

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Tiago André Santos Lima

**CRESCIMENTO E PERFIL LIPÍDICO DE  
MICROALGAS EUSTIGMATOPHYCEAE**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e  
Biotecnologia Vegetal orientada pela Professora Doutora Lília Maria  
Antunes dos Santos e apresentada à Universidade de Coimbra,  
Departamento de Ciências da Vida.

Janeiro de 2020





UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Tiago André Santos Lima

**CRESCIMENTO E PERFIL LIPÍDICO DE  
MICROALGAS EUSTIGMATOPHYCEAE**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e  
Biotecnologia Vegetal orientada pela Professora Doutora Lília Maria  
Antunes dos Santos e apresentada à Universidade de Coimbra,  
Departamento de Ciências da Vida.

Janeiro de 2020



*The mind is everything. What you think you become.*

– Buddha



## **Agradecimentos**

Gostaria de deixar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e tornaram a concretização deste projeto possível.

À Professora Doutora Lília Maria Antunes dos Santos, orientadora deste trabalho, pela orientação científica, amabilidade, apoio, confiança, disponibilidade e todos os ensinamentos prestados.

À Mariana Assunção por toda a paciência, disponibilidade, amabilidade, esclarecimentos e conhecimentos que partilhou comigo. Acompanhou-me e apoiou-me nos momentos mais difíceis desta última fase académica, sempre compreensível e amável. Como tal, não poderia estar mais grato.

Às minhas colegas de laboratório Raquel Amaral, Clara Martins, Joana Ferreira e Maria João pela amizade, ensinamentos e boa disposição que favoreceram ao longo deste projeto.

À D. Isabel Matos por todo o auxílio e simpatia prestada.

Aos meus pais, irmã, avós e bis-avó pelo apoio, confiança e financiamento deste percurso académico. Sem eles a minha evolução académica e pessoal não teria sido possível e como tal, não poderia estar mais grato.

A todas as pessoas de diferentes nacionalidades que tive oportunidade de conhecer ao longo deste percurso académico. Nunca esquecerei os ensinamentos pessoais e culturais e bons momentos que partilhei com todos eles.

Por último mas não menos importante, agradeço à Universidade de Coimbra e à Algoteca de Coimbra por todos os conhecimentos e aprendizagens que me proporcionaram

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Índice .....	i
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
1. Introdução.....	1
1.1 Microalgas da classe Eustigmatophyceae .....	3
1.2 Géneros pertencentes à classe Eustigmatophyceae .....	4
1.3 Valor biotecnológico das microalgas .....	8
1.4 Biotecnologia das Eustigmatophyceae .....	10
1.5 Lípidos de microalgas .....	13
1.5 Contextualização e objetivos .....	16
2. Material e métodos .....	18
2.1 Estabelecimento e crescimento das culturas de microalgas .....	20
2.2 Análise do crescimento das culturas .....	23
2.3 Análise da produção de biomassa.....	24
2.4 Extração e quantificação do lípido total (LT).....	25
2.5 Análise das produtividades de lípido total.....	27
2.6 Separação e quantificação das frações lipídicas .....	27
2.7 Análise estatística .....	28
3. Resultados.....	30
.....	30
3.1 Crescimento de culturas baseado em densidade celular (cél/mL) .....	32
3.2 Produção de biomassa.....	35
3.2.1 Produção de biomassa a 10 e 30 dias estimado com base em peso seco (g/L) 35	
3.2.2 Produção de biomassa a 10 e 30 dias estimado com base em densidade celular (cél/mL) .....	36



3.3	Produção de lípido total a 10 e 30 dias de crescimento.....	37
3.4	Produtividades de lípido total a 10 e 30 dias de crescimento (g/L/d) .....	39
3.5	Quantificação dos lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos a 10 e 30 dias de crescimento .....	40
4.	Discussão .....	47
4.1	Crescimento de culturas baseado na densidade celular.....	49
4.2	Produção de biomassa baseada em peso seco e densidade celular.....	50
4.3	Produção de lípido total.....	52
4.4	Produtividade lipídica .....	53
4.5	Quantificação e qualificação das frações lipídicas.....	55
5.	Conclusões.....	59
6.	Bibliografia.....	63



## Resumo

As microalgas são microrganismos fotossintéticos com organização celular eucariótica ou procariótica que produzem compostos com aplicações comerciais em inúmeras áreas como a aquacultura, saúde humana e animal, nutrição, produção de energia, tratamento de águas residuais e nas indústrias farmacêutica, química e alimentar. A classe Eustigmatophyceae tem recebido especial atenção através do género *Nannochloropsis/Microchloropsis* devido à sua capacidade de produção de metabolitos de grande interesse como os lípidos e à sua elevada produtividade.

O presente estudo teve como principal objetivo conhecer o potencial lipídico de diversas estirpes pertencentes à classe Eustigmatophyceae, em duas fases do crescimento. Para compreender o ciclo de crescimento dos diferentes géneros 5 estirpes foram seleccionadas e o crescimento monitorizado. Para todas as estirpes foi calculada a produção de biomassa por duas metodologias diferentes, foram extraídos e calculados o lípido total e a produtividade lipídica e posteriormente identificadas e quantificadas as diferentes frações lipídicas (lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos).

Nas condições de cultivo estabelecidas, para ambas as metodologias utilizadas, verificou-se uma maior produção de biomassa em cultivos a 30 dias, com *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni a apresentar o valor mais elevado de produção de biomassa baseado em peso seco ( $0,78 \pm 0,03$  g/L). De uma forma geral observou-se um maior conteúdo lipídico em culturas com 10 dias de cultivo, correspondendo o melhor valor a *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 com  $33,40 \pm 1,13\%$  BS e uma produtividade lipídica de  $0,68 \pm 0,07$  g/L/d. Em todas as estirpes verificou-se uma dominância dos lípidos neutros tanto a 10 dias como a 30 dias de cultivo. Este estudo demonstra que mesmo em condições não otimizadas outros géneros dentro da classe Eustigmatophyceae podem possuir valores de produtividade lipídica superiores aos conhecidos para *Nannochloropsis/Microchloropsis*. Os resultados reforçam a posição das eustigmatofíceas como uma classe de microalgas com potencial biotecnológico muito promissor no que respeita aos lípidos.

**Palavras-chave:** Microalgas; Eustigmatophyceae; biomassa; lípido total; produtividade lipídica.

## Abstract

Microalgae are photosynthetic microorganisms with eukaryotic or prokaryotic cell organization that produce compounds with commercial applications in numerous areas such as aquaculture, human and animal health, nutrition, energy production, wastewater treatment and in pharmaceutical, chemical and food industries. The Eustigmatophyceae class has received special attention through the genus *Nannochloropsis* / *Microchloropsis* due to its ability to produce metabolites of great interest such as lipids and its high productivity.

The present study had as main objective to know the lipid potential of several strains belonging to the class Eustigmatophyceae, in two stages of growth. To understand the growth cycle of the different genera, 5 strains were selected and their growth was monitored. For all the strains, biomass production was calculated by two different methodologies, the total lipid and lipid productivity were calculated and the different lipid fractions (neutral lipids, glycolipids and phospholipids) were subsequently identified and quantified.

Under the established cultivation conditions, for both methodologies used, there was a higher production of biomass in cultivations at 30 days, with *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni presenting the highest value of biomass production based on dry weight ( $0.78 \pm 0.03$  g / L). In general, a higher lipid content was observed in cultures with 10 days of cultivation, with the best value corresponding to *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 with  $33.40 \pm 1.13\%$  BS and a lipid productivity of  $0.68 \pm 0.07$  g / L / d. In all strains, neutral lipids dominated both at 10 and 30 days of culture. This study demonstrates that even under non-optimized conditions, other genera within the Eustigmatophyceae class may have higher lipid productivity values than those known for *Nannochloropsis* / *Microchloropsis*. The results reinforce the position of eustigmatophytes as a class of microalgae with very promising biotechnological potential with regard to lipids.

**Keywords:** Microalgae; Eustigmatophyceae; biomass; total lipid; lipid productivity

## **1. Introdução**



## 1.1 Microalgas da classe Eustigmatophyceae

Microalgas são microorganismos eucarióticos ou procarióticos, fotossintéticos e ubíquistas, ou seja, capazes de ocupar habitats inóspitos como solos desertos, montanhas de elevada altitude com neve ou até mesmo fontes termais. A sua diversidade é notável, sendo que existem mais de 50 000 espécies de microalgas em todo o tipo de ecossistemas, porém apenas aproximadamente 30 000 se encontram descritas e estudadas (Richmond, 2004).

A classe Eustigmatophyceae inclui microalgas verde-amareladas de água salgada e doce (Fawley and Fawley, 2007), de solo (Vischer, 1945), de ambientes subaéreos como rochas e árvores (Czerwik-Marcinkowska and Mrozinska, 2009; Nakano *et al.*, 1991) ou ambientes marinhos com condições ácidas (Fawley and Fawley, 2017), águas poluídas (*Nannochloris* e *Stichococcus*) (Ryther, 1954) e águas permanentemente cobertas por gelo (Bielewicz *et al.*, 2011). Em 1971 esta classe, cujo nome é associado ao estigma presente extraplástidialmente em zoósporos de certos géneros (Prior *et al.*, 2009), foi separada da classe Xanthophyceae por Hibberd e Leedale com fundamento em evidências citológicas e ultraestruturais, nomeadamente a organização característica dos zoóporos, em particular a estrutura do aparelho flagelar, o tipo de estigma e sua localização extracloroplastidial (Hibberd, 1981; Santos, 1996). Nas células vegetativas, as características mais evidentes são a presença de um glóbulo vermelho citoplasmático, mais visível em células velhas, constituído por substâncias lipídicas (Eliáš *et al.*, 2017) e a presença de um ou mais cloroplastos parietais (Hibberd, 1990) com ou sem pirenóide associado e sem lamela de cintura a rodear o sistema de tilacóides (Santos, 1996; Andersen *et al.*, 1998). As eustigmatofíceas podem exibir células maioritariamente cocóides (*Eustigmatos*, *Nannochloropsis*, *Vischeria*, *Chlorobotrys*), tetraédricas (*Pseudostaurastrum*), poliédricas (*Goniochloris*), ovoides (*Characiopsis*), solitárias ou agregadas em colónias soltas, com dimensões geralmente entre 2 e 25 µm e paredes celulares lisas ou altamente esculpidas (Eliáš *et al.*, 2017).

Grande parte dos géneros pertencentes a esta classe produz zoósporos ovais, nus ou em forma esférica (Hibberd, 1972), com um estigma não associado ao cloroplasto, presente na extremidade anterior da célula, um ou dois flagelos inseridos abaixo do ápice e um único cloroplasto desprovido de pirenóide (Hibberd and Leedale, 1972; Hibberd, 1981). O flagelo anterior emergente situa-se intimamente associado ao estigma e, no caso de zoósporos biflagelados, os dois flagelos encontram-se inseridos lateralmente com os seus corpos basais posicionados entre si em um ângulo de aproximadamente 90°. No caso de zoósporos biflagelados, o segundo flagelo é

sempre mais curto e estreito que o flagelo anterior, por vezes dificilmente visível ao microscópio ótico (Hibberd and Leedale, 1972; Santos and Leedale, 1991).

Para além das características estruturais únicas mencionadas anteriormente, os organismos desta classe diferem dos da classe Xanthophyceae no que toca à sua composição de pigmentos (Whittle and Casselton, 1975) possuindo unicamente clorofila *a*, com presença dominante de violaxantina enquanto as Xanthophyceae possuem clorofilas *a* e *c* (Norgård *et al.*, 1974) e predomínio de diadinoxantina (Whittle and Casselton, 1975).

A sistemática das Eustigmatophyceae é um tema ainda em desenvolvimento que tem vindo a sofrer numerosas alterações nos últimos anos. O esquema taxonómico formal estabelecido por Hibberd em 1981, reconhecia uma única ordem dividida em quatro famílias distintas (Eustigmataceae, Chlorobotrydaceae, Pseudocharaciopsidaceae, Monodopsidaceae) (Hibberd, 1981), passando mais tarde a cinco com a adição da família Loboceae (Hegewald *et al.*, 2007). Contudo, devido ao facto da diversidade das Eustigmatophyceae ser muito superior ao que anteriormente se pensava, este sistema tornou-se incoerente com as relações filogenéticas conhecidas atualmente para as Eustigmatophyceae que indicam a sua divisão em duas linhagens filogeneticamente divergentes, a primeira que engloba os taxa estabelecidos por Hibberd (1981) na ordem Eustigmatales e uma segunda que inclui outros taxa reconhecidos como Eustigmatophyceae nos últimos 25 anos (Eliáš *et al.*, 2017).

Atualmente o número de espécies pertencentes a esta classe difere de acordo com as fontes de informação consultadas uma vez que diferentes autores como Guiry and Guiry (2009) afirmam a existência de 5 famílias, 10 gêneros e 35 espécies em uma única ordem e outros autores como Přibyl *et al.*, (2012) garantem a existência de 20 espécies em 11 gêneros. De salientar que alguns gêneros da classe Eustigmatophyceae estão ainda incluídos como membros da classe Xanthophyceae nalgumas floras (Ettl, 1978).

As Eustigmatophyceae reproduzem-se maioritariamente através de autósporos e, em alguns casos, por zoósporos (Bold and Wynne, 1985; Hibberd, 1990; Eliáš *et al.*, 2017), uma vez que reprodução sexuada nunca foi ainda observada (Ott *et al.*, 2015).

## **1.2 Gêneros pertencentes à classe Eustigmatophyceae**

Atualmente a classe Eustigmatophyceae é constituída por 16 gêneros com base em evidências ultraestruturais, bioquímicas e/ou moleculares, sendo eles *Eustigmatos*, *Vischeria*, *Chlorobotrys*, *Monodopsis*, *Pseudotetraëdriella*, *Nannochloropsis*, *Microchloropsis*, *Pseudellipsoideon*, *Pseudocharaciopsis*, *Goniochloris*,



*Pseudostaurastrum*, *Trachydiscus*, *Vacuoliviride*, *Tetraëdriella* e *Botryochloropsis* (Eliáš *et al.*, 2017). A sistemática desta classe é um tema em desenvolvimento como foi mencionado dado que alguns géneros transferidos das Xanthophyceae não estão ainda formalmente estabelecidos e, portanto, permanecem com a nomenclatura anterior. É o caso de *Characiopsis*, *Monodopsis/Monodus*, *Tetraplekton* e *Dioxys* cujas diversas estirpes podem ser encontradas na Algoteca de Coimbra. As estirpes ACOI de *Characiopsis* são efetivamente Eustigmatophyceae e estão em vias de serem publicadas como pertencentes a novos géneros de uma nova família (Amaral *et al.*, aceite para publicação) ou a permaneceram como *Characiopsis* (Amaral *et al.*, submetido).

O género *Vischeria*, estabelecido por Pascher em 1938, cuja espécie tipo é *Vischeria stellata* (Chodat) Pascher apresenta uma morfologia globular, poliédrica irregular ou elíptica alongada com dimensões compreendidas entre 7 a 20 µm de diâmetro (Hibberd, 1981). Este género pode dispor de vários sulcos e projeções na parede celular, possui um único cloroplasto com um pirenoide poliédrico saliente (Neustupa and Nemcová, 2001), um vacúolo relativamente grande com conteúdo granular e um glóbulo vermelho facilmente visível (Hibberd, 1981; Kryvenda *et al.*, 2018). Em culturas mais envelhecidas, o glóbulo vermelho deixa de ser visível (Gao *et al.*, 2018). Pode ser encontrado em ambientes aeroterrestres como solos ou rochas (Ettl and Gärtner, 1995) ou ambientes de água doce (Eliáš *et al.*, 2017). A sua reprodução é conseguida mediante autósporos tetraédricos ou achatados ou zoósporos uniflagelados alongados com largura compreendida entre 10 e 15 µm (Hibberd and Leedale, 1972; Hibberd, 1981; Neustupa and Nemcová, 2001). Recentemente o número de espécies pertencentes a este género aumentou como resultado da união dos géneros *Eustigmatos* e *Vischeria* em um género só, *Vischeria* (Kryvenda *et al.*, 2018). A distinção destes dois géneros baseava-se inteiramente em características morfológicas que se tornaram inválidas após o estudo molecular por se saber que estas dependem do meio ambiente envolvente (Kryvenda *et al.*, 2018).

O género *Monodopsis*, estabelecido por Hibberd em 1981, abrange a espécie tipo *Monodopsis subterranea* (Petersen) Hibberd e dispõe de células esféricas, ovoides, elíticas ou cilíndricas com diâmetro menor que 10 µm, uma parede celular densa e irregular com pequenas projeções e um pirenoide profundamente cravado no seu cloroplasto (Hibberd, 1969; Hibberd, 1980). Uma característica importante na distinção deste género, não mencionada por Hibberd nos seus estudos preliminares, baseia-se na existência de uma conexão entre o retículo endoplasmático do cloroplasto e o envelope nuclear (Santos and Leedale, 1995). Este género não produz zoósporos e pode ser encontrado em ambientes terrestres (Hibberd, 1981).

O género *Nannochloropsis*, descrito por Hibberd em 1981 como pertencente à classe Eustigmatophyceae após ter sido removido das Chlorophyceae, apresenta células extremamente pequenas e estruturas celulares simples e semelhantes entre todos os elementos da sua população (Antia *et al.*, 1975; Hibberd, 1981). A espécie tipo *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd manifesta células esféricas com 2 a 4 µm de diâmetro (Hibberd, 1981), ausência de pirenoide e um núcleo situado próximo do cloroplasto com apenas um único nucléolo e, na sua parede celular ocorrem estruturas-tampão cuja função não é claramente conhecida (Santos, 1996). A sua reprodução ocorre por divisão celular (autósporos) devido ao facto deste género não produzir zoósporos (Eliáš *et al.*, 2017) e podem ser encontrados em ambientes de água salgada ou, em raros casos, ambientes de água doce (Hibberd, 1981; Suda *et al.*, 2002; Eliáš *et al.*, 2017).

O género *Microchloropsis* M.W.Fawley, I.Jameson and K.P.Fawley (2015), facilmente confundido com o género mencionado anteriormente possui na sua taxonomia a espécie tipo *Microchloropsis salina* (D.J.Hibberd) M.W.Fawley, I.Jameson and K.P.Fawley, caracterizada pelas suas pequenas células de dimensões entre 2 a 8 µm, cilíndricas ou, em raros casos, esféricas com um único cloroplasto parietal. Tal como acontece com o género *Nannochloropsis*, observa-se uma ausência de pirenoides e a reprodução ocorre por autosporos cilíndricos ou esféricos (Fawley *et al.*, 2015). A diferenciação entre *Microchloropsis* e *Nannochloropsis* é feita através do modificador *micro* e *nanno*, uma vez que o primeiro género é geralmente maior do que o segundo, respetivamente. O derivado de “*chloropsis*” mantém-se para enfatizar a estreita relação entre ambos os géneros (Fawley *et al.*, 2015).

O género *Pseudostaurastrum* Chodat (1921) cuja espécie tipo é *Pseudostaurastrum enorme* (Ralfs) Chodat (1921) caracteriza-se pelas suas células vegetativas solitárias triangulares, poliédricas ou piramidais, com 20 a 25 µm de diâmetro e paredes lisas ou ornamentadas. Na extremidade da sua forma lobada residem braços ramificados que podem atingir 12 µm de comprimento, com ou sem espinhos nos ápices, e no seu interior encontram-se numerosos cloroplastos sem pirenoide. Este género reproduz-se tanto por autosporos como por zoósporos e é encontrado em lagoas e piscinas distróficas e mesotróficas (Schnepf *et al.*, 1996).

O género *Tetraplektron* foi estabelecido em 1957 por Fott e possui como espécie tipo *Tetraplektron tribulus* (Pascher) Lobelich caracterizada pelas suas células solitárias, tetraédricas regulares ou irregulares dispostas de braços localizados nas suas extremidades de igual comprimento (Meyer *et al.*, 1970; [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). As células apresentam dimensões compreendidas entre 20 a 50 µm de comprimento e 20 a 26 µm de largura, paredes celulares geralmente delicadas, lisas ou ornamentadas e

extremidades dos braços por vezes robustas. Relativamente aos cloroplastos, estes localizam-se na porção central da célula e manifestam contornos parietais, discoides, irregulares ou em forma de fita com ausência de pirenoides ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). Quanto à sua reprodução, esta ocorre assexuadamente através de autosporulação ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)).

Um outro género pertencente à classe Eustigmatophyceae estabelecido como *Characiopsis* Borzi (1895) cuja espécie tipo é *Characiopsis minuta* (Braun) Borzi, (syn. *Pseudocharaciopsis minuta* (Braun) Hibberd), com células isoladas que podem permanecer agarradas a um substrato ou formar agregados celulares, por meio de um estipe e/ou disco de fixação (Santos, 1996). Podem ser encontradas em culturas células com diferentes morfologias desde forma ovoide, elipsoidal, fusiforme a globular com dimensões compreendidas entre (12)20(34) x (3)5(10) µm (culturas de células senescentes alcançam dimensões de 35 – 60 µm de comprimento e 10 – 20 µm de largura) e um ou mais cloroplastos parietais ou centrais (Hibberd, 1980). Estudos recentes com estirpes deste género indicam que é parafilético e, conseqüentemente, algumas das espécies estão a ser transferidas para novos géneros de uma nova família (Amaral *et al.*, em publicação), enquanto outras permanecem no género *Characiopsis* tendo sido detetado um pirenoide típico de Eustigmatophyceae nos segundos. A sua reprodução realiza-se através de zoósporos constituídos por dois flagelos distintos (Santos, 1996) e, raras as vezes, por aplanosporos ou autosporos (Ott *et al.*, 2015).

Relativamente ao género *Goniochloris* Geitler (1928), mais especificamente a espécie tipo *Goniochloris sculpta* Geitler ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)), é constituído por células com 4 a 20 µm de comprimento em forma triangular irregular achatada com três braços alongados e finos pronunciados a partir do corpo central (Krienitz *et al.*, 1993) e paredes celulares grossas regularmente ornamentadas e marcadas, ou não, por cavidades e espinhos. Os elementos pertencentes a este género, constituídos por 5 a 6 cloroplastos parietais em forma de disco, podem surgir como células solitárias ou, ocasionalmente, em grupos e reproduzem-se unicamente por autosporos (Ott *et al.*, 2015).

Por fim, o género *Dioxys* Pascher (1939) compreende a espécie tipo *Dioxys incus* Pascher e dispõe de células fusiformes, muitas vezes assemelhando-se a um triângulo achatado preso a um estipe curto. No interior das suas células é possível visualizar-se um pequeno número de cloroplastos parietais e a sua reprodução ocorre por zoósporos (Ott *et al.*, 2015).

### 1.3 Valor biotecnológico das microalgas

O interesse na área de biotecnologia de microalgas tem vindo a aumentar nos últimos anos devido aos avanços da tecnologia relacionada com o cultivo de microalgas em larga escala e à de identificação de uma vasta gama de produtos com elevado potencial comercial que podem ser processados a partir dos constituintes da sua biomassa (Tabela 1).

Tabela 1. Algumas das espécies/grupos de microalgas mais conhecidas, os seus produtos e aplicações (adaptado de Mobin and Alam, 2017).

<b>Espécie</b>	<b>Produto</b>	<b>Áreas de aplicação</b>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Proteína, $\beta$ -caroteno, ácidos gordos essenciais	Alimentação saudável, suplemento alimentar
<i>Arthrospira (Spirulina)</i>	Proteína, Vitamina B <sub>12</sub>	Cápsulas antioxidantes, sistema imunitário
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	Ficocianina, biomassa	Alimentação saudável, cosméticos
<i>Chlorella spp.</i>	Extrato de carboidratos, biomassa	Nutrição animal, bebidas saudáveis, suplemento alimentar
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extrato de carboidratos, biomassa	Alimentação saudável, suplemento alimentar, alimentos
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	DHA	Desenvolvimento do cérebro, saúde infantil e nutrição
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -caroteno, carotenoides	Alimentação saudável, suplemento alimentar, alimentos
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenoides, astaxantina	Alimentação saudável, produtos farmacêuticos, alimentos
<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos gordos	Nutrição animal
<i>Lyngbya majuscula</i>	Imunomoduladores	Farmacêutica, nutrição
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Biomassa	Alimentos para peixes marinhos larvas e juvenis
<i>Nannochloropsis sp.</i>	EPA	Suplemento Alimentar e Farmacêutico
<i>Odontella aurita</i>	Ácidos gordos, EPA	Farmacêutica, cosmética, anti-inflamatória
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Lípidos, ácidos gordos	Nutrição, produção de combustível
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polissacarídeos	Farmacêutica, cosmética
<i>Scenedesmus spp.</i>	Proteína	Aquicultura, nutrição humana

Além disso, estes microrganismos apresentam inúmeras vantagens quando comparados com outras fontes de compostos de interesse, nomeadamente as plantas (Gouveia, 2011; Kirrolia *et al.*, 2013). Ao contrário das plantas terrestres, as microalgas possuem uma maior eficácia na conversão de energia solar em biomassa (3-8% *versus* 0,5% nas plantas), elevada taxa de crescimento (1-3 duplicações por dia),

maior eficiência no sequestro de CO<sub>2</sub> e capacidade de adaptação em condições ambientais inadequadas para fins agrícolas. Estes microrganismos crescem durante todo o ano, ou seja, não dependem de períodos de crescimento sazonais, e a manipulação da sua composição química celular é facilmente concretizada através da alteração das condições de cultivo e indução de condições de stresse. Por exemplo, a carência de nutrientes, alteração do pH, temperatura, intensidade da luz, condições osmóticas, metais pesados e salinidade alteram as vias biossintéticas lipídicas e podem causar uma maior produção de lípidos neutros (principalmente TAGs), de modo a assegurar a tolerância às condições desfavoráveis envolventes (Renaud *et al.*, 1994; Klok *et al.*, 2014). Contudo, para que seja possível a sobrevivência e reprodução (produção de biomassa celular) é necessário ajustar e/ou otimizar previamente diversos fatores importantes como a temperatura, salinidade, intensidade luminosa, ciclo de luz/escuro e nutrientes disponíveis no meio de cultura de acordo com a estirpe que se pretenda cultivar, dado que diversas espécies apresentam necessidades nutricionais distintas (Das *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2013). Como mencionado anteriormente, a temperatura tem um papel importante no crescimento e composição química celular de microalgas uma vez que esta pode modificar a taxa de absorção de nutrientes e carbono, o que pode resultar numa alteração fisiológica dos organismos (Stengel *et al.*, 2011). Se a temperatura estiver dentro de um intervalo ideal, as mudanças fisiológicas sofridas podem ser vantajosas, resultando num aumento de taxa de crescimento, contudo, se a temperatura não respeitar esse intervalo adequado, a taxa de crescimento sofrerá negativamente (Gotham and Rhee, 1981).

No que diz respeito à luz incidente e ciclo de horas aplicado, estes fatores desempenham um papel fundamental na fotossíntese como fonte de energia responsável pelo crescimento fotoautotrófico (Guschina and Harwood, 2013). Porém, intensidades de luz muito altas podem resultar em fotoinibição causada por danos nas lamelas dos cloroplastos (Juneja *et al.*, 2013), o que pode ser evitado se for aplicado um ciclo escuro que permita a conversão completa dos fotões capturados em energia química (Juneja *et al.*, 2013).

A grande diversidade evolutiva e filogenética destes microrganismos tem demonstrado corresponder a uma imensa variedade de compostos químicos de interesse que são sintetizados, nomeadamente lípidos, polissacarídeos, pigmentos, proteínas, enzimas, toxinas, carotenoides, entre outros (Perez-Garcia *et al.*, 2011). A produção e comercialização destes compostos de interesse provenientes da biomassa de determinadas espécies tem contribuído para o melhoramento e enriquecimento de áreas ligadas à aquacultura, nutrição, saúde humana e animal, nutracêutica,

cosmética (Derner *et al.*, 2006; Milledge, 2011; Yaakob *et al.*, 2014), tratamento de águas residuais, produção de energia e outras (Spolaore *et al.*, 2006).

Para além da exploração de compostos de interesse, as microalgas são também utilizadas como matéria-prima para indústrias de produção de energia. Uma vez que a sua biomassa dispõe de boas propriedades de combustão, alcançando valores elevados de aquecimento em comparação com outras matérias-primas (Anbuezhian *et al.*, 2015), esta pode ser usada como matéria-prima direta para aquecimento ou pode ser convertida, através de processos químicos e físicos, em biodiesel, bio-óleo, biogás (metano e hidrogênio) e bioetanol (Lorena, 2017). A combinação de fatores como a elevada concentração de lípido total, perfil de ácidos gordos constituídos por cadeias saturadas e insaturadas com 12 a 22 átomos de carbono (Amaro *et al.*, 2011), taxa de crescimento superior a muitas outras matérias-primas de origem vegetal e propriedades importantes como a viscosidade, estabilidade oxidativa, número de cetano e características de fluxo frio (Stansell *et al.*, 2012) tornam as microalgas ótimas candidatas como matéria-prima para a sintetização de biocombustíveis de qualidade.

De facto, o biodiesel de microalgas é atualmente reconhecido como a “terceira geração de energia de biomassa” (Gressel, 2008) e “única fonte renovável de óleos que poderia satisfazer a demanda global por combustíveis de transporte” (Schenk *et al.*, 2008). Este emite menores quantidades de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e dióxido de enxofre (Delucchi, 2003), apresenta um desempenho idêntico ao do diesel proveniente do petróleo ao mesmo tempo que reduz em 78% as emissões de CO<sub>2</sub> (Sheehan *et al.*, 1998a).

#### **1.4 Biotecnologia das Eustigmatophyceae**

Neste século muitos grupos de microalgas têm vindo a ser estudados com principal foco na produção de compostos de interesse. Entre eles, a classe Eustigmatophyceae tem recebido especial atenção devido à sua capacidade de produção de metabolitos de grande interesse como os lípidos e à sua elevada produtividade. O primeiro relato de lípidos, em grande parte esteróis, provenientes de microalgas pertencentes à classe Eustigmatophyceae surgiu no ano de 1974 com a realização de um estudo focado na espécie *Monodopsis subterranea*, quando esta era ainda considerada Xanthophyceae (Mercer *et al.*, 1974). Anos mais tarde, durante a década de 80, muitos estudos direcionados essencialmente para o género de água salgada *Nannochloropsis* foram realizados com intuito de avaliar a produção de lípidos e de biomassa (Boussiba *et al.*, 1987; Sukenik *et al.*, 1989) e, em consequência dos ótimos resultados atingidos, muitos outros géneros têm sido estudados e frequentemente comparados com

*Nannochloropsis* (*N. oculata*, *N. granulata* e *N. salina*) como o caso de *Vischeria punctata*, *Vischeria helvetica*, e *Eustigmatos vischeri* (Volkman *et al.*, 1993; Gelin *et al.*, 1997).

Os organismos pertencentes a esta classe, geralmente ricos em vitaminas B, C, D e K (Liu and Lin, 2005), são usualmente destacados devido às elevadas quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) nomeadamente ácido eicosapentaenóico (EPA - C20:5  $\omega$ 3) que acumulam. Esta classe promissora para explorações biotecnológicas (Lang *et al.*, 2011) associadas a produção de biocombustíveis, produção de nutracêuticos e farmacêuticos (Lam and Lee, 2012) é também importante em diversas redes alimentares uma vez que inúmeros estudos confirmaram a importância que os ácidos gordos  $\omega$ 3 desempenham na saúde pré-natal, desenvolvimento de sistemas reprodutivo, nervosos e ótico e desenvolvimento de crianças em idade jovem (Yongmanitchai and Ward, 1991). Os seres humanos dispõem de mecanismos de conversão de certos tipos de ácidos gordos em ácidos gordos úteis para o organismo, como por exemplo na conversão de ácido linoleico (C18:2  $\omega$ 6) e ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3  $\omega$ 3) a ácido araquidónico (C20:4  $\omega$ 6), eicosapentaenóico (C20:5  $\omega$ 3) e ácido docosahexaenóico (C22:6  $\omega$ 3), respetivamente (Khozin-Goldberg *et al.*, 2011), sendo por este motivo importante a realização de uma suplementação de ácidos gordos com intuito de ajudar a prevenir uma possível deficiência dos mesmos (Surette, 2008). Uma dieta rica em  $\omega$ 3 tem sido associada à prevenção de doenças cardiovasculares, de retina, artrite e depressão (Benatti *et al.*, 2004) e aos efeitos anti-inflamatórios, vasodilatadores e agentes hipolipemiantes (Simopoulos, 1999; Giovanni and Chew, 2005).

O interesse por esta classe de microalgas iniciou-se com o estudo de *Nannochloropsis* (o género mais estudado até à atualidade). Este género rico em ácidos gordos polinsaturados, proteínas, pigmentos, carboidratos e lípido total (que pode alcançar 68% do seu peso seco) (Lubzens *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997; Harun *et al.*, 2010) encontra-se atualmente no mercado de microalgas e é intensamente utilizado como fonte de alimento em sistemas de aquacultura devido às grandes quantidades de EPA que acumula (Yaakob *et al.*, 2014). Para além do seu bom perfil lipídico, *Nannochloropsis* dispõe também de elevados níveis de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferóis (vitamina E) que podem ser usados, quando adicionados em forma de pó, para o aumento do tempo de validade e valor nutricional de certos alimentos e óleos de cozinha ao reduzir a produção de radicais livres resultantes da oxidação lipídica a altas temperaturas (Ya-Lin *et al.*, 2013).

Lubián *et al.*, (2000) destacaram o género *Nannochloropsis* no seu estudo como uma fonte promissora de carotenoides comercialmente valiosa (violaxantina,

astaxantina e cantaxantina), assim como outros autores (Tumolo, Lanfer-Marquez, Sangeetha, entre outros) realçaram o facto de este ser uma boa fonte de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, EPA (Hoffmann *et al.*, 2010), clorofila *a* e inúmeros metabolitos com atividade antimutagênica, anticancerígena e antioxidante (Tumolo and Lanfer-Marquez, 2012; Sangeetha *et al.*, 2017).

Para além deste, outros géneros pertencentes à classe Eustigmatophyceae manifestam propriedades bastante promissoras para aplicações biotecnológicas relacionadas com lípidos, como o caso de *Eustigmatos* (Zhang *et al.*, 2012), *Vischeria* (Volkman *et al.*, 1999a, b) e *Monodopsis* (Khozin-Goldberg and Cohen 2006). O género *Vischeria* possui um bom perfil de ácidos gordos (Volkman *et al.*, 1999) e carotenoides (principalmente  $\beta$ -caroteno, violaxantina e vaucheriaxantina) (Li *et al.*, 2012) para fins biotecnológicos e o seu crescimento realizado em fotobiorreatores demonstra proporcionar uma elevada produtividade de  $\beta$ -caroteno que pode ser utilizado em áreas nutracêuticas devido às diversas funções fisiológicas que este possui (Li *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016). Estirpes de *Vischeria helvetica*, *Vischeria punctata*, *Vischeria stellata*, *Eustigmatos magnus*, *Eustigmatos polyphem* e *Eustigmatos vischeri* são atualmente conhecidas como sendo boas fontes deste tipo de carotenoide antioxidante (Ahmed *et al.*, 2013) capazes de potenciar a prevenção do desenvolvimento de diversas doenças degenerativas e condições de saúde humana como por exemplo cataratas, certos tipos de cancro, artrite, distrofia muscular, problemas cardiovasculares entre outros (Ahmed *et al.*, 2013).

*Trachydiscus minutus*, um representante da classe identificado mais recentemente, dispõe também de um elevado potencial biotecnológico ao acumular grandes concentrações de ácidos gordos polinsaturados, principalmente EPA, chegando a alcançar 35,7% dos seus ácidos gordos totais. Num estudo realizado em condições de crescimento otimizadas, a produção diária de EPA deste género alcançou 88 mg/L, evidenciando desta forma *Trachydiscus minutus* como uma das mais promissoras microalgas produtoras de EPA (Řezanka *et al.*, 2010). No entanto, existem outras espécies produtoras de elevadas concentrações de EPA, como o caso de *Monodus subterranea* (Iwamoto and Sato, 1986).

Em 2017, num estudo que envolveu 33 microalgas da coleção ACOI pertencentes a diversos grupos taxonómicos verificou-se que muitas das estirpes utilizadas, nomeadamente as eustigmatofíceas *Vischeria helvetica* ACOI 299 e *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 possuíam uma capacidade antioxidante elevada, projetando desta forma a sua potencial utilização com fins biotecnológicos no futuro (Assunção *et al.*, 2017).



## 1.5 Lípidos de microalgas

Os lípidos são um grupo de compostos químicos orgânicos naturais de grande variedade estrutural constituídos principalmente por carbono, hidrogénio e oxigénio. Estes compostos solúveis em solventes hidrofóbicos (não polares) (Nelson and Cox, 2005) descritos como sendo “ácidos gordos e seus derivados, e substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a esses compostos” (Christie and Han, 2012), podem ser encontrados em todos os seres vivos como principais constituintes e desempenham funções biológicas importantes para a sua sobrevivência. Os ácidos gordos, por sua vez são compostos orgânicos simples de cadeias de hidrocarbonetos constituídas por um grupo carboxílico e uma cauda alifática (Lawrence, 2008), e são classificados com base no comprimento da sua cadeia de carbono e no número, posição e configuração das ligações duplas.

O interesse pelo estudo destes compostos químicos e funcionalmente diversificados aumentou significativamente a partir do momento em que se começou a reconhecer a importância da sua ação em diversos processos biológicos vitais em plantas, animais e microrganismos, nomeadamente no armazenamento de energia em tecidos animais e vegetais, manutenção da integridade estrutural de células, entre outros (Christie and Han, 2003; Pignolet *et al.*, 2013).

As microalgas produzem dois tipos distintos de lípidos, com base em características físico-químicas, os lípidos polares designados de lípidos membranares (fosfolípidos e glicolípidos) que se encontram armazenados nas membranas das células e os lípidos não polares designados de lípidos de reserva (lípidos neutros) (Figura 1) que são encontrados no interior de vacúolos presentes no citoplasma das células (Pignolet *et al.*, 2013).

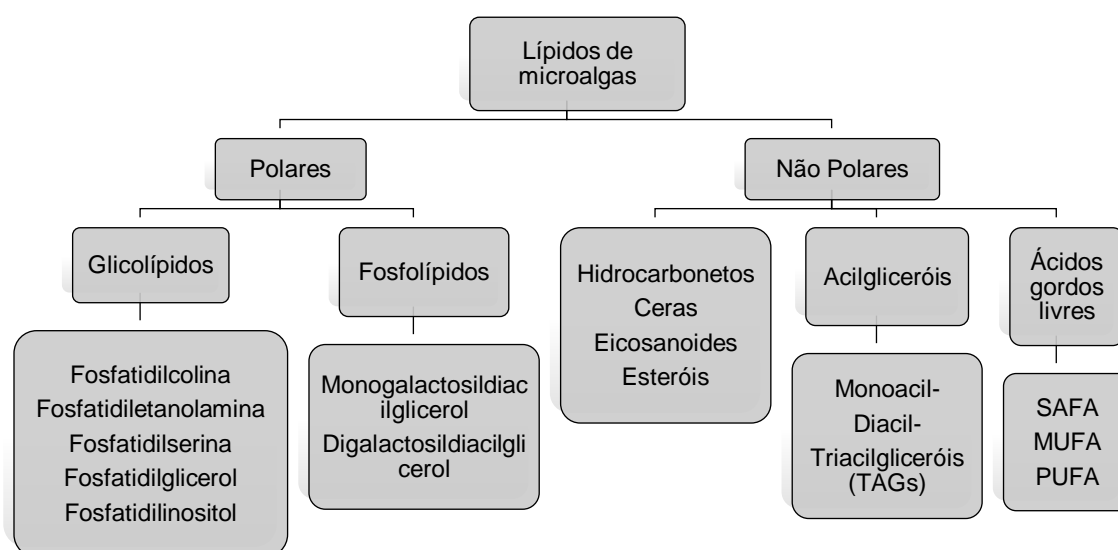


Figura 1. Diferentes classes lipídicas presentes em microalgas (adaptado de Cohen, 1999; Kumar *et al.*, 2015).

Os glicolípidos existem em baixas concentrações em animais e em grandes concentrações em membranas fotossintéticas de algas e plantas, sendo que, no caso de microalgas, os glicolípidos predominantes são os monogalactosildiacilglicerol (MGDG) (armazenados nas membranas dos tilacoides e membranas extraplastidiais) e os digalactosildiacilglicerol (DGDG) (armazenados nas membranas dos tilacoides) (Kumari *et al.*, 2013).

Relativamente aos fosfolípidos, estes podem ser encontrados como principais componentes da maior parte das membranas celulares, com exceção das membranas fotossintéticas de algas, plantas e arqueobactérias. Dentro do grupo de fosfolípidos presentes em algas, destacam-se os fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilinositol (PI) com funções biológicas importantes na manutenção da integridade estrutural e da permeabilidade seletiva das membranas (Kumari *et al.*, 2013).

Os lípidos neutros incluem os acilgliceróis, ácidos gordos livres, eicosanoides, esteróis, hidrocarbonetos e ceras esterificadas (Cohen, 1999) e a sua síntese não é um parâmetro estável devido ao facto de ser influenciada por propriedades físicas e químicas do meio como radiação, temperatura, composição do meio de cultura e fase de crescimento das células (Olofsson *et al.*, 2012). Nas microalgas, os principais constituintes dos lípidos neutros são os triacilgliceróis (TAGs) (esterificações de grupos de hidroxilo de acilgliceróis com ácidos gordos), os monoacilgliceróis e os diacilgliceróis e estes podem ser encontrados em concentrações diferentes (entre 1% a 97% do peso seco da microalga) como produtos de armazenamento ou reserva de energia, de acordo com a estirpe e as condições de crescimento aplicadas (Becker, 2004; Hu *et al.*, 2008; Huerlimann *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2013).

Os lípidos provenientes de microalgas são constituídos maioritariamente por glicerol, açúcares e/ou bases esterificadas de ácidos gordos saturados e/ou insaturados (Becker, 2004; Chacón-Lee and González-Mariño, 2010). Como foi mencionado anteriormente, estes compostos químicos orgânicos naturais desempenham funções biológicas importantes em processos moleculares de sinalização, armazenamento de energia e estruturamento de membranas celulares com capacidade de auto-organização (Voet D. and Voet J. 1995; McMurry, 2007). Como tal, a composição qualitativa e quantitativa destes compostos de enorme diversidade (Guschina and Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008) não é um parâmetro estável devido às alterações metabólicas frequentemente sofridas em consequência às dinâmicas de mudança de estratégia de adaptação ao meio ambiente envolvente que estes organismos sofrem de modo a assegurar a sua sobrevivência (Olofsson *et*

*al.*, 2012). Contudo, existem espécies ricas em lípidos denominadas de espécies oleaginosas com capacidade para acumular grandes quantidades de lípido total (Sheehan *et al.*, 1998b) que pode alcançar, em alguns casos, 90% do seu peso seco (Spolaore *et al.*, 2006). Este armazenamento substancial de lípidos está geralmente associado a uma indução de condições de estresse e/ou consumo de açúcares a uma taxa superior à taxa de formação de células, o que provoca a conversão do açúcar em excesso em lípidos (Arajo *et al.*, 2013).

Para que haja produção de lípidos é necessário haver luz, dióxido de carbono, água e nutrientes inorgânicos (nitratos, fosfatos, ferro e alguns oligoelementos), de forma a ocorrer produção de biomassa e conseqüentemente de óleos (Chisti, 2008). O azoto, um dos nutrientes mais importantes para a regulação de lípidos, pode provocar em algumas espécies de microalgas um aumento exponencial de lípidos de reserva, quando limitado (Gao *et al.*, 2016). No entanto, este aumento está geralmente associado a uma redução da taxa de crescimento celular, o que afeta indiretamente a produtividade lipídica (Converti *et al.*, 2009). Este fenômeno reflete as alterações que as microalgas sofrem em determinadas condições de crescimento como forma de sobrevivência e adaptação.

Na tabela 2 são indicados alguns exemplos de produtividade lipídica, produtividade de biomassa e conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas.

Tabela 2. Conteúdo e produtividade lipídica e de biomassa de diversas espécies de microalgas (adaptado de Mata *et al.*, 2010).

<b>Espécie</b>	<b>Conteúdo lipídico (% peso seco)</b>	<b>Produtividade lipídica (mg/L/dia)</b>	<b>Produtividade de biomassa (g/L/dia)</b>
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0-31,0	-	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	0,02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6-39,8	17,6	0,04
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7	0,23-1,47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20
<i>Chlorella sp.</i>	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	0,28
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67,0	33,5	-
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	47,3	0,17
<i>Monodus subterraneus</i>	16,0	30,4	0,19
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0	0,37-0,48

<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0	-
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4	0,16
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0-60,7	34,8	0,36-1,50
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26
<i>Skeletonema</i> sp.	13,3-31,8	27,3	0,09
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5-51,3	17,4	0,08
<i>Tetraselmis</i> sp.	12,6-14,7	43,4	0,30

### 1.5 Contextualização e objetivos

A Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) é uma unidade de investigação que reúne a maior coleção de microalgas de água doce e microalgas pertencentes à classe Eustigmatophyceae a nível mundial. Esta abrange aproximadamente 4000 estirpes distintas de diversas classes de modo a proporcionar um recurso científico único de biodiversidade (Santos and Santos, 2004) com cerca de 80 estirpes Eustigmatophyceae. A longevidade e manutenção desta grande coleção são realizadas através de sub-cultivos de rotina e aplicação de metodologias desenvolvidas para a criopreservação (Osório *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2013). Na sequência de estudos focados na atividade antioxidante (Assunção *et al.*, 2014), determinação da composição lipídica (Assunção *et al.*, 2015), polissacarídeos (Ferreira *et al.*, 2016), rastreio de extratos para análise de atividade antibiótica e antibiofilme (Amaral *et al.*, 2016), determinação da composição lipídica de sistemas de cultivo unialgal e misto (Correia, 2016), caracterização quimiotaxonômica através de RMN (Iglesias *et al.*, 2019) e benefícios nutricionais do consumo de microalgas (Assunção *et al.*, 2019) realizados pelo grupo de ficologia da Algoteca de Coimbra, o presente estudo teve como objetivo a determinação da produção de biomassa, lípido total e frações lipídicas de 14 estirpes de microalgas pertencentes à classe Eustigmatophyceae em condições autotróficas. Para tal foram selecionadas as seguintes estirpes representativas de cada género presente na coleção: *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424, *Dioxys* sp. ACOI 2029, *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *Goniochloris sculpta* ACOI 1852, *Monodopsis subterranea* SAG 848-1, *Monodopsis unipapilla* SAG 8.83, *Monodopsis* sp. SAG 4769ni, *Monodopsis unipapilla* ACOI 2938, *Microchloropsis gaditana* CCMP 1775, *Microchloropsis salina* SAG 40.85, *Nannochloropsis oculata* SAG 38.85, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni, *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni e *Vischeria helvetica* ACOI 299. Para cada estirpe foi estudada a produção de biomassa após 10 e 30 dias de cultivo em condições controladas e não otimizadas, o lípido total extraído e quantificado e as diferentes frações lipídicas identificadas.



## **2. Material e métodos**



## 2.1 Estabelecimento e crescimento das culturas de microalgas

Para a realização deste estudo foram selecionadas 14 estirpes de microalgas Eustigmatophyceae que se encontram armazenadas na coleção ACOI há mais de 20 anos. Cinco estirpes pertencem à coleção “Culture Collection of Algae at Göttingen University” (SAG) (<https://www.sagdb.uni-goettingen.de>), oito à “Algoteca da Universidade de Coimbra” (ACOI) (<https://www.acoi.ci.uc.pt>) e uma proveniente da Bigelow National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) (<https://ncma.bigelow.org>) (Tabela 3).

Tabela 3. Estirpes estudadas, local de colheita e meio de cultura usado.

Espécie	Número da estirpe	Local de colheita	Meio de cultura
<i>Characiopsis aquilonaris</i>	ACOI 2424	Rabaçal, Lagoa de Chança, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Dioxys</i> sp.	ACOI 2029	Caramulo, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Eustigmatos</i> sp. (sin. <i>Vischeria</i> )	ACOI 4864ni	Madeira, levada	M7, pH 7.2-7.6
<i>Goniochloris sculpta</i>	ACOI 1852	Rabaçal, Lagoa de Chanca, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Monodopsis</i> sp. (como <i>Monodus</i> na coleção)	ACOI 4769ni	Abrantes, Campo Militar de Santa Margarida, Lagoa da Murta, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Monodopsis subterranea</i>	SAG 848-1	Connecticut, rio em Marion, EUA	M7, pH 7.2-7.6
<i>Monodopsis unipapilla</i>	SAG 8.83	Alpes de Venoste, Hochwilde, Tyrol, Áustria	M7, pH 7.2-7.6
<i>Monodopsis unipapilla</i> (como <i>Monodus</i> na coleção)	ACOI 2938	Abrantes, Campo Militar de Santa Margarida, Barragem do Carvalhoso, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Microchloropsis gaditana</i> (sin. <i>Nannochloropsis</i> )	CCMP 1775	Baía de Cádiz, Cádiz, Espanha	F/2, 20ppm, pH 8.4-8.8
<i>Microchloropsis salina</i> (sin. <i>Nannochloropsis</i> )	SAG 40.85	Skate Point, Ilha do Cumbrae, Escócia, Reino Unido	F/2, 35ppm, pH 8.4-8.8
<i>Nannochloropsis oculata</i>	SAG 38.85	Skate Point, Ilha do Cumbrae, Escócia, Reino Unido	F/2, 20ppm, pH 8.4-8.8
<i>Pseudostaurastrum</i> sp.	ACOI 2419ni	Açude da Argolada, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
<i>Tetraplekton</i> sp.	ACOI 2650ni	Barragem do Vale do Rossim, Serra da Estrela, Portugal	M7, pH 7.2-7.6



<i>Vischeria helvetica</i>	ACOI 299	Serra do Gerês, Lagoa do Marinho, Portugal	M7, pH 7.2-7.6
----------------------------	----------	---	----------------

O crescimento das culturas foi realizado e monitorizado em condições controladas de  $51 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de intensidade luminosa (recorrendo a lâmpadas OSRAH Cool White L 36W/ 20 Hellweiss), fotoperíodo de 16:8 horas de luz/escuro e uma temperatura de  $23^\circ\text{C}$  durante 10 e 30 dias. Para garantir um inóculo inicial controlado foram estabelecidas culturas-mãe em balões Erlenmeyer de 5 L mediante a diluição de 1 L de cultura densa com 1 L de meio de cultura fresco (1:1 v/v) e, após 5 dias de crescimento, adicionaram-se 2 L de meio de cultura fresco aos 2 L de cultura-mãe previamente preparados (1:1 v/v) e incorporou-se um sistema de borbulhamento de ar (0,5-1 L/min) nas condições descritas anteriormente.

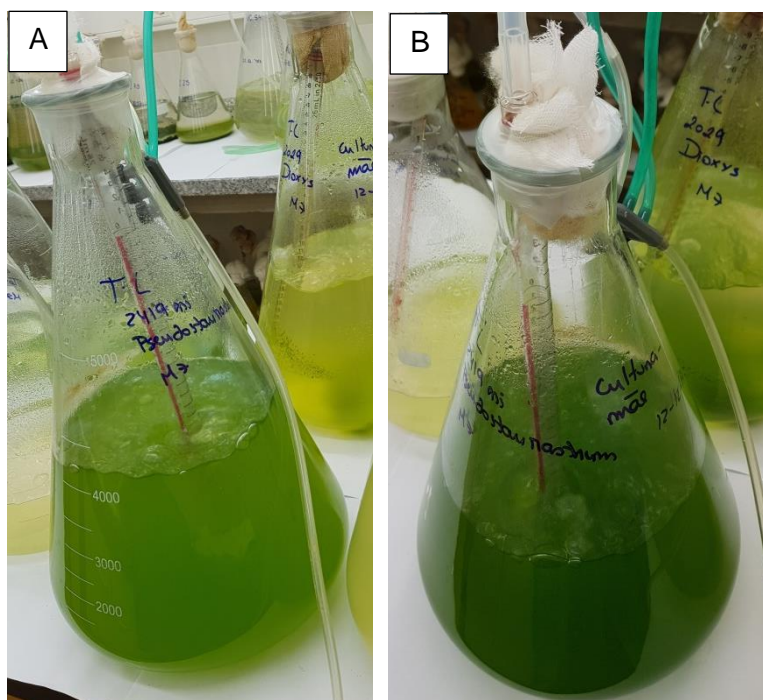


Figura 2. Crescimento de biomassa realizado em balões Erlenmeyer de 5L sob condições controladas. A) Cultura em estado exponencial, ao fim de 10 dias de crescimento; B) Cultura em estado estacionário, ao fim de 30 dias de crescimento.

De modo a garantir a ausência de contaminantes e o bom estado fisiológico das células, realizaram-se observações de amostras ao microscópio no início e no final do estudo.

Os meios de cultura usados para crescimento da biomassa foram os meios M7 (adaptado de Schlösser, 1994) (Tabela 4) e F/2 (adaptado de Guillard and Rytner, 1962; Guillard, 1975) (Tabela 5), este último com diferentes salinidades.

Tabela 4. Composição química do meio de cultura M7 usado no crescimento das microalgas em estudo; quantidades indicadas requeridas para a preparação de 1 L de meio (adaptado de Schlösser, 1994).

Soluções	Solução concentrada (g/100mL)	M7 (mL)
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1%	10
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,1%	10
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,2%	5
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	Solução saturada	10
<b>Extrato de terra</b>		20
<b>Extrato de <i>Sphagnum</i></b>		10
<b>Micronutrientes</b>		5
<b>Água destilada</b>		1
<b>Vitamina B<sub>12</sub></b>	5 x 10 <sup>-6</sup> g/L	1

A solução de micronutrientes presente no meio M7 (Tabela 4) é composta por sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) a 0,1% (1 mL/L), sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O) a 0,1% (2 mL/L), ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) a 0,2% (5 mL/L), nitrato de cobalto hexahidratado (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) a 0,02% (5 mL/L), molibdato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) a 0,02% (5 mL/L), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) a 0,0005% (1 mL/L), EDTA (0,8 g/L) e sulfato de ferro heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (0,7 g/L). O extrato de terra foi preparado a partir de 200 g de terra composta por baixo teor em húmus, adubos ou outros agentes químicos em 1 L de água destilada fervida durante 1 hora. De seguida, filtrou-se a mistura com recurso a um filtro de papel e algodão hidrófilo e procedeu-se à sua centrifugação e autoclavagem durante 1 hora a 120°C e 1 bar de pressão ao longo de três dias consecutivos.

Em relação ao extrato de *Sphagnum*, este foi preparado a partir de 250 g de *Sphagnum* colocado em 7,5 L de água destilada ao longo da noite e posteriormente fervido durante uma hora. Já arrefecida, a mistura foi filtrada com auxílio de um filtro de papel e algodão hidrófilo e por fim autoclavada durante 1 hora a 120 °C e 1 bar de pressão no decorrer de três dias seguidos.

Ao contrário do meio M7, o meio F/2 foi preparado com concentrações de sal adequadas às estirpes de água salgada e salobra em estudo (Tabela 5), mais

concretamente 35 ppm e 20 ppm de salinidade respetivamente, recorrendo a sal de aquário (Tropical Marine Salt).

Tabela 5. Composição química do meio F/2, usado para o crescimento das microalgas em estudo, sendo indicadas as quantidades requeridas para preparação de 1 L de meio.

Soluções	Solução concentrada (g/L)	F/2 (mL/L)
NaNO <sub>3</sub>	75	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5	1
Solução de micronutrientes		1
Água salina		996,5
Solução de vitaminas		0,5

A solução de micronutrientes usada para a preparação do meio F/2 foi elaborada a partir de cloreto de ferro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) (3,15 g/L), EDTA disódico (Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) (4,36 g/L), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) (9,8 mg/L), molibdato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) (6,3 mg/L), sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (22 mg/L), cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) (10 mg/L) e cloreto de manganês tetrahidratado (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) (180 mg/L). Por último, a solução de vitaminas foi preparada com base em 200 mg de tiamina (vitamina B1) a  $2,96 \times 10^{-7}$  M e 10 mL de biotina (vitamina B7) a  $2,05 \times 10^{-9}$  M.

Todos os meios de cultura utilizados ao longo do estudo foram previamente esterilizados em autoclave (Uniclave 88) durante 20 minutos, a 120°C de temperatura e 1 bar de pressão. O pH do meio foi controlado antecipadamente à sua utilização entre valores de 7,2 a 7,6 para o meio M7 e 8,4 a 8,8 para o meio F/2, de modo a evitar grandes variações que poderiam resultar em alterações nas culturas.

## 2.2 Análise do crescimento das culturas

Para a avaliação do crescimento de 5 das 14 estirpes estudadas, foi realizada a monitorização da sua densidade celular ao longo de 30 dias em balões Erlenmeyer de 5 L nas condições descritas anteriormente. Nos dias 0, 2, 5, 9, 13, 16, 19, 23, 26 e 30 foram retiradas amostras de 1 mL de cultura e, de seguida, realizou-se a respetiva contagem do número de células viáveis com auxílio de um hemocítmetro, em triplicado (Figura 3). Calcularam-se as médias e os desvios-padrão e aplicaram-se as fórmulas adequadas para a determinação da densidade celular de cada cultivo (cel/mL).

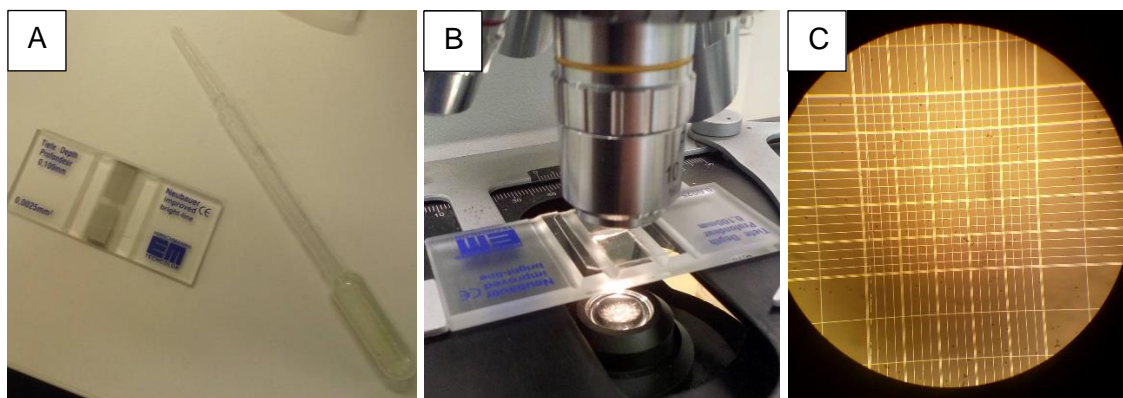


Figura 3. Contagem do número de células viáveis presentes em 1 mL de amostra com recurso a um hemocitômetro e microscópio ótico. A) Hemocitômetro e pipeta com 1 ml de cultura; B) Hemocitômetro na platina do microscópio ótico; C) Matriz do hemocitômetro ampliada 100 vezes.

### 2.3 Análise da produção de biomassa

A produção de biomassa foi determinada por duas metodologias diferentes, peso seco (g/L) e densidade celular (cél/mL), no início (dia 0) e no final do cultivo (dia 10 ou 30), em triplicado. Para a determinação do peso seco, foram filtrados 10 mL de cultura com recurso a filtros de fibra de vidro (Wathman GF/C 47 mm) previamente pesados e um sistema de filtração de Buchner (Figura 4). Após a filtração e posterior lavagem com 10 mL de água destilada, os filtros foram colocados a secar numa estufa a 60°C de temperatura e, por fim, o peso da biomassa foi calculado subtraindo o peso inicial ao peso final do filtro.

Para o cálculo da produção de biomassa ao fim de 10 e 30 dias foi subtraído o peso da biomassa obtida no início do cultivo (dia 0) ao peso obtido no final do mesmo (dia 10 ou 30) e os resultados apresentados em g/L.

A densidade celular (cel/mL) foi registada por contagem do número de células utilizando um hemocitômetro, em triplicado, como referido anteriormente. Para o cálculo da produção de biomassa conseguida ao fim de 10 e 30 dias, foi subtraído o número inicial de células viáveis presentes na amostra ao número final (dia 10 ou 30) de células e os resultados foram apresentados em cél/mL.

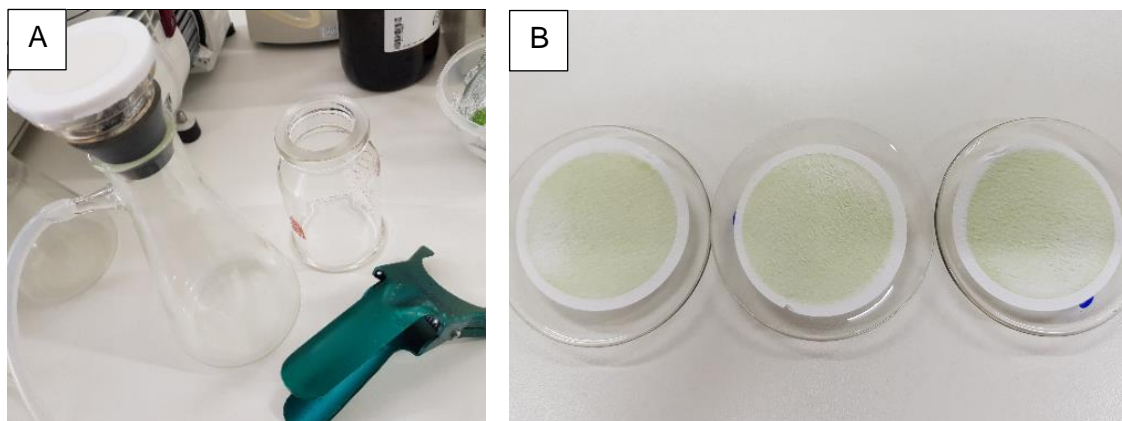


Figura 4. Determinação da biomassa produzida através do método baseado em peso seco. A) Sistema de filtração de Buchner com vácuo; B) Biomassa filtrada sobre filtros de papel expostos em vidros de relógio, em triplicado.

## 2.4 Extração e quantificação do lípido total (LT)

Após o cultivo em balões Erlenmeyer de 5 L nas condições mencionadas anteriormente, recolheu-se a biomassa produzida ao fim de 10 e 30 dias, por centrifugação durante 15 minutos a 4500 rpm e, após o seu congelamento e liofilização (Scanvac Coolsafe), extraiu-se e quantificou-se o lípido total obtido segundo o método de Gao *et al.*, (2016) com algumas modificações, em triplicado (Figura 5).

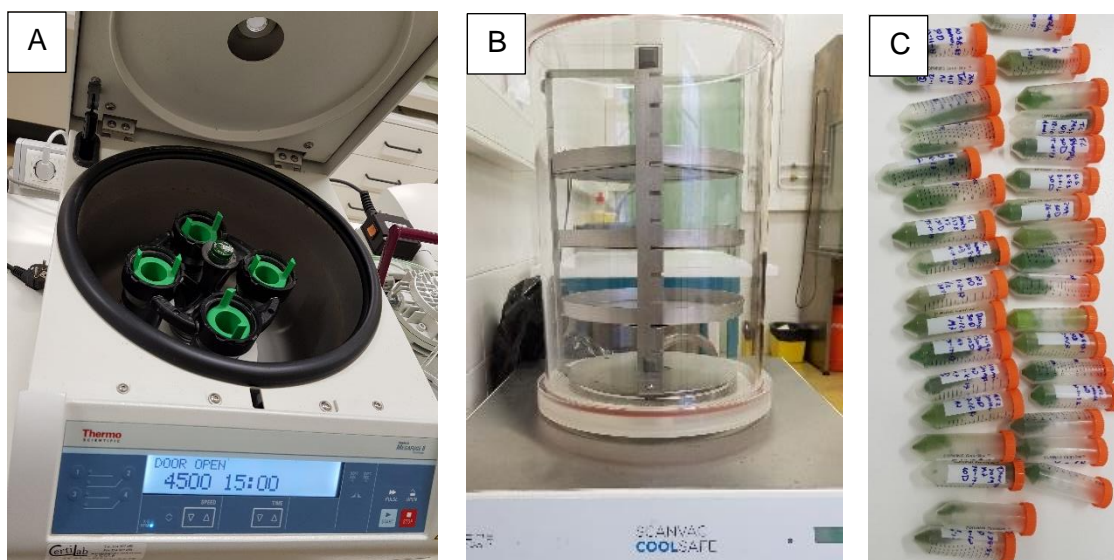


Figura 5. Imagens representativas da metodologia para obtenção de biomassa liofilizada. A) Centrifugação; B) Liofilização; C) Biomassa liofilizada.

A extração lipídica foi concretizada em amostras de 150 mg de biomassa liofilizada. À amostra foram adicionados 0,5 mL de DMSO e, posteriormente, colocou-



se a mistura em banho-maria a 70°C durante 10 minutos. De seguida, adicionaram-se 4,5 mL de metanol, manteve-se a amostra a 4°C durante 1 hora, centrifugou-se a mesma durante 5 minutos a 4500 rpm e recolheu-se o sobrenadante. Seguidamente adicionou-se uma solução composta por 15 mL de éter dietílico: hexano: água 1:1:1 (v/v/v) ao pellet resultante dos processos anteriores, manteve-se a mistura a uma temperatura de 4°C durante 1 hora, centrifugou-se a mesma durante 5 minutos a 4500 rpm e recolheu-se a fase superior do sobrenadante (Figura 6). Este passo foi repetido até total extração do lípido, levando em média 5 repetições do processo, e os sobrenadantes combinados.

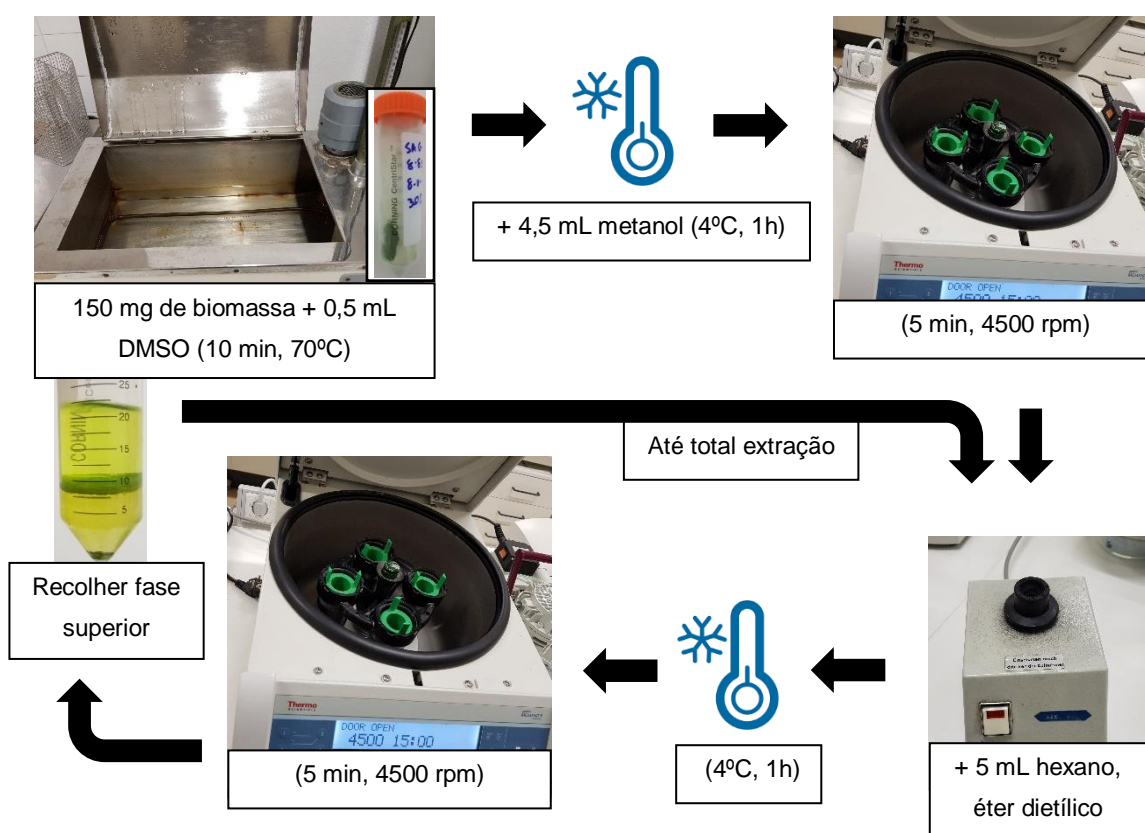


Figura 6. Esquema simplificado referente ao processo de extração lipídica realizado em 150 mg de biomassa previamente liofilizada.

Por fim, os sobrenadantes combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-300) (Figura 7), ressuspensos em clorofórmio, transferidos para eppendorfs previamente pesados, concentrados com auxílio de uma centrífuga speed-vac (Gyrozen MiniVac) e, por último, secos no liofilizador. Após a liofilização das amostras, calculou-se a quantidade de lípido total produzido subtraindo o peso inicial do eppendorf vazio ao peso final do mesmo e os resultados foram apresentados em % de biomassa seca (% BS).

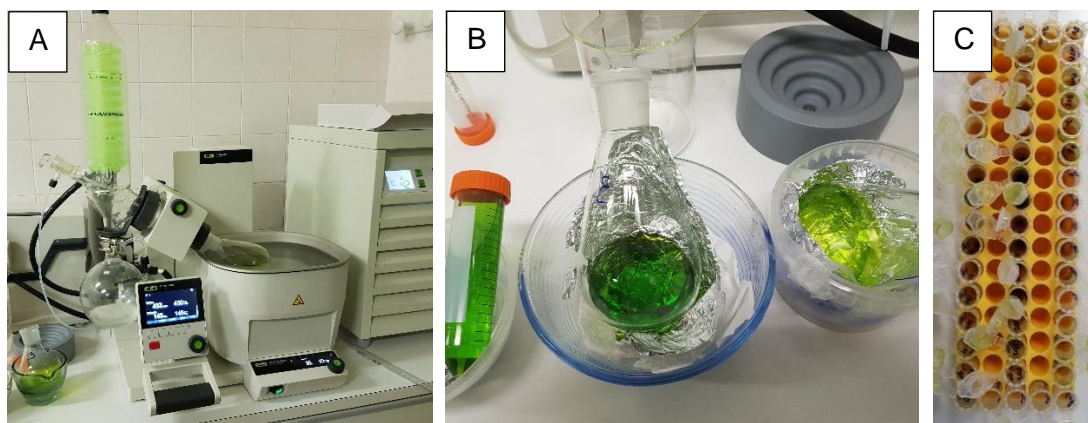


Figura 7. Imagens representativas da metodologia correspondente à evaporação dos sobrenadantes recolhidos. A) Evaporador rotativo Buchi Rotavapor R-300; B) Amostra antes e depois da evaporação; C) Lípido total concentrado no interior de eppendorfs.

## 2.5 Análise das produtividades de lípido total

A produtividade lipídica de cada estirpe de microalga em estudo foi determinada utilizando a equação adotada por Gao *et al.*, (2016), em que Px representa a produtividade lipídica, BS é o peso seco, Cx é o conteúdo de lípido total e t é o tempo de cultura:

$$Px \text{ (g/L/d)} = (BS \text{ (g/L)} \times Cx \text{ (\% BS)}) / t \text{ (d)}.$$

## 2.6 Separação e quantificação das frações lipídicas

Após a extração do lípido total, procedeu-se ao seu fracionamento com intuito de separar e quantificar as três grandes classes lipídicas presentes nas microalgas, nomeadamente os lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos. Esta separação foi concretizada segundo a metodologia de extração de fase sólida (SPE) descrita por Christie (1982) (Figura 8). Para tal, preparou-se antecipadamente uma coluna com 1 g de sílica gel de 60 Å e 5 mL de clorofórmio, ressuspendeu-se o lípido total no mínimo volume de clorofórmio e, de seguida, inseriu-se a mistura no topo da coluna. Posteriormente, a separação foi iniciada através da adição de 10 mL de clorofórmio de modo a eluir os lípidos neutros, seguindo-se de 10 mL de acetona para eluição dos glicolípidos e, por fim, 10 mL de metanol para eluição dos fosfolípidos. Cada fração lipídica recolhida foi evaporada no evaporador rotativo, ressuspensa em clorofórmio, transferida para eppendorfs previamente pesados e identificados, concentrada com recurso a uma centrífuga speed-vac e por fim seca num liofilizador. O cálculo de cada fração lipídica foi determinado através da subtração do peso inicial do tubo eppendorf vazio ao peso final do mesmo e os resultados foram apresentados em % de lípido total (% LT).

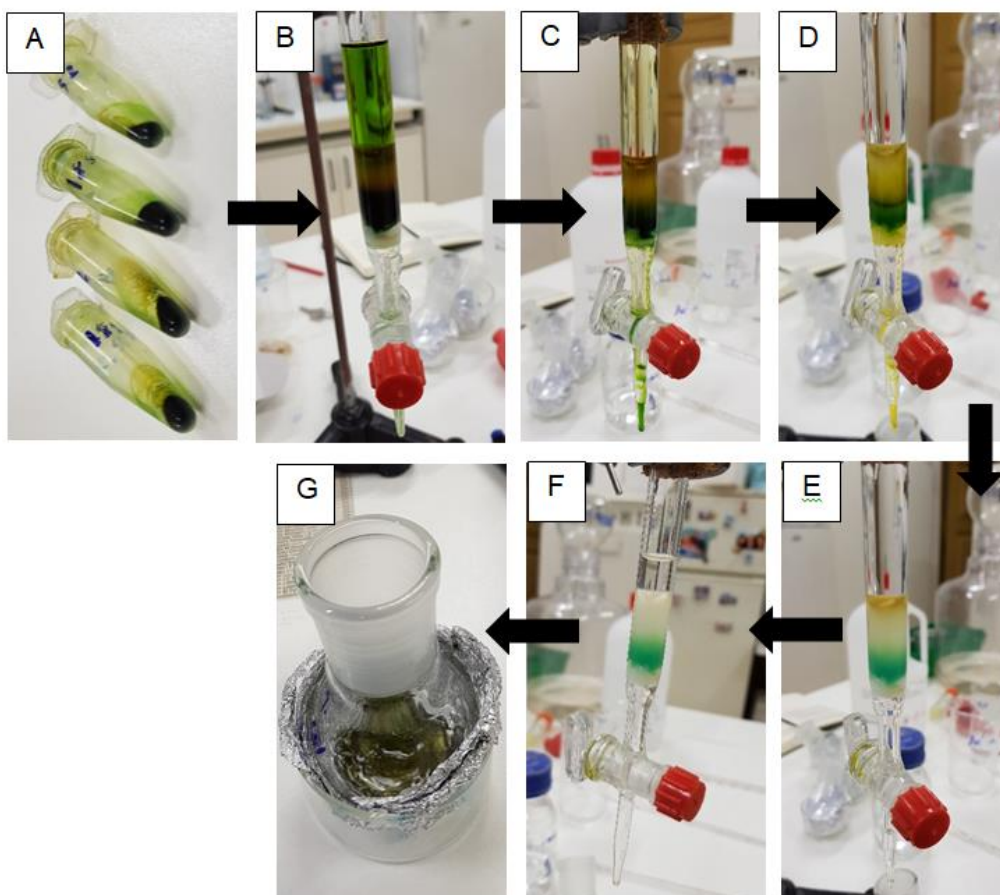


Figura 8. Imagens representativas da metodologia de separação das frações lipídicas do lípido total. A) Lípido total concentrado em eppendorfs; B) Lípido total ressuspensionado em clorofórmio e inserido na coluna com sílica gel; C) Separação dos lípidos neutros; D) Separação dos glicolípidos; E) Separação dos fosfolípidos; F) Coluna após eluição de todas as frações lipídicas; G) Fração lipídica armazenada em balão de evaporação.

## 2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica Statsoft Statistica v13.3 EN mediante a análise de variâncias, ANOVA de uma via e ANOVA fatorial, com um nível de probabilidade de 5% ( $p < 0,05$ ) selecionado antecipadamente com intuito de demonstrar as diferenças estatisticamente significativas. De seguida, procedeu-se ao tratamento de dados com o teste de comparações múltiplas, teste de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$  e nível de rejeição de  $p < 0,01$ .





### **3. Resultados**



### 3.1 Crescimento de culturas baseado em densidade celular (cél/mL)

O crescimento das culturas de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *G. sculpta* ACOI 1852, *M. gaditana* CCMP 1775, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni e *V. helvetica* ACOI 299 foi monitorizado através da determinação da densidade celular.

A curva de crescimento de *C. aquilonaris* ACOI 2424 (Figura 9) iniciou-se com  $1,78 \times 10^6 \pm 2,31 \times 10^5$  cél/mL. Do dia 0 ao dia 2 observa-se uma fase de latência em que o número de células se mantém ( $p < 0,05$ ), sucedendo-se uma fase exponencial de crescimento entre os dias 2 e 9 com um aumento de 10x do número de células, atingindo  $1,93 \times 10^7 \pm 5,35 \times 10^5$  cél/mL no 9º dia. De seguida observa-se uma fase estacionária que começa no dia 9 e acaba no dia 30 ( $p < 0,05$ ), terminando com  $1,97 \times 10^7 \pm 6,25 \times 10^5$  cél/mL.

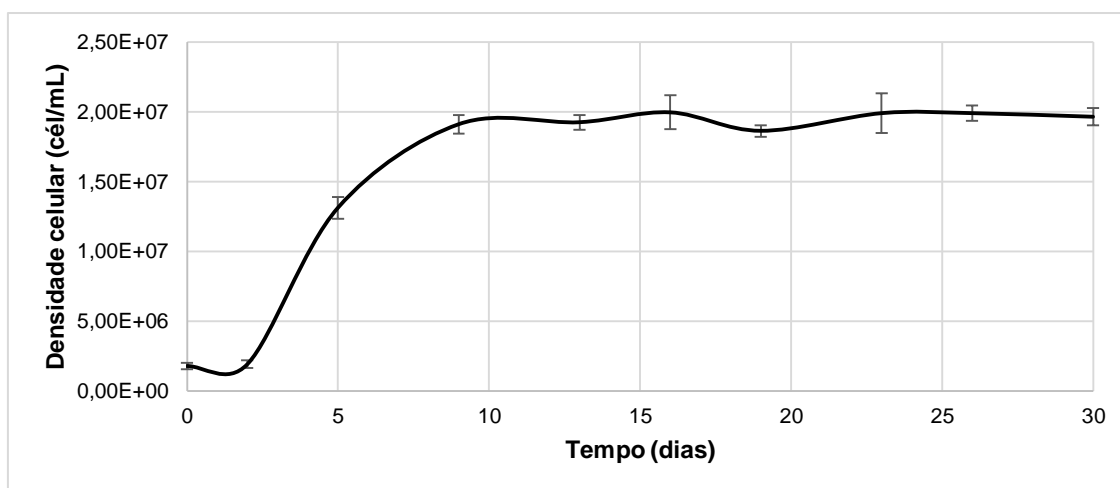


Figura 9. Crescimento de *C. aquilonaris* ACOI 2424 estimado com base na densidade celular (cél/mL) em condições de crescimento controladas.

Em *G. sculpta* ACOI 1852 (Figura 10) a curva de crescimento iniciou-se com  $2,19 \times 10^4 \pm 6,81 \times 10^3$  cél/mL. Do dia 0 ao dia 5 observa-se uma fase de latência em que o número de células mantém-se constante ( $p < 0,05$ ), seguindo-se uma fase exponencial de crescimento do dia 5 ao dia 13 onde aumenta 85x o número de células, atingindo  $4,36 \times 10^7 \pm 4,07 \times 10^6$  cél/mL no 13º dia. De seguida observa-se uma fase estacionária do dia 13 ao dia 23 precedida por uma fase de declínio ( $p < 0,05$ ) com acentuada diminuição do número de células, terminando com  $4,01 \times 10^7 \pm 1,94 \times 10^6$  cél/mL.

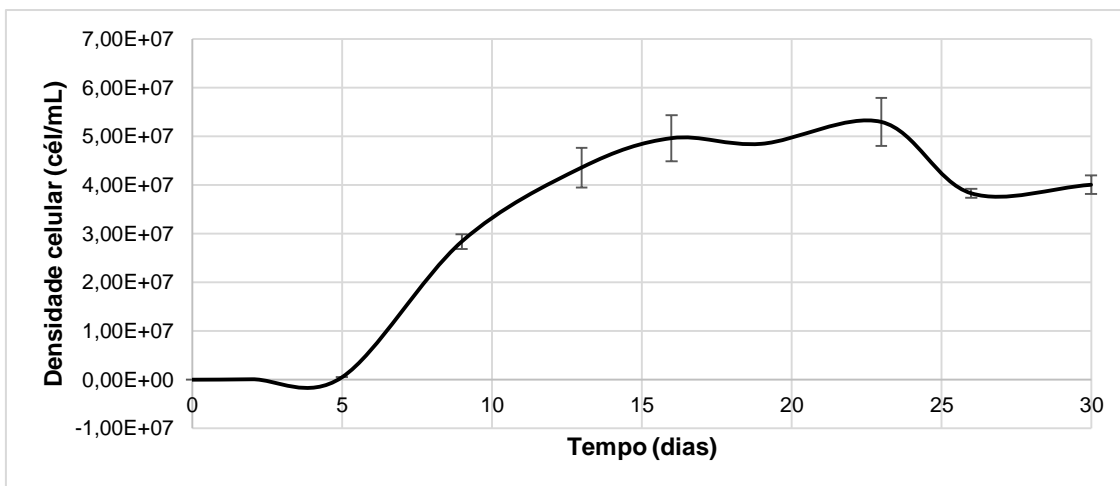


Figura 10. Crescimento de *G. sculpta* ACOI 1852 estimado com base na densidade celular (cél/mL) em condições de crescimento controladas.

Relativamente a *M. gaditana* CCMP 1775 (Figura 11), este cultivo inicia-se com  $1,60 \times 10^7 \pm 7,32 \times 10^5$  células/mL em fase exponencial de crescimento ( $p < 0,05$ ). Ao 5º dia o cultivo atinge o pico máximo de densidade celular com  $2,53 \times 10^7 \pm 8,53 \times 10^5$  células/mL, aumentando desta forma 1,6x o seu número de células por mL ( $p < 0,05$ ). Após a fase exponencial de crescimento, segue-se a fase estacionária até ao último dia de cultivo, dia 30, ( $p < 0,05$ ) com densidade celular final de  $2,30 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^5$  células/mL.

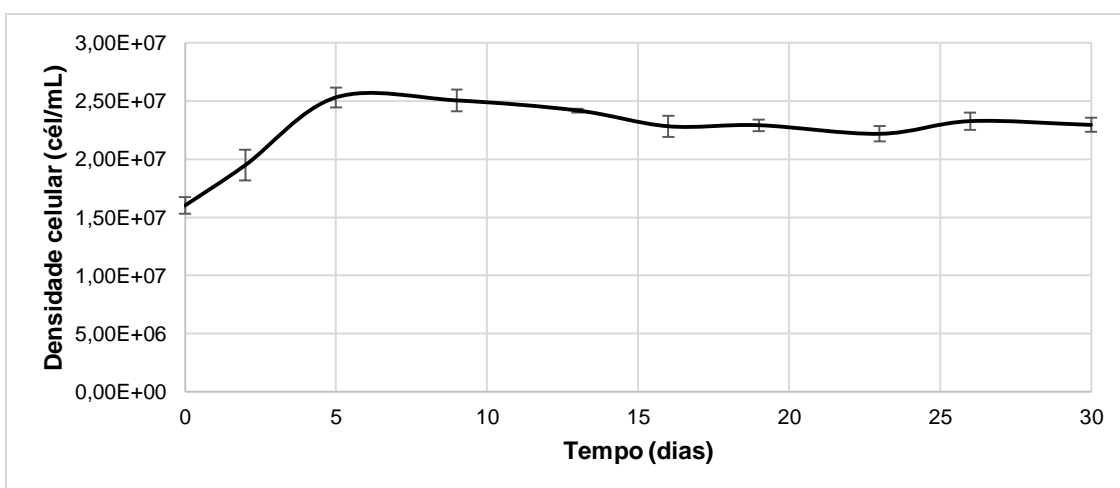


Figura 11. Crescimento de *M. gaditana* CCMP 1775 estimado com base na densidade celular (cél/mL) em condições de crescimento controladas.

Em *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni (Figura 12), a curva de crescimento iniciou-se com  $2,12 \times 10^5 \pm 3,01 \times 10^4$  células/mL. Entre os dias 0 e 5 verifica-se uma fase de latência em que o número de células não sofre um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), seguindo-se uma fase exponencial de crescimento do dia 5 ao dia 9 onde ocorre um

aumento de 2x do número de células, atingindo  $8,72 \times 10^5 \pm 5,39 \times 10^4$  cél/mL no ponto 9. Posteriormente observa-se uma fase estacionária do dia 9 ao dia 30 ( $p < 0,05$ ) com densidade celular final de  $9,30 \times 10^5 \pm 4,36 \times 10^4$  cél/mL.

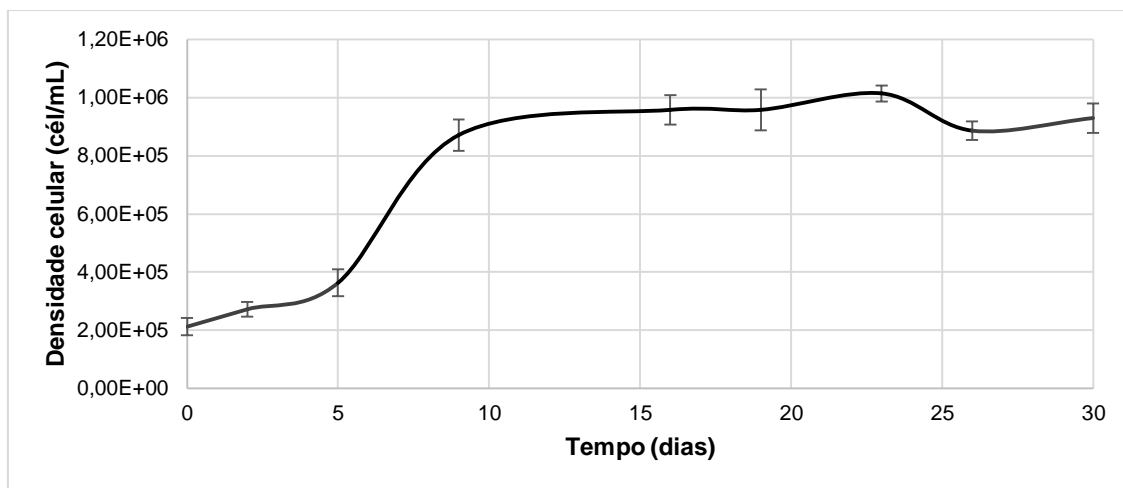


Figura 12. Crescimento de *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni estimado com base na densidade celular (cél/mL) em condições de crescimento controladas.

Por último, a curva de crescimento de *V. helvetica* ACOI 299 (Figura 13) iniciou-se com  $1,30 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^3$  cél/mL, mantendo-se com o número de células constante ( $p < 0,05$ ) entre os dias 0 e 5, momento a partir do qual ocorre uma fase exponencial com aumento de 26x do número de células até ao dia 13 onde atinge um pico máximo de  $9,13 \times 10^6 \pm 6,72 \times 10^5$  cél/mL. Esta fase exponencial é seguida por uma fase estacionária até ao dia 30 ( $p < 0,05$ ), terminando com densidade celular final de  $7,68 \times 10^6 \pm 1,02 \times 10^6$  cél/mL.

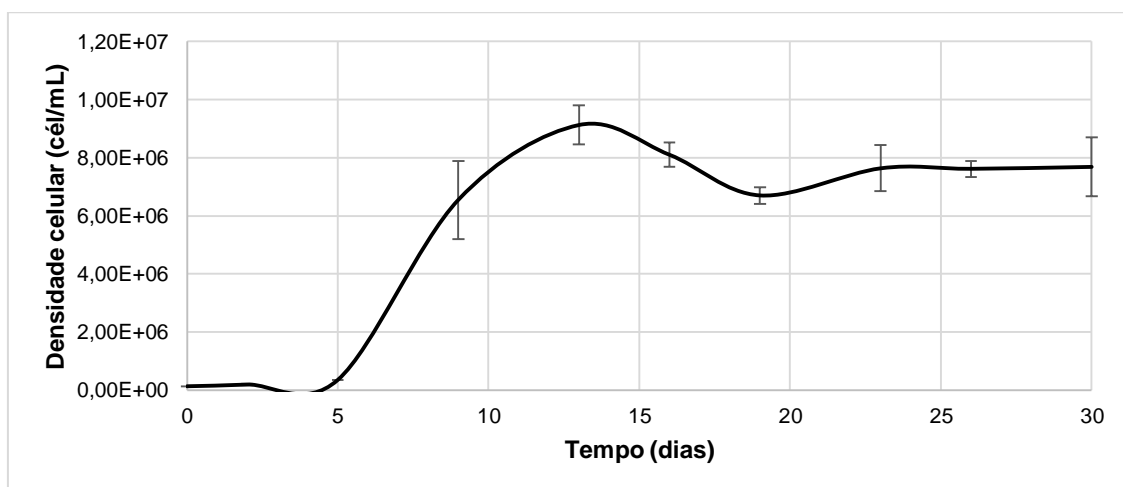


Figura 13. Crescimento de *V. helvetica* ACOI 299 estimado com base na densidade celular (cél/mL) em condições de crescimento controladas.

### 3.2 Produção de biomassa

#### 3.2.1 Produção de biomassa a 10 e 30 dias estimado com base em peso seco (g/L)

A produção de biomassa das 14 culturas analisadas neste estudo foi avaliada por dois métodos distintos a 10 e 30 dias, um baseado em peso seco e outro baseado em densidade celular.

A produção de biomassa estimada com base no peso seco (Figura 14) mostrou ser maior ao fim de 30 dias de cultivo para todas as estirpes estudadas ( $p < 0,05$ ). A 10 dias de cultivo (Figura 14) a produção de biomassa variou entre  $0,05 \pm 0,02$  e  $0,38 \pm 0,02$  g/L, sendo a estirpe *G. sculpta* ACOI 1852 a que apresentou maior produção de biomassa ( $0,38 \pm 0,02$  g/L) ( $p < 0,05$ ). Os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ) correspondem às estirpes *M. gaditana* CCMP 1775 ( $0,14 \pm 0,01$  g/L), *M. salina* SAG 40.85 ( $0,14 \pm 0,03$  g/L), *N. oculata* SAG 38.85 ( $0,12 \pm 0,04$  g/L), *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni ( $0,10 \pm 0,02$  g/L) e *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni ( $0,05 \pm 0,02$  g/L).

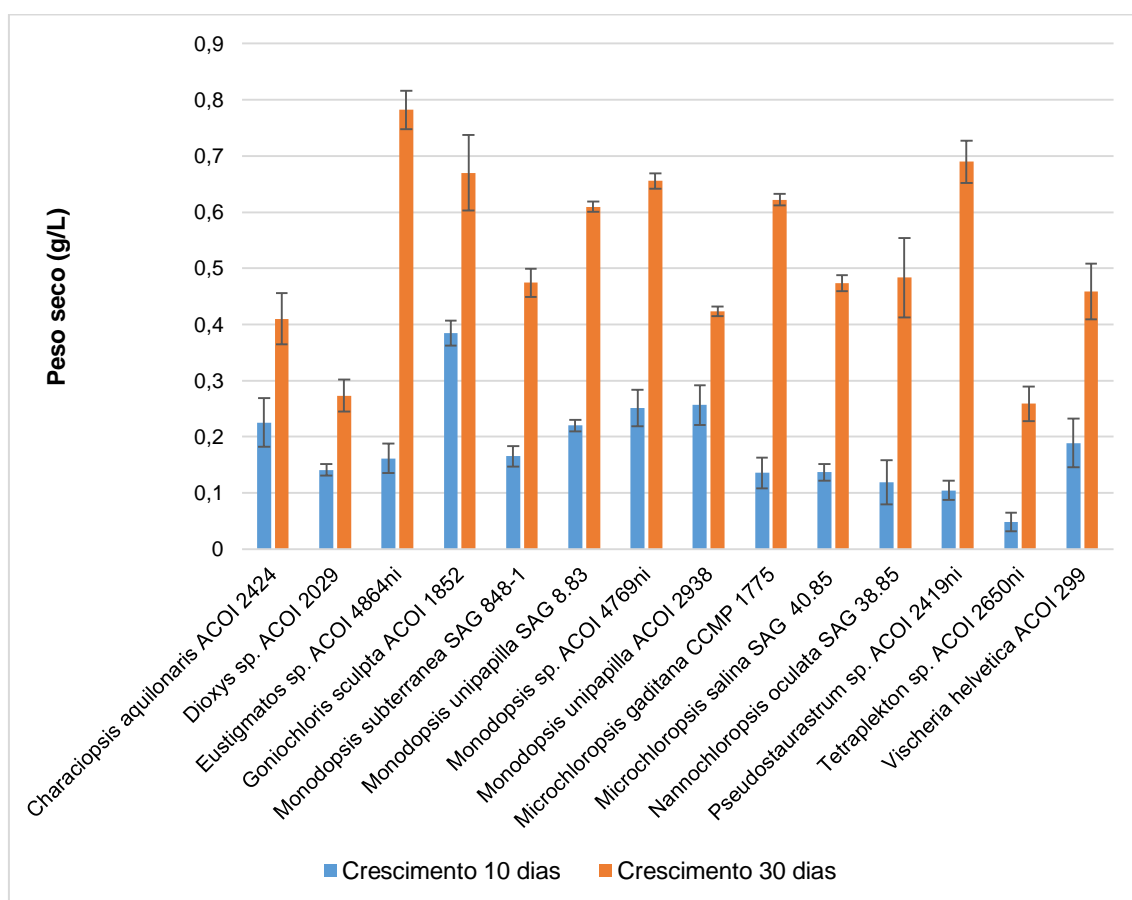


Figura 14. Produção de biomassa estimada com base no peso seco (g/L) ao fim de 10 e 30 dias de cultivo em condições de crescimento controladas.

Dentro do género *Monodopsis*, as estirpes que apresentaram valores mais altos ( $p < 0,05$ ) foram *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. sp.* ACOI 4769ni e *M. unipapila* SAG 8.83 com valores de  $0,26 \pm 0,04$  g/L,  $0,25 \pm 0,03$  g/L e  $0,22 \pm 0,01$  g/L respetivamente. No género *Microchloropsis* não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas estirpes ( $p < 0,05$ ) uma vez que *M. salina* SAG 40.85 apresentou  $0,14 \pm 0,01$  g/L e *M. gaditana* CCMP 1775 apresentou  $0,14 \pm 0,03$  g/L

A 30 dias de cultivo (Figura 14) a produção de biomassa variou entre  $0,26 \pm 0,03$  e  $0,78 \pm 0,03$  g/L, sendo os melhores valores demonstrados pelas estirpes *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni ( $0,78 \pm 0,03$  g/L) e *Pseudostaurostrum* sp. ACOI 2419ni ( $0,69 \pm 0,04$  g/L) ( $p < 0,05$ ). Os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ) correspondem às estirpes *Dioxys* sp. ACOI 2029 ( $0,27 \pm 0,03$  g/L) e *Tetraplektion* sp. ACOI 2650ni ( $0,26 \pm 0,03$  g/L). Para 30 dias de cultivo, as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, com *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni ( $0,66 \pm 0,01$  g/L) e *M. unipapila* SAG 8.83 ( $0,61 \pm 0,01$  g/L) a apresentarem os valores mais altos de produção de biomassa ( $p < 0,05$ ). No caso das estirpes pertencentes ao género *Microchloropsis*, *M. gaditana* CCMP 1775 apresentou o valor mais alto de produção de biomassa com  $0,62 \pm 0,01$  g/L ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Produção de biomassa a 10 e 30 dias estimado com base em densidade celular (cél/mL)

A produção de biomassa estimada com base na densidade celular (Tabela 6) mostrou ser maior ao fim de 30 dias de cultivo para todas as estirpes estudadas com exceção de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. gaditana* CCMP 1775 e *V. helvetica* ACOI 299 ( $p < 0,05$ ). A 10 dias de cultivo (Tabela 6) a produção de biomassa variou entre  $1,73 \times 10^4 \pm 4,41 \times 10^3$  cél/mL e  $4,75 \times 10^8 \pm 4,96 \times 10^7$  cél/mL, sendo a estirpe *M. gaditana* CCMP 1775 a que apresentou maior produção de biomassa ( $4,75 \times 10^8 \pm 4,96 \times 10^7$  cél/mL) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Produção de biomassa estimada com base na densidade celular (cél/mL) ao fim de 10 e 30 dias de cultivo em condições de crescimento controladas.<sup>1</sup>

Espécie	Densidade celular (cél/mL)	
	10 dias	30 dias
<i>Characiopsis aquilonaris</i> ACOI 2424	$8,27 \times 10^7 \pm 1,51 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$8,99 \times 10^7 \pm 1,56 \times 10^7$ <sup>a</sup>
<i>Dioxys</i> sp. ACOI 2029	$1,06 \times 10^9 \pm 2,85 \times 10^{8a}$	$7,60 \times 10^9 \pm 3,65 \times 10^{9b}$
<i>Eustigmatos</i> sp. ACOI 4864ni	$8,82 \times 10^9 \pm 2,65 \times 10^{9ba}$	$1,89 \times 10^{10} \pm 1,90 \times 10^{10b}$
<i>Goniochloris sculpta</i> ACOI 1852	$6,38 \times 10^4 \pm 2,92 \times 10^{4a}$	$5,70 \times 10^5 \pm 7,31 \times 10^{5b}$
<i>Monodopsis subterranea</i> SAG 848-1	$2,38 \times 10^7 \pm 3,50 \times 10^{7ba}$	$1,37 \times 10^8 \pm 3,49 \times 10^{8b}$
<i>Monodopsis unipapilla</i> SAG 8.83	$1,76 \times 10^7 \pm 7,32 \times 10^{7ba}$	$4,88 \times 10^7 \pm 3,22 \times 10^{7b}$



<i>Monodopsis</i> sp. SAG 4769ni	1,20x10 <sup>7</sup> ±5,16x10 <sup>6a</sup>	4,98x10 <sup>7</sup> ±5,08x10 <sup>6b</sup>
<i>Monodopsis unipapilla</i> ACOI 2938	1,56x10 <sup>7</sup> ±0,00x10 <sup>6a</sup>	3,06x10 <sup>7</sup> ±1,41x10 <sup>6ba</sup>
<i>Microchloropsis gaditana</i> CCMP 1775	4,75x10 <sup>8</sup> ±4,96x10 <sup>7a</sup>	4,81x10 <sup>8</sup> ±1,42x10 <sup>7a</sup>
<i>Microchloropsis salina</i> SAG 40.85	2,04x10 <sup>8</sup> ±1,13x10 <sup>7a</sup>	2,90x10 <sup>8</sup> ±2,35x10 <sup>7b</sup>
<i>Nannochloropsis oculata</i> SAG 38.85	2,19x10 <sup>8</sup> ±3,79x10 <sup>6ba</sup>	2,75x10 <sup>8</sup> ±2,33x10 <sup>7d</sup>
<i>Pseudostaurastrum</i> sp. ACOI 2419ni	4,14x10 <sup>6</sup> ±3,88x10 <sup>5ba</sup>	7,40x10 <sup>6</sup> ±1,16x10 <sup>6b</sup>
<i>Tetraplekton</i> sp. ACOI 2650ni	1,73x10 <sup>4</sup> ±4,41x10 <sup>3a</sup>	6,40x10 <sup>4</sup> ±1,02x10 <sup>4ab</sup>
<i>Vischeria helvetica</i> ACOI 299	3,97x10 <sup>6</sup> ±1,07x10 <sup>6ba</sup>	3,38x10 <sup>6</sup> ±9,21x10 <sup>5ba</sup>

<sup>1</sup> Valores dentro da mesma linha com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Para 10 dias, no género *Monodopsis* não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes deste género ( $p < 0,05$ ). Contudo, em *Microchloropsis* foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as duas estirpes sendo que *M. gaditana* CCMP 1775 apresentou o valor mais elevado de densidade celular.

A 30 dias de cultivo (Tabela 6) a produção de biomassa variou entre 6,40x10<sup>4</sup>±1,02x10<sup>4</sup> cél/mL e 4,81x10<sup>8</sup>±1,42x10<sup>7</sup> cél/mL, sendo a estirpe *M. gaditana* CCMP 1775 a que apresentou maior produção de biomassa (4,81x10<sup>8</sup>±1,42x10<sup>7</sup> cél/mL) ( $p < 0,05$ ). Por outro lado os valores mais baixos observados ( $p < 0,05$ ) correspondem às estirpes *Dioxys* sp. ACOI 2029 (7,60x10<sup>6</sup>±3,65x10<sup>5</sup> cél/mL), *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni (1,89x10<sup>7</sup>±1,90x10<sup>6</sup> cél/mL), *G. sculpta* ACOI 1852 (5,70x10<sup>5</sup>±7,31x10<sup>4</sup> cél/mL), *M. unipapilla* ACOI 2938 (3,06x10<sup>7</sup>±1,41x10<sup>6</sup> cél/mL), *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni (7,40x10<sup>6</sup>±1,16x10<sup>6</sup> cél/mL), *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni (6,40x10<sup>4</sup>±1,02x10<sup>4</sup> cél/mL) e *V. helvetica* ACOI 299 (3,38x10<sup>6</sup>±9,21x10<sup>5</sup> cél/mL). Para 30 dias de cultivo, no género *Monodopsis* a estirpe *M. subterranea* SAG 848-1 apresenta diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre todas as restantes estirpes sendo esta a que produziu maior quantidade de biomassa estimada com base em densidade celular correspondente a 1,37x10<sup>8</sup>±3,49x10<sup>7</sup> cél/mL. Também em *Microchloropsis* é possível observar-se diferenças estatisticamente significativas entre ambas as estirpes com *M. gaditana* CCMP 1775 a apresentar o valor mais elevado de produção de biomassa ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Produção de lípido total a 10 e 30 dias de crescimento

O lípido total presente em 150 mg de biomassa liofilizada das 14 culturas analisadas neste estudo foi avaliada através do método de Gao *et al.*, (2016) (com algumas modificações) a 10 e 30 dias de cultivo. De acordo com os resultados da figura 15, observa-se uma maior produção lipídica ao fim de 10 dias de cultivo para todas as estirpes estudadas com exceção de *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *M.*

*subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83, *P. sp.* ACOI 2419ni, *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni e *V. helvetica* ACOI 299 ( $p < 0,05$ ).

A 10 dias de cultivo (Figura 15) o lípido total variou entre  $3,63 \pm 2,10\%$  BS e  $33,40 \pm 1,13\%$  BS, sendo os melhores valores apresentados pelas estirpes *C. aquilonaris* ACOI 2424 ( $33,40 \pm 1,13\%$  BS) e *M. gaditana* CCMP 1775 ( $31,23 \pm 1,65\%$  BS) ( $p < 0,05$ ). O valor mais baixo observado a fim de 10 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ) corresponde à estirpe *M. unipapilla* SAG 8.83. No género *Monodopsis* é possível observar-se diferenças estatisticamente significativas entre as 4 estirpes com *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $17,90 \pm 0,14\%$ ) a apresentar o valor mais alto de lípido total ( $p < 0,05$ ). No género *Microchloropsis*, observaram-se também diferenças estatisticamente significativas entre as duas estirpes com *M. gaditana* CCMP 1775 a apresentar o valor mais elevado de  $31,23 \pm 1,65\%$  BS ( $p < 0,05$ ).

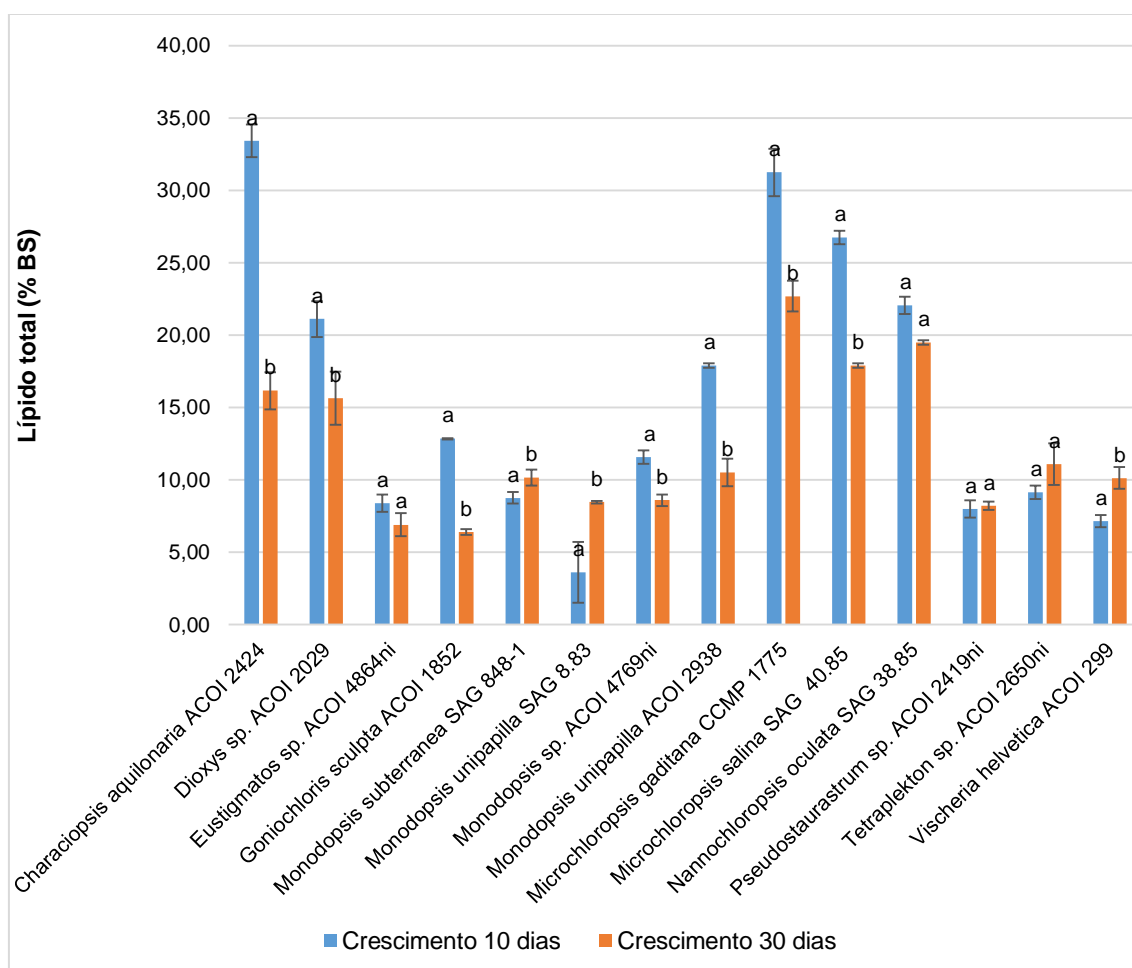


Figura 15. Produção de lípido total (%) estimado com base no método modificado de Gao *et al.*, (2016) ao fim de 10 e 30 dias de cultivo em condições de crescimento controladas. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Valores nas colunas da mesma estirpe com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Ao fim de 30 dias de cultivo (Figura 15) o lípido total variou entre  $6,40 \pm 0,19\%$  BS e  $26,73 \pm 0,47\%$  BS, sendo as estirpes *M. gaditana* CCMP 1775, *M. salina* SAG 40.85 e *N. oculata* SAG 38.85 as que apresentaram maior produção de lípido total com  $22,69 \pm 1,06\%$  BS,  $26,73 \pm 0,47\%$  BS e  $19,49 \pm 0,15\%$  BS respetivamente ( $p < 0,05$ ). No género *Monodopsis* cujo intervalo de valores de lípido total variou entre  $8,47 \pm 0,09\%$  BS e  $10,51 \pm 0,97\%$  BS não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as 4 estirpes. Contudo, dentro do género *Microchloropsis* observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as duas estirpes ( $p < 0,05$ ) sendo que o valor mais alto observado corresponde a *M. gaditana* CCMP 1775 com  $22,69 \pm 1,06\%$  BS.

### 3.4 Produtividades de lípido total a 10 e 30 dias de crescimento (g/L/d)

A produtividade de lípido total (g/L/d) das 14 culturas analisadas neste estudo foi calculada para 10 e 30 dias de crescimento.

A produtividade lipídica (Tabela 7) mostrou ser maior ao fim de 10 dias de cultivo para as estirpes *C. aquilonaris* ACOI 2424, *Dioxys* sp. ACOI 2029, *G. sculpta* ACOI 1852, *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni e *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $p < 0,05$ ). As restantes culturas mostraram maior produtividade lipídica ( $p < 0,05$ ) ao fim de 30 dias de crescimento ou produtividades similares em ambos os tempos de cultivo como o caso de *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. gaditana* CCMP 1775, *M. salina* SAG 40.85, *N. oculata* SAG 38.85 e *V. helvetica* ACOI 299. A 10 dias de cultivo (Tabela 7) a produtividade de lípido total variou entre  $0,03 \pm 0,03$  g/L/d e  $0,68 \pm 0,07$  g/L/d, sendo as estirpes *C. aquilonaris* ACOI 2424 ( $0,68 \pm 0,07$  g/L/d) e *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $0,50 \pm 0,02$  g/L/d) as que apresentaram maior produtividade ( $p < 0,05$ ). Os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ) correspondem a *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni, *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni e *V. helvetica* ACOI 299 com valores correspondentes a  $0,13 \pm 0,02$  g/L/d,  $0,15 \pm 0,02$  g/L/d,  $0,08 \pm 0,01$  g/L/d,  $0,08 \pm 0,01$  g/L/d,  $0,03 \pm 0,03$  g/L/d e  $0,14 \pm 0,04$  g/L/d respetivamente. No género *Monodopsis*, a estirpe *M. unipapilla* ACOI 2938 apresenta diferenças estatisticamente significativas das restantes culturas do mesmo género ( $p < 0,05$ ), apresentando o maior valor de produtividade de lípido total. *M. subterranea* SAG 848-1 e *M. unipapilla* SAG 8.83 são as estirpes cuja produtividade de lípido total foi menor ( $p < 0,05$ ).

A 30 dias de cultivo (Tabela 7) a produtividade de lípido total variou entre  $0,10 \pm 0,02$  g/L/d e  $0,47 \pm 0,02$  g/L/d, sendo os melhores valores apresentados pelas estirpes pertencentes ao género *Microchloropsis*, mais concretamente *M. gaditana* CCMP 1775 ( $0,47 \pm 0,02$  g/L/d) e *M. salina* SAG 40.85 ( $0,42 \pm 0,01$  g/L/d) ( $p < 0,05$ ).

Relativamente aos valores mais baixos ( $p < 0,05$ ), estes correspondem às estirpes *Dioxys* sp. ACOI 2029, *G. sculpta* ACOI 1852, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* ACOI 2938, *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni e *V. helvetica* ACOI 299 com valores de  $0,14 \pm 0,04$  g/L/d,  $0,14 \pm 0,02$  g/L/d,  $0,16 \pm 0,00$  g/L/d,  $0,15 \pm 0,01$  g/L/d,  $0,10 \pm 0,02$  g/L/d e  $0,16 \pm 0,02$  g/L/d respetivamente. Para *Monodopsis* e *Microchloropsis* não existem diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes pertencentes a cada um dos géneros ( $p < 0,05$ ).

Tabela 7. Produtividade de lípido total expressa em g/L/d ao fim de 10 e 30 dias de crescimento em condições controladas.<sup>1</sup>

Espécie	Produtividade lipídica (g/L/d)	
	10 dias	30 dias
<i>Characiopsis aquilonaris</i> ACOI 2424	$0,68 \pm 0,07^a$	$0,22 \pm 0,01^d$
<i>Dioxys</i> sp. ACOI 2029	$0,30 \pm 0,04^a$	$0,14 \pm 0,04^d$
<i>Eustigmatos</i> sp. ACOI 4864ni	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,18 \pm 0,03^a$
<i>Goniocloris sculpta</i> ACOI 1852	$0,49 \pm 0,03^a$	$0,14 \pm 0,02^d$
<i>Monodopsis subterranea</i> SAG 848-1	$0,15 \pm 0,02^a$	$0,16 \pm 0,00^a$
<i>Monodopsis unipapilla</i> SAG 8.83	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,17 \pm 0,00^d$
<i>Monodopsis</i> sp. SAG 4769ni	$0,29 \pm 0,03^a$	$0,19 \pm 0,01^d$
<i>Monodopsis unipapilla</i> ACOI 2938	$0,50 \pm 0,02^a$	$0,15 \pm 0,01^d$
<i>Microchloropsis gaditana</i> CCMP 1775	$0,45 \pm 0,13^a$	$0,47 \pm 0,02^a$
<i>Microchloropsis salina</i> SAG 40.85	$0,38 \pm 0,04^a$	$0,42 \pm 0,01^a$
<i>Nannochloropsis oculata</i> SAG 38.85	$0,26 \pm 0,09^a$	$0,31 \pm 0,05^a$
<i>Pseudostaurastrum</i> sp. ACOI 2419ni	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^d$
<i>Tetraplekton</i> sp. ACOI 2650ni	$0,03 \pm 0,03^a$	$0,10 \pm 0,02^d$
<i>Vischeria helvetica</i> ACOI 299	$0,14 \pm 0,04^a$	$0,16 \pm 0,02^a$

<sup>1</sup> Valores dentro da mesma linha com diferentes letras sobscritas são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Quantificação dos lípidos neutros, glicolípidos e fosfolípidos a 10 e 30 dias de crescimento

A concentração de lípidos neutros (LN), glicolípidos (GL) e fosfolípidos (FL) presentes no lípido total das 14 culturas analisadas neste estudo foi avaliada ao fim de 10 e 30 dias de cultivo (Figura 16).

A concentração de lípidos neutros (LN) não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre 10 e 30 dias de cultivo com exceção de *M. gaditana* CCMP 1775, que demonstra uma maior produção de lípido neutro ao fim de 30 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ). Após 10 dias de crescimento as concentrações de lípidos neutros variaram entre  $35,12 \pm 2,14\%$  LT e  $62,66 \pm 1,05\%$  LT sendo as culturas de *C. aquilonaris* ACOI 2424 ( $53,96 \pm 3,59\%$  LT), *Dioxys* sp. ACOI 2029 ( $53,00 \pm 2,11\%$  LT), *M. gaditana* CCMP 1775 ( $62,66 \pm 1,05\%$  LT) e *N. oculata* SAG 38.85 ( $52,81 \pm 4,56\%$  LT) as que

apresentaram maior produtividade de LN ( $p < 0,05$ ). Relativamente ao género *Monodopsis*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as 4 estirpes ( $p < 0,05$ ).

Contudo, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas no género *Microchloropsis* ao fim de 10 dias de cultivo sendo a estirpe *M. gaditana* CCMP 1775 a que apresentou maior concentração de LN ( $p < 0,05$ )

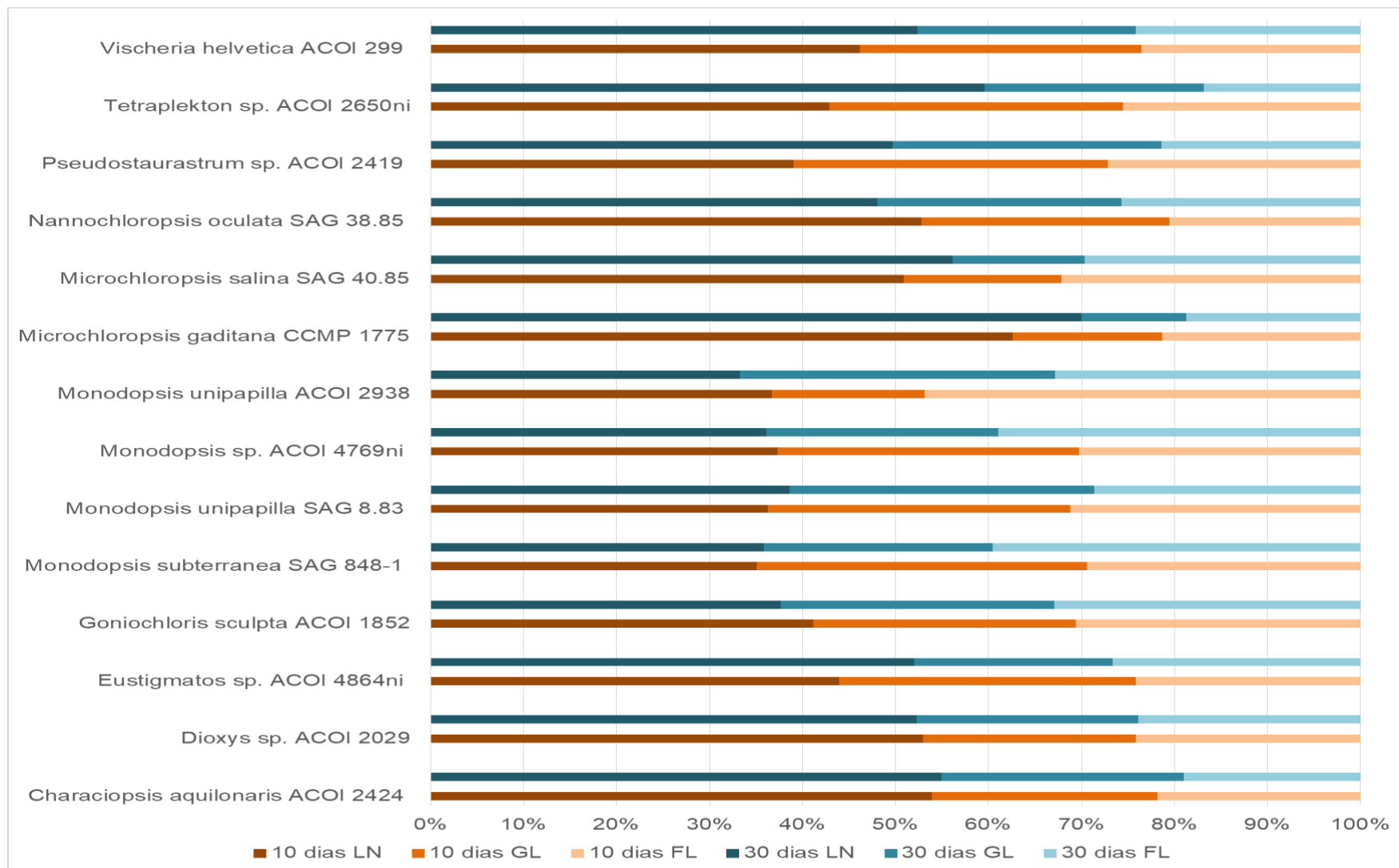


Figura 16. Composição de frações lipídicas presentes em amostras de lípido total de 14 estirpes Eustigmatophyceae; LN – Lípidos neutros; GL – Glicolípidos; FL – Fosfolípido.

Ao fim de 30 dias de cultivo a concentração de lípidos neutros (Figura 16) variou entre  $33,33 \pm 1,07\%$  LT e  $70,02 \pm 1,42\%$  LT correspondendo os valores mais elevados às estirpes *M. gaditana* CCMP 1775 e *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni com  $70,02 \pm 1,42\%$  LT e  $59,63 \pm 6,48\%$  LT respetivamente ( $p < 0,05$ ). Os valores mais baixos de LN foram obtidos pelas culturas de *G. sculpta* ACOI 1852 ( $37,74 \pm 7,14\%$  LT), *M. subterranea* SAG 848-1 ( $35,89 \pm 2,19\%$  LT), *M. unipapilla* SAG 8.83 ( $38,63 \pm 0,46\%$  LT), *Monodopsis* sp. SAG 4769ni ( $36,16 \pm 1,45\%$  LT) e *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $33,33 \pm 1,07\%$  LT) ( $p < 0,05$ ). Entre as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de LN ao fim de 30 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ). Dentro do género *Microchloropsis* foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao fim de 30 dias de crescimento sendo *M. gaditana* CCMP 1775 a estirpe que alcançou o maior valor de LN ( $p < 0,05$ ).

Relativamente à concentração de glicolípidos (GL), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre 10 e 30 dias de cultivo com exceção de *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. gaditana* CCMP 1775 e *V. helvetica* ACOI 299 cuja produção de GL mostrou ser superior ao fim de 10 dias ( $p < 0,05$ ). A concentração de GL ao fim de 10 dias de crescimento variou entre  $16,09 \pm 1,70\%$  LT e  $35,51 \pm 1,50\%$  LT, sendo *C. aquilonaris* ACOI 2424, *Dioxys* sp. ACOI 2029, *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. gaditana* CCMP 1775 e *M. salina* SAG 40.85 os cultivos que apresentaram os valores mais baixos ( $p < 0,05$ ). Entre as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de GL ao fim de 10 dias de crescimento apresentando *M. unipapilla* ACOI 2938 o valor mais baixo e distinto das restantes estirpes (*M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83, *Monodopsis* sp. SAG 4769ni) cuja produção de GL foi superior e semelhante entre todas. Dentro do género *Microchloropsis* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao fim de 10 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ). A 30 dias de crescimento a concentração de GL variou entre  $11,26 \pm 0,26\%$  LT e  $33,84 \pm 1,07\%$  LT, sendo os valores mais elevados correspondentes aos cultivos de *M. unipapilla* SAG 8.83 ( $32,76 \pm 3,60\%$  LT) e *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $33,84 \pm 1,07\%$  LT) ( $p < 0,05$ ). As estirpes com valores mais baixos de GL foram as *M. gaditana* CCMP 1775 ( $11,26 \pm 0,26\%$  LT) e *M. salina* SAG 40.85 ( $14,15 \pm 0,00\%$  LT) ( $p < 0,05$ ). Dentro do género *Monodopsis* e *Microchloropsis* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de GL ao fim de 30 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ).

Por último, a concentração de fosfolípidos (FL) não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre 10 e 30 dias de cultivo, com exceção de *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* ACOI 2938, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419

e *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni ( $p < 0,05$ ). *M. subterranea* SAG 848-1 produziu quantidades mais elevadas de FL ao fim de 30 dias de crescimento enquanto *M. unipapilla* ACOI 2938, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419 e *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni apresentaram maiores produções de FL ao fim de 10 dias de cultivo ( $p < 0,05$ ). A concentração de FL presente em cultivos com 10 dias de crescimento variou entre  $20,47 \pm 0,73\%$  LT e  $46,83 \pm 2,60\%$  LT, sendo a maior concentração de FL representada pela estirpe *M. unipapilla* ACOI 2938 ( $46,83 \pm 2,60\%$  LT) ( $p < 0,05$ ). Entre as estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* verificaram-se diferenças estatisticamente significativas na concentração de FL ao fim de 10 dias de cultivo, mais concretamente no cultivo de *M. unipapilla* ACOI 2938 cuja concentração apresentou-se diferente e mais elevada comparativamente a todas as outras culturas ( $p < 0,05$ ). *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83 e *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni apresentam valores mais baixos e idênticos entre si. Para além de *Monodopsis* observaram-se também diferenças estatisticamente significativas dentro do género *Microchloropsis* ao fim de 10 dias de crescimento sendo *M. salina* SAG 40.85 a estirpe com maior concentração de FL ( $32,13 \pm 0,53\%$  LT) ( $p < 0,05$ ). A 30 dias de crescimento a concentração de FL variou entre  $16,77 \pm 0,24\%$  LT e  $39,53 \pm 0,57\%$  LT com *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *G. sculpta* ACOI 1852, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. unipapilla* SAG 8.83, *Monodopsis* sp. ACOI 4769ni, *M. unipapilla* ACOI 2938 e *M. salina* SAG 40.85 a apresentarem os valores mais elevados de FL ( $p < 0,05$ ). A 30 dias de cultivo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentro dos géneros *Monodopsis* e *Microchloropsis* ( $p < 0,05$ ).





#### **4. Discussão**



#### 4.1 Crescimento de culturas baseado na densidade celular

Neste trabalho, as estirpes *Nannochloropsis oculata* SAG 38.85, *M. salina* ACOI 40.85 e *M. gaditana* CCMP 1775 foram selecionadas como modelos de comparação uma vez que a maioria dos estudos orientados para a biotecnologia de microalgas são realizados com o género *Nannochloropsis* e espécies pertencentes a este género que foram recentemente segregados no género *Microchloropsis* (Sukenik *et al.*, 1989; Fawley *et al.*, 2015; Karthikaichamy *et al.*, 2017).

Para uma melhor compreensão do ciclo de crescimento dos diferentes géneros pertencentes à classe Eustigmatophyceae foram selecionadas 5 estirpes (*C. aquilonaris* ACOI 2424, *G. sculpta* ACOI 1852, *M. gaditana* CCMP 1775, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni e *V. helvetica* ACOI 299) e o seu crescimento monitorizado em condições de cultivo autotrófico (Figuras 9 a 13). Para tal determinou-se a densidade celular das culturas (cél/mL) dado que este método de análise permite obter uma estimativa mais realista do estado da cultura através da contagem de células viáveis presentes na amostra.

A partir da análise das diferentes curvas de crescimento verificaram-se que todas as estirpes apresentaram uma curva sigmóide típica do crescimento de microalgas em cultivo “batch” (Richmond, 2003) composta por fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio (Andersen, 2005; Barsanti and Gualtieri, 2006). Ao comparar as cinco curvas de crescimento realizadas observa-se que, ao contrário de *G. sculpta* ACOI 1852, *V. helvetica* ACOI 299, *C. aquilonaris* ACOI 2424 e *P. sp.* ACOI 2419ni, a estirpe *M. gaditana* CCMP 1775 não possui fase de latência, iniciando desta forma a sua fase exponencial de crescimento imediatamente após a inoculação (Figura 11). A fase de latência envolve um crescimento mínimo da cultura provocado por processos de adaptação fisiológica das células ao meio de cultura (Barsanti and Gualtieri, 2006). A duração desta fase está relacionada com a densidade celular inicial, o estado fisiológico e a capacidade de adaptação ao meio de cultura pelas estirpes (Andersen, 2005; Lee *et al.*, 2015). Dependendo destes fatores a duração desta fase é diferente podendo até ser inexistente. A densidade celular inicial pode ser um dos fatores que explica a inexistência de fase de latência em *M. gaditana* CCMP 1775 (Figura 11), uma vez que foi a estirpe com a qual se iniciou o crescimento com maior número de células viáveis. De entre as restantes estirpes, *C. aquilonaris* ACOI 2424 é a que tem menor duração de fase de latência (2 dias) e mais uma vez verifica-se que é a estirpe com maior número de células inicial (Figura 9).

Relativamente à fase exponencial observaram-se diferentes durações consoante a estirpe em questão. Esta fase é responsável pela rápida produção de biomassa, é a fase em que ocorre a multiplicação do número de células até se atingir a fase de

crescimento máximo e resulta da presença de nutrientes em excesso, potencial genético da microalga, composição do meio de cultura e condições de crescimento (Kobayashi *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2011). A estirpe *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni (Figura 12) foi a que apresentou um crescimento mais rápido, possuindo uma fase exponencial mais curta (4 dias), seguida de *M. gaditana* CCMP 1775 (5 dias), *C. aquilonaris* ACOI 2424 (7 dias), *G. sculpta* ACOI 1852 e *V. helvetica* ACOI 299, sendo estas últimas duas com 8 dias de duração de fase exponencial de crescimento. Verifica-se que a duração desta fase também está relacionada com a taxa de multiplicação do número de células (Wood *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2013). *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni embora seja a alga com o crescimento mais rápido apresentando a menor duração de fase exponencial (2 dias), é também a alga que tem menor taxa de multiplicação (2X). Ao contrário da situação verificada em *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni, a estirpe *G. sculpta* ACOI 1852 é a que cresce mais lentamente apresentando uma duração de fase exponencial de 8 dias, contudo tem uma taxa de multiplicação de 85X.

Posteriormente segue-se uma fase estacionária fortemente marcada pela estabilização do crescimento celular provocado pela acumulação de produtos inibidores de metabolismo, esgotamento de nutrientes essenciais e desvio da energia fotossintética da divisão celular para a sintetização e acumulação de hidratos de carbono e lípidos (Richmond, 2003; Chen *et al.*, 2011) ao mesmo tempo que surge um aumento de produção de enzimas específicas para a adsorção de nutrientes (Piorreck *et al.*, 1984; Hu *et al.*, 2008; Yeh and Cheng, 2012). *G. sculpta* ACOI 1852 foi a estirpe que apresentou a fase estacionária mais curta (10 dias) (Figura 10) comparativamente às restantes culturas, sendo também a única a apresentar uma fase de declínio no período de tempo considerado. A fase de declínio caracteriza-se por apresentar um crescimento negativo resultante da acumulação de produtos de excreção tóxicos, esgotamento de nutrientes, perturbação de pH ou contaminações e, conseqüentemente, alteração da utilização da energia fotossintética para produção de lípidos (Barsanti and Gualtieri, 2006; Hu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015). Esta fase nem sempre é iniciada visto que as células possuem capacidade de manter-se viáveis por longos períodos de tempo devido às suas reservas endógenas (Richmond, 2003; Rocha *et al.*, 2003).

#### **4.2 Produção de biomassa baseada em peso seco e densidade celular**

Da extração e quantificação da biomassa celular através do método baseado em peso seco (Figura 14), verificou-se uma maior produção da mesma ao fim 30 dias de crescimento em condições não otimizadas para todas as estirpes em estudo. Uma vez

que o peso seco reflete essencialmente a capacidade que as microalgas têm em alcançar dimensões celulares elevadas quando estas são adultas (Rocha *et al.*, 2003), já se previa a existência de maior quantidade de biomassa em culturas com 30 dias. A biomassa celular é um parâmetro suscetível a erros causados por impurezas presentes na amostra como por exemplo o sal (Zhu and Lee, 1997; Sarrafzadeh *et al.*, 2015). Por esta razão torna-se imperativo a utilização de soluções pré-determinadas para a lavagem da biomassa retida no filtro de papel de modo a remover sais, nutrientes e outras impurezas que possam alterar o peso final da amostra (Strickland and Parsons, 1968; Rocha *et al.*, 2003). Neste estudo optou-se pela utilização de água destilada para a lavagem da biomassa. No entanto podem também ser utilizadas soluções isotónicas de sal de amónio (Wikfors *et al.*, 1992; Brown and Farmer, 1994), 0,9% de cloreto de sódio (Hu and Richmond, 1994), água do mar (Akimoto *et al.*, 1990; Spriharan *et al.*, 1991) ou sal de amónio e cloreto de sódio (Henderson *et al.*, 1988). Os valores de biomassa seca obtidos neste estudo a 10 e 30 dias de crescimento vão de encontro à bibliografia existente para *N. salina* (Fakhry and Maghraby, 2015), *N. oculata* (Wan *et al.*, 2011) e para estirpes pertencentes a outras classes (Rodolfi *et al.*, 2009; Huerlimann *et al.*, 2010). É de salientar que os valores obtidos neste estudo para as estirpes pertencentes a *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* superaram os referidos em Huerlimann *et al.*, (2010), Lim *et al.*, (2012) e Fakhry and Maghraby, (2015) para os mesmos géneros. Como foi mencionado anteriormente, os géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* foram cultivados de modo a serem comparados com as restantes estirpes uma vez que estes são conhecidos por serem bons produtores de biomassa e lípidos (Sukenik *et al.*, 1989; Harun *et al.*, 2010; Fakhry and Maghraby, 2015). Contudo, em condições não otimizadas, os valores mais elevados de produção de biomassa baseada em peso seco pertenceram aos cultivos a 30 dias de *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni (0,78±0,03 g/L) e *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni (0,69±0,04 g/L). Estes valores são inferiores aos encontrados na bibliografia para outras espécies de *Eustigmatos* nas quais se obtêm produções de biomassa entre 7,9 e 8.34 g/L (Zhang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018) contudo, é de salientar que estes valores se obtiveram em condições de cultivo otimizadas e a otimização das condições de cultivo resulta numa maior produção de biomassa (Sukenik, 1991).

Relativamente ao método baseado em densidade celular (Tabela 6), verificou-se uma vez mais maior produção de biomassa em todas as culturas com 30 dias de crescimento com exceção de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *M. unipapilla* ACOI 2938, *M. gaditana* CCMP 1775 e *V. helvetica* ACOI 299. A quantificação com base em densidade celular é um método relativamente preciso, contudo demorado (Rocha *et al.*, 2003). Requer a contagem de células com auxílio de um hemocítmetro e

microscópio ótico invertido e evidencia maioritariamente estirpes de rápido crescimento (Rocha *et al.*, 2003). Esta observação pode ser facilmente confirmada através da consulta dos valores presentes na tabela 6 que demonstram culturas de rápido crescimento (*Nannochloropsis* e *Microchloropsis*) (Sukarni *et al.*, 2014) como melhores produtoras de biomassa. Neste caso, *M. salina* SAG 40.85, *M. gaditana* CCMP 1775 e *N. oculata* SAG 38.85 alcançaram densidades celulares superiores aos valores encontrados para os mesmos géneros (Huerlimann *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012). É de salientar que os géneros *Monodopsis*, *Eustigmatos* e *Characiopsis* demonstram valores de produção de biomassa com base em densidade celular bastante similares aos obtidos para os géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* indicando mais uma vez o interesse biotecnológico que outros géneros da classe Eustigmatophyceae podem ter. As restantes estirpes em estudo com exceção de *Tetraplekton* sp. ACOI 2650ni apresentaram densidades celulares que vão de encontro com os estudos realizados por Huerlimann *et al.*, (2010) e Lim *et al.*, (2012). Comparando ambos os métodos de quantificação de biomassa utilizados, verifica-se uma discrepância enorme de resultados. As estirpes com valores de produção de biomassa mais elevados não coincidem nos dois métodos de avaliação usados. Como já foi mencionado anteriormente, ambos os métodos baseiam-se em parâmetros diferentes de avaliação e, como tal, é importante realizar uma prévia reflexão e seleção do método mais indicado tendo em conta os objetivos finais do trabalho. Neste trabalho temos diferentes géneros em estudo com morfologias e processos de divisão celular diferentes entre si. Verificou-se que o método da quantificação da biomassa com base em densidade celular foi o mais indicado dando uma perspetiva mais realista, uma vez que envolve a contagem de células sem discriminação de tamanho, peso ou produtos metabólicos.

#### **4.3 Produção de lípido total**

Após a extração de lípido total e respetiva quantificação (Figura 15) verificou-se que a maioria das estirpes apresenta maior produção de lípido total após 10 dias de cultivo. Estas observações não vão de encontro ao esperado. A produção/acumulação de lípidos é geralmente maior em células mais velhas uma vez que, após a fase exponencial de crescimento, a energia fotossintética é naturalmente desviada da divisão celular para a acumulação de lípidos (Hu *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2018). Contudo, certas microalgas podem apresentar produções lipídicas mais elevadas em culturas mais jovens como se pode observar no estudo realizado por Huerlimann *et al.*, (2010). É de salientar que fatores como a resposta e adaptação das culturas ao meio de cultura, a curva de crescimento, densidade celular (associada a um aumento do

sombreamento e bloqueamento da luz nas zonas mais profundas da cultura) e potencial intrínseco necessitam de ser considerados para uma correta avaliação do potencial lipídico (Richmond, 2000; Huerlimann *et al.*, 2010). A metodologia de extração e quantificação lipídica é também um fator que pode resultar em valores diferentes de lípido total (Li *et al.*, 2014). Como já foi mencionado anteriormente, *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* são géneros fortemente estudados e reconhecidos pelo seu ótimo potencial lipídico (Sukenik, 1991; Wang *et al.*, 2012; Ming, 2014). Por esta razão, já se previa que as produções de lípido total mais elevadas correspondessem às estirpes de *M. gaditana* CCMP 1775, *M. salina* SAG 40.85 e *N. oculata* SAG 38.85. Destaca-se aqui que os valores obtidos neste estudo para *M. gaditana* CCMP 1775 foram superiores ou idênticos aos obtidos por Chiu *et al.*, (2008) e Wang and Wang (2011) cujas produções variaram entre 22,7±1,9% BS e 29,7±2,0% BS e 17,2±0,2% BS e 22,7±0,8% BS. Para além do elevado potencial lipídico de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*, verificou-se também que existe outro género com um potencial idêntico ou superior na produção de lípido total como é o caso de *C. aquilonaris* ACOI 2424. A sua produção lipídica ao fim de 10 dias foi de 33,40±1,13% BS, o que torna esta microalga a melhor produtora de lípidos neste estudo. Contudo, já foram observados valores mais elevados de lípido total, em condições otimizadas, para *Eustigmatos cf. polyphem* (Gao *et al.*, 2018) e *Vischeria stellata* (Gao *et al.*, 2016). Como resultado, é esperado um aumento do interesse biotecnológico por parte da comunidade científica em relação a outros géneros pertencentes a esta classe. Os restantes valores de lípido total vão de encontro aos encontrados na bibliografia para as microalgas em geral (Rodolfi *et al.*, 2009; Huerlimann *et al.*, 2010) e para outros géneros da classe Eustigmatophyceae (Gao *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018; Bellou and Aggelis, 2012). É de relembrar que este estudo foi realizado em condições não otimizadas e, como já mencionado, a produção lipídica pode ser melhorada quando usadas condições de crescimento otimizadas (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010). Como exemplo, temos o estudo realizado por Breuer *et al.*, (2012) cuja cultura de *Chlorella* cultivada em meio com e sem azoto sofreu um aumento de 28% BS para 70% BS de lípido total, respetivamente.

#### **4.4 Produtividade lipídica**

De modo a analisar a produtividade lipídica, calcularam-se as respetivas produtividades lipídicas (g/L/d) (Tabela 7) mediante o peso seco das suas biomassas (g/L) (Figura 14), conteúdo de lípido total (% BS) (Figura 15) e tempo de cultivo (10 dias/ 30 dias). De acordo com os valores apresentados na tabela 7, verifica-se que a maior produtividade ocorre em culturas com 10 dias de crescimento. Como foi



mencionado anteriormente, já seria de esperar o grande potencial de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* contudo, *C. aquilonaris* ACOI 2424 e *M. unipapilla* ACOI 2938 surpreenderam pelo seu elevado potencial lipídico uma vez que estas alcançaram produtividades lipídicas superiores às de *M. salina* SAG 40.85 ao fim de 10 dias de cultivo. Apesar de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* demonstrarem um elevado conteúdo de lípido total tanto a 10 como a 30 dias de cultivo, a sua biomassa baseada em peso seco revelou ser baixa em culturas a 10 dias de crescimento. Por esta razão, após os cálculos efetuados, *C. aquilonaris* ACOI 2424 e *M. unipapilla* ACOI 2938 apresentaram os valores mais elevados observados. Num estudo efetuado por Rodolfi *et al.*, (2009) também se verificaram produtividades lipídicas elevadas em estirpes pertencentes ao género *Monodopsis* comparativamente a *Nannochloropsis*, com valores distintos aos observados no nosso estudo. Todos os valores correspondentes à produtividade lipídica a 10 e 30 dias de cultivo vão de encontro aos mencionados para as diversas microalgas encontradas nos estudos de Rodolfi *et al.*, (2009), Huerlimann *et al.*, (2010) e Lim *et al.*, (2012). De salientar que as produtividades de *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*, em condições não otimizadas, superaram os valores referidos para *Nannochloropsis* nos trabalhos mencionados anteriormente.

A 30 dias de cultivo a produtividade lipídica máxima alcançada ( $0,47 \pm 0,02$  g/L/d) foi menor contudo, observaram-se aumentos da mesma por parte de algumas estirpes. O aumento deve-se essencialmente à maior produção de biomassa observada a 30 dias de cultivo. Apesar de *C. aquilonaris* ACOI 2424 e *M. unipapilla* ACOI 2938 demonstrarem as melhores produtividades observadas a 10 dias, foi verificado um decréscimo das mesmas a 30 dias de crescimento. Esta observação pode ser explicada como resposta a possíveis alterações metabólicas causadas pela presença e acumulação de produtos de excreção tóxicos, esgotamento de nutrientes e/ou perturbações no pH (Barsanti and Gualtieri, 2006; Hu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015). Relativamente às culturas cuja produtividade lipídica sofreu um aumento a 30 dias de cultivo, destacam-se as estirpes pertencentes aos géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*. De salientar que, uma vez mais, os valores anteriormente mencionados são superiores a muitos encontrados em bibliografias para *Nannochloropsis* e outras Eustigmatophyceae (Rodolfi *et al.*, 2009; Huerlimann *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). A produtividade lipídica pode ser aumentada quando usadas condições de crescimento que proporcionem uma maior produção de biomassa e, conseqüentemente lípido total. O enriquecimento de culturas com CO<sub>2</sub>, aumento de horas de luz (Li *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009) e disponibilidade em azoto (Illman *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008) fazem com que a otimização da produtividade lipídica seja possível.

#### 4.5 Quantificação e qualificação das frações lipídicas

Da separação e quantificação das frações lipídicas, verificou-se que para cada alga não se observaram diferenças na produção/acumulação de lípidos neutros entre 10 e 30 dias de cultivo. Nas microalgas, os lípidos neutros são a principal fonte de reserva de energia das células (Guschina and Harwood, 2009; Wang *et al.*, 2016). Por esta razão, seria de esperar que à medida que o tempo de cultivo aumenta houvesse um conseqüente aumento da produção/acumulação de lípidos neutros (Gao *et al.*, 2018) contudo, com exceção de *M. gaditana* CCMP 1775 tal não se verificou. Como já discutido anteriormente, neste estudo também se verificou que ao invés de aumentar o lípido total com o aumento do tempo de cultura, este diminui em grande parte das estirpes. Esta observação pode ser uma explicação para o não aumento da produção/acumulação de lípidos neutros pelas estirpes ao longo do tempo, uma vez que o aumento do lípido total está diretamente relacionado com a acumulação de lípido neutro (Gao *et al.*, 2018). Verificou-se também que de uma forma geral todas as culturas apresentam uma maior quantidade de lípidos neutros em comparação com as outras frações. A dominância de lípidos neutros no perfil lipídico das microalgas é comum e frequentemente observada (Gao *et al.*, 2016). Esta fração lipídica é composta maioritariamente por triacilglicerídeos (TAG) e é nestes que reside o maior interesse biotecnológico devido às suas propriedades que possibilitam a sua utilização para a sintetização de biocombustíveis de terceira e quarta geração através do processo de transesterificação (Solovchenko, 2012). *M. gaditana* CCMP 1775 foi a estirpe que apresentou a maior quantidade de lípido neutro seguido de *C. aquilonaris* ACOI 2424, *Dioxys* sp. ACOI 2029 e *N. oculata* SAG 38.85. Como já referido anteriormente *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* são géneros reconhecidos pelo seu potencial lipídico, em especial pela acumulação de elevadas quantidades de lípido neutro (Sukenic, 1991; Wang *et al.*, 2012) sendo de esperar os resultados obtidos. Contudo, neste estudo verificou-se que existem outros géneros com um potencial idêntico na produção/ acumulação de lípidos neutros como são o caso dos géneros *Characiopsis* e *Dioxys*. Os valores de lípidos neutros obtidos vão de encontro aos referidos na bibliografia realizada por Ma *et al.*, (2016) e para outras estirpes da classe Eustigmatophyceae (Gao *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018). A concentração de lípidos neutros é diretamente influenciada pelas condições de cultivo, nomeadamente pelas condições de stress como é o caso da carência de azoto, que promove um aumento bastante significativo de lípidos neutros (Tornabene *et al.*, 1983). É de salientar que os valores obtidos neste estudo para *M. gaditana* CCMP 1775 a 30 dias de cultivo (70,02±1,42% LT) e em condições não otimizadas foram superiores e/ou idênticos aos

obtidos por Ma *et al.*, (2016) cuja produção variou entre 23 e 58% LT e Xiao *et al.*, (2013) com produções de 69,7% LT.

No caso dos glicolípidos e fosfolípidos, também se verificou que para cada alga não há diferenças na produção/acumulação destas classes de lípidos entre 10 e 30 dias de cultivo, com algumas exceções. Os lípidos polares (glicolípidos e fosfolípidos) fazem parte da composição das membranas celulares e participam em atividades de modulação e em trocas de energia, sinais e substâncias (Wang *et al.*, 2016). As microalgas tendem a alterar o seu metabolismo lipídico consoante o tempo de cultivo aumenta (Guschina and Harwood, 2009) e, como resultado, a concentração de lípidos neutros aumenta ao mesmo tempo que os glicolípidos e fosfolípidos reduzem (Zhang *et al.*, 2012). Este aspeto mais uma vez não se verificou para os glicolípidos e fosfolípidos de grande parte das estirpes em estudo. *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni, *M. subterranea* SAG 848-1, *M. gaditana* CCMP 1775 e *V. helvetica* ACOI 299 foram as únicas estirpes em que se observou uma diminuição dos glicolípidos de 10 para 30 dias de cultivo. No caso dos fosfolípidos tal apenas se verificou para *M. unipapilla* ACOI 2938, *Pseudostaurastrum* sp. ACOI 2419ni e *Tetraplektion* sp. ACOI 2650ni. Estas diferenças nos resultados podem ser explicadas pelo método de separação das frações lipídicas escolhido. O método de extração em fase sólida é um método rápido e simples mas, tal como todos os métodos possui algumas limitações (Christie and Han, 2012). No nosso caso, um dos problemas que se observaram na utilização desta técnica foi que algumas vezes ficava amostra presa na coluna de sílica após todas as extrações previstas, indicando possíveis perdas de frações lipídicas ao longo do processo. Os valores de glicolípidos e fosfolípidos obtidos são de uma forma geral superiores aos encontrados na bibliografia para o mesmo tempo de cultivo (Gao *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018), sendo os valores de glicolípidos ao fim de 10 e 30 dias de cultivo bastante similares aos obtidos em culturas muito jovens (3 dias de cultivo). Culturas jovens sintetizam elevadas quantidades de glicolípidos e fosfolípidos uma vez que as microalgas sintetizam estes lípidos polares para constituírem parte das membranas fotossintéticas e de organelos (Gao *et al.*, 2016). Neste estudo as estirpes de *Monodopsis* foram as que apresentaram maior quantidade de glicolípidos e fosfolípidos. Tal como acontece nos lípidos neutros, o teor de glicolípidos pode variar dependendo das condições de cultivo, aumentando com a carência em azoto (Damiani *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016) e limitação em fósforo (Liang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Os glicolípidos e fosfolípidos são compostos geralmente por grandes quantidades de ácidos gordos polinsaturados (PUFA)  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 com propriedades benéficas para nutrição e saúde humana e animal e apresentam na sua constituição componentes com atividade antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória que podem

ser usados como fitoquímicos nas indústrias de farmacêutica e cosmética (Costa *et al.*, 2016).



## **5. Conclusões**



Nas condições de cultivo estabelecidas verificou-se que as estirpes produziram mais biomassa ao fim de 30 dias de cultivo, tendo *Eustigmatos* sp. ACOI 4864ni apresentado o valor mais elevado de produção de biomassa baseado em peso seco ( $0,78 \pm 0,03$  g/L). Ao contrário do que seria de esperar, a maioria das estirpes apresentou um maior conteúdo lipídico ao fim de 10 dias de cultivo, com a espécie *Characiopsis aquilonaris* ACOI 2424 a provar ter um potencial lipídico superior aos reconhecidos géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis*, mesmo em condições não otimizadas. O fracionamento do lípido total revelou que em todas as estirpes há dominância dos lípidos neutros tanto a 10 como a 30 dias de cultivo, revelando mais uma vez o potencial desta classe.

Até onde se sabe, este foi o primeiro estudo de lípidos que envolveu a utilização de diferentes géneros desta classe, contribuindo para o conhecimento do potencial biotecnológico de outros géneros pertencentes à classe Eustigmatophyceae. Uma vez que o interesse biotecnológico nesta classe se centraliza essencialmente nos géneros *Nannochloropsis* e *Microchloropsis* esperamos com este trabalho ter mostrado que o valor da classe pode ser muito superior ao que se conhece, e ter despertado a atenção da comunidade científica para outros géneros nomeadamente, *Characiopsis*.

Em conclusão, este estudo reforça a posição das eustigmatofíceas como uma classe de microalgas com potencial biotecnológico muito promissor no que respeita aos lípidos.





## **6. Bibliografia**



Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y. Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 165, pp. 300-306

Akimoto, M., Ishii, T., Yamagaki, K., Ohtaguchi, K., Kiode, K., Yazawa, K. (1990). Production of eicosapentaenoic acid by a bacterium isolated from mackerel intestines. *JAOCs*, 67, pp. 911-915

Amaral, R., Eliáš, M., Santos, L.M.A. (2019). *Characiopsis* Borzì belongs to the Eustigmatophyceae. Submitted to the *European Journal of Phycology*

Amaral, R., Fawley, K.P., Němcová Y., Ševčíková, T., Lukešová, A., Fawley, M.W., Santos, L.M.A., Eliáš, M. (2020). Towards modern classification of eustigmatophytes including the description of *Neomonodaceae*, fam. nov., and three new genera. *Journal of Phycology*, accepted

Amaral, R., Martins, C.B., Assunção, M.F., Santos, L.M., Soto, S.M., Lombó, F., Römling, U., Tredici, M.R., Ortiz, F.L., Jensen, H.E., Foster, T.J., Rodolfi, L., Sosio, M., Rodríguez, I.R., Vardavoulias, M., Vasconcelos, V., Probert, I. (2016). Fighting hospital infection with new antibiotic molecules derived from microalgae: The NoMorFilm EU project. *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR|International Meeting on Marine Research 2016*, Peniche

Amaral, R., Pereira, J.C., Pais, A.A.C.C., Santos, L.M.A. (2013). Is axenicity crucial to cryopreserve microalgae?, *Cryobiology*, 67, pp. 312-320

Amaral, R., Santos, M.F., Santos, L.M.A. (2009). Overcoming recalcitrance in *Porphyridium aerugineum* geitler employing encapsulation-dehydration cryopreservation methods. *Cryo-Letters*, 30, pp. 462-472

Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, 88, pp. 3402-3410

Anbuezhian, R., Karupiah, V., Li, Z. (2015). Prospect of Marine Algae for Production of Industrially Important Chemicals. Em: D. Das (Eds.), *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, Springer. Cham

Andersen, R., Brett, R., Potter, D., Sexton, J. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist*, 149, pp. 61-74

Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. Estados Unidos da América

Antia, N.J., Bisalputra, T., Cheng, J.Y., Kalley, J.P. (1975). Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloris oculata* and *Monallantus salina* in the Eustigmatophyceae. *Journal of Phycology*, 11, pp. 339-343

Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, pp. 95-98

Assunção, M.F.G., Batista, A.P., Amaral, R., Santos, L.M.A. (2019). Microalgae for Human Nutrition Perspectives for the Future. Em: G.A., Ravishankar, R.R., Ambati (Eds.), *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals*, CRC Press. Nova Iorque

Assunção, M.F.G., Santos, L.M.A., Varejão, J.M.T.B. (2015). Bioactive compounds from *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K.M., Drew, R., Ross, *Chrysolita lamellosa* P.L., Anand., Conference: XX Cryptogamic Botany Symposium. Porto

Assunção, M.F.G., Ressurreição, S., Ferreira, J.D., Martins, C.B., Amaral, R., Santos, S., Santos, L.M.A., Varejão, J.M.T.B. (2014). Screening of antioxidant activity in microalgae. *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR, International Meeting on Marine Research 2014*, Peniche

Assunção, M., Amaral, R., Martins, C., Ferreira, J., Ressurreição, S., Santos, S., Varejão, J., Santos, L. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 29, pp. 865-877

Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton

Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition. Em: Richmond, A. (Ed.), Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, Blackwell Publishing. Oxford

Bellou, S. and Aggelis, G. (2013). Biochemical activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. Journal of Biotechnology, 164, pp. 318-329

Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R., Calvani, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. Journal of the American College of Nutrition, 23, pp. 281-302

Bielewicz, S., Bell, E., Kong, W., Friedberg, I., Priscu, J.C., Morgan-Kiss, R.M. (2011). Protist diversity in a permanently ice-covered Antarctic Lake during the polar night transition. ISME Journal, 5, pp. 1559-1564

Bold, H.C., Wynne, M.J., (1985). Introduction to the Algae. 2, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs

Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., and Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. Em: Coombs, J. and Hall, D.O. (Eds.), Biomass, Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Ingleterra

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. Bioresource Technology, 124, pp. 217-226

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture, 151, pp. 315-31

Brown, M.R., and Farmer, C.L. (1994). Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. Journal of Applied Phycology, 6, pp. 61-65

Chacón-Lee, T.L. and González-Mariño, G.E. (2010). Microalgae for “Healthy” Foods- Possibilities and Challenges. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, pp. 655-675

Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y., Salley, S.O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102, pp. 1649-1655

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, pp. 294-306

Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, pp. 126-131

Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, C.H., Kuan, T.C., Ong, S.C., Lin, C.S. (2008). Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, 99, pp. 3389-3396

Christie, W., and Han, X. (2012). Analyses of simple lipid classes. *Lipid Classes*, 4, pp. 69-90

Christie, W.W. (1982). *Lipid analysis. Isolation, separation, identification, and structural analysis of lipid*, 2nd edn. Pergamon Press, Oxford, pp. 207

Christie, W.W. and Han, X. (2003). *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis (Fourth)*. Woodhead Publishing. USA

Cohen, Z. (1999). *Chemicals from microalgae*. Taylor and Francis Group. London

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48, pp. 1146-1151

Correia, J. (2016). *Cultivo de Vischeria helvética e Asterococcus korschikoffii em sistema unialgal e mistro e determinação do seu conteúdo lipídico*. Tese de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal – Universidade de Coimbra, Coimbra

Costa, G.B., Felix, M.R., Simioni, C., Ramlov, F., Oliveira, E.R., Pereira, D.T., Maraschin, M., Chow, F., Horta, P.A., Lalau, C.M., da Costa, C.H., Matias, W.G., Bouzon, Z.L., Schmidt, E.C. (2016). Effects of copper and lead exposure on the

ecophysiology of the brown seaweed *Sargassum cymosum*. *Protoplasma*, 253, pp. 111-125

Czerwik-Marcinkowska, J. and Mrozinska, T. (2009). Epilithic algae from caves of the Krakowsko- Czestochowska upland (Southern Poland). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78, pp. 301-309

Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101, pp. 3801-3807

Das, P., Aziz, S.S., Obbard, J.P. (2011). Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renewable Energy*, 36, pp. 2524-2528

Delucchi, M. (2003). A Lifecycle Emissions Model (LEM): Lifecycle Emissions from Transportation Fuels, Motor Vehicles, Transportation Modes, Electricity Use, Heating and Cooking Fuels, and Materials. UC Davis: Institute of Transportation Studies. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/9vr8s1bb>

Derner, R.B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S.M., De and Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 36, pp. 1959-1967

Eliáš, M., Amaral, R., Fawley, K.P., Fawley, M.W., Němcová, Y., Neustupa, J., Přibyl, P., Santos, L.M.A., Ševčíková, T. (2017). Eustigmatophyceae. Em: J.M. Archibald, A.G.B. Simpson, C.H. Slamovits, (Eds.), *Handbook of the Protists*, Springer International Publishing. Cham

Ettl, H. (1978). Xanthophyceae. Em: H. Ettl, H.J. Gerloff, H. Heynig (Eds.), *Susswasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart

Ettl, H. and Gärtner, G. (1995). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart

Fakhry, E.M. and El Maghraby, D.M. (2015). Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. *Botanical Studies*, 56



Fawley, K.P. and Fawley, M.W. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist*, 158, pp. 325-336

Fawley, M.W. and Fawley, K.P. (2017). Rediscover of *Tetraedriella subglobosa* Pascher, a member of the Eustigmatophyceae, 17, pp. 96-102

Fawley, M.W., Jameson, I., Fawley, K.P. (2015). The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*, 54, pp. 545-552

Ferreira, J.D., Assunção, M.F.G., Varejão, J.M.T.B., Santos, L.M.A. (2016). Polysaccharide production and antioxidant activity of *Pectodictyon cubicum* Taft, a mucilaginous microalga. *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2016*, Peniche

Gao, B., Xia, S., Lei, X., Zhang, C. (2018). Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos cf. polyphem*. *Journal of Applied Phycology*, 30, pp. 215-229

Gao, B., Yang, J., Lei, X., Xia, S., Li, A., Zhang, C. (2016). Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *Journal of Applied Phycology*, 28, pp. 821-830

Garcia Alba, L., Torri, C., Fabbri, D., Kersten, S.R.A., (Wim) Brillman, D.W.F. (2013). Microalgae growth on the aqueous phase from Hydrothermal Liquefaction of the same microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 228, pp. 214-223

Gelin, F., Volkman, J.K., de Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S. (1997). Mid-chain hydroxy long-chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis*. *Phytochemistry* 45, pp. 641-646

Gotham, I. and G-Yull, R. (1981). Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate uptake in phytoplankton in continuous culture. *Journal of Phycology*, 17, pp. 309-314

Gouveia, L. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, pp. 1-69

Gressel, J. (2008). Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, 174, pp. 246-263

Guillard, R.L., and Ryther, J.H. (1962). Studies for marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detormnule conferracea* (Cleve) Gram. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, pp. 229-239

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Em: W. L. Smith, and M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Plenum Press. Nova Iorque

Guiry, M.D. and G.M., Guiry (2009). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Acedido em: 24, Dezembro, 2019 em: [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

Guschina, I.A. and Harwood, J.L. (2013). Chapter 2: Algal lipids and their metabolism. Em: M. A. Borowitzka, N.R. Moheimani, (Eds.), *Algae for biofuels and energy*, Springer. Nova Iorque

Guschina, I.A. and Harwood, J.L. (2009). Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. Em: M.T. Arts, M.T. Brett, M.J. Kainz (Eds.) *Lipids in aquatic ecosystems*, Springer. Nova Iorque

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

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, pp. 1037-1047

Hegewald, E., Padišák, J., Friedl, T. (2007). *Pseudotetraëdriella kamillae*: Taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae (*Stramenopiles*). *Hydrobiologia*, 586, 107-116

- Henderson, R.J., Leftley, J.W., Sargent, J.R. (1988). Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Phytochemistry*, 27, pp. 1679-1683
- Hibberd, D.J. and Leedale, G.F. (1972). Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae. *Annals of Botany*, 36, pp. 49-71
- Hibberd, D.J. (1980). Eustigmatophyta. Em: E.R., Cox (Ed.), *Phytoplankton*, Elsevier. Amsterdão
- Hibberd, D.J. (1969). Cytological studies on the coccoid Xanthophyceae. Tese de Doutoramento em Ficologia. University of Leeds
- Hibberd, D.J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82, pp. 93-119
- Hibberd, D.J., (1990). Phylum Xanthophyta. Em: L., Margulis, J.O., Corliss, M., Melkonian, D.J., Chapman, (Eds.), *Handbook of Protozoa*, Jones and Barlett Publishers, Boston
- Hoffmann, M., Marxen, K., Schulz, R., Vanselow, K.H. (2010). TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Marine Drugs*, 8, pp. 2526-2545
- Hu, Q. and Richmond, A. (1994). Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 6, pp. 391-396
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, pp. 621-639

Huerlimann, R. de Nys, R., Heimann, K. (2010). Growth, Lipid Content, Productivity, and Fatty Acid Composition of Tropical Microalgae for Scale-Up Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, pp. 245-257

Iglesias, M.J., Soengas, R., Martins, C.B., Correia, M.J., Ferreira, J.D., Santos, L.M.A., Ortiz, F.L. (2019). Chemotaxonomic profiling through NMR. *Journal of Phycology*

Illman, A.M., A.H. Scragg, S.W., Shales (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, pp. 631-635

Iwamoto, H., Sato, S. (1986). Production of EPA by freshwater unicellular algae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, pp. 434

Juneja, A., Ceballos, R.M., Ganti, S. (2013). Murthy effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 9, pp. 4607-4638

Karthikaichamy, A., Deore, P., Rai, V., Bulach, D., Beardall, J., Noronha, S., Srivastavam, S. (2017). Time for Multiple Extraction Methods in Proteomics? A Comparison of Three Protein Extraction Methods in the Eustigmatophyte Alga *Microchloropsis gaditana* CCMP526. Em: Özdemir, V. (Ed.), *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, Mary Ann Liebert, Inc. Toronto

Khozin-Goldberg, I. and Cohen. Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, pp. 696-701

Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, pp. 905-915

Kirrolia, A., Bishnoi, N.R., Singh, R. (2013). Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20, pp. 642-656

Klok, A.J., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2014). Edible oils from microalgae: insights in TAG accumulation. *Trends in Biotechnology*, 32, pp. 521-528

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., and Tsuji, Y. (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, pp. 351-356

Krienitz, L., Hegewald, E., Reymond, O., Peschke, T. (1993). Variability of LM, TEM and SEM characteristics of *Pseudogoniochloris tripus* gen. et comb. nov. (Xanthophyceae). *Algological Studies*, 69, pp. 67-82

Kryvenda, A., Rybalka, N., Wolf, M., Friedl, T. (2018). Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (*Stramenopiles*) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. *European Journal of Phycology*, pp. 1-21

Kumar, R.R., Rao, P.H., Muthu, A. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 2

Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C.R.K., Jha, B. (2013). Algal lipids, fatty acids and sterols. Em: H. Domínguez (Ed.), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing. Oxford

Lam, M.K., and Lee, K.T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30, pp. 673-690

Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology*, 11, pp. 124

Lawrence, E. (Ed.). (2008). *Henderson's dictionary of biology*. 14, Pearson Education Limited. Essex

Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, pp. 497-512

Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, Macmillan Publishers. Estados Unidos da América

Neustupa J. and Nemcová Y. (2001). Morphological and taxonomic study of three terrestrial *estigmatophyceae* species. *Nova Hedwigia Beiheft*, 123, pp. 373-386

Liang, K., Zhang, Q., Gu, M., Cong, W. (2012). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 25, pp. 311-318

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, 24, pp. 815-820

Li, Z., Sun, M., Li, Q., Li, A., Zhang, C. (2012). Profiling of carotenoids in six microalgae (*Eustigmatophyceae*) and assessment of their  $\beta$ -carotene productions in bubble column photo-bioreactor. *Biotechnology Letters*, 34, pp. 2049-2053

Lim, D.K.Y., Garg, S., Timmins, M., Zhang, E.S.B., Thomas-Hall, S.R., Schuhmann, H., Schenk, P.M. (2012). Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters. *PLoS ONE*, 7

Liu, C.P., and Lin, L.P. (2005). Morphology and eicosapentaenoic acid production by *Monodus subterraneus* UTEX 151. *Micron*, 36, pp. 545-550

Lorena, S.P. (2017). Desenvolvimento do processo de extração de lipídios da biomassa de microalgas marinhas. Tese de Mestrado em em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia, São Paulo

Lubián, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I.E., Sobrino, C., Gonzales-del Valle, M., Pares, G. (2000). *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 249-255

Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O. Sukenik, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133, pp. 295-310

Ma, X.-N., Chen, T.-P., Yang, B., Liu, J., Chen, F. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs*, 14, pp. 61

Mata, T., Martins, A. Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, pp. 217-232

Mata, T., Melo, A., Meireles, S., Mendes, A., Martins, A., Caetano, N.S. (2013). Potential of Microalgae *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater for Biodiesel Production. *Chemical Engineering Transactions*, 32, pp. 901-906

McMurry, J. (2007). *Organická chemie. Vysoké učení technické v Brně, Nakladatelství Medical Association Journal*, 178, pp. 177-180

Mercer, E.I., London, R.A., Kent, I.S.A., Taylor, A.J. (1974). Sterols, sterol esters and fatty acids of *Botrydium granulatum*, *Tribonema aequale* and *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 13, pp. 845-852

Meyer, R.L., Wheeler, J.H., Brewer, J.R. (1970). The freshwater algae of Arkansas. II. New additions. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 24, pp. 32-35

Milledge, J.J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, pp. 31-41

Ming Ren, K.O. (2014). Cultivation of *nannochloropsis gaditana* on mixtures of nitrogen sources. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33, pp. 551-555

Mobin, S. and Alam, F. (2017). Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*, 110, pp. 510-517

Nakano, T., Handa, S., Takeshita, S. (1991). Some corticolous algae from the Taishaku-kyô Gorge, western Japan. *Nova Hedwigia*, 52, pp. 427-451

Norgård, S., Svec, W.A., Liaaen-Jensen, S., Jensen, A., Guillard, R.R.L. (1974). Algal carotenoids and chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2, pp. 7-9

Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J.P., 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, pp. 1577-1592

Osório, H.C., Laranjeiro, C.N., Santos, L.M.A., Santos, F.M. (2004). First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra Collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability. *Nova Hedwigia*, 79, pp. 227-235

Ott, D.W., Oldham-Ott, C.K., Rybalka, N., Friedl, T. (2015). Xanthophyte, Eustigmatophyte, and Raphidophyte Algae. *Freshwater Algae of North America*, pp. 485-536

Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45, pp. 11-36

Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40, pp. 781-796

Piorreck, M., Baasch, K.-H., and Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23, pp. 207-216

Přibyl, P., Eliáš, M., Cepák, V., Lukavský, J., Kaštánek, P. (2012). Zoosporogenesis, morphology, ultrastructure, pigment composition, and phylogenetic position of *Trachydiscus minutus* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta). *Journal of Phycology*, 48, pp. 231-242

Prior, S.E., Fawley, M.W., Fawley, K.P. (2009). DNA sequence analysis of freshwater Eustigmatophyceae, a potential source of essential fatty acids. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 63, pp. 139-144

Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal of Applied Phycology*, 6, pp. 337-345



- Řezanka, T., Petrankova, M., Cepak, V., Pribyl, P., Sigler, K., Cajthaml, T. (2010). *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia Microbiologica*, 55, pp. 265-269
- Richmond, A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 441-451
- Richmond, A. (2003). Growth characteristics of ultrahigh-density microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8, pp. 349-353
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishing. Oxford
- Rocha, J., Garcia, J., Henriques, M. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20, pp. 237-242
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovana, G., Biondi, N., Bovini, G., Tredici, M.R. (2009). Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102
- Ryther, J.H. (1954). The ecology of phytoplankton blooms in Moriches Bay and Great South Bay, Long Island, New York. *Biological Bulletin*, 106, pp. 198-209
- San Giovanni, J.P., Chew, E.Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24, pp. 87-138
- Sangeetha, J., Gayathri, S., Rajeshkumar, S. (2017). Antimicrobial assessment of marine brown algae *Sargassum whitti* against UTI pathogens and its phytochemical analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10, pp. 1905-1910
- Santos L.M.A. (1996). The Eustigmatophyceae: actual knowledge and research perspectives. *Nova Hedwigia*, 112, pp. 391-405

Santos, L.M.A. and Leedale, G.F. (1991). *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae): Ultrastructure of the zoospores, with special reference to the flagellar apparatus. *Protoplasma*, 164, pp. 160-167

Santos, L.M.A. and Leedale, G.F. (1995). Some notes on the ultrastructure of small azoosporic members of the algal class Eustigmatophyceae. *Nova Hedwigia*, 60, pp. 219-225

Santos, L., Santos F. (2004). The Coimbra Culture Collection of Algae (ACOI). *Nova Hedwigia*, 79, pp. 39-47

Sarrafzadeh, M.H., La, H.-J., Seo, S.-H., Asgharnejad, H., Oh, H.-M. (2015). Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *Journal of Biotechnology*, 216, pp. 90-97

Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 1, pp. 20-43

Schlösser, U.G. (1994). SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of strains. *Botanica Acta*, 107, pp. 113-186

Schnepf, E., Niemann, A., Wilhelm, C. (1996). *Pseudostaurastrum limneticum*, a eustigmatophycean alga with astigmatic zoospores: Morphogenesis, fine structure, pigment composition and taxonomy. *Archiv für Protistenkunde*, 146, pp. 237-249

Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, pp. 560S-569S

Sheehan, J., Camobreco, V., Duffield, J., Graboski, M., Shapouri, H. (1998a). Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus. Tech Rep NREL/SR-580-24089, US Department of Energy and US Department of Agriculture

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998b). Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, Close-Out Report. United States

Solovchenko, A.E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Applied Phycology*, 59, pp. 167-176

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, pp. 87-96

Spriharan, S., Bagga, D., Nawaz, M. (1991). The effects of nutrients and temperature on biomass, growth, lipid production, and fatty acid composition of *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin, and Guillard. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29, pp. 317-326

Stansell, G.R., Gray, V.M., Sym, S.D. (2012). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, 24, pp. 791-801

Stengel, D.B., S. Connan, Popper, Z.A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29, pp. 483-501

Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. (1968). Determination of reactive phosphorus. Em: J.C. Stevenson (Ed.), *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, Fisheries, Research Board of Canada. Ottawa

Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*, 41, pp. 273-279

Sukarni, Sudjito, Hamidi, N., Yanuhar, U., Wardana, I.N.G. (2014). Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5, pp. 279-290

Sukenik, A., Carmeli, Y. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*, 25, pp. 686-692

Surette, M.E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *Canadian Medical Association Journal*, 178, pp. 177-180

Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S., Burris, N. (1983). Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, pp. 435-440

Tumolo, T. and Lanfer-Marquez, U.M. (2012). Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties. *Food Research International*, 46, pp. 451-459

Vischer, W. (1945). Heterokonten aus Alpinen Boden, Speziell dem Schweizerischen Nationalpark. *Ergebnisse der wissenschaftlichen Untersuchung der Schweizerischen Nationalparks*, 1, pp. 481-510

Voet, D., Voet, J.G. (1995). *Biochemistry*. New York: John Wiley and Sons, 4

Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W. (1993). The biochemical composition of marine microalgae from the class eustigmatophyceae. *Journal of Phycology*, 29, pp. 69-78

Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I. (1999a). Fatty acids and hydroxy fatty acids in three species of freshwater eustigmatophytes. *Journal of Phycology*, 35, pp. 1005-1012

Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I. (1999b). Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C<sub>29</sub> sterols, C<sub>22</sub>-C<sub>28</sub> n- alcohols and C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub> n-alkyl diols in freshwater environments. *Organic Geochemistry*, 30, pp. 307-318

Wang, B., Lan, C., Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30, pp. 904-912

Wang, F.F., Huang, L.D., Gao, B.Y., Zhang, C.W., (2018). Optimum production conditions, purification, identification, and antioxidant activity of violaxanthin from microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae). *Marine Drugs*, 16, pp. 190-203

Wang, G. and Wang, T. (2011). Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, pp. 135-143

- Wang, H., Gao, L., Zhou, W., Liu, T. (2016). Growth and palmitoleic acid accumulation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* at varying temperatures and light regimes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, pp. 1589-1595
- Whittle, S.J. and Casselton, P.J. (1975). The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal*, 10, pp. 179-191
- Wikfors, G.H., Ferris, G.E. Smith, B.C. (1992). The relationship between gross biochemical composition of cultured algal foods and growth of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture*, 108, pp. 135-154
- Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L.M., (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. Em: R.A. Anderson, (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, Elsevier. Massachusett
- Xiao, Y., Zhang, J., Cui, J., Feng, Y., Cui, Q. (2013). Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, 130, pp. 731-738
- Xu, K., Zou, X., Wen, H., Xue, Y., Zhao, S., Li, Y. (2018). Buoy-bead flotation harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* using surface-layered polymeric microspheres: A novel approach. *Bioresource Technology*, 267, pp. 341-346
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., Takriff, M. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21, pp. 6
- Ya-Lin, L., Yao-Chun, C., Huei-Meei, S. (2013). Freeze-dried microalgae of *Nannochloropsis oculata* improve soybean oil's oxidative stability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp. 9675-9683
- Yeh, K.L. and Cheng, J.S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105, pp. 120-127

Yongmanitchai, W. and Ward, O.P., (1991). Growth of and  $\omega$ -3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. Applied and Environmental Microbiology, 57, pp. 419-425

Zhang, J., Wan, L., Xia, S., Li, A. Zhang, C. (2012). Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae). Bioprocess and Biosystems Engineering, 36, pp. 1125-1130

Zhu, C.J. and Lee, Y.K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. Journal of Applied Phycology, 9, pp. 189-194