Figura 11 - Cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos na análise dos ácidos gordos de <i>Nannochloropsis sp.</i> . As letras identificam os ácidos gordos mais significativos, onde A é ácido mirístico (C14:0), B ácido palmítico (C16:0), C ácido palmitoleico (C16:1 n7), D ácido esteárico (C18:0), E ácido oleico (C18:1 n9), F ácido linoleico (C18:2 n6), G ácido araquidónico (C20:4 n6) [AA] e H ácido eicosapentaenóico (C20:5 n3) [EPA].	43
Figura 12 - Ordenação ACP dos meios de cultura e fase de crescimento em função do perfil de ácidos gordos em <i>Nannochloropsis sp.</i> , representando os dois primeiros eixos 65.8% da variação total (38.2% PC1 e 27.6% PC2), onde NNB se refere a NutriBloom,	

Índice de figuras

NNBCO a NutriBloom sem Cobalto, NS a Simplex e NSMS a Sea Mineral Solution. Exp e Est correspondem às fases de crescimento exponencial e estacionária, respetivamente.	46
Figura 13 – Evolução do número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS. Os valores representam a média dos triplicados dos números obtidos nesses dias.	47
Figura 14 – Curva de calibração de <i>Tetraselmis sp.</i> , com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=540\text{nm}$ e do número de células por mililitro, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) S e (C) SMS	48
Figura 15 - Crescimento de <i>Tetraselmis sp.</i> avaliado em função da concentração celular (células.mL ⁻¹) - ■ - e do peso seco (g.L ⁻¹) -□- ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) S e (C) SMS. Os valores representam a média dos triplicados.	50
Figura 16 - Percentagem de proteína obtida nos diferentes meios de cultivo em <i>Tetraselmis sp.</i> . A percentagem é em relação a 100mg de peso seco, a barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.	51
Figura 17 - Percentagem de hidratos de carbono obtida nos diferentes meios de cultivo em <i>Tetraselmis sp.</i> A percentagem é calculada em relação a 100mg de peso seco, a barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.	52
Figura 20 - Ordenação ACP dos meios de cultura e fase de crescimento em função do perfil de ácidos gordos em <i>Tetraselmis sp.</i> , representando os dois primeiros eixos 95.3% da variação total (70,7% PC1 e 18,6% PC2), onde TNB se refere a NutriBloom, TS a Simplex e TSMS a Sea Mineral Solution. Exp e Est correspondem às fases de crescimento exponencial e estacionária, respetivamente.	57

Índice de tabelas

Tabela I - Classificação taxonómica das microalgas em estudo 6

Tabela II - Perfil bioquímico de *Nannochloropsis sp.*, utilizando como meio de cultivo F/2 (Guillard and Ryther, 1963), segundo Brown *et al.* (1998). A percentagem refere-se a 100g de peso seco. 7

Tabela III - Perfil bioquímico de *Tetraselmis sp.*, utilizando como meio de cultivo F/2 (Guillard and Ryther, 1963), segundo Brown *et al.* (1998). A percentagem refere-se a 100g de peso seco. 9

Tabela IV – Composição química dos diferentes meios de cultura comerciais (F/2, Conway (C), Artificial SeaWater (ASW) e NutriBloom (NB)) e dos meios desenvolvidos no presente estudo (NutriBloom sem cobalto (NB s/Co), Sea Mineral Solution (SMS) e Simplex (S). A concentração encontra-se em mM. 14

Tabela V - Resumo dos dados obtidos no crescimento de *Nannochloropsis sp.*. A taxa específica de crescimento (μ) é expressa em dias⁻¹, o tempo de duplicação (td) em dias. 37

Tabela VI – Produtividade obtida no cultivo de *Nannochloropsis sp.* em laboratório. A produtividade volumétrica de biomassa (P) é expressa em g.peso seco.L⁻¹.dia⁻¹. Os valores representam a média dos triplicados. 39

Tabela VII - Perfil de ácidos gordos obtidos na análise de *Nannochloropsis sp.*. O valor obtido encontra-se em percentagem de peso seco, com o respetivo valor de erro-padrão. Exp refere-se à fase exponencial, enquanto que Est à fase estacionária. Por NB entende-se NutriBloom, NB s/Co NutriBloom sem Cobalto, S Simplex e SMS. Sea Mineral Solution. 44

Tabela VIII - Resumo dos dados obtidos no crescimento de *Tetraselmis sp.*. A taxa específica de crescimento (μ) está em dias⁻¹, o tempo de duplicação (td) em dias. 49

Tabela IX - Produtividade obtida no cultivo de *Tetraselmis sp.* em laboratório. A produtividade volumétrica de biomassa (P) é dada em g.peso seco.L⁻¹.dia⁻¹. Os valores representam a média dos triplicados. 50

Tabela X - Perfil de ácidos gordos obtidos na análise de *Tetraselmis sp.*. O valor obtido encontra-se em percentagem de peso seco, com o respetivo valor de erro-padrão. Exp refere-se à fase exponencial, enquanto Est à fase estacionária. Por NB entende-se NutriBloom, S Simplex e SMS. Sea Mineral Solution. 55

Índice de equações

Equação 1- Curva logística de quatro parâmetros para o crescimento microbiano, onde x corresponde à densidade celular (células.ml^{-1}), x_0 à densidade celular inicial, a à interseção com o eixo do y , b ao declive da reta, e ao logaritmo natural de Napier, t ao tempo final (dias) e t_0 ao tempo inicial (dias).....	25
Equação 2 - Determinação da taxa específica de crescimento, onde x se refere à densidade celular (células.ml^{-1}), x_0 densidade celular inicial (células.ml^{-1}), μ à taxa específica de crescimento (dias^{-1}) e t ao tempo (dias).....	25
Equação 3 - Determinação do tempo de duplicação (t_d) da cultura, onde μ corresponde à taxa específica de crescimento.	26
Equação 4 - Fórmula padrão para a determinação do número de células por mililitro, através da utilização do hemocitómetro de Neubauer.....	27
Equação 5 - Fórmula de determinação do Peso seco (g.L^{-1}).	28
Equação 6 - Cálculo da produtividade volumétrica em biomassa da cultura ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). X_f - concentração de biomassa seca no final do ensaio; X_i - concentração de biomassa seca no início do ensaio e Tempo total- duração do ensaio.....	28
Equação 7 – Determinação da concentração de proteína na amostra, onde y se define como sendo o valor da absorvância obtida e x a concentração, em mg.L^{-1} , de proteína.30	
Equação 8 - Determinação da concentração de glucose na amostra, onde y se define como sendo o valor da absorvância obtida e x a concentração, em mg.L^{-1} , de hidratos de carbono	31
Equação 9 - Cálculo dos lípidos totais, em percentagem. O peso inicial corresponde à massa dos tubos limpos e vazios, enquanto o peso final corresponde à massa dos tubos com o produto da evaporação do clorofórmio (g). O volume total de clorofórmio refere-se ao utilizado na extração (mL), e o volume evaporado à última adição de clorofórmio (mL). A biomassa seca refere-se à massa inicial colocada nos tubos de extração (g). ..	32

Página intencionalmente deixada em branco

Lista de abreviaturas e símbolos

Ao longo deste trabalho, serão utilizadas abreviaturas em língua inglesa por ser esta a utilizada na literatura da especialidade.

μ - Taxa específica de crescimento

D.O. - densidade ótica

DHA – *Docosahexaenoic Acid* - Ácido Docosahexaenóico

EPA – *Eicosapentaenoic Acid* – Ácido Eicosapentaenóico

Est – fase de crescimento estacionário

Exp – fase de crescimento exponencial

F/2 - meio de cultivo de Guillard

MUFA – *Monounsaturated Fatty Acid* – Ácidos Gordos Monoinsaturados

NB - meio de cultivo NutriBloom

NB s/Co - meio de cultivo NutriBloom sem cobalto

PUFA – *Polysaturated Fatty Acids* – Ácidos Gordos Polinsaturados

R² - Coeficiente de Correlação Quadrático

S – meio de cultivo Simplex

SMS – meio de cultivo Sea Mineral Solution

td - Tempo de duplicação

Página intencionalmente deixada em branco

1. Introdução

A dieta mediterrânea, especialmente em Portugal, tem por base o consumo de peixe. Segundo a FAO (1984), dos países onde esta dieta é aplicada com regularidade (Espanha, Itália, Egipto, Grécia, Portugal, etc.), Portugal é o único onde, tradicionalmente, o peixe é mais consumido do que a carne – provavelmente porque a maior parte da costa está em contacto com o oceano Atlântico, que tem maior produtividade que o mar Mediterrâneo, com o qual os outros países estão em contacto. Estima-se ainda que, nesse ano, o consumo de peixe por pessoa em Portugal rondou os 30kg por pessoa.

Atentando à procura que se verifica, é necessário proceder a uma gestão dos recursos pesqueiros. Definida, em 1984, por Sætersdal como sendo a maneira de “obter a melhor utilização possível do recurso em proveito da comunidade”, esta gestão tem de contrabalançar as necessidades alimentares, lucros e a captura sustentável dos recursos, de modo a não reduzir as populações de ictiofauna, bivalves e crustáceos a números “perigosamente” baixos (Cadima, 2000).

A aquacultura apresenta-se como uma alternativa promissora e viável, uma vez que permite manter o consumo regular de peixe e, ao mesmo tempo, evita a captura excessiva de espécimes selvagens, não prejudicando em demasia os *stocks* selvagens. A sua implementação global tem aumentado nos últimos 50 anos e, em 2008, participava já com 36% do volume de pescado consumido mundialmente e com um incremento anual de perto de 9% (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

A nível global, desde a década de 70 do século passado, o continente Europeu tem sido um dos com pior prestação no que respeita à implementação e desenvolvimento da aquacultura, sendo apenas melhor que os Estados Unidos da América (FAO, 2010). Tal como na Europa, em Portugal, a implementação desta prática só se verificou em proporções maiores a partir da década de 70, atingindo o apogeu na segunda metade da década de 80 - 11 toneladas por ano-, tendo, a partir

daí começado a diminuir. Em 2010 atingiram-se mínimos que não eram registados desde a primeira metade da década de 80 - 3 toneladas por ano - (FAO, 2010).

Atualmente, a aquacultura em Portugal tem diferentes problemas, que a impedem de se desenvolver. De entre as questões mais críticas por resolver destacam-se a burocracia, falta de investimento e falta de investigação (Sykes, 2010).

A investigação e desenvolvimento de novas dietas, nutricionalmente superiores e adaptadas às espécies em cultivo é imperativo, uma vez que quanto melhor o alimento, melhor o seu desenvolvimento e maior rentabilidade terá o processo (Sykes, 2010). Guedes & Malcata (2012), referem que a sobrevivência e correto desenvolvimento de juvenis e fases mais avançadas está diretamente ligada com a qualidade do alimento fornecido nos estágios de vida iniciais das diferentes espécies, sendo que quanto melhor a qualidade, melhor a sobrevivência e desenvolvimento. Em aquacultura, e nos primeiros estágios de vida, é frequente a utilização de microalgas como primeiro alimento (Planas & Cunha 1999).

1.1 Investigação em ambiente empresarial

A investigação em ambiente empresarial, quer efetuada dentro das mesmas ou em parceria com instituições de ensino superior, é de extrema importância, uma vez que permite a modernização e otimização de processos empresariais, rentabilizando-os e gerando maior conhecimento prático. O retorno económico, a curto, médio e longo prazo, que advém das parcerias estabelecidas será superior a quaisquer investimentos iniciais necessários às investigações. As melhorias nos processos produtivos, o aumento da rentabilidade dos produtos e do *know-how* trarão vantagens competitivas, não só às empresas, como também ao país, podendo ser potenciador de maior investimento e visibilidade científica.

Atualmente, uma das áreas de investigação, em empresas de produção de microalgas, é a obtenção de biomassa em quantidade suficiente. Geralmente, alcançada através do cultivo em fotobiorreatores de grande capacidade (Chen *et al...* 2009), envolve custos processuais consideráveis. Para obter uma elevada produtividade em biomassa, é necessária a utilização de meio de cultivo, que deve

ser nutricionalmente adaptado à estirpe em cultura (Grobbelaar 2012). Idealmente, o meio de cultivo deve ter todos os elementos requeridos pela microalga. No entanto, devido ao elevado custo (3 a 5% do custo total da produção de microalgas), raramente estão disponíveis fórmulas equilibradas para o seu crescimento (Acién *et al.* 2012; Chen *et al.* 2009). Um dos objetivos de investigação de empresas produtoras de microalgas deve ser, então, o melhoramento dos meios de cultivo, tentando que estes tenham o menor custo possível.

Existem algumas empresas de produção de biomassa algal para aplicação em aquacultura que investem constantemente no melhoramento do produto em Portugal, como é o caso da Necton S.A..

1.2 Necton, S.A.

Fundada em 1997 a partir de um projeto da Escola Superior de Biotecnologia do Porto, a Necton - Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas, S.A. estabeleceu-se no Parque Natural da Ria Formosa, em Belamandil, e, desde então, desenvolve a sua atividade na área da biotecnologia azul.

Distingue-se pela produção de sal marinho tradicional, flor de sal e ainda por produzir biomassa algal à escala industrial. A empresa tem participado em vários projetos de investigação e desenvolvimento, tendo ampliado o seu *know-how* industrial.

A empresa Necton comercializa soluções concentradas de microalgas com diferentes formulações: PhytoBloom Green Formula®, PhytoBloom Ice® e PhytoBloom Prof.®. Os produtos são mormente exportados, sendo vendidos sobretudo para maternidades de aquacultura e empresas de formulações cosméticas. Na Necton, são produzidas microalgas de água doce e salgada, sendo que nestas últimas se destacam as *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*.

1.3 Microalgas em aquacultura

A aplicação de microalgas à aquacultura apresenta alguns problemas base, como a obtenção de biomassa suficiente para a utilização em larga escala (Olaizola 2003).

Sem descurar as mais-valias resultantes das diferentes aplicações das microalgas em contexto empresarial, considera-se que, até à data, uma das vertentes economicamente mais rentáveis será a sua utilização em aquacultura. São a base da cadeia trófica marinha (figura 1) e, como tal, tornam-se indispensáveis ao adequado desenvolvimento de variadíssimas espécies marinhas, desde larvas a indivíduos adultos (Brown 2002).

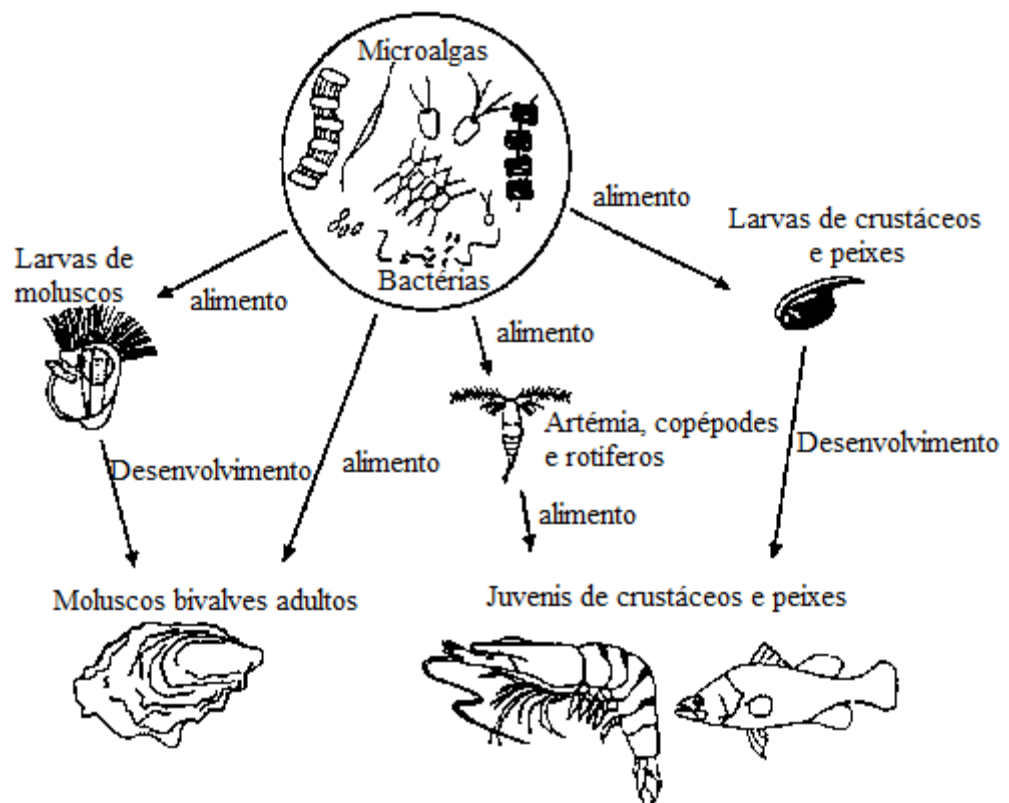


Figura 1 - Esquema simplificado da cadeia trófica marinha, onde o fitoplâncton se apresenta como base da mesma e produtor primário [Adaptado de FAO, 1996]

A utilização das microalgas está essencialmente ligada à nutrição e, dependendo do animal em cultivo, pode servir como alimento principal ou como aditivo (Hemaiswarya *et al.* 2011). Uma das aplicações mais comuns das microalgas

em aquacultura é o efeito de “água verde”, quando utilizadas diretamente como alimento vivo de larvas de crustáceos e peixes (Rodolfi *et al.*, 2003), ou como enriquecimento de presas vivas, nomeadamente artémia, copépodes e rotíferos (Okauchi & Kawamura 1997; Ghezelbash *et al.*, 2008; Day *et al.*, 1999). O mecanismo pelo qual a ação das microalgas se revela benéfica em contacto direto com as larvas não é totalmente compreendido. Hipóteses como a atenuação da luz a que as larvas estão expostas, a excreção de hormonas de crescimento e de vitaminas para o meio, o efeito probiótico, a manutenção da qualidade do zooplâncton, a conservação da qualidade da água, o controlo microbiano ou a ativação de enzimas digestivas, têm sido equacionadas (Brown 2002). Algumas microalgas, como *Haematococcus pluvialis*, são ainda utilizadas como fonte de astaxantina, para intensificar a coloração avermelhada dos tecidos, sobretudo na produção de salmão, característica muito apreciada pelos consumidores.

A escolha da microalga a utilizar em aquacultura deve ir de encontro às necessidades nutricionais do animal em cultivo, sendo que larvas de diferentes espécies têm distintas necessidades nutricionais (Abu-rezq *et al.*, 1999). A combinação de microalgas distintas fornece um alimento rico e mais equilibrado, permitindo um maior crescimento do animal (Hemaiswarya *et al.*, 2011).

Para além do perfil nutricional, deve ter-se em conta características que potenciem maior rentabilidade e ausência de riscos para a saúde pública. O elevado valor nutricional, a alta digestibilidade, o tamanho e forma ideais, o rápido crescimento, o fácil cultivo e a ausência de toxicidade, são relevantes na sua seleção da microalga em aquacultura (Brown 2002; Hemaiswarya *et al.*, 2011). Por cumprirem os pré-requisitos anteriores, são frequentemente utilizadas microalgas como *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp., *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella* sp., *Rhodomonas* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. (Brown, 2002)(FAO, 1996).

Por serem as microalgas com maior produção na Necton (del Pino, V. – comunicação pessoal – 2013), serão consideradas neste trabalho *Nannochloropsis* sp.

e *Tetraselmis* sp., microalgas taxonómicas (tabela I) e fisiologicamente distintas (secção 1.3.1 e 1.3.2).

Tabela I - Classificação taxonómica das microalgas em estudo

	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Tetraselmis</i> sp.
Filo	Ochrophyta	Chlorophyta
Classe	Eustigmatophyceae	Chlorodendrophyceae
Ordem	Eustigmatales	Chlorodendrales
Família	Monodopsidaceae	Chlorodendraceae
Género	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Tetraselmis</i>

1.3.1 *Nannochloropsis* sp.

Tendo sido denominada até à década de 80 do século passado como sendo uma espécie marinha de *Chlorella* sp., estudos posteriores vieram a distinguir a nível ultraestrutural as duas microalgas pelo que, em 1986, foi criado o género *Nannochloropsis* sp. (figura 2). Integrado na classe Eustigmatophyceae (*Rodolfi et al.*, 2003), existem seis espécies reconhecidas como pertencentes a este género, sendo que *N. limnetica* e *N. oculata* são encontradas em ambientes de água doce e salobra, respetivamente, embora de forma pouco frequente. As espécies marinhas integram habitualmente o fitoplâncton de ecossistemas marinhos, principalmente de águas costeiras, fazendo parte integrante do ciclo do carbono (Krienitz & Wirth, 2006; Silva, 2011).

De pequenas dimensões (2-5µm), esférica, amarela-castanha e não flagelada (Hu & Gao 2003; Rocha *et al.*, 2003), *Nannochloropsis* sp. tem um perfil nutricional distinto, principalmente devido ao elevado conteúdo lipídico – em particular do ácido

eicosapentaenóico (EPA), pertencente à família dos ácidos gordos polinsaturados omega 3 (ω -3 PUFA) (Hu & Gao 2003). À parte do seu perfil bioquímico (Tabela II), esta espécie possui ainda diferentes características que a tornam ideais para a utilização em aquacultura, entre as quais se destacam a elevada velocidade de crescimento, o metabolismo muito ativo, assim como a resistência às tensões de mistura e às contaminações (Olofsson *et al.*, 2012).



Figura 2 - Representação esquemática de *Nannochloropsis* sp. Adaptado de Van den Hoek *et al.*, (1996).

Pelas razões já mencionadas, o cultivo massivo de *Nannochloropsis* sp. é apontado como promissor para a produção de biofuel (Pal *et al.*, 2011) e para a fabricação de EPA a nível industrial. No entanto, o custo de produção de biomassa ainda é demasiado elevado, não só em termos de investimento, como também em custos operacionais (Rodolfi *et al.*, 2003).

Tabela II - Perfil bioquímico de *Nannochloropsis* sp., utilizando como meio de cultivo F/2 (Guillard and Ryther, 1963), segundo Brown *et al.*, (1998). A percentagem refere-se a 100g de peso seco.

	% Peso seco
Proteínas	17±8
Lípidos totais	26±2
Hidratos de Carbono	23±9

1.3.2 *Tetraselmis* sp.

Descrita pela primeira vez no final do século XIX, *Tetraselmis* sp. é correntemente um género taxonómico, pertencente à família Chlorodendraceae, a qual inclui 31 espécies marinhas e de água doce. Podem ocorrer na forma planctónica ou bentónica ou, em casos extremos, colonizar areia ou ser endossimbioentes com animais semelhantes a platelmintos. São células verdes unicelulares (10 a 14µm) que podem variar entre as formas cordiforme, elíptica ou quase esférica, nunca chegando a sê-lo completamente (figura 3). No polo apical as células apresentam uma invaginação, onde surgem os quatro flagelos iguais que possuem (Okauchi & Kawamura 1997). Apesar de apresentarem flagelos em condições de cultivo ideais, estes podem perder-se se a temperatura for demasiado extrema – dando origem a cistos de resistência – ou durante a reprodução assexuada que efetuam (Palz & Pirrwitz 1983; Marin *et al.* 1993). A membrana plasmática é revestida por duas ou três camadas de escamas fundidas, em forma de diamante, de natureza orgânica – teca – que protegem a célula e a tornam resistente a tensões físicas.

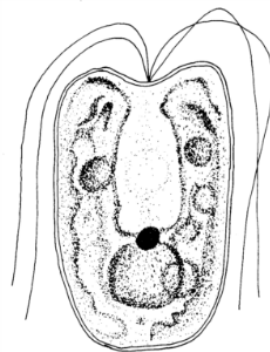


Figura 3 - Representação esquemática de *Tetraselmis* sp. Adaptado de Laing (1991)

A identificação das espécies ainda não é clara, no entanto, em 1993, Marin *et al.* sugeriu como característica distintiva a estrutura detalhada das escamas dos flagelos.

Tetraselmis sp. tem sido extensivamente utilizada para estudos fisiológicos e em aquacultura, sendo considerada como alimento de qualidade (Tabela III). Hemaiswarya *et al.*. (2011) sugere a sua utilização em protocolos zootécnicos para a produção de larvas de camarão, uma vez que possui aminoácidos que aumentam a taxa de crescimento dos animais e reduzem a síndrome de zoea.

Tabela III - Perfil bioquímico de *Tetraselmis* sp., utilizando como meio de cultivo F/2 (Guillard and Ryther, 1963), segundo Brown *et al.*. (1998). A percentagem refere-se a 100g de peso seco.

	% Peso seco
Proteínas	30±7
Lípidos totais	16±2
Hidratos de Carbono	26±9

Estudos indicam ainda o potencial desta microalga a nível farmacêutico, uma vez que foram descobertas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras em extratos e em polissacarídeos extraídos (Matsunaga *et al.*. 2005).

1.4 Condições de cultivo

Por forma a melhorar o perfil nutricional das microalgas para a sua utilização em aquacultura, são utilizadas diferentes estratégias de manipulação, principalmente ao nível das condições de cultivo, manipulando-se a intensidade luminosa, a temperatura, o arejamento/agitação, a salinidade e o meio de cultivo.

1.4.1 Intensidade luminosa

A luz pode ser fornecida de forma artificial ou natural, dependendo das instalações onde o cultivo sucede, optando-se por lâmpadas brancas fluorescentes quando verificada a primeira situação (Laing 1991). O fotoperíodo deve também ser

considerado, uma vez que quando expostas a 24h de luz podem entrar em stress bioquímico, sendo preferencial utilizar-se fotoperíodos de dia:noite 16h:8h ou 12h:12h (Silva 2011). Em ambientes naturais, os microorganismos estão sujeitos a diversas mudanças de irradiação ao longo do dia (Richmond 2004), sendo fundamental, no caso de se optar por iluminação natural, controlar a iluminação ao longo do dia. A necessidade de luz varia também com a densidade da cultura, sendo que culturas mais densas requerem maior fornecimento de luz (L. Barsanti & Gualtieri 2006).

Este fator é considerado limitante e stressante. O controlo deste parâmetro é de extrema importância, uma vez que a energia para a fotossíntese é obtida desta forma – os pigmentos fotossintéticos capturam a energia dos fotões, gerando eletrões (e^-) com elevado potencial redutor, empregues na produção de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto (NADPH) e adenosina trifosfato (ATP), depois utilizados para reduzir o dióxido de carbono (CO_2) a 3-fosfoglicerato, no Ciclo de Calvin (Stryer *et al.* 2002)– e está documentada a alteração do perfil bioquímico da microalgas, numa tentativa de fotoadaptação/aclimatização (Richmond 2004).

Na Necton, o uso de luz artificial é desvalorizado, sendo privilegiado o uso de luz natural. Esta situação verifica-se quer a nível laboratorial (crescimento e manutenção de culturas *stock*), como a nível industrial, estando os reatores de produção em larga escala localizados no exterior. Em meses com maior intensidade luminosa, os reatores podem ser parcialmente cobertos durante o dia, de maneira a diminuir a exposição solar.

1.4.2 Temperatura

A temperatura, por ter uma influência considerável nas reações metabólicas, fisiológicas deve ser cuidadosamente controlada (Richmond 2004; Andersen 2005).

Apesar das condições ótimas serem diferentes entre estirpes, estima-se que a temperatura adequada ao cultivo das espécies comerciais esteja compreendida entre 16°C e 27°C (L. Barsanti & Gualtieri 2006). No caso de a temperatura ser superior a

35°C pode ser induzido um estímulo na produção enzimática que, numa tentativa de manter os níveis de fotossíntese estáveis, pode, no limite, levar à morte do organismo (Richmond 2004; Silva 2011), enquanto na situação oposta se verifica redução no crescimento celular e potencial formação de células de resistência (Zeng *et al.* 2011).

A Necton possui formas distintas de controlo da temperatura. A nível laboratorial, as instalações encontram-se equipadas com ar condicionado, regulado por forma a conservar, sensivelmente, os 23°C. Já os reatores exteriores possuem um sistema de rega na parte superior que, nos meses mais quentes, é acionado, regulando a temperatura a que a cultura se encontra.

1.4.3 Arejamento/Agitação

A agitação é um importante fator a considerar no cultivo de microalgas, uma vez que promove a distribuição homogénea de luz e nutrientes, tornando-os disponíveis para todas as células (Laing 1991).

É realizada de diferentes formas, dependendo do reator e do volume a misturar. Em ambiente laboratorial, é comum ser promovida através de arejamento, no entanto, a nível industrial, este método seria impraticável, sendo, por isso, preferida movimentação através de pás mecânicas ou bombas hidráulicas (Laing 1991).

É uma variável limitante que deve ser controlada, sendo necessária para prevenir a sedimentação das culturas, potenciar a homogeneização e evitar a estratificação térmica (L. Barsanti & Gualtieri 2006). O arejamento/agitação não deve ser turbulenta, de maneira a não prejudicar as células (Silva 2011).

As culturas stock da Necton são misturadas através do fornecimento de ar, tal como descrito anteriormente, já as culturas exteriores são homogeneizadas através de bombas hidráulicas. São adicionadas ainda esferas plásticas para diminuir a deposição das culturas nos reatores.

1.4.4 Salinidade

A salinidade deve ser adaptada ao microorganismo em crescimento, considerando o ambiente onde normalmente este é encontrado (Richmond 2004).

As microalgas podem adaptar-se a um grande espectro de salinidade (Silva 2011) que, em casos extremos, pode atingir a salinidade 90, como a microalga *Dunaliella salina*. No entanto, considera-se que o ótimo se deve encontrar entre os 15 e os 35 (J. Bergé & Barnathan 2005).

As diferenças iônicas afetam os organismos de três maneiras distintas: (a) *stress* osmótico, com diminuição do gradiente interno de água (b) *stress* osmótico por incorporação de sal (c) alteração dos rácios iônicos, devido à permeabilidade seletiva da membrana. Pode alterar o metabolismo e afetar a composição bioquímica, principalmente o perfil de ácidos gordos, podendo, em casos extremos, impossibilitar o crescimento da cultura, por a energia ser redirecionada para a sobrevivência e não para o crescimento (Renaud & Parry 1994; Huang *et al.* 2012).

A salinidade pode aumentar por evaporação de água da cultura, quer lenta, quer rapidamente, tal como se verifica em ambientes com ar condicionado ou elevadas temperaturas. Na Necton a salinidade das culturas é monitorizada através de sondas, sendo ajustada com água doce caso o parâmetro aumente.

1.4.5 Composição do meio de cultivo

A manutenção correta das microalgas em cultivo depende da escolha apropriada do meio de cultivo, mais uma vez tentando mimetizar o mais possível o ambiente natural de onde as estirpes são provenientes.

Teoricamente, os nutrientes disponíveis naturalmente no meio seriam suficientes para o crescimento das microalgas no entanto, é sugerido como método *standard* a adição de meio enriquecido à água (Barsanti & Gualtieri 2006). Isto acontece por a concentração de células necessária para a produção de biomassa algal a nível empresarial ser superior às encontradas no ambiente (FAO, 1996).

Os meios marinhos – meios apropriados para o crescimento de estirpes de água salgada – são bastante complexos, utilizando-se vários compostos orgânicos para os enriquecer. A água salgada a empregar pode ser natural ou artificial, sendo que o meio deve ser suficientemente rico para estimular o crescimento (Zeng *et al.* 2011), contendo os nutrientes base, em maior – macro – ou menor – micro - concentração. O azoto (N) e o fósforo (P), elementos constituintes da estrutura celular e dos ácidos nucleicos, são essenciais ao crescimento das estirpes, tornando-se limitantes quando em baixas concentrações (Cai *et al.* 2013). Os micronutrientes são conhecidos por determinarem o aparecimento de “blooms” algais em meio natural, sendo, por isso, determinantes para o crescimento microalgal. O ferro (Fe), potássio (K) e sais inorgânicos – ativadores metabólicos – são dos micronutrientes utilizados mais conhecidos (Zeng *et al.* 2011; Cai *et al.* 2013). O EDTA é também adicionado aos meios de cultivo como substância quelante, de modo a atuar como “tampão” e manter a concentração de iões metálicos livres constante (Barsanti & Gualtieri 2006).

Os meios sintéticos mais utilizados e estudados à escala mundial são F/2 e Walne, que, devido aos elevados custos de produção, são preferidos para o uso laboratorial e não industrial. Os meios sintéticos disponíveis atualmente são, por vezes, variações uns dos outros, ocorrendo estas a nível das concentrações de nutrientes a adicionar. Os meios podem ainda ter a adição de vitaminas (Rawat *et al.* 2012). Na Necton, o meio escolhido é NutriBloom, meio desenvolvido pela empresa utilizado no cultivo *in* e *outdoors*. Sendo muito enriquecido (tabela IV), tem como vantagem a não utilização de vitaminas quando empregue à escala industrial.

Tabela IV – Composição química dos diferentes meios de cultura comerciais (F/2, Conway (C), Artificial SeaWater (ASW) e NutriBloom (NB)) e dos meios desenvolvidos no presente estudo (NutriBloom sem cobalto (NB s/Co), Sea Mineral Solution (SMS) e Simplex (S). A concentração encontra-se em mM.

		NB	NB s/Co	F/2	SMS	S	C	ASW
Macronutrientes	N	2000	2000	0,88	2000	2000	1,1800	8,820
	K	100	100	0,04	100	100	0,1240	6,790
	Fe	20	20	0,01	20,64	-	0,0048	0,011
Micronutrientes	Zn	1	1	$7,65 \times 10^{-5}$	$7,60 \times 10^{-04}$	-	0,0002	0,001
	Mn	1	1	$9,1 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-02}$	-	0,0018	0,009
	Mo	0,1	0,1	$2,6 \times 10^{-5}$	$4,20 \times 10^{-04}$	-	0,0000	0,002
	Co	0,1	-	$4,2 \times 10^{-5}$	$8,50 \times 10^{-05}$	-	0,0001	0,000
	Cu	0,1	0,1	$3,93 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-04}$	-	0,0001	0,000
EDTA		26,4	26,4	-	20	-	0,1540	0,001
Outros Compostos		-	-	Sim	Sim	-	-	Sim

O cobalto (Co), que é utilizado pelas microalgas na síntese de cianocobalamina – vitamina B₁₂ -, apresenta um grau de toxicidade a não desprezar, apesar das baixas concentrações utilizadas. Além de nocivo para o manipulador, há introdução de um elemento tóxico na cadeia trófica que deve ser evitada (Mei *et al.* 2007).

Barsanti & Gualtieri (2006) referem que não existem métodos completamente errados para o desenvolvimento e otimização de meios de cultivo, uma vez que os meios já conhecidos foram muitas vezes desenvolvidos por tentativa e erro e com base em suposições teóricas. Há a considerar também que microalgas

diferentes têm requisitos nutricionais distintos, podendo um meio ser adequado para uma microalga e para outra não.

Tal como os fatores anteriormente apresentados, também a qualidade e concentração do meio de cultivo influenciam a atividade fotossintética, produtividade e metabolismo celular (Huang *et al.* 2012).

Sendo organismos altamente mutáveis e adaptáveis ao ambiente onde são cultivados, as microalgas tendem a sofrer um reajuste bioquímico interno sempre que existe alguma alteração, ainda que mínima, das condições de cultivo (Ghezelbash *et al.* 2008).

1.5 Perfil bioquímico

A biomassa algal é constituída por diversos compostos bioquímicos, destacando-se as proteínas, hidratos de carbono e lípidos por se considerar que contêm o maior potencial energético e por serem os constituintes maioritários das células (Stryer *et al.* 2002).

1.5.1 Proteínas

As proteínas são macromoléculas dinâmicas e versáteis, constituídas por diferentes aminoácidos que desempenham funções cruciais nos sistemas biológicos (Nelson & Cox 2004). Podem agir como catalisadores, transportadores, geradores de movimento, controladores do crescimento ou mesmo como agentes na proteção mecânica da célula (Stryer *et al.* 2002; Sánchez *et al.* 2002).

O teor em proteína determina o valor nutricional da microalga (Hemaiswarya *et al.* 2011), através do conteúdo, disponibilidade e proporção dos aminoácidos. A qualidade nutricional é, frequentemente, determinada a partir do conteúdo de proteínas bruto (Becker 2007). O seu teor proteico pode até aumentar o seu valor comercial, uma vez que, quando isoladas e extraídas, as proteínas de microalgas são consideradas produtos com elevado valor no mercado (Taberner *et al.* 2012). Está também comprovado que a qualidade das proteínas encontradas em

microalgas é, por vezes, superior à encontrada em plantas terrestres (Becker 2007), aumentando assim a sua importância.

Nas microalgas, Brown (2002) considera que o valor proteico varia entre 30 a 40% na fase exponencial tardia, no entanto são conhecidas microalgas, *Chlorella* sp. e *Dunaliella* sp., que podem atingir até 60% de proteínas (Zepka *et al.* 2008).

1.5.2 Hidratos de carbono

São as biomoléculas mais abundantes no planeta, sendo utilizadas em funções estruturais, de armazenamento de energia e como intermediário metabólico. A quantidade de polissacarídeos encontrados nas microalgas varia consoante a espécie e a fase de crescimento (Stryer *et al.* 2002; Nelson & Cox 2004; Draaisma *et al.* 2012).

Os hidratos de carbono são compostos formados na fase escura da fotossíntese, a partir do ciclo de Calvin, através da redução do dióxido de carbono e utilização de ATP e NADPH. A maior parte dos hidratos de carbono ocorre durante este processo de fixação de CO₂, considerando-se, assim, como o produto mais abundante deste metabolismo (Chen *et al.* 2013). Podem ser formados no interior dos cloroplastos ou no citosol (Markou *et al.* 2012). Compostos por monossacarídeos – pequenas moléculas que contém entre 3 a 9 átomos de carbono – conseguem variar o tamanho ou a configuração estereoquímica de um ou mais centros de carbono. Podem ser agrupados através de várias estruturas oligossacáridas (Stryer *et al.* 2002).

As microalgas caracterizam-se pela ausência ou presença em baixas percentagens de alguns hidratos de carbono comuns em plantas superiores, como a lignina. Esse facto é vantajoso do ponto de vista nutritivo, uma vez que as torna mais facilmente digeríveis, tornando a biomassa algal uma boa escolha (Markou *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013). Os hidratos de carbono são acumulados em forma de amido nos plastídeos e têm uma função estrutural (constituintes da parede celular) ou acumuladora. Esta última função é de extrema importância, uma vez que fornecem parte da energia necessária em processos metabólicos e, em caso de necessidade,

permitem ao organismo sobreviver em condições adversas, dando tempo à microalga de reajustar o perfil bioquímico e adaptar-se às novas condições (Richmond 2004).

Os hidratos de carbono podem atingir entre 5 a 33% da biomassa algal seca (Brown 2002), sendo essa percentagem reajustável, por adaptação às condições do meio.

1.5.3 Lípidos

A definição destes compostos não é consensual, podendo ser considerados como qualquer molécula biológica solúvel num solvente orgânico (Halim *et al.* 2012) ou como ácidos gordos, derivados e moléculas com biossíntese/função semelhante a esses (Woertz 2007; Xiao 2010). Os lípidos totais – mistura heterogénea de triacilgliceróis, fosfolípidos, ácidos gordos, ceras e pigmentos - têm como principais funções a sinalização intracelular, fornecimento de energia metabólica e participação na formação de membranas e tecidos. Os lípidos em organismos marinhos refletem as condições ambientais e bioquímicas dos locais onde estes habitam, sendo utilizados frequentemente como biomarcadores (Bergé & Barnathan 2005; Simões 2011). Podem atingir até cerca de 77% da biomassa seca de microalgas, no entanto, normalmente, variam entre os 10 a 20% (Brown 2002; Xiao 2010; Simões 2011).

Os ácidos gordos consistem em grupos carboxílicos hidrofílicos, ligados a uma cadeia de hidrocarbonetos e hidrofóbicos, integrando moléculas lipídicas (Halim *et al.* 2012). São cadeias de tamanho variável, podendo variar entre os 4 e os 26 átomos de carbonos (Simões 2011). Dividem-se em saturados e insaturados, sendo que os primeiros não possuem ligações duplas, e os segundos tem pelo menos uma ligação dupla. Dentro dos ácidos gordos insaturados, existem ainda os monoinsaturados (uma ligação dupla) [MUFA], polinsaturados (mais de uma ligação dupla) [PUFA] e HUFA's. Estes últimos são ácidos gordos altamente insaturados, contendo no mínimo 20 carbonos e três ou mais ligações duplas. Os exemplos mais conhecidos são o ácido docosa-hexaenóico (DHA) e EPA (figura 4). No caso de DHA é constituído por 22 carbonos e existem 3 ligações duplas a partir do carbono 6, já EPA, é composto por 20 carbonos, com 3 ligações duplas a partir do carbono 5.

As células vegetais são as únicas que conseguem biossintetizar de raiz ácidos gordos n-3 e n-6, vulgarmente designados como ómega 3 e 6, essenciais aos organismos heterotróficos, ocupando, por isso, uma posição de destaque da cadeia trófica (Bergé & Barnathan 2005). A composição e quantidade de ácidos gordos mudam grandemente com as condições abióticas às quais o organismo está exposto (Griffiths *et al.* 2011), podendo a posição das ligações duplas, configuração, geometria e grau de insaturação ser distintivos entre espécies e serem considerados marcadores taxonómicos (Gutnikov 1995).

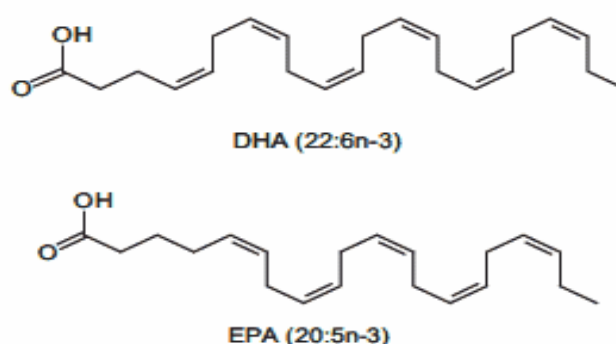


Figura 4 - Estrutura dos ácidos gordos DHA e EPA. [Retirado de: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/omega-3-fatty-acids.html>]

Fazendo parte dos lípidos neutros que não contêm ácidos gordos (Halim *et al.* 2012), os pigmentos são frequentemente utilizados para estimar a biomassa de fitoplâncton presente em amostras de água (Davidson *et al.* 1991). Adaptam-se rapidamente às condições ambientais, particularmente os pigmentos, podendo ser indicadores de *stress* nutricional (Rocha *et al.* 2003), apresentando-se em diversas formas, nomeadamente clorofilas, carotenoides e ficobilinas. Cada uma das classes de pigmentos apresenta um pico de absorvância da luz diferente, permitindo um melhor aproveitamento da luz a que estão expostos (Barsanti & Gualtieri 2006).

Os pigmentos são ainda responsáveis por conferir cor às células, sendo estes muitas vezes característicos das classes às quais cada espécie pertence (Van den Hoek *et al.* 1996).

Pigmentos, ácidos gordos, lípidos gerais, hidratos de carbono e proteínas, por serem extremamente influenciados pelos meios de cultivo utilizado no crescimento das microalgas, colocam em aquacultura questões que se prendem com a necessidade de investigação de meios otimizados que apresentem a melhor relação qualidade/preço, fornecendo ao animal um alimento de qualidade com o mais baixo investimento possível.

Página Intencionalmente deixada em branco

2. Objetivos

O presente trabalho teve com objetivo identificar um meio de cultivo adequado à produção em grande escala das espécies *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp., e cuja utilização permitisse:

- (1) Obter elevadas taxas de crescimento
- (2) Atingir elevada produtividade
- (3) Reduzir ao máximo o uso de Cobalto
- (4) Diminuição custos produção

Para tal, foram comparados quatro meios distintos - NutriBloom, Simplex, Sea Mineral Solution e NutriBloom sem cobalto – nas duas espécies escolhidas, tendo por base:

- (I) Curvas de crescimento;
- (II) Duração das fases do crescimento;
- (III) A produção de biomassa obtida (densidade ótica, contagem celular e peso seco)
- (IV) Perfil bioquímico:
 - a. Proteínas brutas;
 - b. Hidratos de carbono;
 - c. Lípidos totais;
 - d. Perfil de ácidos gordos.

Página Intencionalmente deixada em branco

3. Materiais e Métodos

O procedimento experimental subdividiu-se em três fases distintas:

Fase 1. Ensaios preliminares de crescimento de microalgas: Teste de cinco meios de cultivo, através do crescimento de microalgas em tubos de ensaio de 80mL

Fase 2. *Scale up* do processo: Teste dos meios de cultivo selecionados na fase anterior, através do crescimento em balões de 5L

Fase 3. Perfil bioquímico das culturas de microalgas: Processamento das amostras obtidas durante o trabalho realizado na Necton, através da determinação do perfil bioquímico da biomassa de microalgas resultante dos vários ensaios

Sendo que as duas primeiras decorreram nas instalações da empresa Necton S.A., durante três meses, e a última fase na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Instituto Politécnico de Leiria, durante oito meses.

3.1 Condições de cultivo

Nannochloropsis sp. e *Tetraselmis* sp., estirpes comerciais da empresa Necton, foram mantidas à temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e sujeitas a luz solar, seguindo um fotoperíodo dia:noite de aproximadamente 12h:12h.

A água salgada utilizada proveio da Ria Formosa, sendo sujeita a diversos processos de esterilização. Primeiramente, foi submetida a filtração por recurso a três membranas filtrantes de porosidade sucessivamente mais reduzida (20 a $1\mu\text{m}$), sendo de seguida sujeita a um tratamento com hipoclorito de sódio. Após a neutralização do composto ativo – através do uso de tiosulfato de sódio - procedeu-se à esterilização por autoclavagem, durante 40 minutos, à temperatura de 121°C e pressão 1atm.

Utilizaram-se cinco meios de cultivo diferentes na fase 1 e quatro na fase 2, sendo a primeira etapa uma triagem dos meios a utilizar no *scale up*. Utilizaram-se como meios de controlo F/2 modificado [F/2] (as vitaminas foram suprimidas do

meio F/2, uma vez que a nível industrial não são utilizadas por serem muito dispendiosas) e NutriBloom [NB] (meio comercial e industrial da empresa Necton S.A., baseado no meio Algal-1: Nutrición Avanzada SA). Por alteração da composição de NB foram criados outros meios com o objetivo de se testar a sua viabilidade. Assim, o meio NutriBloom sem Cobalto [NB s/ Co] surgiu pela eliminação do cobalto; o meio Simplex [S], pela eliminação dos micronutrientes e o meio Sea Mineral Solution [SMS] (composição tabela IV) pela substituição dos micronutrientes pelos encontrados naturalmente nas águas das salinas da Ria Formosa. A concentração da solução aquosa recolhida da água das salinas, $50\mu\text{L.L}^{-1}$, adicionada ao meio SMS foi definida de acordo com a otimização efetuada por Pereira (2009). Os outros meios mantiveram as concentrações de macronutrientes. Cada um dos meios, para cada uma das microalgas, foi testado em triplicado, de modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

O cultivo foi efetuado em *fed-batch*, com arejamento suave e constante, tendo a concentração de nitratos (protocolo 1 (anexo)) sido medida semanalmente na fase 1 e a cada dois dias na fase 2, permitindo regular a concentração de nitratos a 2mM e manter a proporção N:P = 20, garantindo que existem nutrientes disponíveis, tal como Olofsson *et al.*. (2012). Foi também selecionada esta concentração por ser a que permite maior conversão de nitrato de sódio em proteínas (Fabregas *et al.*. 1985). De três em três dias avaliou-se a concentração de nitratos no meio de crescimento e ajustou-se a 2mM sempre que necessário. A presença de nitratos em excesso revelou-se da enzima nitrato reductase (Cai *et al.*. 2013).

3.2 Medição dos parâmetros de crescimento

O crescimento de uma cultura pode ser avaliado por diversos métodos, numa tentativa de minimizar os erros associados, e envolve diferentes medições ao longo do tempo do ensaio, permitindo assim acompanhar a evolução da cultura. No presente estudo, foram consideradas três metodologias complementares: medição da densidade ótica (540nm), contagem celular (câmaras de Neubauer) e determinação do peso seco.

3.2.1 Densidade ótica

A densidade ótica (D.O.) foi utilizada como medição indireta do crescimento da cultura, uma vez que a absorvância da luz pode ser diretamente relacionada com a densidade celular, através de curvas de calibração adequadas (densidade ótica vs número de células/peso seco) (Griffiths & Garcin, *et al.*, 2011). A densidade ótica de cada amostra foi medida de dois em dois dias, num espectrofotómetro Shimadzu, UV-mini 1240, a $\lambda=540\text{nm}$. Para amostras mais concentradas, foram efetuadas diluições, permitindo que o valor de absorvância não ultrapassasse o valor máximo de 1, mantendo a linearidade da lei de Beer-Lambert (Narayana & Sunil 2009).

Utilizando o programa estatístico SigmaPlot (versão 12.0), traçou-se a curva de crescimento de cada ensaio, utilizando-se uma curva logística de 4 parâmetros (equação 1).

$$x = x_0 + \frac{a}{1 + e^{\frac{-(t-t_0)}{b}}}$$

Equação 1- Curva logística de quatro parâmetros para o crescimento microbiano, onde x corresponde à densidade celular (células.ml^{-1}), x_0 à densidade celular inicial, a à interseção com o eixo do y, b ao declive da reta, e ao logaritmo natural de Napier, t ao tempo final (dias) e t_0 ao tempo inicial (dias).

A taxa específica de crescimento (μ) foi determinada através da equação 2. O crescimento apenas é significativo na fase exponencial do desenvolvimento da cultura tendo, por isso, sido considerados apenas os valores correspondentes a essa fase, em cada um dos ensaios.

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu t$$

Equação 2 - Determinação da taxa específica de crescimento, onde x se refere à densidade celular (células.ml^{-1}), x_0 densidade celular inicial (células.ml^{-1}), μ à taxa específica de crescimento (dias^{-1}) e t ao tempo (dias)

A equação 2 relaciona-se com a equação da recta obtida quando considerados apenas os valores correspondentes à fase supracitada, sendo μ correspondente ao declive da recta.

O tempo de duplicação celular (t_d) foi determinado a partir da equação 3, para o crescimento microbiano.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Equação 3 - Determinação do tempo de duplicação (t_d) da cultura, onde μ corresponde à taxa específica de crescimento.

O controlo do crescimento através da D.O. é vastamente aplicado em laboratório e em controlo da produção industrial, uma vez que é rápido e não destrutivo. No entanto, podem ser introduzidos erros nas leituras, sobretudo devido a alterações na morfologia externa das células, composição ou propriedades óticas (Griffiths, Garcin, *et al.*. 2011).

3.2.2 Contagem celular

Tal como o método anterior, também este foi efetuado a cada dois dias de ensaio, permitindo controlar diretamente o aumento do número de células. Trata-se de um método que recorre à utilização de microscópio ótico [VWR, China] e de um hemocítmetro ou câmara de contagem de Neubauer [Brand, Alemanha]. Utilizou-se a divisória mais pequena da câmara, devido ao tamanho e à densidade das células em estudo. No caso de *Tetraselmis* sp., adicionaram-se algumas gotas de álcool, de maneira a fixar as células e permitir a sua contagem.

Após a contagem, o número de células por mililitro foi determinado a partir da equação 4, onde o número do quadrado médio se refere ao número médio de células por divisória do quadrado central. O fator de diluição só é considerado quando esta é efetuada.

Número células por mililitro = Número do quadrado médio $\times 25 \times 10000 \times$ Fator de diluição

Equação 4 - Fórmula padrão para a determinação do número de células por mililitro, através da utilização do hemocitómetro de Neubauer.

Esta metodologia tem como desvantagem a contabilização do total das células, por não ser possível a distinção quanto à sua viabilidade, excetuando-se as células visivelmente danificadas. Para minimizar os erros associados à contagem, as células posicionadas nas linhas laterais esquerdas e inferiores não são contabilizadas, enquanto as encontradas nos limites laterais direitos e superiores o são. Os valores obtidos nesta secção foram relacionados com os obtidos na secção anterior, de modo a obter uma curva de calibração dos diferentes meios de cultivo em cada uma das espécies consideradas.

3.2.3 Peso seco

A determinação do peso foi repetida a cada sete dias de ensaio, permitindo aferir a evolução da produção de biomassa ao longo do período de cultivo. O processo inicia-se com a preparação prévia dos filtros de microfibras de vidro (Whatman 1,5 μ m diâmetro 47mm) a utilizar. Todos os filtros foram limpos com uma solução de formiato de amónio (0,5M) [Acrös Organics] e colocados na estufa a 70°C, durante 2 a 4h, de modo a eliminar vestígios de celulose, após o que o seu peso foi registado e considerado como $X_{inicial}$. Nos dias determinados, recolheu-se uma amostra de 5mL da cultura e filtrou-se a vácuo. Quando o filtro aparentava já estar seco adicionava-se 5mL de formiato de amónio, de modo a eliminar possíveis vestígios de sais inorgânicos e reduzir, assim, o erro associado ao método. Após a filtração do novo volume de formiato de amónio, o filtro era cuidadosamente retirado do sistema de filtração e colocado na estufa (T=70°C e 72h). Posteriormente, as amostras eram retiradas e novamente pesadas, sendo esse novo valor correspondente a X_{final} . Através da equação 5 foi determinada a massa obtida, permitindo proceder às curvas de calibração de peso seco vs D.O..

$$X = \frac{(X_{\text{Final}} - X_{\text{Inicial}})}{\text{Volume filtrado}}$$

Equação 5 - Fórmula de determinação do **Peso seco** (g.L^{-1}).

A produtividade volumétrica em biomassa (P) das culturas foi calculada através da equação 6, sendo o valor obtido expresso em $\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$.

$$P = \frac{X_F - X_i}{\text{Tempo}_{\text{total}}}$$

Equação 6 - Cálculo da produtividade volumétrica em biomassa da cultura ($\text{g.L}^{-1}\text{.dia}^{-1}$). X_F - concentração de biomassa seca no final do ensaio; X_i - concentração de biomassa seca no início do ensaio e **Tempo total**- duração do ensaio.

3.3 Recolha, embalagem e transporte de amostras

De cada uma das réplicas foram recolhidos 200mL de amostra, nos dias 16 e 18 do tempo de cultivo. Os pontos de recolha foram determinados de acordo com a fase de crescimento das culturas, correspondendo à fase exponencial tardia e à fase estacionária, respetivamente. O volume foi colocado em sacos previamente preparados e identificados, tendo cada saco sido dividido em três partes semelhantes e selado a quente. As amostras foram conservadas a -20°C até à data de transporte.

As amostras foram colocadas numa caixa de esferovite, juntamente com placas de gelo – para evitar o descongelamento precoce – e a caixa selada com fita-cola. No mesmo dia, foram transportadas até à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, desembaladas e conservadas a -20°C até à sua utilização.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Preparação das amostras

A análise bioquímica foi precedida pela preparação das amostras. As amostras foram descongeladas e recolhidos 10mL, com exceção da análise de ácidos gordos, onde foram recolhidos 50mL, e centrifugadas (Eppendorf 5810R, Alemanha) à temperatura ambiente, $v=5000\text{rpm}$; 5min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em água destilada, para promover a remoção de sais excedentes e o choque osmótico, permitindo a extração mais simples dos compostos para análise. A solução ressuspensa foi novamente centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante novamente desprezado. O procedimento foi repetido duas vezes, de modo a garantir a eliminação dos sais.

3.4.2 Extração e quantificação de proteína bruta

Depois do tratamento prévio da amostra, esta foi sujeita a um procedimento de extração, por forma a libertar potenciais proteínas intracelulares (López *et al.*, 2010).

O pellet foi ressuspensionado em 500 μL de tampão de extração (tabela II (anexo 2)) e imediatamente colocado a 95°C (Julabo SW22, USA), durante 5min, de modo a proceder à desnaturação da amostra, preservando-a da ação de potenciais proteases. Decorrido o período de desnaturação, as amostras foram colocadas em gelo durante 30s. As amostras foram, de seguida, centrifugadas a 2min, $v= 13,200\text{ rpm}$, o sobrenadante recolhido e colocado em tubos limpos.

O sobrenadante foi posteriormente submetido ao método colorimétrico de Lowry (1951). Este método baseia-se na formação de complexos proteicos através da ligação das proteínas ao sulfato de cobre, em meio alcalino. Por adição do reagente de Folin-Ciocalteu promove-se uma oxidação das ligações peptídicas, formando azul de molibdênio e conferindo, assim, a característica cor azul. A intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de ligações peptídicas quebradas e, consequentemente, à concentração de proteínas (Safi *et al.*, 2013).

A cada amostra adicionaram-se 50µL de hidróxido de sódio 0,2N e 1mL da solução **I** de Lowry (tabela II (anexo 2)), seguida de homogeneização em vórtex. As amostras foram deixadas a incubar durante 10min, envoltas em papel de alumínio - para evitar reações provocadas pela exposição à luz - e à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi adicionado 100µL da solução **H** de Lowry (tabela II (anexo 2)). Seguiu-se um novo período de incubação, no escuro, à temperatura ambiente e durante 30min. Foi medida a absorvância da solução, a $\lambda=750\text{nm}$ [Sunergy H1 – Biotek], e o valor de proteína na amostra, em mg.L^{-1} , foi calculado com base na equação obtida na curva de calibração de Bovine Serum Albumin (protocolo 2, em anexo), transcrita na equação 7.

$$y = 0,4169x + 0,0977$$

Equação 7 – Determinação da concentração de proteína na amostra, onde **y** se define como sendo o **valor da absorvância** obtida e **x** a **concentração**, em mg.L^{-1} , de proteína.

Apesar de não ser o método mais sensível, o método de Lowry foi preferido aos métodos de Bradford (1976) e Kjeldahl (1883), por ser um método moderadamente constante de proteína para proteína e de, apesar de ser um método espectrofotométrico, utilizar um comprimento de onda onde os pigmentos não são considerados, evitando assim custos adicionais na sua extração (Walker 2002).

3.4.3 Extração e quantificação de hidratos de carbono

Após o tratamento prévio da amostra o pellet foi levado à estufa, durante 12h a $T=60^{\circ}\text{C}$, para secar a amostra e eliminar os vestígios de água.

Pesaram-se 5mg de biomassa seca para tubos de 15mL, adicionando-se 5mL de etanol a 96% (Aga). A solução foi colocada a incubar a $T=95^{\circ}\text{C}$, 10min. A amostra foi colocada a esta temperatura elevada para permitir que a extração de compostos fosse mais eficiente, uma vez que a promoção de um choque de temperatura origina a cedência da estrutura celular. Há também a criação de correntes de convecção no fluido, movendo a amostra e aumentando a superfície de contacto. Após esse período, as amostras foram centrifugadas - $v=2500\text{rpm}$, 5min – e o sobrenadante recolhido. A extração foi repetida três vezes. O método de extração

foi adaptado de Chow & Landhäusser (2004). Apesar de as extrações com etanol poderem incluir substâncias contaminantes, tais como lípidos, proteínas e pigmentos, os autores supracitados concluíram que estas formam complexos com o ácido fénico que absorvem a comprimentos de onda inferiores ao considerado no método, não sendo a sua interferência significativa na determinação do teor de hidratos de carbono.

Do extrato obtido foram retirados 200 μ L e submetidos ao método colorimétrico de Dubois (1956), tal como Leandro (2000).

À amostra foi acrescentado 1mL de ácido fénico a 5% (Scharlau) e, imediatamente, adicionado 5ml de ácido sulfúrico a 96% (Sigma). O segundo reagente permitiu quebrar quaisquer polissacarídeos existentes, tornando-os monossacarídeos. A partir deste momento, as pentoses e hexoses existentes foram desidratadas para furfural e hidroximetil furfural, respetivamente, que interagiram com o ácido fénico previamente adicionado e criaram a característica cor rosada. As soluções foram colocadas a arrefecer à temperatura ambiente durante 10min, seguindo-se uma incubação a T=30°C durante 15min. Foi medida a absorvância do sobrenadante, a $\lambda=485\text{nm}$, e o valor de hidratos de carbono na amostra, em mg.L^{-1} , foi calculado por comparação com a equação obtida na curva de calibração de glucose (protocolo 3, em anexo), transcrita na equação 8.

$$y = 0,0053x + 0,0622$$

Equação 8 - Determinação da concentração de glucose na amostra, onde **y** se define como sendo o **valor da absorvância** obtida e **x** a **concentração**, em mg.L^{-1} , de hidratos de carbono

Este método foi escolhido por permitir, rapidamente, a quantificação dos açúcares dominantes, mesmo quando estes se encontram em baixas concentrações (Chow & Landhäusser 2004).

3.4.4 Extração e quantificação de lípidos totais

Após o tratamento prévio da amostra o pellet foi levado à estufa, durante 72h a 60°C, para secar a amostra e eliminar os vestígios de água. Após esse processo as amostras foram submetidas ao método de extração lipídica Bligh and Dyer (1959).

Pesaram-se 5mg de biomassa seca de cada uma das amostras para tubos de falcon de 15mL e adicionaram-se 800µL de água miliQ [Carlo Erba], procedendo-se de seguida à uniformização das amostras através de um homogeneizador [Fisatom 712], a 20 000 rpm. As amostras foram colocadas em gelo, adicionando-se 3ml de uma solução de metanol e clorofórmio (2:1) [Panreac; Sacharlaw]. Houve um novo passo de homogeneização durante 60s, v= 20 000rpm, e, novamente em gelo, adicionou-se 1ml de clorofórmio. Durante 30s e à mesma velocidade, executou-se uma nova uniformização. Centrifugaram-se as amostras (v=7000rpm, 10min) e a fase orgânica (sobrenadante) foi recolhida e colocada em tubos limpos. Adicionou-se um novo mililitro de clorofórmio e os tubos foram colocados no evaporador rotativo a 60°C, v=90rpm, até o volume evaporar completamente. Os tubos foram a arrefecer no exsiccador. A massa foi medida e os lípidos totais determinados gravimetricamente através da equação 9.

$$\% \text{ Lípidos Totais} = \frac{(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) \times \text{Vol}_{\text{total}} \text{ clorofórmio}}{\text{Vol de clorofórmio evaporado} \times \text{Biomassa seca}}$$

Equação 9 - Cálculo dos lípidos totais, em percentagem. O **peso inicial** corresponde à massa dos tubos limpos e vazios, enquanto o **peso final** corresponde à massa dos tubos com o produto da evaporação do clorofórmio (g). O **volume total de clorofórmio** refere-se ao utilizado na extração (mL), e o **volume evaporado** à última adição de clorofórmio (mL). A **biomassa seca** refere-se à massa inicial colocada nos tubos de extração (g).

3.4.5 Perfil de ácidos gordos

Após o tratamento prévio, foram medidas 0,200g de amostra e realizada uma transesterificação direta, tal como efetuada por Lepage & Roy (1986) . À biomassa foi adicionada 1,5ml de uma solução de metanol e cloreto de acetilo (20:1) [Panreac; Merck], sendo essa solução necessária para a metilação das amostras. Um

ciclo de homogeneização em vórtex, durante 30s, foi efetuado para garantir a mistura e disrupção celular. Adicionou-se 1ml de hexano [Fisher Scientific] a cada amostra e procedeu-se a um novo ciclo de homogeneização.

As amostras foram colocadas a incubar, durante 1h, T=80°C, com agitação, para garantir a sua derivatização completa. Depois da incubação, os tubos foram arrefecidos em gelo e acrescentado 1mL de água MiliQ. Um novo ciclo de homogeneização em vórtex, durante 1min foi realizado. As alíquotas foram centrifugadas a $v=2784\text{rpm}$, 10min, T=4°C, até formarem 3 fases. A fase orgânica foi removida e filtrada por uma coluna de sulfato de sódio anidro, removendo qualquer presença de água. As amostras foram guardadas em vials de cromatografia gasosa (GC) e posteriormente injetadas.

Os ésteres metílicos de ácidos gordos foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo Finnigan TRACE GC Ultra (Thermo Electron Corporation), equipado com uma coluna TR-FAME (30mx0,25mm IDx0,25m), um auto sampler AS 3000 Thermo Electron Corporation e um detetor de ionização de chama, tal como Tecelão *et al.*. (2010). O injetor, a operar em modo *splitless*, e o detetor foram programados para 250°C e 260°C, respetivamente. Foi utilizado hélio como gás de arraste, ao caudal de $1,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ar e hidrogénio foram fornecidos ao detetor, ao caudal de $350\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respetivamente. A temperatura do forno foi regulada para ter um incremento lento, aumentando para 60°C durante 1min, incremento para 150°C a $15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e permanência em patamar durante 1min. Novo aumento até 180°C, a $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, onde permaneceu 3min, um novo incremento de temperatura até aos 220°C, a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e um patamar final nesta temperatura, por 1min.

O tempo de retenção de cada ácido gordo foi identificado por comparação com o tempo de retenção de padrões comerciais [PUFA-1 Marine Souce e PUFA-3 Menhaden oil (Supelco Analytical)], encontrando-se a descrição em anexo (tabela (anexo) III).

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com recurso ao *software* Sigma Plot (versão 12.0), tendo sido utilizados os testes *One-way anova*, *One-way anova on ranks* e *t-student*. Para cada uma das microalgas em estudo, e de modo a identificar a relação entre meio cultura, fase de crescimento e o conteúdo em ácidos gordos, foi aplicada uma análise de componentes principais (ACP) tendo por base o perfil de ácidos gordos obtidos para cada meio de cultura em ambas as fases de crescimento.

4. Resultados

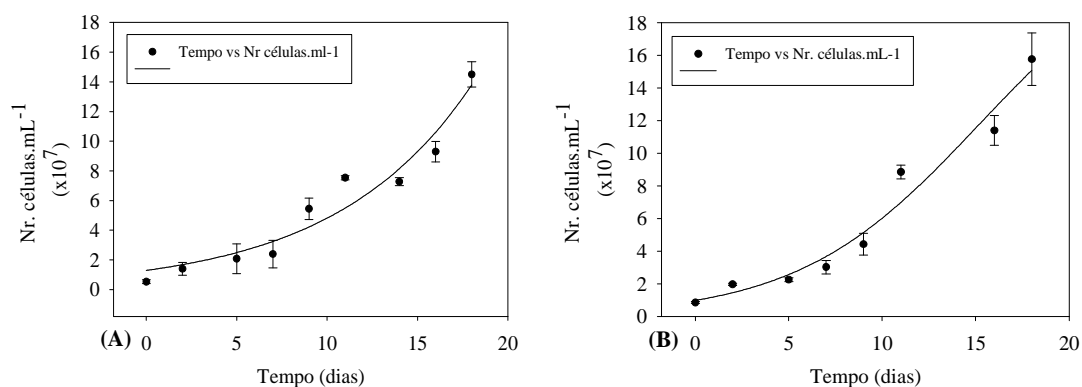
4.1 *Nannochloropsis* sp.

4.1.1 Crescimento

O crescimento das culturas, tal como referido na secção 3.1, foi seguido ao longo do tempo de cultivo através da medição da densidade ótica, número de células.mL⁻¹ e peso seco (figuras 5,6 e 7).

O crescimento nos meios **S** e **SMS** apresentou uma fase lag mais pronunciada do que nos meios **NB** e **NB s/Co**, indicando que a cultura precisou de um período de adaptação superior aos dois primeiros meios. A fase exponencial nos últimos meios foi mais demorada que nos dois primeiros, permitindo atingir maiores concentrações celulares.

Em relação ao número de células.mL⁻¹ ao longo do tempo de cultivo (figura 6) não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$) entre os meios de cultivo. Contudo, tanto o meio **NB** como o meio **NB s/Co** apresentaram o mesmo valor máximo de concentração celular ($15,8 \times 10^7$ células.mL⁻¹), superior aos apresentados pelo meio **S** ($9,02 \times 10^7$ células.mL⁻¹) e pelo meio **SMS** ($6,84 \times 10^7$ células.mL⁻¹).



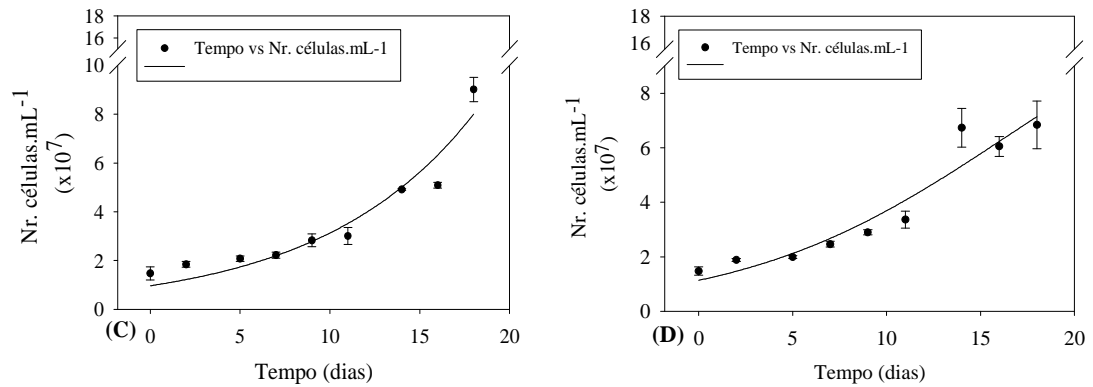
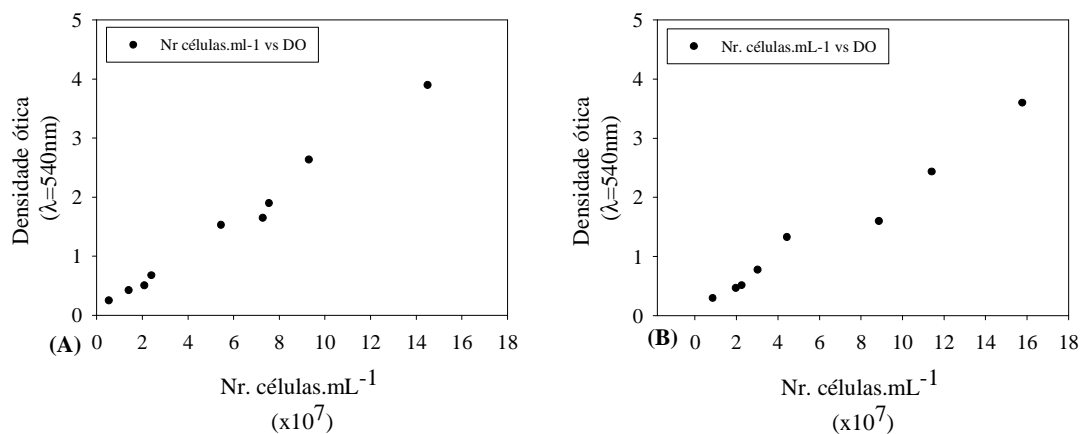


Figura 5- Evolução do número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: **(A)** NB, **(B)** NB s/ Co, **(C)** S e **(D)** SMS. Os valores representam a média dos triplicados dos números obtidos nesses dias.

A figura 6 representa a relação da densidade ótica (D.O.) de *Nannochloropsis* sp. e o número de células por mililitro nos diferentes meios de cultivo. Relativamente à D.O., são estatisticamente semelhantes ($p > 0,050$), apesar de se verificar que os meios **NB** e **NB s/Co** apresentam D.O. superiores a **S** e **SMS** no final do tempo de cultivo (3,9 – 3,6 – 1,4 e 1,2, respetivamente).



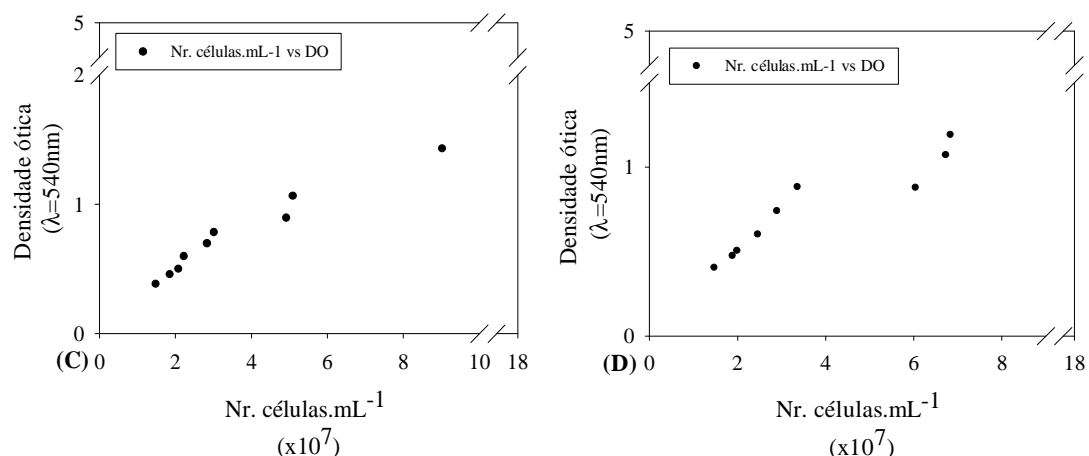


Figura 6 – Curva de calibração de *Nannochloropsis* sp., com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=540\text{nm}$ e do número de células por mililitro, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS.

Através dos gráficos apresentados, foi feita a relação entre o número de células por mililitro e o tempo de cultivo, para determinar o valor da taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td) e R^2 . O valor de R^2 varia entre 0 e 1 sendo que, quanto mais próximo este estiver do valor máximo, mais a equação se ajusta à situação real. Na tabela V encontram-se os dados referentes aos diferentes meios.

Tabela V - Resumo dos dados obtidos no crescimento de *Nannochloropsis* sp.. A taxa específica de crescimento (μ) é expressa em dias⁻¹, o tempo de duplicação (td) em dias.

	μ (dias ⁻¹)	td (dias)	r^2	Equação
NB	0,69	1,00	0,89	$y=0,692x-0,697$
NB s/Co	0,81	0,86	0,91	$y=0,806x-0,783$
S	0,34	2,04	0,77	$y=0,339x+0,515$
SMS	0,33	2,12	0,87	$y=0,328x+0,763$

A taxa específica de crescimento e o td não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$). Contudo, o meio **NB s/Co** apresenta o td mais baixo (0,86 dias), indicando que cada célula demora menos tempo a dividir-se

do que acontece nos outros meios. Quando em meios **NB**, **S** e **SMS**, as células demoram a dividir-se, respetivamente, 1, 2,04 e 2,12 dias.

As equações apresentadas permitem, através da D.O., obter o número de células em qualquer parte do ciclo de crescimento. A equação que mais se adequa à situação real é a de **NB s/Co**, uma vez que apresenta uma relação de 0,91. O meio **NB** e o meio **SMS** apresentam valores de relação próximos – 0,89 e 0,87, respetivamente – sendo o meio **S** o que apresentou um modelo com a relação mais baixa - apenas 0,77.

Relativamente ao peso seco (figura 7), foi possível determinar que existiram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,050$) **NB** e **S**, e **NB** e **SMS**. **NB s/Co** apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,050$) com o meio **S**. A produção de biomassa seca, ao fim dos dezoito dias de cultivo, de **NB** ($1,76 \text{ g.L}^{-1}$) e **NB s/Co** ($1,76 \text{ g.L}^{-1}$) não apresentou diferenças estatisticamente significativas. O meio **SMS**, ao fim de 18 dias de cultivo apresentou $0,93 \text{ g.L}^{-1}$ de peso seco, e por último **S**, com $0,76 \text{ g.L}^{-1}$. As fases de crescimento utilizadas no trabalho foram definidas de acordo com os resultados obtidos na determinação do peso seco.

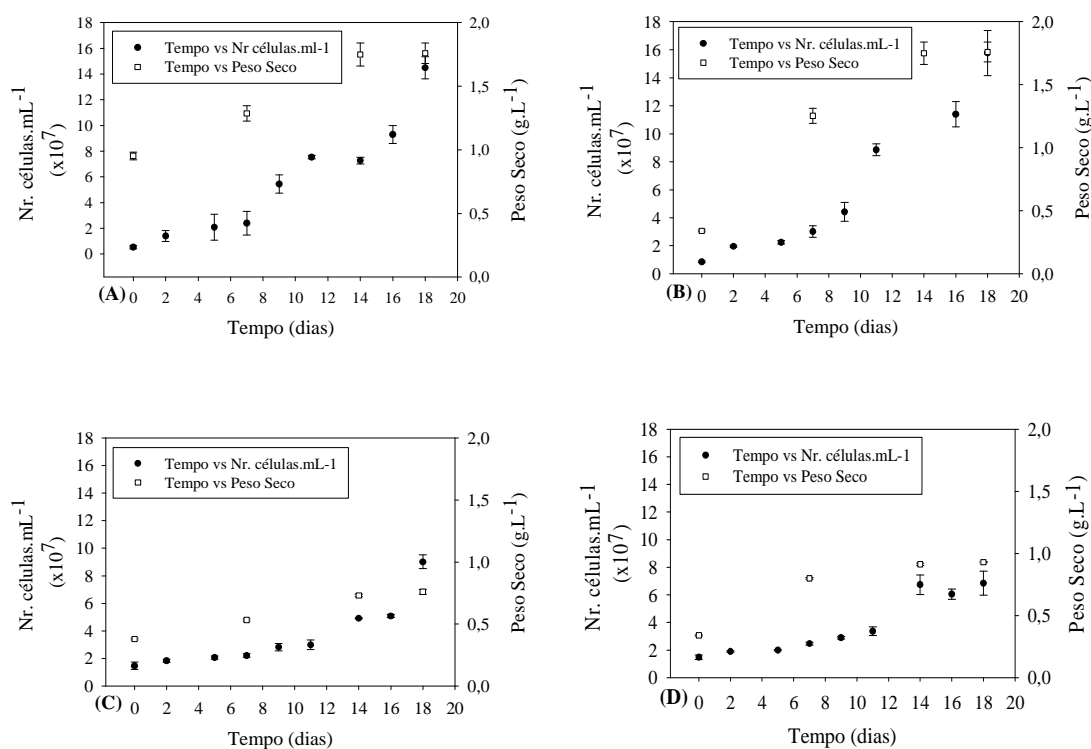


Figura 7 – Crescimento de *Nannochloropsis* sp. avaliado em função da concentração celular (células.mL⁻¹) - ■ - e do peso seco (g.L⁻¹) -□- ao longo do tempo de cultivo, usando

diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS. Os valores representam a média dos triplicados.

4.1.2 Produtividade

No que diz respeito à produtividade (tabela VI) da microalga *Nannochloropsis* sp., o meio **NB s/Co** revelou ser superior aos restantes, produzindo 0,08g de peso seco por litro diariamente. O meio **NB** apresentou a segunda maior produtividade (0,04 g.L⁻¹.dia⁻¹), sendo que **S** e **SMS** apresentaram os valores mais baixos (0,02 e 0,03 g.L⁻¹.dia⁻¹, respetivamente).

Tabela VI – Produtividade obtida no cultivo de *Nannochloropsis* sp. em laboratório. A produtividade volumétrica de biomassa (**P**) é expressa em g.peso seco.L⁻¹.dia⁻¹. Os valores representam a média dos triplicados.

	NB	NB s/Co	S	SMS
Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	0,04 ± 0,008	0,08 ± 0,009	0,02 ± 0,002	0,03 ± 0,006

Existiram diferenças estatisticamente significativas entre o meio **NB s/Co** e **S** ($p < 0,050$).

4.1.3 Perfil bioquímico

4.1.3.1 Proteína bruta

O teor de proteína em *Nannochloropsis* sp. tendeu a diminuir ao longo do tempo de crescimento da cultura. Na fase exponencial o meio **NB s/Co** (34,22%) alcançou o maior teor proteico, enquanto que, na fase estacionária, o meio **NB** (30,7%) revelou o maior conteúdo (figura 8). O meio **SMS** (Exp: 29,86% - Est: 25,64%) apresentou a menor percentagem proteica em ambas as fases de cultivo.

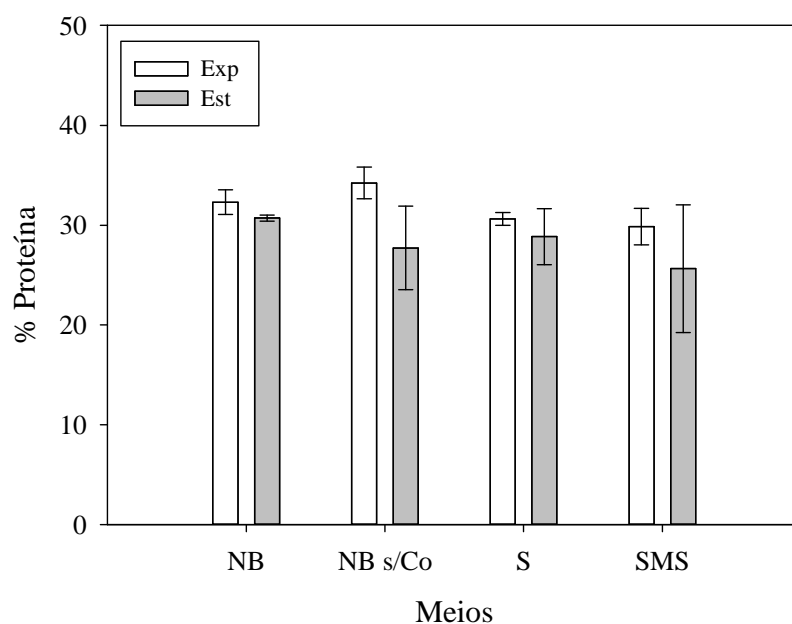


Figura 8 - Percentagem de proteína obtida nos diferentes meios de cultivo de *Nannochloropsis* sp.. A percentagem é relativa a 100mg de peso seco. A barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

Relativamente à diminuição do conteúdo de proteína, o meio **NB** foi o que perdeu menos proteína entre as duas fases de cultivo consideradas, perdendo cerca de 1,6%, estando este valor próximo do que se verificou também em **S** (1,7%). O meio **SMS** perdeu cerca de 4,2%, menos do que o meio **NB s/Co** que perdeu mais proteína que todos os outros meios, atingindo os 6,5%.

Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre meios de cultura e fases de crescimento.

4.1.3.2 Hidratos de carbono

O teor em hidratos de carbono de *Nannochloropsis* sp. tendeu a aumentar ao longo do crescimento. Em ambas as fases de crescimento, o meio com maior percentagem de hidratos de carbono foi **NB** (Exp: 24,46% - Est: 34,48%) (figura 9). O meio **S** (Exp: 12,51% - Est: 32,2%) apresentou o menor teor de hidratos de carbono em ambas as fases.

Apesar de ter sido o que apresentou maior percentagem de hidratos de carbono em cada uma das fases, o meio **NB** foi o que apresentou menor incremento

entre as fases exponencial e estacionária, aumentando apenas 10%. O meio **S** alcançou um incremento de 13,8% e o meio **NB s/Co** de 16,5%. O meio **SMS** apresentou o maior incremento, aumentando 19,6%.

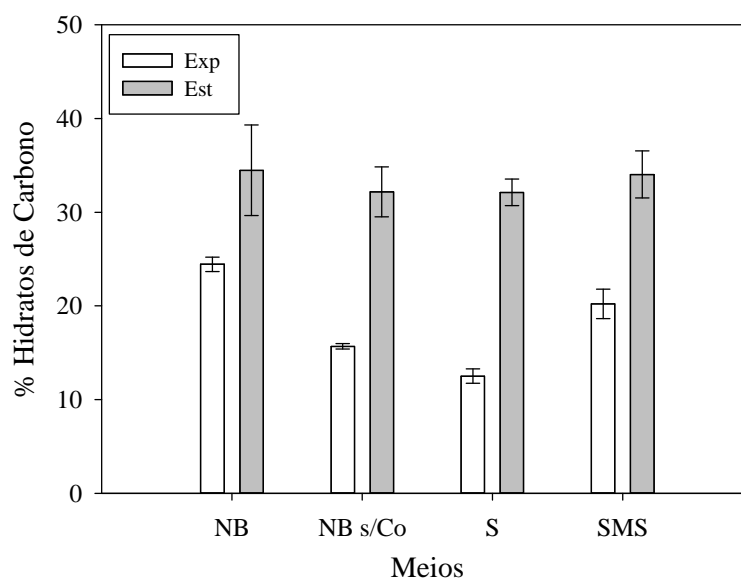


Figura 9 - Percentagem de hidratos de carbono obtida nos diferentes meios de cultivo em *Nannochloropsis* sp.. A percentagem é relativa a 100mg de peso seco. A barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

As culturas nos meios **NB s/Co**, **S** e **SMS** apresentam diferenças estatisticamente significativas entre a fase exponencial e estacionária ($p < 0,050$). Estas, nos meios **NB s/Co** e **S** na fase exponencial, apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,050$) em relação aos outros meios, quando as culturas destes se encontram na fase estacionária.

4.1.3.3 Lípidos totais

Ao longo do tempo de cultivo, o teor lipídico de *Nannochloropsis* sp. aumentou. Na fase exponencial, o meio **SMS** apresentou o maior teor lipídico (24%) e **NB s/Co** apresentou o menor teor lipídico - 9,39% - e, na fase estacionária, **S** apresentou o maior conteúdo lipídico (28%) e **NB** a menor percentagem 22,9% (figura 10).

O meio **S** teve o maior incremento entre fases, cerca de 16,3%, seguido do meio **NB s/Co**, 14,6%. Os meios **NB** e **SMS** tiveram os incrementos mais baixos, apresentando 6,8% e 1,1%, respectivamente.

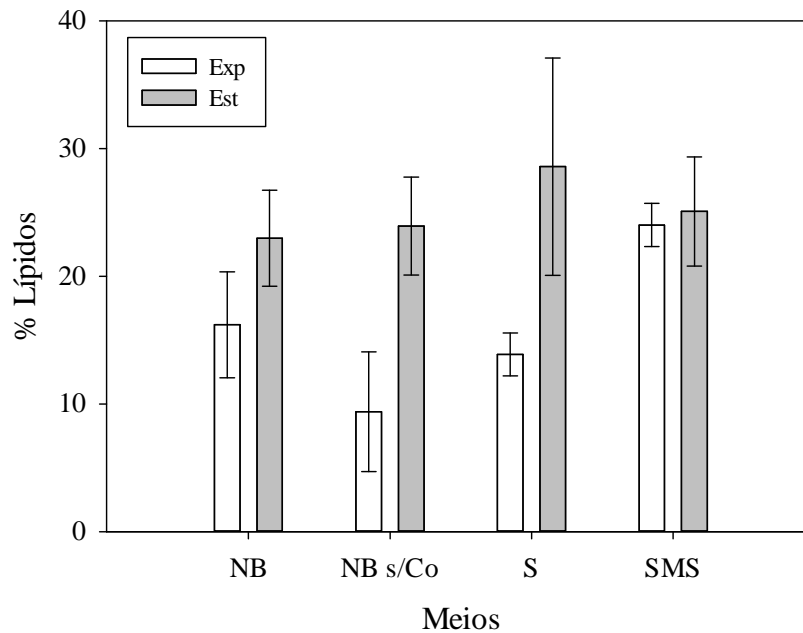


Figura 8 - Percentagem de lípidos totais obtida nos diferentes meios de cultivo em *Nannochloropsis* sp.. A percentagem é relativa a 100mg de peso seco. A barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

Os meios não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$). Apesar disso, os testes estatísticos não são robustos o suficiente para detetar diferenças, fazendo com que os resultados devam ser interpretados cuidadosamente. No entanto, e através da análise da figura 11, verificou-se que existem grandes intervalos entre fases nos meios **NB s/Co** e **S**, sendo passível de existirem diferenças não detetadas nos testes.

4.1.3.4 Perfil de ácidos gordos

Na análise do perfil em ácidos gordos obtiveram-se cromatogramas semelhantes ao da figura 11.

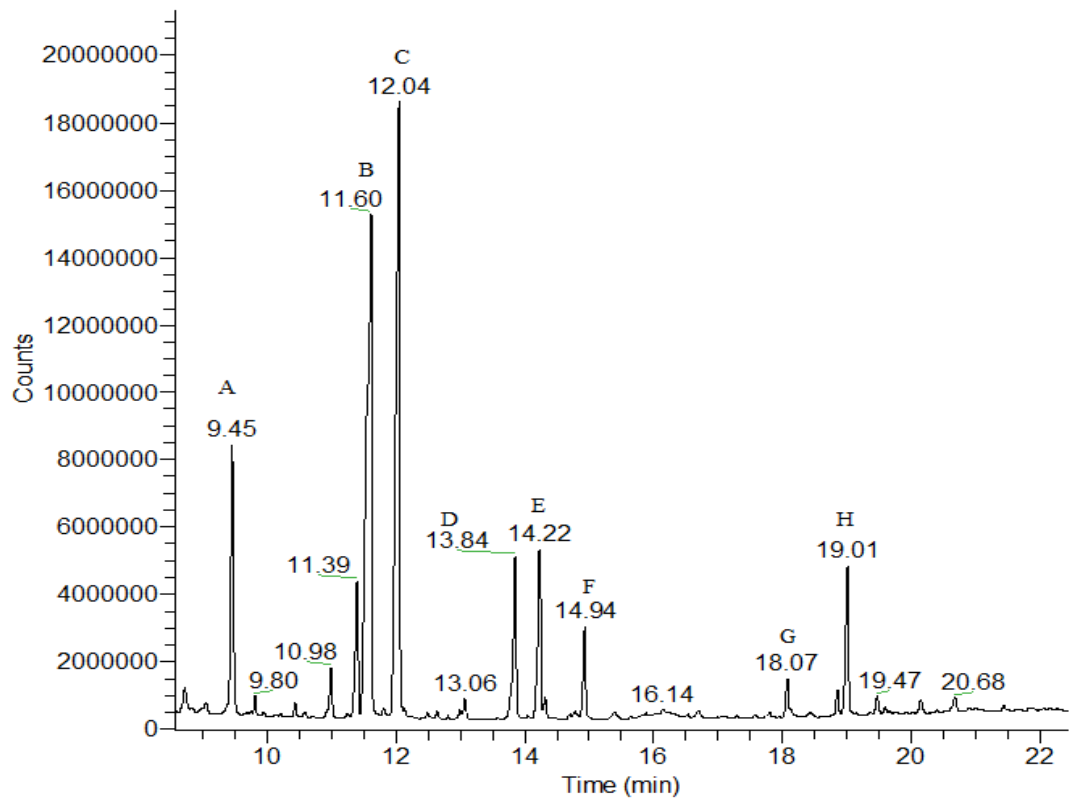


Figura 9 - Cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos na análise dos ácidos gordos de *Nannochloropsis* sp.. As letras identificam os ácidos gordos mais significativos, onde **A** é ácido mirístico (C14:0), **B** ácido palmítico (C16:0), **C** ácido palmitoleico (C16:1 n7), **D** ácido esteárico (C18:0), **E** ácido oleico (C18:1 n9), **F** ácido linoleico (C18:2 n6), **G** ácido araquidónico (C20:4 n6) [AA] e **H** ácido eicosapentaenóico (C20:5 n3) [EPA].

Nannochloropsis sp., ao nível dos ácidos gordos não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$), quer entre meios, quer entre fases. Apesar disso, os resultados devem ser interpretados cuidadosamente (tabela VII).

Tabela VII - Perfil de ácidos gordos obtidos na análise de *Nannochloropsis* sp.. O valor obtido encontra-se em percentagem de peso seco, com o respetivo valor de erro-padrão. **Exp** refere-se à fase exponencial, enquanto que **Est** à fase estacionária. Por **NB** entende-se NutriBloom, **NB s/Co** NutriBloom sem Cobalto, **S** Simplex e **SMS**. Sea Mineral Solution.

	NB		NB s/Co		S		SMS	
	Exp.	Est.	Exp.	Est.	Exp.	Est.	Exp.	Est.
C14:0	1,41±0,3	2,53±1,4	2,19±0,3	2,28±0,2	0,20±0,1	1,82±0,3	0,97±0,2	3,01±0,9
C16:0	6,04±1,2	11,25±5,6	10,6±1,9	11,34±1,9	1,69±0,4	10,18±0,2	5,01±0,6	13,36±3,9
C16:1n7	4,90±0,9	10,30±4,9	7,40±1,3	8,30±0,6	1±0,14	---	3,80±0,54	9,90±3,2
C16:2n4	---	---	---	---	---	---	---	0,40±0,2
C18:0	0,80±0,1	---	2,50±0,8	3,40±0,9	0,60±0,2	1,30±0,2	1,00±0,2	1,20±0,3
C18:1n7	---	---	3,05±0,7	---	---	---	---	---
C18:1n9	1,30±0,2	---	---	---	0,60±0,1	3,40±0,4	1,90±0,1	4,20±0,9
C18:2n6	0,50±0,1	1,11±0,5	0,40±0,2	1,80±0,8	0,20±0,1	0,93±0,2	0,40±0,1	1,00±0,2
C20:4n6	0,30±0,1	0,61±0,3	0,40±0,1	0,20±0,1	0,04±0,004	0,30±0,06	0,10±0,05	0,20±0,11
C20:4n3	---	---	---	---	---	1,50±0,2	---	1,30±0,5
C20:5n3	1,00±0,2	2,80±1,7	1,40±1,4	1,10±0,5	0,20±0,012	---	0,50±0,008	---
Σn3	1,00±0,2	2,80±1,7	1,40±1,4	1,10±0,5	0,20±0,01	1,50±0,15	0,60±0,09	1,30±0,46
Σn6	0,81±0,14	1,70±0,72	0,80±0,2	2,06±0,9	0,22±0,04	1,20±0,2	0,50±0,05	1,20±0,32
%PUFA	49,46	51,66	45,14	40,28	45,46	31,70	49,56	49,35

O somatório de n-3, na fase exponencial indica valores superiores no meio **NB s/Co** (1,4%), seguido do meio **NB** (1%), **SMS** (0,6%) e, por último **S** (0,2%). Essa tendência não se verifica na fase estacionária, onde **NB** (2,8%) traduz resultados superiores, seguido de **S** (1,5%), **SMS** (1,3%) e **NB s/Co** (1,1%).

O somatório de n-6 apresentou resultados distintos do anterior, sendo que, na fase exponencial, **NB** (0,81%) revelou resultados superiores, seguido de **NB s/Co** (0,8%), **SMS** (0,5%) e **S** (0,22%). Na fase estacionária, **NB s/Co** (2,06%) proporcionou dados mais elevados, seguido de **NB** (1,7%), **S** (1,2%) e, por fim **SMS** (1,2%).

Foi também calculado o teor de PUFA's nos lípidos totais, sendo possível concluir que, na fase exponencial, **SMS** apresenta o maior conteúdo (49,56%), sucedido por **NB** (49,46%), **S** (45,46%) e, por último **NBs/Co** (45,14%). Na fase estacionária, **NB** (51,66%) assume-se como sendo o meio com mais PUFA's, seguido por **SMS** (49,35%), **NBs/Co** (40,28%) e **S** (31,70%).

A aplicação da análise de componentes principais – ACP (Figura 12), permitiu detetar associações entre os níveis de ácidos gordos, o meio de cultura e diferenciar a fase de crescimento em que foram recolhidas as amostras. Os dois primeiros eixos explicaram 65.8% da variação total (38.2% CP1 e 27.6% CP2). Assim, e para a microalga *Nannochloropsis* sp., a representação dos scores no diagrama de ordenação (Figura 13) demonstrou a existência de níveis mais elevados de C18:2 n6 na fase exponencial para os meios de cultura de **NB**, **SMS** e **S**. Por seu lado, a fase estacionária de **S** e **SMS** demonstrou ser caracterizada por níveis mais elevados de C18:1 n9, C20:4 n3 e C16:2 n4. Para o meio de cultura **NB s/ Co**, a fase exponencial e estacionária foram caracterizadas pela presença de C20:5 n3 e C20:4 n6, respetivamente.

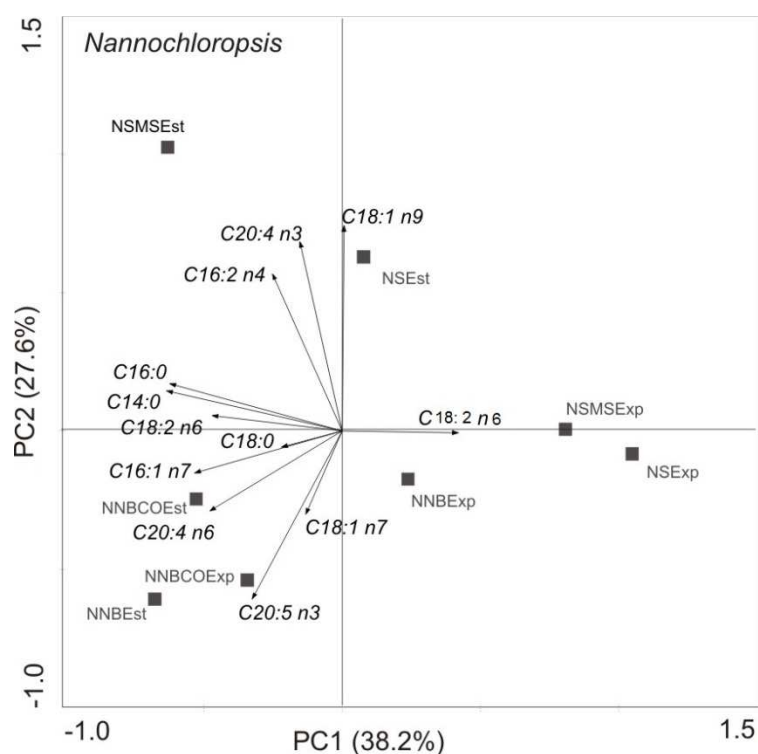


Figura 10 - Ordenação ACP dos meios de cultura e fase de crescimento em função do perfil de ácidos gordos em *Nannochloropsis* sp., representando os dois primeiros eixos 65.8% da variação total (38.2% PC1 e 27.6% PC2), onde **NNB** se refere a NutriBloom, **NNBCO** a NutriBloom sem Cobalto, **NS** a Simplex e **NSMS** a Sea Mineral Solution. **Exp** e **Est** correspondem às fases de crescimento exponencial e estacionária, respetivamente.

4.2 *Tetraselmis* sp.

4.2.2 Crescimento

Tal como aconteceu para a microalga anterior, também o crescimento de *Tetraselmis* sp. foi acompanhado ao longo do tempo de cultivo através da densidade ótica, número de células e peso seco (figuras 13, 14 e 15). A fase lag foi mais pronunciada no meio **SMS** que nos restantes meios considerados, no entanto, foi também o meio que apresentou maior fase exponencial. O meio **S** foi o meio com simultaneamente menor fase de adaptação (lag) e menor fase exponencial.

Relativamente ao número de células (figura 13), o meio **SMS** apresentou valores superiores em ambas as fases, atingindo $4,2 \times 10^7$ células.mL⁻¹ na fase exponencial e $5,8 \times 10^7$ células.mL⁻¹ na fase estacionária, tendo incrementado 1,58% entre fases. O meio **NB** apresentou resultados intermédios, atingindo $3,65 \times 10^7$

células.mL⁻¹ na fase exponencial e 4,22 x10⁷ células.mL⁻¹ na fase estacionária. Esse aumento traduziu-se num incremento de 0,57%. O meio **S** atingiu os resultados mais baixos dos três considerados, tendo 3,45x10⁷ células.mL⁻¹ na fase exponencial e 3,48x10⁷ células.mL⁻¹ na fase estacionária, representando uma variação de 0,03%. Apesar de diferentes, o número de células não apresentou diferenças estatisticamente significativas (p>0,050).

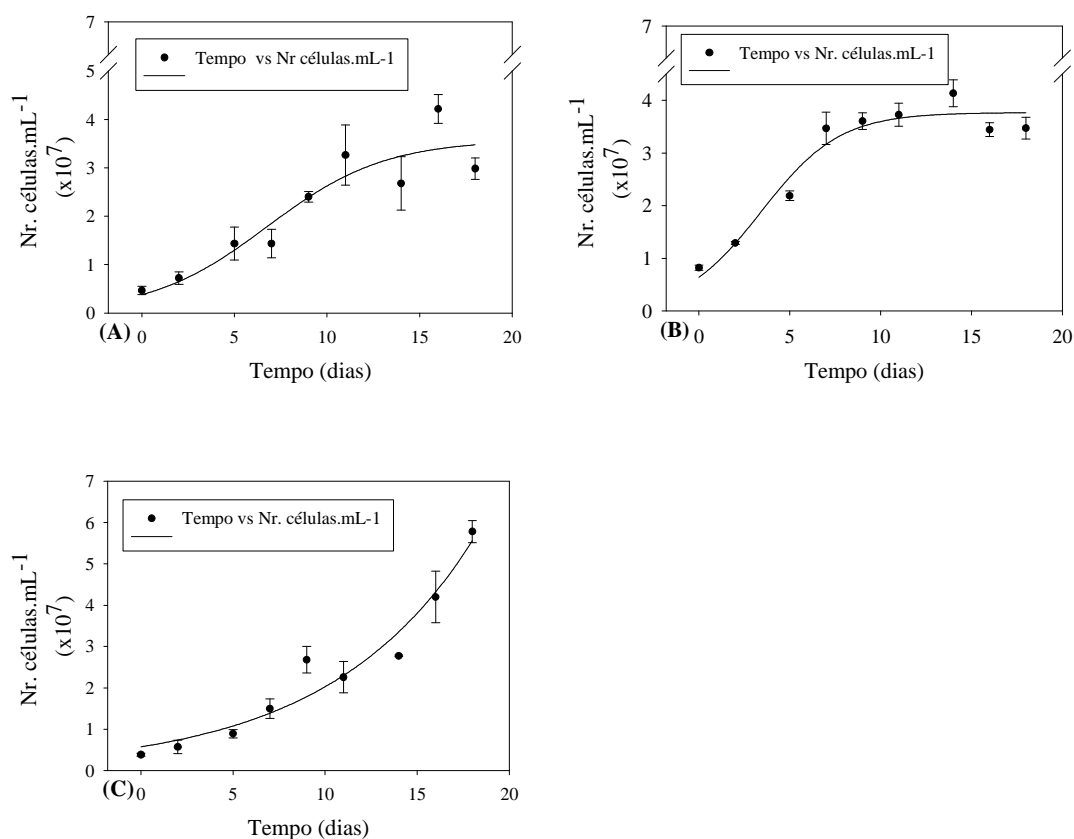


Figura 11 – Evolução do número de células por mililitro ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) NB s/ Co, (C) S e (D) SMS. Os valores representam a média dos triplicados dos números obtidos nesses dias.

A densidade ótica ao longo do tempo (figura 15) não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os meios (p>0,050). No dia 16, o meio **SMS** apresentava uma absorvância de 1,135, **NB** 0,82 e **S** 0,504. No dia 18, **SMS** continuava a apresentar ainda a maior absorvância de entre os três meios considerados, atingindo ao 0,96. O meio **S** foi o meio com menor absorvância, atingindo apenas 0,623.

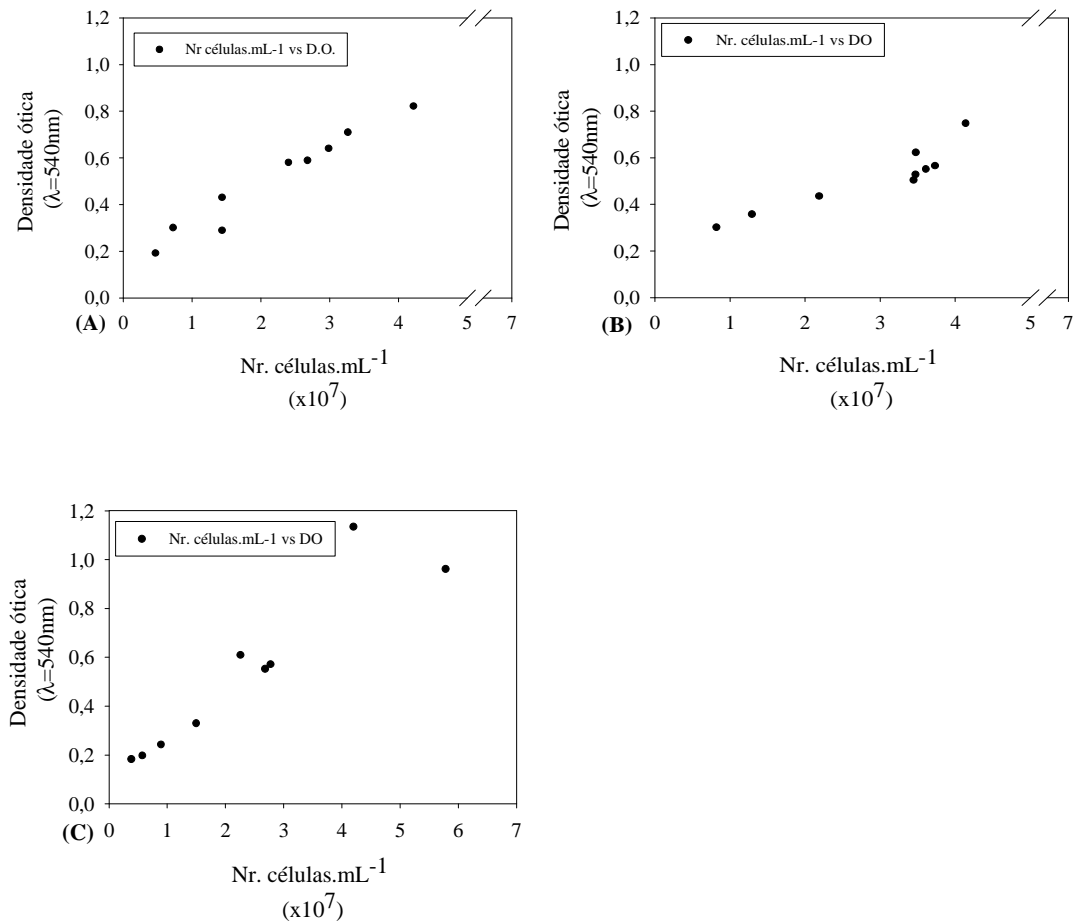


Figura 12 – Curva de calibração de *Tetraselmis* sp., com base na evolução da densidade ótica a $\lambda=540\text{nm}$ e do número de células por mililitro, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) S e (C) SMS

Através da análise dos dados representados nos gráficos, foi feita a relação entre a D.O. e o número de células, determinando-se o valor da taxa específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (t_d) e R^2 . Na tabela IX encontram-se os dados referentes aos diferentes meios.

Tabela VIII - Resumo dos dados obtidos no crescimento de *Tetraselmis* sp.. A taxa específica de crescimento (μ) está em dias⁻¹, o tempo de duplicação (**td**) em dias.

	μ (dias ⁻¹)	td (dias)	R ²	Equação
NB	0,18	3,81	0,82	y=0,182x+0,518
S	0,27	2,57	0,98	y=0,270x+0,818
SMS	0,27	2,56	0,88	y=0,271x-0,125

A taxa específica de crescimento de *Tetraselmis* sp. nos diferentes meios foi próxima, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$). O meio **S** e **SMS** apresentaram μ igual (0,27 dias⁻¹). No entanto, a fase exponencial do meio **S** foi menos longa que a do meio **SMS**, fazendo com que, a nível do número de células (figura 15), o meio **S** não conseguisse atingir densidades tão elevadas como as verificadas no meio **SMS**. Tal como μ , também o tempo de duplicação foi semelhante entre o meio **S** e **SMS** ($\approx 2,6$ dias). O meio **NB** apresentou o maior tempo de duplicação (3,81 dias) de entre os três considerados. O tempo de duplicação também não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$). As equações apresentadas permitem, através da D.O., calcular o número de células em qualquer parte do ciclo de crescimento. A equação mais adequada à situação real é a do meio **S**, apresentando um R² de 0,98. O meio **SMS** apresenta um R² de 0,88 e **NB** 0,82, sendo este último o que menos se adequa ao modelo real.

O peso seco (figura 15), tal como os outros parâmetros de crescimento, não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$). O meio **SMS**, após 18 dias de cultivo, produziu 2,22 g.L⁻¹, tendo sido o com resultados mais elevados. Para o mesmo período de tempo, o meio **NB** produziu 1,427 g.L⁻¹ e o meio **S** 1,24 g.L⁻¹.

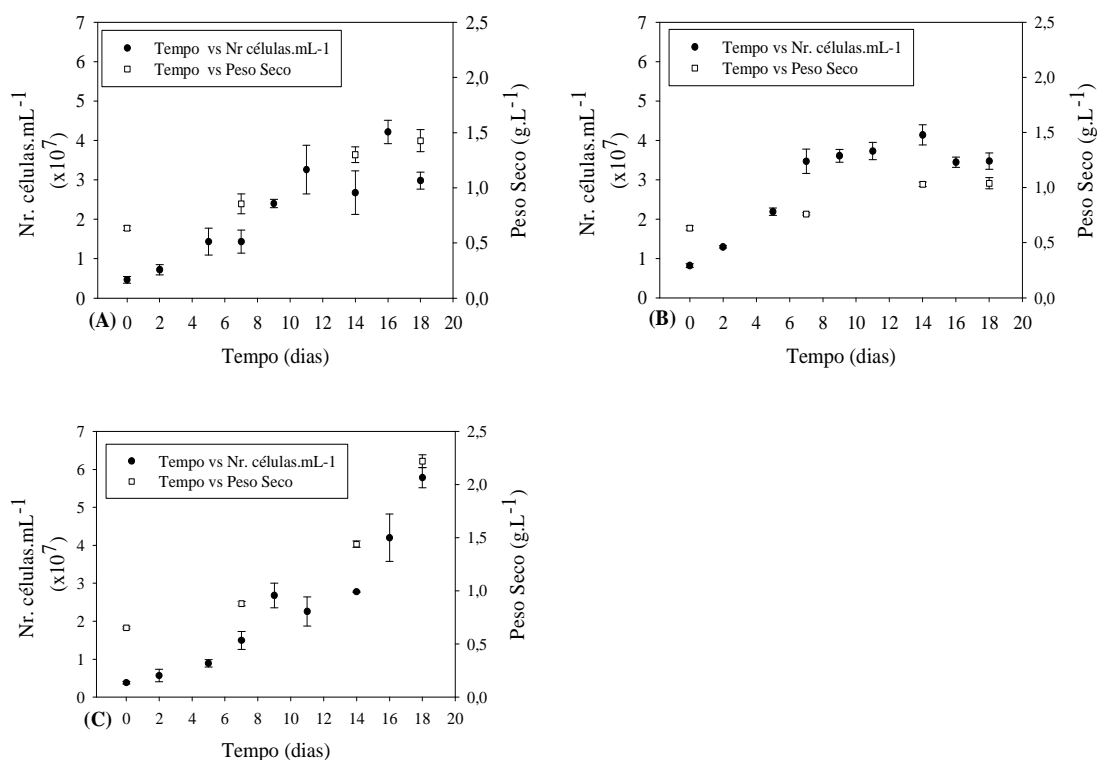


Figura 13 - Crescimento de *Tetraselmis* sp. avaliado em função da concentração celular (células.mL⁻¹) - ■ - e do peso seco (g.L⁻¹) -□- ao longo do tempo de cultivo, usando diferentes meios de cultivo: (A) NB, (B) S e (C) SMS. Os valores representam a média dos triplicados.

4.2.3 Produtividade

Relativamente à produtividade (tabela X) da microalga *Tetraselmis* sp., o meio **SMS** revelou ser superior aos outros, produzindo diariamente 0,08g de peso seco por litro. O meio **NB** apresentou a segunda maior produtividade (0,04 g.L⁻¹.dia⁻¹), sendo que **S** apresentou o valor mais baixo (0,03 g.L⁻¹.dia⁻¹), tal como se vinha a verificar nos resultados anteriores.

Tabela IX - Produtividade obtida no cultivo de *Tetraselmis* sp. em laboratório. A produtividade volumétrica de biomassa (**P**) é dada em g.peso seco.L⁻¹.dia⁻¹. Os valores representam a média dos triplicados.

	NB	S	SMS
Produtividade (g.L⁻¹.dia⁻¹)	0,04±0,002	0,03±0,001	0,08±0,003

Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os meios ($p>0,050$), apesar SMS e S terem valores distintos.

4.2.4 Perfil bioquímico

4.2.4.1 Proteína bruta

Ao longo do tempo de cultivo, o teor de proteína de *Tetraselmis* sp. tendeu a diminuir (figura 16). Na fase exponencial, o meio **NB** (26,6%) apresentou o menor teor proteico, ao passo que o meio **S** apresentou maior conteúdo (28,6%). Já na fase estacionária, o meio **NB** passou a ser o com maior teor proteico (26,3%), tendo o meio **SMS** exibido menores percentagens (13,01%).

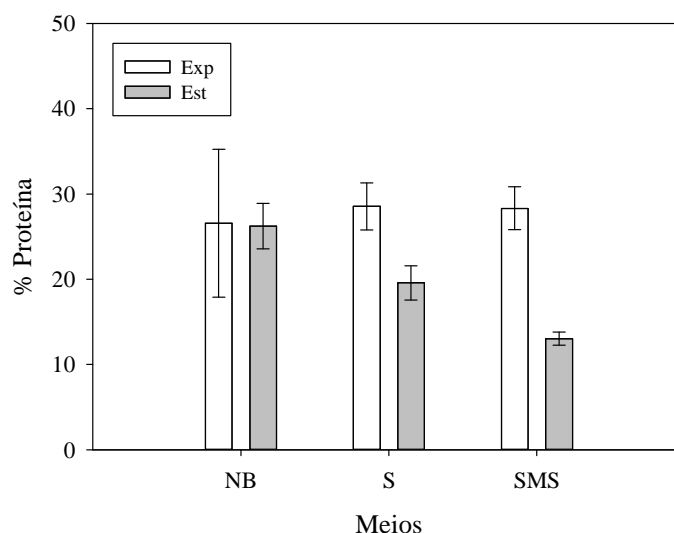


Figura 14 - Percentagem de proteína obtida nos diferentes meios de cultivo em *Tetraselmis* sp.. A percentagem é em relação a 100mg de peso seco, a barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

O meio **SMS** perdeu maior conteúdo proteico entre fases, diminuindo 15,3%. O meio **S** reduziu em cerca de 8% o seu conteúdo proteico e, o meio **NB** apresentou a menor diminuição, decrescendo apenas 0,33%.

Os meios não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,050$), nem mesmo entre fases de crescimento, tornando-os equivalentes.

4.2.4.2 Hidratos de carbono

Ao longo do tempo de cultivo considerado, a percentagem de hidratos de carbono incrementou em todos os meios considerados (figura 17). Na fase exponencial, o meio **NB** apresentou maior teor de hidratos de carbono (24,4%) e o meio **S** a menor percentagem (17,6%). O meio **SMS** apresentou valores intermédios em relação aos restantes considerados, atingindo os 21,6%. Na fase estacionária, o meio **NB** continuou a ser o meio com maior conteúdo de hidratos de carbono (24,5%), o meio **SMS** com valores intermédios (22,1%) e o meio **S** o com o menor teor de hidratos de carbono (21,9%).

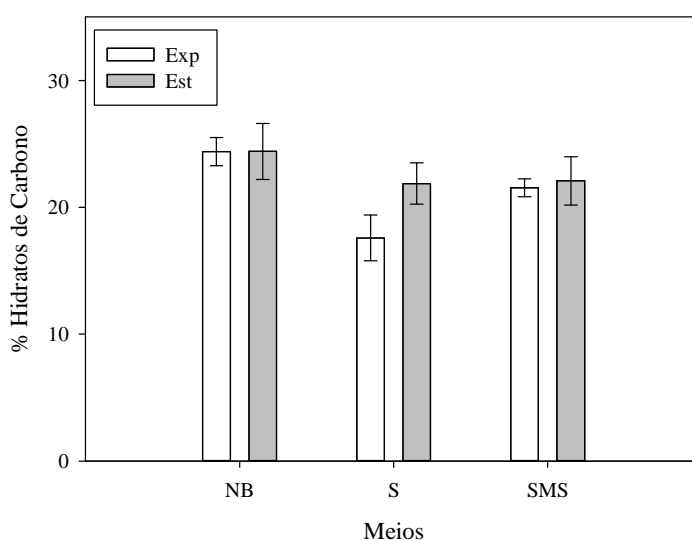


Figura 15 - Percentagem de hidratos de carbono obtida nos diferentes meios de cultivo em *Tetraselmis* sp. A percentagem é calculada em relação a 100mg de peso seco, a barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

Apesar do meio **NB** ser o que apresenta maior teor de hidratos de carbono em ambas as fases, demonstrou pouca variação entre estas (0,016%). O meio **S**, aquele que se evidenciou em ambas as fases como o meio com menos conteúdo de hidratos de carbono, apresentou o maior incremento da fase exponencial para a fase estacionária (4,3%). O meio **SMS** variou apenas 0,54% entre as duas fases de crescimento consideradas.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$) entre os meios ou fases de cultivo.

4.2.4.3 Lípidos totais

O teor lipídico de *Tetraselmis* sp., ao longo do tempo de cultivo, tendeu a aumentar entre fases de crescimento (figura 18). Na fase exponencial, o meio **S** apresentou maior conteúdo lipídico (18,89%), ficando o meio **SMS** muito próximo desse valor (18,85%). O meio **NB** atingiu apenas os 12,48%, sendo o meio com menor teor lipídico na fase exponencial. Já na fase estacionária, o conteúdo lipídico de **NB** aumentou e este passou a ser o meio com maior percentagem lipídica dos três considerados (26,21%), seguido pelo meio **SMS**, que apresentou 25,21%. O meio **S** passou, assim, a ser o meio com menor percentagem lipídica, atingindo apenas 21,41%.

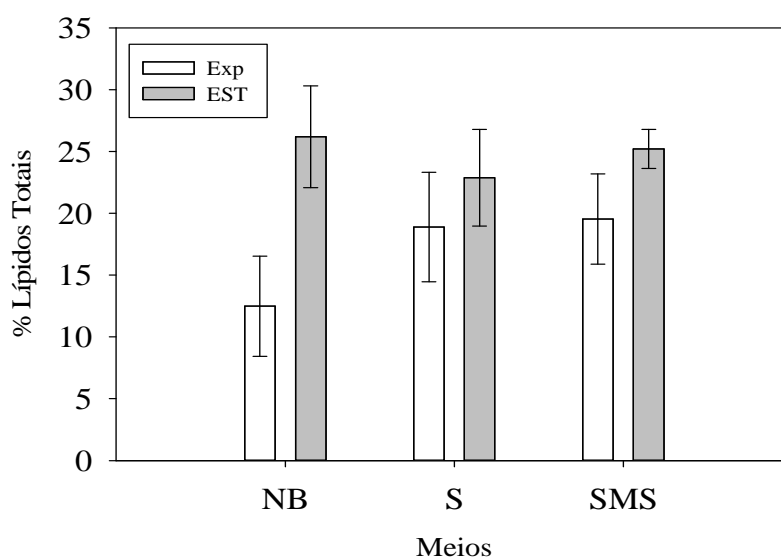


Figura 18 - Percentagem de lípidos totais obtida nos diferentes meios de cultivo em *Tetraselmis* sp.. A percentagem é em relação a 100mg de peso seco, a barra branca representa a fase exponencial de cada um dos meios e a barra cinzenta a fase estacionária. A percentagem é representada com o seu erro-padrão associado.

O meio NB apresentou o maior incremento entre fases (13,73%), enquanto o meio S revelou menor variação (2,5%). O meio SMS variou 6,4%.

Estatisticamente, os meios são semelhantes, uma vez que não existiram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,050$).

4.2.4.4 Perfil de ácidos gordos

A separação de ácidos gordos obteve cromatogramas semelhantes ao da figura 19. Os picos foram identificados por comparação com os padrões corridos anteriormente.

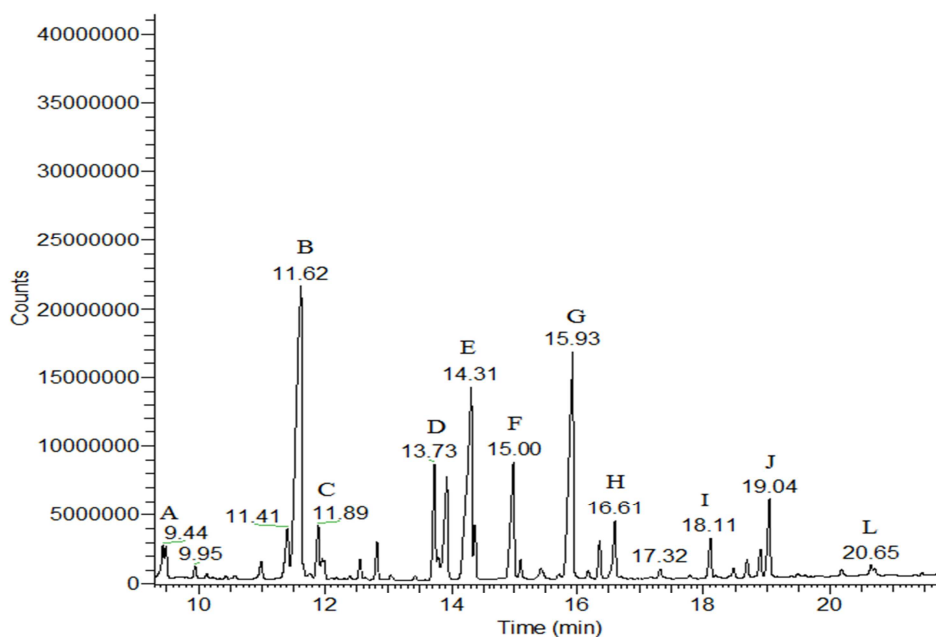


Figura 19 - Cromatograma ilustrativo dos resultados obtidos na análise dos ácidos gordos *Tetraselmis* sp.. Os números identificam os ácidos gordos mais significativos, onde **A** é ácido mirístico (C14:0), **B** ácido palmítico (C16:0), **C** Ácido palmitoleico (C16:1n7), **D** ácido esteárico (C18:0), **E** ácido vacénico (C18:1 n7), **F** ácido octadecatrienóico (C18:3 n4) **G** ácido linoleico (C18:2 n6), **H** ácido estearidónico (C18:4 n3), **I** ácido eicosenoico (C20:1 n9), **J** ácido aracidónico (C20:4 n6) e **L** ácido eicosoentaenóico (C20:5 n3)

Em *Tetraselmis* sp., apenas a produção de C18:0 apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,050$), nomeadamente entre os meios **S** (2,52%) e **SMS** (6,74%). Os valores dos diferentes ácidos gordos obtidos nos meios considerados estão patentes na tabela XI.

Tabela X - Perfil de ácidos gordos obtidos na análise de *Tetraselmis* sp.. O valor obtido encontra-se em percentagem de peso seco, com o respetivo valor de erro-padrão. **Exp** refere-se à fase exponencial, enquanto **Est** à fase estacionária. Por **NB** entende-se NutriBloom, **S** Simplex e **SMS**. Sea Mineral Solution.

	NB		S		SMS	
	Exp	Est	Exp	Est	Exp	Est
C14:0	0,58±0,3	0,90±0,1	0,37±0,1	1,53±0,3	0,42±0,1	0,73±0,2
C16:0	5,51±1,9	6,70±2,1	4,59±0,9	12,4±2,5	4,69±1,5	6,10±1,5
C16:2n4	--	--	--	--	0,19±0,1	---
C16:3n4	--	--	--	--	---	2,79±0,8
C18:0	1,98±0,8	4,38±0,5	2,61±0,5	6,74±0,9	2,09±0,5	2,52±1,3
C18:1n7	--	---	---	7,50±1,2	---	---
C18:2n6	0,83±0,3	2,82±0,6	1,04±0,2	3,62±0,9	1,49±0,3	1,94±0,7
C18:3n3	---	---	1,79±0,3	---	---	2,37±0,9
C18:4n3	0,47±0,3	4,06±1,4	---	4,82±1,1	3,06±0,8	---
C20:1n9	---	---	0,71±0,2	1,27±0,5	0,48±0,2	0,42±0,2
C20:4n6	---	---	0,36±0,06	1,16±0,3	0,31 ± 0,1	---
C20:4n3	---	---	0,92±0,3	---	---	0,73±0,3
C20:5n3	0,28±0,1	0,80 ± 0,2	---	---	0,62±0,2	---
Σ n3	0,75 ± 0,2	4,86±1,6	2,70±0,5	4,82±1,1	3,68±0,9	3,51 ± 1,3
Σ n6	0,83±0,3	2,82±0,6	1,40±0,2	4,68±1,1	1,80±0,4	1,94±0,7
%PUFA	16,36	44,59	38,91	47,03	46,06	46,85

Na fase exponencial, o meio **SMS** revelou valores superiores de $\Sigma n-3$, apresentando, no total, 3,68 % do peso seco. O meio **S** apresentou o segundo maior teor de $\Sigma n-3$ (2,7%), enquanto **NB** apresentou o valor mais reduzido (0,75%). Já na fase estacionária, **NB** aumentou o teor de $\Sigma n-3$, passando a ser o meio com maior conteúdo de entre os três considerados (4,86%). O meio **S** aumentou também a produção, atingindo 4,8%. No meio **SMS**, registou-se uma ligeira perda, atingindo os 3,51%. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,050$) entre **NB** e **S** na fase exponencial.

Para o somatório de n-6 na fase exponencial, **SMS** revelou novamente valores superiores aos outros meios considerados (1,8%). O meio **S** atingiu 1,4% de $\Sigma n-6$ e **NB** 0,83%. Na fase estacionária, o meio **S** revelou-se o com maior teor de $\Sigma n-6$, atingindo os 4,68%, enquanto **NB** exibiu 2,82%. O meio **SMS** aumentou pouco a sua produção de n-6, atingindo apenas 1,94%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os meios ($p > 0,050$).

A %PUFA's presente foi também calculada para cada uma das fases, sendo que, na fase exponencial, o meio **SMS** revelou a maior percentagem, atingindo os 46,06%. O meio **S** apresentou 38,9%, enquanto o meio **NB** apenas apresentou 16,4%. Já na fase estacionária, o meio **S** atingiu os 47,03%, tornando-se o meio com maior teor de PUFA's. O meio **SMS** incrementou pouco, revelando 46,85% e o meio **NB** registou um grande aumento, atingindo os 44,6%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os meios ($p > 0,050$).

Na figura 20 encontra-se representada a ordenação ACP da variação do conteúdo em ácidos gordos para os diferentes meios de cultura e fases de crescimento testados para *Tetraselmis* sp.. Os dois primeiros eixos explicaram 76.7% da variação total (47.9% PC1 e 28.8% PC2).

Em termos globais, verificou-se a predominância de ácidos gordos polinsaturados na fase exponencial de crescimento de *Tetraselmis* sp.. Ao longo do eixo 1 (CP1), é possível diferenciar o conteúdo em ácidos gordos para o meio **S** na fase estacionária (C18:1 n:7, C16:0, C18:0, C14:0 e C18:2 n6) e fase exponencial (C18:3 n3, C20:4 n3 e C16:3 n4). CP1 distinguiu igualmente as fases de crescimento

para o meio **NB**: fase estacionária associada a níveis elevados de C18:4 n3 e fase exponencial a C16:2 n4. eixo 2 (CP2), permitiu distinguir a resposta de *Tetraselmis* sp. ao meio **SMS** nas duas fases de crescimento analisadas. Na fase estacionária, tendem a predominar ácidos gordos como C20:5n e C16:2 n4, enquanto que na fase exponencial surgem conteúdos mais elevados de C18:3 n3, C20:4 n3 e C16:3 n4.

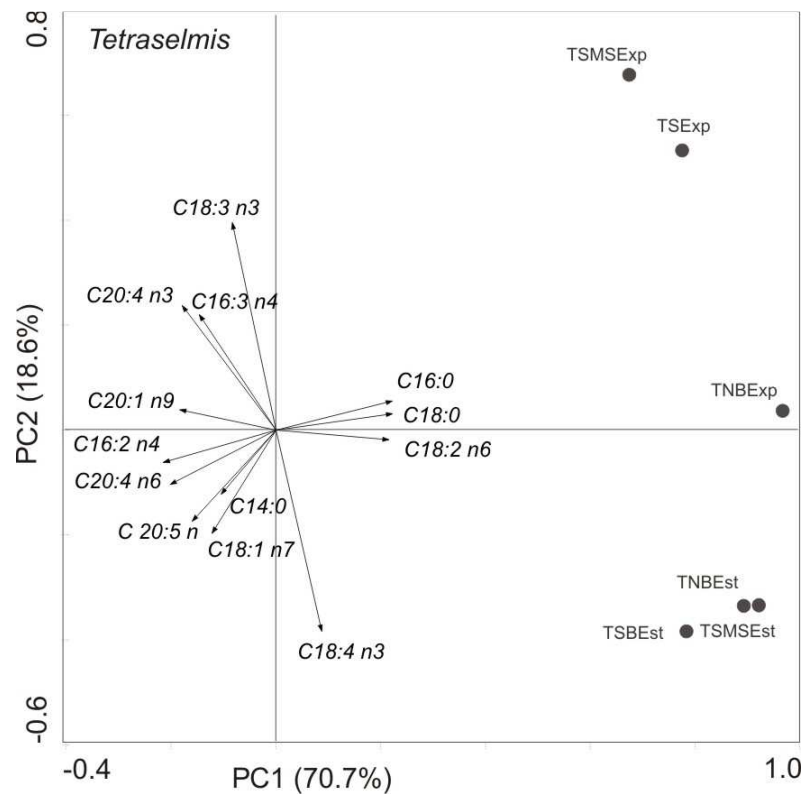


Figura 16 - Ordenação ACP dos meios de cultura e fase de crescimento em função do perfil de ácidos gordos em *Tetraselmis* sp., representando os dois primeiros eixos 95,3% da variação total (70,7% PC1 e 18,6% PC2), onde **TNB** se refere a NutriBloom, **TS** a Simplex e **TSMS** a Sea Mineral Solution. **Exp** e **Est** correspondem às fases de crescimento exponencial e estacionária, respetivamente.

5. Discussão

5.1 Crescimento e produtividade

Os meios de referência para o cultivo de microalgas, o meio F/2 e o meio de Conway, apresentam menor concentração de macronutrientes do que os meios utilizados neste trabalho. No que respeita aos micronutrientes, apresentam ambos menor concentração desses compostos do que os meios SMS, NB s/Co e NB. O meio F/2 é menos enriquecido que o meio de Conway, e ambos menos enriquecidos do que os meios SMS, NB e NB s/Co. O meio S, quando comparado com os de referência, possui menor concentração de micronutrientes. Relativamente à concentração de ferro disponível, importante para o correto desenvolvimento de ambas as culturas - por interferir em processos biológicos como a produção de clorofila (Carvalho *et al.*, 2006) -, verificou-se ser inferior nos meios de referência comparativamente a SMS, NB s/Co e NB e ausente no meio S.

O meio de cultivo F/2 é um dos mais comuns para o cultivo de *Nannochloropsis* sp.. Apesar disso, o valor da densidade celular obtida nesse meio, que varia entre $1,34 \times 10^7$ (Silva 2011) e $5,50 \times 10^7$ (Rocha *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2012), é inferior a qualquer uma das densidades obtidas com os meios em estudo, uma vez que em NB e NB s/Co se atingiu $15,7 \times 10^7$ células.mL⁻¹, em S $9,00 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e em SMS $6,80 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Banerjee *et al.*, (2011), quando utilizou o meio Conway para o cultivo desta microalga obteve também densidades celulares inferiores (5×10^6 células.mL⁻¹) às atingidas nos meios utilizados.

De entre os meios estudados, verificou-se que NB e NB s/Co permitem densidades celulares semelhantes, ao passo que S e SMS promovem valores inferiores. Esse aspeto prende-se com a diferença na composição dos micronutrientes. Os resultados sugerem que *Nannochloropsis* sp. tem consideráveis requisitos a nível dos micronutrientes, apresentando melhores resultados quando o meio tem uma elevada disponibilidade dos mesmos. O meio SMS, apesar de ter maior concentração de micronutrientes que o meio S, apresenta menor crescimento, sugerindo estar relacionada com a concentração de ferro existente no meio SMS, que é superior a qualquer meio utilizado. Chebil & Yamasaki (1998) indicam que os metais apresentam uma função relevante no desenvolvimento desta microalga, no

entanto Iriani *et al* (2011) demonstraram que, a partir de $9,44 \text{ mg.L}^{-1}$ a presença de ferro inibia o crescimento de *Chlorella* sp., invés de o promover. Apesar de serem microalgas distintas, o mesmo facto pode ter-se verificado no crescimento de *Nannochloropsis* sp..

Apesar da importância dos micronutrientes, os resultados indicam que a cultura se desenvolve melhor quando tem grande disponibilidade de macronutrientes, preferindo essa situação a um meio completo, sugerida pelas densidades superiores atingidas em S quando comparadas com os meios de referência.

Com um maior rácio superfície-volume, característico das suas pequenas dimensões, *Nannochloropsis* sp. apresentou uma elevada taxa de crescimento, por conseguir incorporar eficientemente os nutrientes do meio de cultivo (Silva 2011). Patil *et al.* (2007) refere que esta microalga demora 2,2 dias a duplicar, no entanto esse valor é superior a qualquer um dos obtidos neste trabalho, que variaram entre os 0,86 dias em meio NB s/Co e os 2,12 dias em meio SMS, demonstrando que estes meios parecem mais adequados ao crescimento de *Nannochloropsis* sp. que o meio de referência considerado na bibliografia.

Tetraselmis sp. é comumente cultivada em diferentes meios de referência, sendo que, tal como em *Nannochloropsis* sp., os mais utilizados são os meios F/2 e Conway. As densidades celulares obtidas com estes meios foram $2,56 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e $1,40 \times 10^7$ células.mL⁻¹, respetivamente (X. Huang *et al.* 2012; Lourenço *et al.* 1997). São valores inferiores aos alcançados neste estudo, uma vez que, usando NB foram obtidas $4,20 \times 10^7$ células.mL⁻¹, utilizando S $3,48 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e, por último, empregando SMS atingiram-se $5,8 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

Apesar do meio NB ser o mais enriquecido a nível dos micronutrientes, não permitiu a obtenção da maior densidade celular, sendo esta atingida no meio SMS. Os resultados sugerem que *Tetraselmis* sp. necessita de uma concentração de micronutrientes mais elevada que a apresentada em S e nos meios de referência, não podendo esta ser tão elevada como a presente no meio NB. Elevadas concentrações de micronutrientes aparentam ter um papel inibidor no crescimento desta microalga.

Segundo Patil *et al.* (2007) *Tetraselmis* sp. tem como tempo de duplicação 3,3 dias. Esse valor é inferior ao obtido em NB (3,81 dias) mas superior ao alcançado

no crescimento nos meios S (2,56 dias) e SMS (2,57 dias), indicando que os últimos dois meios são mais adequados ao crescimento desta espécie.

O meio S (composto unicamente pelos macronutrientes nitratos e fosfatos) apresentou valores de crescimento inferiores aos demais meios utilizados – com exceção do meio SMS no caso de *Nannochloropsis* sp. -, mas superiores aos de referência. Esse aspecto prende-se com a composição do próprio meio. Segundo Carvalho *et al.* (2006), nenhum meio pode ser considerado adequado para o crescimento de microalgas sem a presença de micronutrientes diversificados. Os micronutrientes, tal como o nome indica, são requeridos em baixas concentrações, apesar de serem extrema importância a nível fisiológico e do crescimento das diferentes microalgas. Assim, os dados obtidos sugerem que as concentrações presentes na água utilizada, em conjunto com a concentração de macronutrientes escolhida, é mais vantajosa que a utilização de meios de cultivo mais completos, como é o caso de F/2 e Conway.

Embora o nível de nutrientes fosse controlado e regulado ao longo do tempo, as culturas de ambas as microalgas demonstraram tendência a estabilizar o crescimento. Este comportamento pode dever-se ao aumento da densidade celular dentro do balão, podendo ter originado o efeito de *self-shading*, conhecido por regular o aparecimento de *blooms* algais no meio ambiente, provocando a atenuação da intensidade da luz na coluna de água e o aumento de microalgas nesse espaço, até se encontrarem em excesso e começarem a impedir a propagação da cultura (Shigesada & Okubo 1981).

Nos dias de recolha de amostra foi repostado o volume e adicionado meio, tendo as culturas apresentado um ligeiro aumento na densidade celular. Na presença de nutrientes e mais espaço físico terão tendência a preenchê-lo (Andersen 2005), justificando assim o seu ligeiro incremento. A adição de água pode também ter dissipado ligeiramente o efeito de *self-shading* referido anteriormente, podendo também ter contribuído para o ténue aumento.

5.2 Proteína bruta

Ördög *et al.*. (2011) refere que os dados obtidos pelos diferentes autores na avaliação do teor proteico das microalgas são discrepantes, podendo tal dever-se às diferentes condições de cultivo utilizadas.

O teor proteico para *Nannochloropsis* sp. pode variar entre 17 e 28% em meio F/2 (Brown 2002; Guil-Guerrero *et al.*. 2004). Os valores obtidos no presente trabalho (25,64 a 34,22%) para esta microalga, em qualquer uma das fases de crescimento, foram superiores aos referidos anteriormente. Apesar disso, os valores do conteúdo proteico de *Nannochloropsis* sp. cultivada em meio NB estão de acordo com o folheto de informação do produto comercializado pela Necton S.A. – 30 a 35%.

Para *Tetraselmis* sp., os valores descritos na bibliografia também são discrepantes, variando entre 11 e 50% (Bondioli *et al.*. 2012) em meio F/2 e 35 a 65% em meio Conway (Tzovenis *et al.*, 2009). Nos meios em estudo, os valores de proteína em *Tetraselmis* sp. mantiveram-se dentro do intervalo reportado pelos autores, sendo o valor mínimo de 25,64% - meio SMS, fase estacionária – e o máximo 34,22% - meio NB, fase exponencial -.

Dado que todos os meios utilizados para *Nannochloropsis* sp e *Tetraselmis* sp. continham a mesma concentração de macronutrientes e sabendo-se que a concentração de nitratos disponíveis no meio influencia a produção de proteínas, uma vez que este é o seu componente estrutural (Stryer *et al.*. 2002), pressupõe-se que a diferença de teor proteico encontrada entre meios se deve às diferentes concentrações de micronutrientes.

Segundo Osman & El-naggar (2004), a concentração do micronutriente cobalto deve ser suficiente para promover o desenvolvimento correto das microalgas, mas não tão elevada que o possa inibir. Em todos os meios em estudo, verificou-se que, tanto em *Nannochloropsis* sp. como em *Tetraselmis* sp., na fase exponencial, a ausência de cobalto traduziu-se numa maior produção de proteínas. Na fase estacionária a presença de cobalto se torna benéfica.

Mei *et al* (2007) indica que o mecanismo que leva o cobalto a tornar-se tóxico ainda não se encontra completamente descrito e entendido, no entanto, sugere que esteja relacionado com o *uptake* de macro e micronutrientes. Os resultados obtidos sugerem também haver uma relação entre a presença/ausência de cobalto no meio e o teor de proteína encontrado na microalga. Quando os micronutrientes se encontram mais disponíveis, como é o caso dos meios NB e NB s/Co, a ausência de Co parece promover uma melhor assimilação de N, levando, assim, a um maior teor proteico em NB s/Co que em NB. Quando os micronutrientes se encontram menos disponíveis, como é o caso de S e SMS, a ausência completa de Co, como ocorre em S, parece promover uma melhor utilização de N que em SMS, onde existe uma baixa concentração deste micronutriente. Os meios NB e NB s/Co apresentam teores mais elevados de proteína que S e SMS por terem maior disponibilidade de Mo, que lhes permite uma melhor utilização de N.

Em *Tetraselmis* sp., verificou-se que, em meios com menor concentração de Co houve melhor assimilação de N, aumentando, assim, o teor de proteína verificado na microalga.

Os resultados obtidos encontram-se em linha com os registados por Ördög *et al.* (2011), pois, sendo as proteínas componentes necessários à divisão celular, é admissível registar maior conteúdo proteico na fase exponencial do que na fase estacionária, tendência essa verificada em ambas as microalgas.

Brown *et al.* (1998) demonstrou que os valores de aminoácidos essenciais entre larvas de ostras e microalgas são muito semelhantes e que a composição em aminoácidos das proteínas presentes em microalgas é relativamente semelhante entre espécies, independentemente da sua taxa de crescimento (Brown 2002). Deste modo, as proteínas costumam ser desvalorizadas em relação a outros compostos celulares das microalgas (López *et al.* 2010), sugerindo que o valor proteico das microalgas é pouco relevante ou pouco aproveitado pelos animais em aquacultura.

5.3 Hidratos de carbono

Os valores apresentados para os hidratos de carbono variam grandemente entre os meios de referência.

Para *Nannochloropsis* sp., utilizando F/2, os valores podem oscilar entre 7 e 34% de peso seco (Brown 2002; Hu & Gao 2003), tendo os resultados obtidos com os meios de cultivo utilizados no presente estudo sido superiores ao valor mínimo descrito, enquadrando-se entre 12 e 34%.

Em *Tetraselmis* sp., os resultados obtidos em meios de referência verificam a mesma tendência, podendo variar entre os 10 e os 33% da biomassa seca da microalga, em meio F/2 (Souza & Kelly 2000; Brown 2002), entre 26 e 45% em meio Conway (Tzovenis *et al.*, 2009) e entre 17 e 24%, nos meios em estudo.

Em *Nannochloropsis* sp., o meio NB apresentou resultados superiores aos demais meios utilizados, tendo os meios NB s/Co e S apresentado os mais baixos. Verifica-se, assim, que os meios com menor concentração de Co têm teores de hidratos de carbono inferiores aos que apresentam concentrações mais elevadas, sugerindo que Co pode induzir toxicidade à célula, que tentará compensá-la com o aumento da produção de hidratos de carbono (Osman *et al.*, 2004). O meio NB s/Co apresenta resultados ligeiramente superiores a S, indicando que o Co pode não ser o único micronutriente responsável pela indução de toxicidade.

Markou *et al.* (2012) refere que a deficiência de ferro nos meios de referência pode justificar os baixos resultados obtidos nestes, quando comparados com os meios utilizados no presente estudo. Concentrações demasiado baixas de ferro originam uma inibição da fotossíntese, do que resulta uma diminuição da absorção de N. Dado que os hidratos de carbono são diretamente obtidos a partir da fotossíntese, a sua diminuição resultará também num decréscimo do teor deste composto.

A elevada concentração de determinados micronutrientes, como o cobre, pode, também, justificar o incremento da produção de hidratos de carbono, como reação compensatória à toxicidade induzida pelo metal (Markou *et al.* 2012). A deficiência de outros nutrientes, como o potássio, está também relacionada com o aumento da produção de hidratos de carbono em microalgas.

Para *Tetraselmis* sp. verificaram-se melhores resultados em meio NB, tendo o meio SMS apresentado resultados intermédios entre NB e S. Apesar de SMS possuir valores mais elevados de Fe que os outros meios, possui concentrações de Cu e Co

mais baixas que NB, podendo a menor presença destes micronutrientes justificar o facto de não se atingir percentagens de hidratos de carbono tão elevadas.

À medida que a cultura começa a abrandar o crescimento, as células terão tendência a diminuir a produção de proteína e a acumular reservas sob a forma de hidratos de carbono (Ördög *et al.*, 2011) justificando, assim, o aumento na fase estacionária de *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp..

5.4 Lípidos totais

Com a utilização do meio de cultivo F/2, os valores dos lípidos totais podem variar entre 7 e 40% (Hu & Gao 2003; Bondioli *et al.*, 2012), em *Nannochloropsis* sp. e entre 7% e 30%, em *Tetraselmis* sp. (Tzovenis *et al.*, 2009; Bondioli *et al.*, 2012). Quando cultivada em meio de Conway, *Tetraselmis* sp. apresenta entre 7 a 9% de lípidos totais.

Os resultados alcançados nos meios em estudo em *Nannochloropsis* sp. e em *Tetraselmis* sp. encontram-se alinhados com os valores de referência. Em *Nannochloropsis* sp. variam entre os 9 e 25% e, para *Tetraselmis* sp., variam entre 12 e 26%.

Os resultados obtidos para *Nannochloropsis* sp. sugerem a existência de uma relação direta entre a concentração de Co e molibdênio (Mo), enquanto que em *Tetraselmis* sp. apenas Mo aparenta condicionar a percentagem de lípidos totais.

Assim, em *Nannochloropsis* sp., parece existir uma relação entre as concentrações de Co e Mo; o meio SMS, com baixa concentração de ambos os nutrientes, apresentou a maior acumulação lipídica de entre os meios considerados. Nos meios NB e NB s/Co, apesar de terem a mesma concentração de Mo, verifica-se que NB s/Co acumula mais lípidos do que NB, sugerindo que a ausência de cobalto parece estimular a acumulação de lípidos. No caso de S, que não apresenta nenhum dos micronutrientes referidos, a acumulação de lípidos é a mais alta de entre os quatro meios considerados.

Apesar de contraditório, existem diferentes estratégias, bem documentadas, para a acumulação de lípidos, sendo uma delas a carência de N (Sharma *et al.*, 2012).

Assim, e uma vez que há ausência de Mo, a fixação de N por parte das microalgas será baixa, simulando baixa concentração de N no meio e aumentando o teor de lípidos. Os resultados sugerem que *Nannochloropsis* sp. se encontra em stress quando existem baixas concentrações de Co e Mo, ou quando o Co é suprimido, preferindo crescer num meio com elevadas concentrações de ambos os micronutrientes.

Embora, segundo Sharma *et al.* (2012), um meio que proporcione a acumulação de lípidos não possa ser considerado ótimo para o crescimento das culturas, esta característica é valorizada em aquacultura por se traduzir na produção de um alimento com maior valor nutricional na dieta dos diferentes animais.

Em *Tetraselmis* sp., o meio NB apresentou maior teor lipídico que os outros meios, provavelmente devido à maior concentração de Mo. O meio S apresentou o menor conteúdo de lípidos dos três meios testados, podendo dever-se à ausência do micronutriente supracitado.

5.5 Perfil de ácidos gordos

A carência de N tem sido a maneira mais utilizada para aumentar a produção de ácidos gordos em microalgas, por permitir atingir elevadas percentagens lipídicas e cortes no custo de produção. Apesar disso, quando privadas deste nutriente, as microalgas demoram mais tempo a crescer, atingindo densidades celulares inferiores às normais, afetando assim a produtividade (Sharma *et al.* 2012). Verificou-se, tal como Molina *et al.* (1991) refere, que existe uma relação inversa entre o crescimento e a acumulação de ácidos gordos saturados.

Inge & Rainuzzo (1997) relataram a existência de uma relação entre o aumento de ácido palmítico (C16:0) e a diminuição do teor de ω -3 PUFA com a carência de N. Este fenómeno verificou-se na fase estacionária de *Nannochloropsis* sp. em NBs/Co e nessa mesma fase do crescimento de *Tetraselmis* sp. em SMS.

A relação anterior traduziu-se também na diminuição da percentagem total de PUFA's de uma fase de crescimento para a outra. Em *Nannochloropsis* sp., essa diminuição pode dever-se à ausência de cobalto que, influenciando a acumulação de lípidos, poderá também alterar a acumulação de n3's, principalmente quando a

cultura já se encontra mais densa e envelhecida. Para *Tetraselmis* sp., a diminuição poderá estar relacionada com um micronutriente em concentrações inibidoras, uma vez que se atingiu maior percentagem de PUFA's no meio sem qualquer adição de micronutrientes.

Em ambas as microalgas e em todos os meios utilizados verificou-se um aumento de C16:0 da fase exponencial para a fase estacionária. Este ácido gordo saturado tem como principal função a acumulação de energia, sendo que o seu aumento indica que as culturas estavam a parar o crescimento e a começar a acumular reservas energéticas (Stryer *et al.*, 2002).

A presença do ácido esteárico (C18:0) em quantidades elevadas pode ser benéfica quando utilizado em aquacultura. Em *Lysmata amboinensis*, Calado *et al.* (2009) relacionou a diminuição da mortalidade na fase larvar com uma maior percentagem deste ácido gordo saturado nas larvas, sendo por isso, considerado fundamental para o correto desenvolvimento da espécie.

A bibliografia refere que, para *Nannochloropsis* sp., os valores de ácido eicosoentaenoico (EPA) rondará os 15% (Z. Wen & F. Chen 2003). Os valores obtidos neste trabalho foram inferiores aos espectáveis, no entanto é conhecido que existe uma relação entre uma elevada intensidade luminosa e o aumento dos ácidos gordos (Fidalgo *et al.*, 1998), podendo este facto indicar que a intensidade luminosa usada não foi a suficiente para provocar este tipo de *stress*.

As microalgas em estudo apresentaram pequenas percentagens de ácido araquidónico (C20:4 n6), na fase exponencial, em *Nannochloropsis* sp. e em ambas as fases em *Tetraselmis* sp.. Apesar de serem valores baixos, este ácido gordo é conhecido por ser essencial para diversos animais marinhos e, até mesmo, para o crescimento e metamorfose de diversas larvas (Guedes & Malcata 2012).

Sánchez *et al.* (2000) consideram que o valor nutricional de uma microalga está dependente do seu rácio n3/n6, devendo este encontrar-se entre o valor 2 e 5. Nenhum dos meios utilizados permitiu atingir este valor, em nenhuma das microalgas consideradas. Apesar disso, os meios utilizados permitiram a obtenção de elevados teores lipídicos, havendo presença de importantes ácidos gordos - C18:0, EPA e AA –que sustentam a qualidade nutricional dos meios utilizados.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Para a microalga *Nannochloropsis* sp., a produção de biomassa em termos de peso seco entre NB e NB s/Co não revelou diferenças estaticamente significativas. Apesar disso, NB apresentou maior percentagem de hidratos de carbono e PUFA's. Relativamente à seleção futura de um meio para o cultivo desta microalga, a escolha deve ter em conta o perfil bioquímico pretendido, uma vez que são semelhantes em termos de produtividade e de custos. De salientar que no meio NB s/Co eliminou-se por completo Co, reduzindo-se a toxicidade do meio. A utilização deste meio representa também uma redução de custos anuais com meios de cultivo de 0,18%.

Para *Tetraselmis* sp., o meio de cultivo SMS registou os melhores resultados a nível da densidade celular, tempo de duplicação e produtividade, permitindo em simultâneo a redução da concentração do Co relativamente ao meio anteriormente referido. Na fase exponencial, o meio de cultivo SMS apresentou maior percentagem de lípidos e PUFA's. Na fase estacionária, NB evidenciou maior percentagem de proteínas, hidratos de carbono e lípidos. O meio de cultivo S revelou maior percentagem de PUFA's. Para *Tetraselmis* sp., embora a escolha do meio de cultivo deve também ter em conta o perfil bioquímico pretendido, os dados obtidos apontam para que SMS seja a melhor opção, quer biológica, quer economicamente, permitindo uma redução anual de 9,24%, no que toca a custos com meios de cultivo.

As discrepâncias das concentrações de micronutrientes nos diferentes meios utilizados explicam as variações obtidas nos perfis bioquímicos das duas microalgas, especialmente as variações de ferro, cobre, cobalto e molibdênio.

O desenvolvimento e otimização de meios de cultivo para estes microorganismos ainda são uma área promissora e que carece de investigação, uma vez que, apesar dos esforços, os custos da produção a larga escala de microalgas ainda continua a ter custos elevados e, nem sempre, a produtividade desejada.

Futuramente, sugere-se que sejam efetuados novos estudos no desenvolvimento de meios, nomeadamente em relação às concentrações ótimas de micronutrientes para *Tetraselmis* sp., tendo em vista uma maior produtividade e

perfil bioquímico superior, não descurando o facto de dados obtidos em meio laboratorial poderem diferir dos alcançados no cultivo em larga escala.

7. Bibliografía

- Abu-Rezq, T.; Al-Musallam, L.; Al-Shimmari, J.; Dias, P. (1999). Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia*, 403, pág. 97–107;
- Acién, F., Fernández, J., Magán, J., Molina E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.005;
- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Press Release, USA;
- Banerjee, S.; Hew, W.; Khatoon, H.; Shariff, M. (2011). Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10, pág. 1375-1383;
- Barsanti, L. e Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*, CRC Press, USA;
- Becker, E.W., 2007. Microalgae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), pág. 207–210;
- Bergé, J. e Barnathan, G., 2005. Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms : Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. *Advances Biochemistry Engineering/Biotechnology*, 96, pág. 49–125;
- Bondioli, P.; Della, L.; Rivolta, G.; Chini, G.; Bassi, N.; Rodolfi, L.; Casini, D.; Prussi, M.; Chiaramonti, D.; Tredici, M., (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis sp . F & M-M24* and *Tetraselmis suecica F & M-M33*. *Bioresource Technology*, 114, pág. 567–572;
- Brown, M. R., 2002. *Nutritional value of microalgae for aquaculture*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002*. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown, M.; Mccausland, M.; Kowalski, K., (1998). The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165, pág. 281–293;

- Cadima, E.L., 2000. Introdução. In *Manual dos Recursos Marinhos*. Lisboa: FAO, p. 159;
- Cai, T.; Park, S. e Li, Y., (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, pág. 360–369;
- Calado, R.; Vitorino, A.; Reis, A.; Lopes da Silva, T.; Dinis, M. (2009). Effect of different diets on larval production, quality and fatty acid profile of the marine ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* (de Man, 1888), using wild larvae as a standard. *Aquaculture Nutrition*, 15(5), 484–491;
- Carvalho, A.; Pontes, I.; Gaspar, H.; Malcata, F. (2006). Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4), pág. 358–366;
- Chebil, L. e Yamasaki, S., (1998). Improvement of a rotifer ecosystem culture to promote recycling marine microalga, *Nannochloropsis* sp.. *Aquacultural Engineering*, 17, pág. 1-10 ;
- Chen, C.; Zhao, X.; Yen, H.; Ho, S.; Cheng, C.; Lee, D.; Bai, F.; Chang, J. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>;
- Chen, P.; Min, M.; Chen, Y.; Wang, L.; Li, Y.; Chen, Q.; Wan, Y.; Wang, X.; Cheng, Y.; Deng, S.; Hennessy, K.; Lin, X.; Liu, Y.; Wang, Y.; Martinez, B.; Ruan, R. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal Of Agricultural Biological Engineering*, 2(4), pág. 1-30;
- Chow, P. & Landhäusser, S., 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree physiology*, 24(10), pág. 1129 –1136;
- Davidson, K., Flynn, K. e Cunningham, A., (1991). Relationships between photopigments, cell carbon, cell nitrogen and growth rate for a marine nanoflagellate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 153(1), pág. 87-96;
- Day, J., Benson, E. e Fleck, R., (1999). In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In vitro cell development biology-plant*, 35, pág. 127-136;
- Doran, P., (1995). *Bioprocess Engineering Principles* 1st ed., New Jersey: Elsevier;

- Draaisma, B.; Wijffels, H.; Slegers, P.; Brentner, L.; Roy, A.; Barbosa, M. (2012). Food commodities from microalgae. *Current opinion in biotechnology*, 24, pág. 1-9;
- Fabregas, J.; Herrero, C.; Cabezas, B.; Abalde, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49(3-4), pág. 231-244 ;
- Fidalgo, J.; Cid, A.; Torres, E.; Sukenik, A.; Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition , lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 166, pág. 105-116;
- Ghezelbash, F.; Farboodnia, T.; Heidari, R.; Agh, N. (2008). Biochemical effects of different salinities and Luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. *Medwell Journals*, 3, pág. 217-221;
- Griffiths, M.; Garcin, C.; van Hille, R.; Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), pág. 119-123;
- Griffiths, M.; Garcin, C.; van Hille, R.; Harrison, S. (2011). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 85 (2), pág. 989–1001;
- Grobbelaar, J., (2012). Microalgae mass culture : the constraints of scaling-up. *Journal of Applied Phycology*, 24, pág. 315–318;
- Guedes, A. e Malcata, F., (2012). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. In Z. A. Muchlisin, ed. *Aquaculture*, pág. 59-79;
- Guil-Guerrero, J.; Navarro-Juárez, R.; López-Martínez, J.; Campra-Madrid, P.; Reboloso-Fuentes, M. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*, 65, pág. 511–517;
- Gutnikov, G., (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of chromatography B*, 671(1-2), pág. 71-89;
- Halim, R., Danquah, M. e Webley, P., (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production : A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), pág. 709–732;
- Hemaiswarya, S.; Raja, R.; Kumar, R.; Ganesan, V.; Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27, pág. 1737-1746;

- Hu, H. e Gao, K., (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters*, 25, pág. 421–425;
- Huang, X., Huang, Z. e Wen, W., (2012). Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth , total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology*, pág. 129–137;
- Inge, K. e Rainuzzo, J., (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(44), pág. 207–221;
- Iriani, D.; Suriyaphan, O. e Chaiyanate, N., (2011). Effect of iron concentration on growth, protein content and total phenolic content of *Chlorella* sp. cultured in basal medium, *Sains Malaysiana*, 40, 353–358
- Krienitz, L. e Wirth, M., (2006). The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia*, 36, pág. 204-210;
- Laing, I., (1991). Cultivation of marine, unicellular algae. Ministry of agriculture, fisheries and food, Lowesoft, pág. 1-32;
- Leandro, S. M. (2000). Culturas laboratoriais de diatomáceas marinhas – perfis de exopolissacarídeos. Tese de mestrado no Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro;
- Lepage, G. e Roy, C., (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one step reaction. *Journal of lipid research*, 27, pág. 114-120;
- López, C.; García, C.; Fernández, F.; Bustus, C.; Chisti, Y.; Sevilla, J. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101, pág. 7587–7591;
- Lourenço, S.; Lanfer, U.; Mancini-filho, J.; Barbarino, E.; Aidar, E. (1997). Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I . Comparison of two culture media. *Aquaculture*, 148, pág. 153-168;
- Marin, B., Matzke, C. e Melkonian, M., (1993). Flagellar hairs of *Tetraselmis* (Prasinophyceae): Ultrastructure and intrageneric variation. *Phycologia*, 32, pág. 213-222;
- Markou, G.; Angelidaki, I. e Georgakakis, D., (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main

- bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(3), pág. 631–645;
- Matsunaga, T.; Hideki, T.; Miyashita, H.; Yokouchi, H. (2005). Marine Microalgae. *Advances Biochemistry Engineering/Biotechnology*, 96, pág. 165-188;
 - Mei, L.; Zuh, Q., Hu, C.; Chen, L.; Liu, Z.; Kong Z. (2007). Cobalt and manganese stress in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae): Effects on lipid peroxidation and antioxidant enzymes, *Journal of Environmental Sciences*, 19, pág. 1330–1335
 - Molina, E.; Martinez, M.; Garcia, F.; Contreras, A. (1991). Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *Tetraselmis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, pág. 21-25;
 - Narayana, B. e Sunil, K., (2009). A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate. *Euroasian Journal of Analytical Chemistry*, 4(2), pág. 204-214 ;
 - Nelson, D. e Cox, M., (2004). *Lehninger - Principles Of Biochemistry* 4th ed., New York: Worth Publishing;
 - Okauchi, M. e Kawamura, K., (1997). Optimum medium for large-scale culture of *Tetraselmis tetrathele*. *Hydrobiologia*, 358, pág. 217-222;
 - Olaizola, M., (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, pág. 459-466;
 - Olofsson, M. Lamela, T.; Nilsson, E.; Bergé, J.; Del Pino, V.; Uronen, P.; Legrand, C. (2012). Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. *Energies*, 5, pág. 1577-1592;
 - Ördög, V.; Stirk, W.; Bálint, P.; Staden, J.; Lovász, C. (2011). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24, pág. 907-914;
 - Osman, M. e El-naggar, A., (2004). Differential effects of Co²⁺ and Ni²⁺ on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 16, pág. ...
 - Pal, D.; Khozin-goldberg, I.; Cohen, Z.; Boussiba, S. (2011). The effect of light , salinity , and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, pág. 1429–1441;

- Palz, W. e Pirrwitz, D., (1983). *Energy from Biomass*, New York: Springer.
- Patil, V.; Kallqvist, T.; Olsen, E.; Vogt, G.; Gislerød, H. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15, pág. 1-9;
- Pereira, H., (2009). *Desenvolvimento e otimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala*. Tese de mestrado - Universidade do Algarve;
- Planas, M. e Cunha, I., (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177(1-4), pág. 171–190;
- Rawat, I.; Ranjith K.; Mutanda, T.; Bux, F. (2012). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103, pág. 444–467;
- Renaud, S. e Parry, D., (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 6(3), pág. 347-356;
- Richmond, A., (2004). *Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology* 1st ed., Oxford: Blackwell Science;
- Rocha, J., Garcia, J. e Henriques, M., (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), pág. 237-242;
- Rodolfi, L.; Chini, G.; Barsanti, L.; Rosati, G.; Tredici, M. (2003). Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20, pág. 243-248;
- Safi, C., Charton, M. e Pignolet, O., (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, 25, pág. 497-501;
- Sánchez, A.; Garc, M.; Garc, F.; Molina, E.; Chisti, Y. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors : studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, pág. 13-18;
- Sánchez, S., Mart, E. e Espinola, F., (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6, pág. 1015–1023;

- Sharma, K., Schuhmann, H. e Schenk, P., (2012). High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*, 5(12), pág. 1532-1553;
- Shigesada, N. e Okubo, A., (1981). Analysis of the self-shading effect on algal vertical distribution in natural waters. *Journal of Mathematical Biology*, 12(291), pág. 311-326;
- Silva, C., (2011). *Contributos para o desenvolvimento de um Biosensor no cultivo de microalgas*. Tese de Mestrado - Instituto Politécnico de Leiria;
- Simões, T., (2011). *Síntese enzimática de lípidos estruturados sucedâneos de gordura de leite humano , enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados*. Tese de Mestrado - Instituto Politécnico de Leiria;
- Sykes, A. (2010). Aquaculture in Portugal, EAS 2010 Students Workshop, 6th October, Porto, Portugal
- Souza, F. e Kelly, G., (2000). Effects of a diet of a nitrogen-limited alga *Tetraselmis suecica* on growth , survival and biochemical composition of tiger prawn *Penaeus semisulcatus* larvae. *Aquaculture*, 181, pág. 311–329;
- Stryer, L., Berg, J. e Tymoczko, J., (2002). *Biochemistry* 5th ed., New York: HW Freeman;
- Tabernero, A., Martín, E. e Galán, M., (2012). Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal*, 63, pág. 104-115;
- Tecelao, C., Silva, J., Dubreucq, E., Ribeiro, Maria H., Ferreira-Dias, S. (2010). Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1-4), 122-127;
- Tzovenis, I.; Fountoulaki, E.; Dolapsakis, N.; Kotzamanis, I.; Nengas, I.; Bitis, I.; Cladas, Y.; Economou-Amili, A. (2009). Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 21, pág. 457-469;
- Van den Hoek, C., Mann, D. e Jahns, H., (1996). *Algae: An Introduction to Phycology*, Cambridge University Press;
- Walker, J., (2002). *The Protein Protocols Handbook* 2nd ed. J. M. Walker, ed., New Jersey: Humana Press Inc.;

- Wen, Z. e Chen, F., (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21, pág. 273-294;
- Woertz, I., (2007). *Lipid Productivity of Algae Grown on Dairy Wastewater as a Possible Feedstock for Biodiesel*. Tese de Mestrado –Universidade Politécnica da Califórnia;
- Xiao, L., (2010). *Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from Marine Products*. Tese de Mestrado – Universidade de Bergensis;
- Zeng, X.; Danquah, M.; Chen, X.; Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, pág. 3252–3260;
- Zepka, L.; Jacob-Lopes, E.; Goldbeck, R.; Queiroz, M. (2008). Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(8), pág. 1305–1310.

Anexos

Protocolo 1: Determinação de Nitratos

A quantificação de nitratos nas culturas foi determinada de acordo com Narayana & Sunil (2009), adaptado nas instalações da Necton. Centrifugou-se 8ml de cultura a $v=3100$ rpm, durante quinze minutos. Desprezou-se o pellet e pipetou-se 1ml de sobrenadante para um tubo de ensaio limpo. A esse tubo acrescentou-se 8,8ml de uma solução de NaCl a 35g/L e 0,2mL de HCl (1M). Cada amostra foi medida em duplicado. O branco consistia em 9,8ml da solução de NaCl e 0,2mL de HCl.

As absorvâncias foram medidas no espectrofotômetro Shimadzu, UV-mini 1240, em células de quartzo de 4mL, a $\lambda_1=220\text{nm}$ e $\lambda_2=275\text{nm}$. A absorvância a utilizar na equação da curva de calibração (equação (anexo) 2) foi obtida de acordo com a equação (anexo) 1. A curva de calibração foi obtida através da absorvância de soluções diferentes de concentração (em mM) crescente e conhecida de nitrato de sódio (NaNO_3), sendo obtido um $r^2=0,9981$. Foi feita a média dos valores obtidos e calculado o valor de meio a adicionar na cultura, de modo a reajustar a concentração à pretendida.

$$\text{Abs}_{220\text{nm}} - 2 \cdot \text{Abs}_{275\text{nm}} = y$$

Equação (anexo) 1 - Equação de determinação da absorvância de y , relativa ao método em uso

$$y = 0,2487x - 0,0195$$

Equação (anexo) 2 - Equação obtida através da curva de calibração, onde y depende do resultado obtido na equação anterior e x determina a concentração de nitratos no meio.

Protocolo 2: Curva de Calibração de Bovine Serum Albumin

A determinação de proteína dependeu da realização de uma curva de calibração. Foi utilizado bovine serum albumin (BSA) a 96% da Sigma, ressuspenso em hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2N, como padrão, uma vez que é frequentemente utilizado para o efeito.

De cada concentração foram retirados 100µl, aos quais se adicionou 1ml da solução I do método de Lowry. A solução incubou, no escuro, durante 10min à temperatura ambiente, após os quais se adicionou 100µl do reagente H do método de Lowry. A amostra ficou a incubar, protegida da luz, durante 30min, depois dos quais foi lida a absorvância a $\lambda=750\text{nm}$.

Tabela (anexo) I - Composição das soluções utilizadas no método de Lowry

Solução	Composição
A	Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%
B	Tris-HCl 0,5M (pH=6,8)
C	Carbonato de Sódio 2% [Dissolvido na solução F]
D	Sulfato de Cobre II 0,5% [Dissolvido na solução E]
E	Citrato de Sódio 1%
F	Hidróxido de Sódio 0,1N
G	Hidróxido de Sódio 0,2N
H	Reagente Folin-Ciocalteu 1:2 Água MiliQ
I	Solução C: Solução D 50:1
J	Tampão de extração: 62,5mM Tris-HCl + 1% glicerol + 2% SDS

A curva de calibração foi obtida através da absorvância de soluções diferentes de concentração (em mg.L^{-1}) crescente e conhecida de BSA, sendo obtido um $r^2=0,9828$ (equação (anexo) 3).

$$y = 0,4169x + 0,0977$$

Equação (anexo) 3 - Recta de calibração de BSA para a determinação proteica, onde **y** é a absorvância das amostras e **x** determina a concentração de proteínas, em mg.L^{-1} .

Protocolo 3: Curva de Calibração de Glucose

A determinação dos hidratos de carbono dependeu da realização de uma curva de calibração. Primeiramente, foi preparada uma solução stock de glucose anidra, JMVP 1000mg.L^{-1} , em NaOH a 1M,. Prepararam-se soluções-padrão de 2mL a partir da solução stock, com as concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200mg.L^{-1} , tendo sido tomado como branco a solução de NaOH a 1M.

Aos 2mL da solução padrão foi acrescentado 1ml de ácido fénico a 5% (Scharlau) e imediatamente adicionado, cuidadosamente, ácido sulfúrico a 96% (Scharlau). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e deixadas em repouso durante 10min à temperatura ambiente. As amostras foram colocadas a incubar a $T=30^{\circ}\text{C}$, 15°C . Sem agitar, foi lida a absorvância a $\lambda=485\text{nm}$.

A curva de calibração foi obtida através da absorvância de soluções diferentes de concentração (em mg.L^{-1}) crescente e conhecida de glucose anidra, sendo obtido um $r^2=0,9973$ (equação (anexo) 4).

$$y= 0,0053x+0,0622$$

Equação (anexo) 4 - Equação obtida através da curva de calibração, onde **y** é a absorvância das amostras e **x** determina a concentração de hidratos de carbono, em mg.L^{-1} .

Ácidos Gordos

Tabela (anexo) II - Lista dos ácidos gordos identificados nas microalgas em estudo. À esquerda encontra-se o nome sistemático e à direita o número de carbonos e ligações duplas, empregando a representação usada ao longo do trabalho.

Nome Sistemático	Número carbonos e ligações duplas
Ácido mirístico	C14:0
Ácido palmítico	C16:0
Ácido palmitoleico	C16:1n7
Ácido hexadecatrienóico	C16:3n4
Ácido hexadecadienóico	C16:2n4
Ácido esteárico	C18:0
Ácido vacénico	C18:1n7
Ácido oleico	C18:1n9
Ácido linoleico	C18:2n6
Ácido estearidónico	C18:4n3
Ácido eicosenoico	C20:1n9
Ácido araquidónico	C20:4n6
Ácido eicosatetraenoico	C20:4n3
Ácido eicosaoentaenoico	C20:5n3