

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
Departamento de Botânica

**ESTUDO DA FISIOLOGIA DO CRESCIMENTO,
PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS E FOTOSÍNTESE EM
30 ESPÉCIES DE MICROALGAS VERDES DE ÁGUA DOCE**

Eduardo Caffagni de Camargo

São Carlos – SP

2020

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
Departamento de Botânica

Eduardo Caffagni de Camargo

**Estudo da fisiologia do crescimento, produção de biomoléculas e
fotossíntese em 30 espécies de microalgas verdes de água doce**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Teresa Lombardi

São Carlos – SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eduardo Caffagni de Camargo, realizada em 12/06/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior (UNESP)

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig (UFSC)

Profa. Dra. Giseli Swerts Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Raquel Andrade de Rossi (ALGAE)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela conclusão desta importante etapa da minha formação acadêmica.

Aos meus pais, pelo amor e companheirismo inestimáveis.

Aos colegas de laboratório, pela maravilhosa convivência e ajuda nas atividades práticas.

À professora Ana Teresa Lombardi, pela paciência e orientação excepcional ao longo de todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

RESUMO

Estudos de fisiologia e fotossíntese em microalgas são uma contribuição fundamental em projetos voltados à fixação de carbono atmosférico e à produção de biomassa com propósitos comerciais. Apesar de sua vasta diversidade, as microalgas verdes (*Chlorophyta stricto sensu*) possuem poucas espécies sendo cultivadas em larga escala. Este trabalho de prospecção teve como objetivo investigar o crescimento, desempenho fotoquímico, produção primária e capacidade de acúmulo de biomoléculas (clorofila, carotenoides, proteínas e carboidratos) em 30 espécies de *Chlorophyta*, sob condições controladas de laboratório. Os resultados evidenciaram a significância de *Chlorella sorokiniana* em praticamente todos os parâmetros avaliados. *Muriella decolor* se destacou em taxa de crescimento e densidade celular. O acúmulo de carotenoides totais foi significativamente mais alto em *Monoraphidium griffithii*, *Chlorolobion braunii* e *Curvastrum pantanale*. As espécies *Hariotina reticulata* e *Chlorolobion lunulatum* são indicadas à produção de proteínas. *C. lunulatum*, *C. pantanale*, *H. reticulata*, *Scenedesmus quadricauda* e *Desmodesmus spinosus* têm grande potencial para a síntese de carboidratos. Principal ferramenta de análise neste estudo, a fluorometria de Pulso de Amplitude Modulada (PAM) foi usada para avaliar o desempenho fotoquímico das microalgas em diversos aspectos e para estimar sua produção primária bruta (P^B). Destacaram-se nesta importante variável: *C. sorokiniana*, *D. spinosus* e *D. communis*. São, portanto, espécies potenciais para a mitigação de carbono. A partir dos dados obtidos, constatou-se que a correlação entre taxa específica de crescimento e P^B é moderada, o que impossibilita uma inferência precisa da segunda variável a partir apenas da primeira. Verificou-se, porém, que P^B (na condição *in vivo*) é fortemente correlacionada à produtividade específica de carboidratos totais. O uso de amostras *in vivo* foi considerado mais apropriado para a quantificação de P^B em comparação à introdução de um processo adicional de extração da clorofila *a*, uma vez que este altera a integridade de amostras e compromete a interpretação fisiológica dos dados. O presente estudo fornece, assim, uma base sólida para pesquisas voltadas à mitigação de carbono e a potenciais aplicações biotecnológicas para as 30 cepas investigadas.

Palavras-chave: Bioprospecção. Biotecnologia. *Chlorophyta*. Fluorescência.

ABSTRACT

Studies on the physiology and photosynthesis of microalgae are an essential contribution to projects aimed at carbon fixation and biomass production for commercial purposes. Green microalgae (Chlorophyta *stricto sensu*) comprise a vast diversity of species, yet few of them have been massively cultured. The present research aimed at screening 30 species of Chlorophyta for their growth, photochemical performance, primary production and ability to accumulate biomolecules (chlorophyll, carotenoids, proteins and carbohydrates). All cultures were kept under controlled laboratory conditions. The results showed that *Chlorella sorokiniana* stood out in virtually every analyzed aspect. *Muriella decolor* presented a significant growth rate and cell density. The accumulation of total carotenoids was substantial in *Monoraphidium griffithii*, *Chlorolobion braunii* and *Curvastrum pantanale*. New information was found regarding protein productivity in *Hariotina reticulata* and *Chlorolobion lunulatum*. *C. lunulatum*, *C. pantanale*, *H. reticulata*, *Scenedesmus quadricauda* and *Desmodesmus spinosus* are potential carbohydrate producers. The evaluation of different photochemical parameters and the estimation of the microalgae's gross primary production (P^B) were carried out through Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry, the main assessment tool applied in this research. *C. sorokiniana*, *D. spinosus* and *D. communis* stood out in terms of P^B . As a consequence, they are potential organisms for carbon mitigation. Inferring P^B based only on the algae's specific growth rate, as we initially hypothesized, was found not to be possible, since both variables are moderately correlated. Nonetheless, a strong correlation between P^B (under *in vivo* conditions) and total carbohydrate productivity was observed. Using *in vivo* samples was considered a more appropriate way of quantifying P^B rather than adding a chlorophyll-*a* extraction step to the same method, since it affects the samples integrity, thus compromising the interpretation of physiological data. This study thereby provides a solid basis for researchers interested in carbon mitigation and potential biotechnological applications involving the 30 strains investigated.

Keywords: Bioprospection. Biotechnology. Chlorophyta. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas fundamentais da fotossíntese e seus principais produtos. As reações da fase fotoquímica incluem a absorção de luz, liberação de O_2 pela fotólise da água, transporte de elétrons por uma cadeia não-cíclica e produção de $NADPH_2$ e ATP para a fase subsequente. As reações da etapa bioquímica envolvem a redução do CO_2 e a síntese de G3P a partir dos dois produtos oriundos dos processos fotoquímicos. Adaptado de Masojídek, Torzillo e Koblížek (2004). 21

Figura 2. Esquema conceitual da transferência de energia em um fotossistema. Vários pigmentos atuam juntos como uma antena, coletando a luz e transferindo sua energia para o centro de reação, onde reações químicas armazenam parte dessa energia, transferindo elétrons (e^-) da clorofila para uma molécula aceptora. Um doador de elétrons reduz, então, a clorofila novamente. A transferência de energia na antena é um fenômeno puramente físico, denominado ressonância. Adaptado de Taiz e Zeiger (2002). 24

Figura 3. Representação básica do esquema Z da fotossíntese. A luz vermelha absorvida pelo fotossistema II (PSII) produz um oxidante forte e um redutor fraco. Em contrapartida, a luz vermelha distante, preferencialmente absorvida pelo fotossistema I (PSI), produz um oxidante fraco e um redutor forte. O oxidante forte gerado pelo PSII oxida a água, enquanto o redutor forte produzido pelo PSI reduz o $NADP^+$ em NADPH. Cria-se, com isso, um fluxo acíclico de elétrons (e^-), partindo do lado doador do PSII para o lado aceptor do PSI. Graças a essa cadeia de transporte, cria-se um gradiente de prótons entre tilacoide e estroma do cloroplasto (não representado na figura), que impulsiona a produção de ATP a partir de ADP e P_i . No centro de reação do PSII e PSI encontram-se os pares de clorofila *a* denominados P680 e o P700, respectivamente. O asterisco (*) representa o estado reduzido de ambos os pares. Adaptado de Taiz e Zeiger (2002). ... 25

Figura 4. Representação esquemática da curva Kautsky. Em sua fase rápida, uma amostra de microalgas pré-adaptadas ao escuro possui um sinal mínimo de fluorescência (F_o), medido por luz modulada (ML), e um pico de fluorescência, com um valor máximo (F_m), após ser exposta a um pulso saturante (SP). A diferença entre ambos equivale à fluorescência variável máxima (F_v). Na fase lenta da curva, pulsos sequenciais de luz actínica (AL) são acionados até a amostra atingir seu estado estável de adaptação à luz, com um valor basal (F_s) e máximo (F'_m) de fluorescência. A diferença entre ambos é

representada por ΔF . A fluorescência mínima das algas adaptadas à luz (F'_o) pode ser medida após o desligamento da AL, aplicando-se uma luz no comprimento de onda do vermelho distante. A diferença entre F'_m e F'_o corresponde à fluorescência variável na condição de exposição à AL (F'_v). Adaptado de Masojídek, Vonshak e Torzillo (2010).
 29

Figura 5. Esquema ilustrativo do arranjo experimental, com o sistema de iluminação dos cultivos. Os frascos em triplicata foram mantidos sobre suportes de altura regulável e iluminados por baixo com fitas de LED. 37

Figura 6. Esquema ilustrativo do procedimento experimental adotado para o cultivo de cada espécie de microalga estudada. Um cultivo preliminar (etapa 1) forneceu o inóculo para o cultivo principal (etapa 2), assim como uma referência para a irradiância (E) com base no valor calculado de irradiância saturante (E_k). 38

Figura 7. Curva-padrão de calibração da concentração de clorofila a em amostras *in vivo* ($C_{a \text{ in vivo}}$) a partir da medição de fluorescência (em unidades relativas, RFU). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 40

Figura 8. Curvas-padrão de calibração usadas na determinação de **(a)** proteínas totais, a partir de leituras de absorbância a 595 nm (A_{595}), e **(b)** carboidratos totais, com base em valores de absorbância a 315 nm (A_{315}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 43

Figura 9. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorbância a 684 nm (A_{684}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 51

Figura 10. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorbância a 750 nm (A_{750}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 53

Figura 11. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural da concentração de clorofila a *in vivo* ($C_{a \text{ in vivo}}$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 55

- Figura 12.** Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base em absorvância a 684 nm. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 57
- Figura 13.** Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base em absorvância a 750 nm. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 57
- Figura 14.** Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base na concentração de clorofila *a in vivo*. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 58
- Figura 15.** Densidade celular de 30 espécies de microalgas verdes, determinada no último dia de cultivo. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 61
- Figura 16.** Concentração de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) e carotenoides totais (CT) em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 62
- Figura 17.** Produtividade específica de proteínas totais em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 64
- Figura 18.** Produtividade específica de carboidratos totais em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). O sinal de adição (+) indica espécies cuja produtividade ganha destaque se *C. sorokiniana* não for considerada na análise estatística. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 65
- Figura 19.** Monitoramento diário de F_v/F_m em 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 68
- Figura 20.** Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) do fotossistema II em 30 espécies de microalgas verdes. Medição realizada no último dia de cultivo, com as culturas em fase exponencial de crescimento. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$). 70

- Figura 21.** Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'_m$) do fotossistema II em 30 espécies de microalgas verdes. Medição realizada no último dia de cultivo, com as culturas em fase exponencial de crescimento. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 71
- Figura 22.** Decaimento fotoquímico (qP) de fluorescência em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 72
- Figura 23.** Decaimento não-fotoquímico (NPQ) da fluorescência em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 74
- Figura 24.** Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$) vs. irradiância (E), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 76
- Figura 25.** Curvas rápidas de luz das 30 espécies de microalgas verdes estudadas. As abreviações dos nomes das espécies estão de acordo com a tabela 1. Três conjuntos enumerados distinguem: as curvas de maior amplitude (conjunto 1, ao qual pertencem *H. reticulata*, *S. quadricauda* e *D. communis*), as intermediárias (conjunto 2) e as de menor amplitude (conjunto 3, com as espécies *A. stipitatus*, *M. komarkovae* e *C. pantanale*). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 81
- Figura 26.** Valores de inclinação inicial da curva rápida de luz (α) para 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 82
- Figura 27.** Taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 83
- Figura 28.** Irradiância saturante (E_k) em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$)..... 85

Figura 29. Coeficiente médio de absorção específico da clorofila <i>a</i> em amostras <i>in vivo</i> ($a^*_{in vivo}$) de 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).....	87
Figura 30. Coeficiente médio de absorção específico da clorofila <i>a</i> em amostras submetidas à extração com DMSO (a^*_{DMSO}) para 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).....	87
Figura 31. Produção primária bruta em amostras de cultura <i>in vivo</i> ($P^B_{in vivo}$) de 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).....	90
Figura 32. Produção primária bruta em 30 espécies de microalgas verdes, com amostras submetidas ao processo de extração de pigmentos à base de DMSO (P^B_{DMSO}). O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).	91
Figura 33. Gráfico <i>biplot</i> da PCA para diferentes variáveis em 30 espécies de microalgas verdes. As abreviações dos nomes das espécies estão de acordo com a tabela 1.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de microalgas verdes investigadas na prospecção. Cada espécie tem sua própria identificação (número da cepa), abreviação (empregada em alguns resultados gráficos), tempo de cultivo (em dias) e respectivos valores de irradiância saturante (E_k). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$). 35

Tabela 2. Matriz de correlação para as principais variáveis analisadas neste estudo: taxa específica de crescimento, com base em absorbância, a 684 nm (μ_{684}) e 750 nm (μ_{750}), e em concentração de clorofila a *in vivo* (μ_{Ca}); densidade celular (DC); concentração de clorofila a (C_a) e carotenoides totais (CT); produtividade específica de proteínas totais ($ProtT$) e carboidratos totais ($CarbT$); rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F'_m$) do fotossistema II; decaimento fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (NPQ) da fluorescência; inclinação inicial da RLC (α); taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$); irradiância saturante (E_k); produção primária bruta em amostras *in vivo* ($P^B_{in vivo}$) e em amostras de extrato à base de DMSO (P^B_{DMSO}). Coeficientes de Pearson maiores do que 0,7 foram destacados em negrito ($p < 0,05$). 96

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas na PCA e os componentes principais 1 e 2. 102

LISTA DE ABREVIACÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

Variáveis

μ	Taxa específica de crescimento
μ_{684}	μ com base em absorbância (medida a 684 nm)
μ_{750}	μ com base em absorbância (medida a 750 nm)
μ_{Ca}	μ com base em C_a <i>in vivo</i>
A	Absorbância
A^*	Média aritmética da absorbância
a^*	Coefficiente de absorção médio específico da clorofila a
a^*_{DMSO}	a^* determinado em amostras submetidas à extração de clorofila com DMSO
$a^*_{in vivo}$	a^* em amostras <i>in vivo</i>
A_λ	Absorbância em um determinado comprimento de onda
λ	Comprimento de onda (medido em nm)
l	Comprimento do caminho óptico
C_a	Concentração de clorofila a
C_{a^*}	Concentração de clorofila a usada para o cálculo de a^*_{DMSO}
$C_{a in vivo}$	Concentração de clorofila a <i>in vivo</i>
C_b	Concentração de clorofila b
CT	Concentração de carotenoides totais
E	Irradiância
E_k	Irradiância saturante
F'_m	Fluorescência máxima em adaptação à luz
F'_o	Fluorescência mínima em adaptação à luz
F'_v	Fluorescência variável em amostras adaptadas à luz
F_m	Fluorescência máxima em adaptação ao escuro
F_o	Fluorescência mínima em adaptação ao escuro
F_s	Fluorescência basal em estado estável de adaptação à luz
F_v	Fluorescência variável em amostras adaptadas ao escuro
ΔF	Diferença entre as fluorescências F'_m e F_s
F_v/F_m	Rendimento quântico máximo do PSII
$\Delta F/F'_m$	Rendimento quântico efetivo do PSII

Φ_e	Coeficiente de rendimento de elétrons para fixação de carbono
qP	Decaimento fotoquímico da fluorescência
NPQ	Decaimento não-fotoquímico da fluorescência (por dissipação de calor)
P^B	Produção primária bruta
P^B_{DMSO}	P^B em amostras submetidas à extração de clorofila com DMSO
$P^B_{in vivo}$	P^B em amostras <i>in vivo</i>
α	Inclinação inicial da Curva Rápida de Luz
ETR	Taxa absoluta de transporte de elétrons
$rETR$	Taxa relativa de transporte de elétrons
$rETR_{max}$	Taxa relativa máxima de transporte de elétrons
r	Coeficiente de correlação de Pearson
V	Volume de amostra

Abreviações

AL	Luz actínica
ANOVA	Análise de Variância
LED	Diodo emissores de luz
ML	Luz modulada
P680	Par especial de moléculas de clorofila <i>a</i> no centro de reação do PSII
P700	Par especial de moléculas de clorofila <i>a</i> no centro de reação do PSI
PAM	Pulso de Amplitude Modulada
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PCA	Análise de Componentes Principais
pH	Potencial hidrogeniônico
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
RLC	Curva Rápida de Luz
SP	Pulso saturante

Medidas

°C	Graus Celsius
μmol	Micromol
atm	Atmosfera
AU	Unidades de Absorbância
d	Dia
e ⁻	Elétron
g	Grama
g	Aceleração da gravidade
h	Hora
L	Litro
m	Metro
m ²	Metro quadrado
m ³	Metro cúbico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
RFU	Unidades Relativas de Fluorescência
s	Segundo
sr	Esferoradiano
W	Watt

Átomos, Moléculas e Compostos químicos

ATP	Adenosina trifosfato
C	Carbono
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (em sua forma reduzida)

N ₂ O	Óxido nitroso
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₃	Ozônio
Pi	Fosfato inorgânico
Q _A	Quinona A

Observação: As siglas foram mantidas conforme a tradução dos termos em inglês, a fim de manter o padrão encontrado na maioria das publicações acadêmicas.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Mudanças climáticas	19
1.2 Fotossíntese: conceitos fundamentais	20
1.3 Organismos fotossintetizantes	21
1.4 Microalgas verdes	22
1.5 Cultivo de microalgas: vantagens e aplicações.....	22
1.6 Fotoquímica	23
1.7 Fluorescência da clorofila.....	26
1.7.1 Princípios e vantagens.....	26
1.7.2 Fluorometria PAM	27
1.7.3 Produção primária a partir da fluorescência.....	31
2. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	32
2.1 Justificativa	32
2.2 Hipóteses.....	33
2.3 Objetivos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Espécies estudadas	34
3.2 Condições de cultivo.....	34
3.3 Etapas experimentais e intensidade luminosa.....	37
3.4 Duração dos cultivos.....	38
3.5 Monitoramento diário	39
3.5.1 Crescimento das culturas.....	39
3.5.2 Rendimento quântico máximo	40
3.6 Medições finais	41
3.6.1 Densidade celular	41
3.6.2 Extração de pigmentos	41
3.6.3 Proteínas e carboidratos	42
3.6.4 Rendimento quântico efetivo	43
3.6.5 Decaimento de fluorescência	44
3.6.6 Absorção de luz e produção primária.....	45
3.6.7 Curva Rápida de Luz.....	48
3.7 Análise dos dados	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Crescimento das culturas	50
4.2 Densidade celular.....	60

4.3 Biomoléculas	62
4.3.1 Pigmentos	62
4.3.2 Proteínas e carboidratos	63
4.4 Fotoquímica da Fotossíntese.....	67
4.4.1 Rendimentos quânticos do PSII e decaimentos de fluorescência	67
4.4.2 Curva Rápida de Luz.....	75
4.4.3 Absorção de luz.....	86
4.4.4 Produção primária bruta	90
4.5 Correlação entre variáveis.....	95
4.6 Análise de Componentes Principais	100
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mudanças climáticas

O aquecimento global impõe à comunidade científica o desafio de encontrar alternativas capazes de auxiliar na mitigação do efeito-estufa, fenômeno atmosférico caracterizado pela retenção de parte da radiação solar refletida pela superfície do planeta. O calor proveniente desse processo permite a existência de vida na Terra, mas, em excesso, causa sérias consequências, de curto e longo prazo, para o ambiente, incluindo: derretimento do gelo polar, elevação do nível dos oceanos, morte de corais, alterações em regimes pluviométricos, intensificação de estiagens e tempestades, desertificação, comprometimento de serviços ecossistêmicos para a humanidade e impactos irreversíveis na biodiversidade do planeta (SOLOMON et al., 2009; MONTOYA; RAFFAELLI, 2010; BELLARD et al., 2012; LAM; LEE; MOHAMED, 2012).

Gases como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) e ozônio (O_3) são considerados os componentes de efeito estufa mais abundantes na atmosfera (JACOBSON, 2009). O CO_2 é, de todos, o que mais contribui em quantidade para o aquecimento superficial do planeta. Grande parte do CO_2 proveniente de emissões permanece na atmosfera por séculos (KNUTTI; ROGELJ, 2015). Desde 1800, a partir da Revolução Industrial, a temperatura global aumentou cerca de $0,8\text{ }^\circ\text{C}$ (COLE; MCCARTHY, 2014). É previsto que, até o ano de 2100, haja uma elevação média da temperatura mundial de $3,1\text{--}3,7\text{ }^\circ\text{C}$, com base nas políticas climáticas implementadas até o momento (RITCHIE; ROSER, 2019).

Para combater o aquecimento global, faz-se necessária a mobilização tanto da comunidade científica quanto dos principais meios de produção que movem a economia de uma nação. Além da redução das emissões de gases-estufa, a fixação do carbono já presente na atmosfera é cada vez mais considerada em estudos científicos (HUANG; TAN, 2014). É o caso, por exemplo, das técnicas de captura e armazenamento de CO_2 , que procuram isolar o carbono em compartimentos naturais subterrâneos, como reservatórios de gás e óleo, jazidas de carvão ou aquíferos profundos (REHAN; NEHDI, 2005). A injeção de CO_2 em formações geológicas, como medida de mitigação, é, no entanto, sujeita a vazamentos, podendo levar à acidificação de ambientes aquáticos e à alteração da solubilização de componentes tóxicos, como metais (DE ORTE et al., 2014).

Fundamentada no processo da fotossíntese, a abordagem biológica de mitigação do CO₂ atmosférico é isenta de tal problema, podendo gerar lucro ao empreendedor, quando se considera o aproveitamento de biomassa obtida ao final do cultivo (HUANG; TAN, 2014). Trata-se de uma vantagem econômica que as técnicas de captura e armazenamento não proporcionam, principalmente por exigirem alto investimento de capital em sua implantação (CUÉLLAR-FRANCA; AZAPAGIC, 2015).

Ampliar o conhecimento sobre biofixação de carbono é, portanto, essencial, não apenas para o setor empresarial, mas para a ciência, uma vez que a compreensão plena da fotossíntese ainda configura um desafio para estudiosos de diversas áreas, devido à complexidade de sua regulação e interação com fatores externos (DIETZE, 2014).

1.2 Fotossíntese: conceitos fundamentais

Seria impossível descrever a vida, da forma como a conhecemos atualmente, sem a existência da fotossíntese. De acordo com Gest (2002), a versão original do termo “fotossíntese” (*photosyntax*) foi cunhada por Charles Barnes, em 1893, e designava, na época, “a síntese de compostos de carbono complexos a partir de ácido carbônico, na presença de clorofila e sob ação da luz”. Uma definição geral, atualizada e apropriada para a fotossíntese seria: uma série de processos nos quais a energia eletromagnética é convertida em energia química destinada à biossíntese de matéria orgânica em nível celular (GEST, 2002). Em uma descrição mais completa, a fotossíntese compreende uma série de reações divididas em duas importantes etapas:

Etapa fotoquímica (incorretamente denominada “fase clara” ou “reações de luz”), que envolve a absorção de fótons nos cloroplastos, o uso de sua energia na quebra (fotólise) de moléculas de água, com consequente liberação de oxigênio (O₂) e a condução de elétrons em uma cadeia de transporte não-cíclica. Esta, por sua vez, permite a formação de adenosina trifosfato (ATP), a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi), e a redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺ → NADPH).

Etapa bioquímica (“fase escura”), que compreende o chamado Ciclo das Pentoses Fosfato (Ciclo de Calvin). É indiretamente dependente da luz, pois requer ATP e NADPH, produzidos na etapa fotoquímica, para assimilar CO₂ e formar o

gliceraldeído 3-fosfato (G3P), fundamental para a síntese de açúcares, amido, aminoácidos e ácidos graxos (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2014).

O esquema ilustrativo exibido na figura 1 traz, de forma sucinta, uma visão geral das duas etapas (fotoquímica e bioquímica) da fotossíntese, com seus principais produtos.

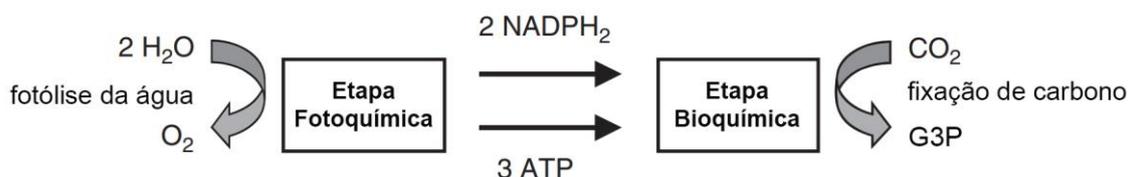


Figura 1. Etapas fundamentais da fotossíntese e seus principais produtos. As reações da fase fotoquímica incluem a absorção de luz, liberação de O₂ pela fotólise da água, transporte de elétrons por uma cadeia não-cíclica e produção de NADPH₂ e ATP para a fase subsequente. As reações da etapa bioquímica envolvem a redução do CO₂ e a síntese de G3P a partir dos dois produtos oriundos dos processos fotoquímicos. Adaptado de Masojídek, Torzillo e Koblížek (2004).

1.3 Organismos fotossintetizantes

Um organismo fotossintetizante pode ser definido como aquele cuja fração predominante de energia para a síntese celular é fornecida pela luz (GEST, 2002). Os organismos fotossintetizantes dividem-se em três grandes grupos: plantas terrestres, algas e cianobactérias. As plantas são vegetais vasculares, caracterizadas pela presença de tecidos condutores especializados (xilema e floema), formados por células diferenciadas (TAIZ; ZEIGER, 2002). “Algas” (do latim, *algae*) é um nome comum para organismos eucariontes fotoautotróficos, caracterizados como talófitos, ou seja, desprovidos de raízes, caule e folhas (LEE, 2008). Cianobactérias, por sua vez, são organismos procariontes, dotados de parede celular gram-negativa e capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (MARISCAL; HERRERO; FLORES, 2007).

Algas e cianobactérias são constituintes do fitoplâncton, nome coletivo para microrganismos fotossintéticos que vivem, parcial ou totalmente, em águas marinhas, lagos, reservatórios, rios ou mesmo poças, atuando como fonte de carbono orgânico para teias alimentares pelágicas (REYNOLDS, 2006). Segundo Falkowski e Kolber (1995),

mais de 95% da fixação de carbono nos oceanos provém da atividade fotossintética fitoplanctônica. Em termos globais, a contribuição do fitoplâncton para a incorporação anual de carbono é de cerca de 40%. Participam da composição do fitoplâncton as microalgas. Elas constituem o imenso grupo de algas microscópicas, unicelulares ou formadoras de colônias, cujo tamanho varia na ordem de micrômetros (SUGANYA et al., 2016).

1.4 Microalgas verdes

Grupo de interesse no presente trabalho, o filo Chlorophyta (*stricto sensu*) engloba as chamadas “algas verdes”, unicelulares ou multicelulares, que contém clorofila *a* e *b*, amido como material de reserva e parede celular constituída por celulose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006). Guiry (2012) estimou que cerca de 8000 espécies de Chlorophyta já haviam sido descritas até a data de sua publicação. As algas verdes possuem grande diversidade morfológica, com organismos macro e microscópicos, marinhos e dulciaquícolas (TOMASELLI, 2004). Espécies de Chlorophyta são frequentemente encontradas em ambientes onde a luz é abundante, como águas rasas e piscinas de marés, sendo pouco comuns nos oceanos, em comparação às algas marrons e vermelhas; podem, também, ser encontradas em ambientes terrestres, na superfície de rochas, árvores e até mesmo sobre a neve (KENNEDY, 2020). A importância ecológica das algas verdes inclui sua atuação como produtores primários em cadeias alimentares aquáticas e a simbiose que estabelecem com diversos organismos eucariontes, incluindo fungos, ciliados, foraminíferos, cnidários e moluscos (LELIAERT et al., 2012).

1.5 Cultivo de microalgas: vantagens e aplicações

Cultivar microalgas é uma estratégia promissora para a mitigação do efeito-estufa. As microalgas podem apresentar alta taxa de crescimento e capacidade de biofixação de CO₂ (WANG et al., 2008; BHOLA et al., 2014). Diferentemente dos vegetais terrestres e do reflorestamento em larga escala, as microalgas não competem com a produção de alimentos e não afetam serviços ecossistêmicos se cultivadas em ambientes isolados (WOODWARD et al., 2009). O cultivo de microalgas não se restringe a uma determinada época do ano, não requer o uso de pesticidas e herbicidas, pode ser usado na biorremediação de poluentes e na obtenção de biomassa com potencial para a produção

de suplementos alimentares, vitaminas, pigmentos, antioxidantes, fármacos, cosméticos, biofertilizantes e biocombustíveis (BONOTTO, 1988; BOROWITZKA, 1995; SPOLAORE et al., 2006; SINGH; GU, 2010; STIRK et al., 2013; MONDAL et al., 2017; KHAN; SHIN; KIM, 2018). Associar tais benefícios a projetos voltados para sequestro de carbono é, portanto, um incentivo tanto a empreendedores quanto à pesquisa científica.

As microalgas verdes têm sido empregadas na obtenção sustentável de bioprodutos de interesse comercial, incluindo produtos químicos finos, como, por exemplo, carotenoides e ácidos graxos essenciais (FU et al., 2019). O cultivo de microalgas verdes também pode ser destinado à produção de biohidrogênio, diterpenos e uma vasta gama de proteínas com finalidades terapêuticas (MELIS; HAPPE, 2001; RASALA; MAYFIELD, 2011; LAUERSEN et al., 2018). Espécies de Chlorophyta capazes de acumular carboidratos podem se tornar matéria-prima na produção de bioetanol (RIZZA et al., 2017). Aquelas com alto teor proteico em sua biomassa tem grande importância no enriquecimento nutricional de alimentos e ração animal (DIXON; WILKEN, 2018), além de servirem para a fabricação de bioplástico (ZELLER et al., 2013).

1.6 Fotoquímica

A etapa fotoquímica da fotossíntese relaciona-se intrinsecamente à luz. Sistemas uniformes de captura da energia luminosa dependem de pigmentos fundamentais para funcionarem. O principal desses pigmentos é a clorofila *a*, que absorve intensamente as luzes vermelha e azul, sendo a luz verde predominantemente refletida (MADIGAN et al., 2016). As moléculas de pigmentos se organizam em complexos proteicos associados à membrana tilacoidal dos cloroplastos, denominados fotossistemas (NUGENT; PURTON; EVANS, 2003). Eles conectam os componentes da separação inicial de cargas e os doadores/aceptores de elétrons na conformação necessária para que o processo da fotoquímica aconteça (COSGROVE, 2007).

Os fotossistemas possuem duas partes distintas: um complexo de captura de luz (complexo antena) e um centro de reação. A transferência de energia entre essas partes é esquematizada na figura 2. Um aglomerado de pigmentos se concentra no complexo antena. Eles captam a energia luminosa de excitação e a transferem por ressonância ao centro de reação, onde ocorre uma separação de cargas por reações de óxido-redução, iniciando, assim, a conversão da energia fótica em energia química (KRAUSE; WEIS, 1991). A clorofila *a* é o pigmento presente em maior quantidade nesse aglomerado.

Outros pigmentos, considerados acessórios, também são encontrados no complexo antena. Pode-se citar, por exemplo, as moléculas de clorofila *b*, *c* e *d*, que auxiliam na captação e transferência de energia luminosa para a clorofila *a*, e os carotenos e xantofilas, que protegem o aparato fotossintético de danos oxidativos causados pela incidência excessiva de luz (CAHOON; TIMKO, 2003; LARKUM, 2016).

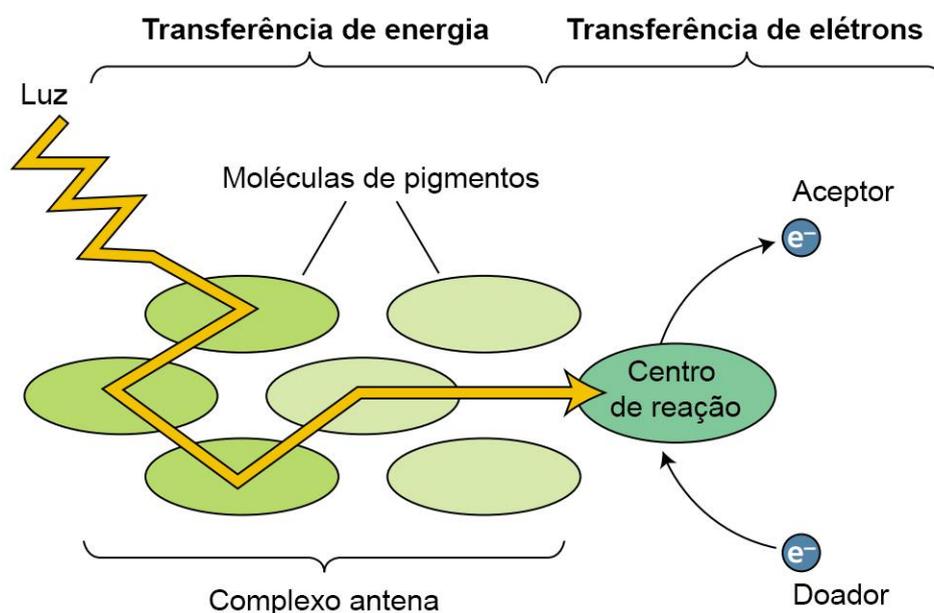


Figura 2. Esquema conceitual da transferência de energia em um fotossistema. Vários pigmentos atuam juntos como uma antena, coletando a luz e transferindo sua energia para o centro de reação, onde reações químicas armazenam parte dessa energia, transferindo elétrons (e^-) da clorofila para uma molécula aceitadora. Um doador de elétrons reduz, então, a clorofila novamente. A transferência de energia na antena é um fenômeno puramente físico, denominado ressonância. Adaptado de Taiz e Zeiger (2002).

Os centros de reação podem ser interpretados como armadilhas de excitação, capazes de se abrir ou fechar (MAUZERALL; GREENBAUM, 1989). Um centro de reação “fechado”, que sofreu redução, tem uma eficiência fotoquímica de separação de cargas entre doador e aceitador primário de elétrons equivalente a zero (VREDENBERG; PRASIL, 2013).

Proposto por Hill e Bendall (1960) e bem aceito na comunidade científica (RAVEN; GIRARD-BASCOU, 2001), o chamado “esquema Z” da fotossíntese é um modelo ilustrativo das reações fotoquímicas. A figura 3 mostra uma representação

simplificada do esquema Z. Seu nome deriva de sua típica representação em zigue-zague. Nela estão inseridos os dois tipos de fotossistemas encontrados em organismos autotróficos eucariontes: os fotossistemas II (PSII) e I (PSI), assim intitulados por ordem de descoberta.

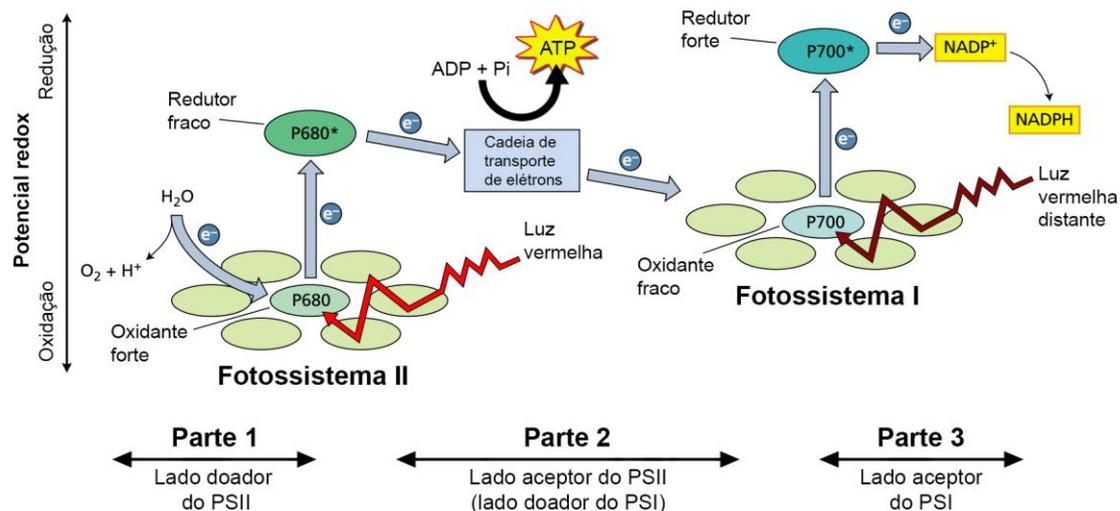


Figura 3. Representação básica do esquema Z da fotossíntese. A luz vermelha absorvida pelo fotossistema II (PSII) produz um oxidante forte e um redutor fraco. Em contrapartida, a luz vermelha distante, preferencialmente absorvida pelo fotossistema I (PSI), produz um oxidante fraco e um redutor forte. O oxidante forte gerado pelo PSII oxida a água, enquanto o redutor forte produzido pelo PSI reduz o NADP^+ em NADPH . Cria-se, com isso, um fluxo acíclico de elétrons (e^-), partindo do lado doador do PSII para o lado receptor do PSI. Graças a essa cadeia de transporte, cria-se um gradiente de prótons entre tilacoide e estroma do cloroplasto (não representado na figura), que impulsiona a produção de ATP a partir de ADP e P_i . No centro de reação do PSII e PSI encontram-se os pares de clorofila *a* denominados P680 e o P700, respectivamente. O asterisco (*) representa o estado reduzido de ambos os pares. Adaptado de Taiz e Zeiger (2002).

O esquema Z pode ser dividido em três partes: (1) o lado doador do PSII, que inclui as reações responsáveis pela entrada de elétrons no fotossistema a partir da água; (2) a cadeia de transporte de elétrons intersistêmica, composta por uma série de carreadores; e (3) o lado receptor do PSI, onde ocorre a redução direta de NADP^+ em NADPH , o qual será exportado para o Ciclo de Calvin (FALKOWSKI; RAVEN, 2007). Um par especial de clorofila *a* está localizado no centro de reação de cada fotossistema. No PSII, encontra-

se o par P680 e, no PSI, o P700. A letra “P” é a abreviação de “pigmento” e o número adjacente corresponde ao comprimento de onda (λ , em nm) no pico ótimo de absorção luminosa desse pigmento (RAVEN; EICHHORN; EVERT, 2014).

O processo descrito pelo esquema Z recebe o nome de fotofosforilação acíclica, pois a produção de energia, na forma de ATP, está vinculada a uma cadeia não-cíclica de elétrons, iniciada com a fotólise da água e encerrada na produção de NADPH. Um outro processo, denominado fotofosforilação cíclica, produz ATP a partir do PSI, mas não resulta em liberação de oxigênio para a atmosfera. A representação completa do esquema Z envolveria uma série de carreadores de elétrons, não incluídos na figura 3. Os nomes e processos fotoquímicos mencionados nesta seção são importantes para a compreensão do principal método de estudo da fotossíntese adotado no presente trabalho: a análise da emissão de fluorescência pela clorofila.

1.7 Fluorescência da clorofila

1.7.1 Princípios e vantagens

A fotossíntese deve ser estimada de forma correta para a obtenção de estimativas confiáveis sobre biofixação de carbono. A medição do sinal de fluorescência emitido por pigmentos fotossintéticos é uma ferramenta de grande importância nessa tarefa. Fluorescência é a emissão imediata de fótons com comprimento de onda maior do que o da luz incidida em uma substância (VERNET; SMITH, 2007). A clorofila é um exemplo de molécula fluorescente. O sinal por ela emitido é rico em informações sobre o organismo fotossintetizante, sensível a mudanças ambientais e passível de alta detecção (KALAJI et al., 2014).

A possibilidade de estudo da fisiologia vegetal a partir da fluorescência da clorofila decorre do princípio básico de que a energia luminosa incidente sobre o pigmento não é utilizada em sua totalidade. A luz absorvida pelos fotossistemas pode ser: (1) usada na etapa fotoquímica da fotossíntese ou perdida por meio (2) da dissipação de calor e (3) pela emissão de fluorescência (KOLBER; FALKOWSKI, 1993; NICKLISCH; KÖHLER, 2001; MURCHIE; LAWSON, 2013). Tais destinos podem ser interpretados como frações de um todo. Como as três vias competem entre si pela desexcitação da energia fótica, assume-se que o somatório dos seus rendimentos seja igual a 1 (MATTOS, 2006). Alterações na eficiência de um desses processos resultará em consequente

mudança nos demais (MISRA; MISRA; SINGH, 2012). Analisa-se, dessa forma, um processo de perda energética para estimar a porção do que foi aproveitado na fotossíntese. A associação entre fluorometria e clorofila se tornou, portanto, uma forma conveniente de medição indireta da atividade fotossintética (PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 2011).

A maior parte do sinal de fluorescência da clorofila é causada pela atividade do PSII. Sua sensibilidade a fatores externos, bióticos ou abióticos, permite a compreensão dos mecanismos fotossintéticos e como estes respondem ao ambiente (MURCHIE; LAWSON, 2013). A aplicação da fluorescência em análises fisiológicas tem a vantagem de ser uma técnica versátil, robusta, não-invasiva e eficiente na obtenção de dados qualitativos e quantitativos a respeito da fotossíntese (ROHÁČEK; BARTÁK, 1999; NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012; MISRA; MISRA; SINGH, 2012). A fluorescência também pode ser estimulada por níveis relativamente baixos de luz, que não causam estresse fisiológico prolongado ou permanente, o que, segundo Andersen (2005), torna sua medição *in vivo* uma ferramenta conveniente para estimar até mesmo taxas de crescimento em microalgas.

Uma dificuldade digna de menção a respeito da fluorescência da clorofila é a sua densa fundamentação teórica, refletida em uma complexa terminologia. Nomenclaturas encontradas na literatura são, muitas vezes, confusas e notoriamente inconsistentes entre os diferentes grupos de pesquisa que a empregam (ANDERSEN, 2005). Uma mesma variável pode ser descrita com diferentes termos, seja por questão de preferência, seja pela aplicação de técnicas fluorométricas sutilmente distintas. Por esse motivo, o presente trabalho adotará símbolos e expressões para as variáveis relacionadas à fluorescência da clorofila com base na terminologia mais frequentemente encontrada na literatura internacional, traduzida com fidelidade do inglês.

1.7.2 Fluorometria PAM

Um método fluorométrico que vem ganhando cada vez mais destaque na literatura científica é a fluorometria de Pulso de Amplitude Modulada (PAM). Introduzida por Schreiber, Schliwa e Bilger (1986), a técnica PAM combina diferentes tipos de luz para analisar a cinética de indução da fluorescência (SCHREIBER, 2004). Seu desenvolvimento teve como objetivo original avaliar reações fotossintéticas primárias e mecanismos de dissipação energética em estudos fisiológicos com vegetais vasculares,

sendo posteriormente aplicada para macrófitas e fitoplâncton, em condições naturais ou artificiais (FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013).

Uma vasta gama de variáveis fotoquímicas pode ser estimada por meio da fluorometria PAM. Elas derivam da interpretação da chamada “curva Kautsky” (figura 4), também conhecida como “indução da fluorescência” ou “fluorescência transiente” (STIRBET; GOVINDJEE, 2011). Os sinais de fluorescência são sempre medidos em unidades relativas (RFU). Descrita originalmente por Kautsky e Hirsch (1931), a representação desse complexo fenômeno ilustra as principais mudanças no rendimento de fluorescência da clorofila *a* quando um organismo fotossintético adaptado a uma condição de escuro é transferido para uma condição de exposição à luz (MAUZERALL; GREENBAUM, 1989; HUOT; BABIN, 2010).

Segundo Cosgrove e Borowitzka (2010), a curva Kautsky pode ser dividida em duas partes fundamentais: uma fase rápida, com duração de, no máximo, 1 s, e uma fase lenta, que pode se estender por vários minutos (GOVINDJE, 1995). Ambas as fases da curva de indução da fluorescência são fontes ricas de informação sobre a fotossíntese oxigênica (PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 2011).

Avaliações da fase rápida são feitas por meio do chamado método do pulso saturante (SCHREIBER et al., 1995a). Para tal intento, amostras de suspensão algal devem ser previamente mantidas no escuro por, pelo menos, 20 minutos, conforme orientam Schreiber et al. (1995b). A origem da curva Kautsky representa o valor mínimo de fluorescência emitido por moléculas de clorofila no complexo antena dos fotossistemas. Usa-se, nesta etapa, uma luz modulada de medição (ML) com intensidade baixa o suficiente ($< 0,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para não induzir a redução da quinona A (Q_A), o primeiro aceptor de elétrons atuante na parte 2 do esquema Z da fotoquímica (SCHREIBER, 1998; COSGROVE; BOROWITZKA, 2010). É o estado redox desse carreador que determina o fechamento do centro de reação, sendo este o fator determinante do rendimento de fluorescência da clorofila *a* (MAUZERALL; GREENBAUM, 1989; SCHREIBER et al., 1998).

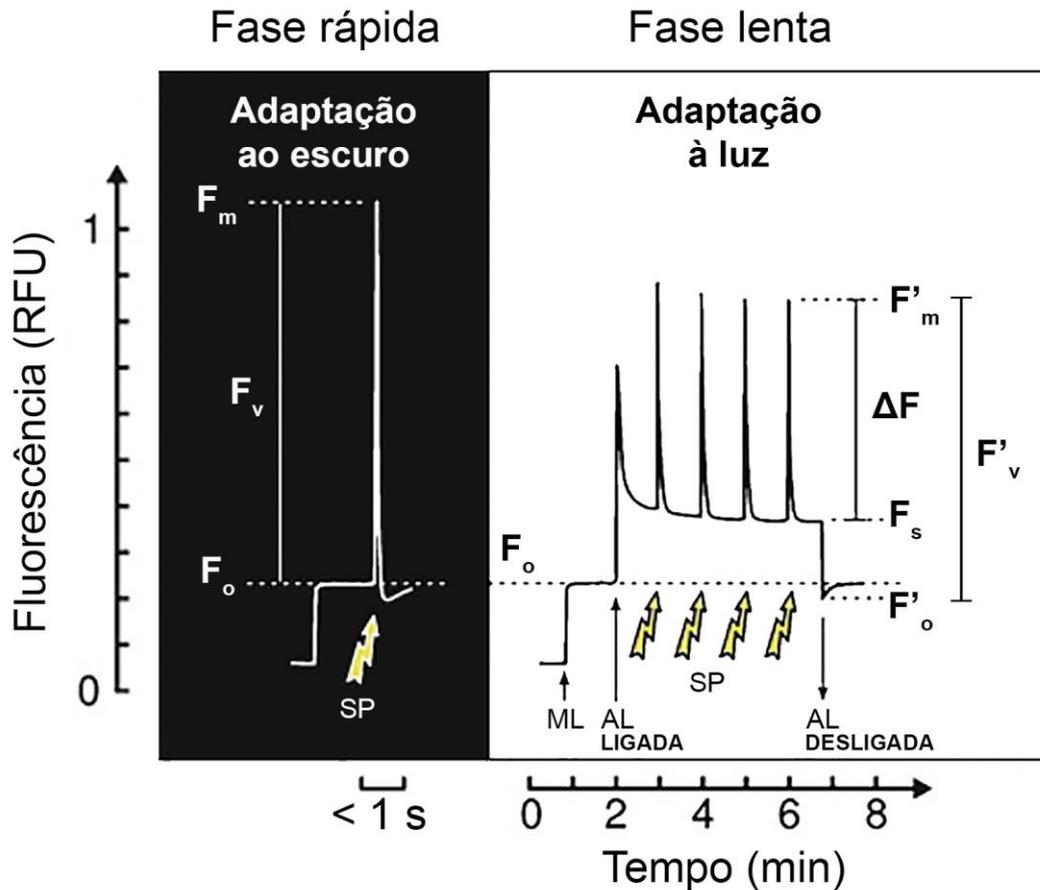


Figura 4. Representação esquemática da curva Kautsky. Em sua fase rápida, uma amostra de microalgas pré-adaptadas ao escuro possui um sinal mínimo de fluorescência (F_o), medido por luz modulada (ML), e um pico de fluorescência, com um valor máximo (F_m), após ser exposta a um pulso saturante (SP). A diferença entre ambos equivale à fluorescência variável máxima (F_v). Na fase lenta da curva, pulsos sequenciais de luz actínica (AL) são acionados até a amostra atingir seu estado estável de adaptação à luz, com um valor basal (F_s) e máximo (F'_m) de fluorescência. A diferença entre ambos é representada por ΔF . A fluorescência mínima das algas adaptadas à luz (F'_o) pode ser medida após o desligamento da AL, aplicando-se uma luz no comprimento de onda do vermelho distante. A diferença entre F'_m e F'_o corresponde à fluorescência variável na condição de exposição à AL (F'_v). Adaptado de Masojídek, Vonshak e Torzillo (2010).

Quando irradiadas com ML, amostras de microalgas em suspensão emitem um registro de fluorescência mínima, F_o (COSGROVE; BOROWITZKA, 2010), que caracteriza uma condição na qual todos os centros de reação se encontram “abertos” e ávidos por elétrons (MAUZERALL; GREENBAUM, 1989). Na fluorometria PAM, a aplicação de um pulso saturante de luz (SP) reduz as quinonas A, B e todo o conjunto de

plastoquinonas livres na membrana do tilacoide (SUGGETT et al., 2003). Nesse momento, a fotoquímica cai subitamente para nível zero, fazendo com que a emissão de fluorescência atinja o seu ápice. Esse pico de fluorescência máxima (F_m) é, então, registrado na curva Kautsky. A correta medição de F_m requer a pré-adaptação dos organismos fotossintetizantes ao escuro, pois, do contrário, processos de dissipação não-fotoquímica podem fazer com que esse valor seja subestimado.

A diferença entre F_m e F_o equivale à fluorescência variável máxima (F_v), parâmetro que, segundo Krause e Weis (1991), não representa um componente independente da fluorescência; ele apenas descreve a alteração na emissão de fluorescência entre dois estados definidos. De acordo com Nicklisch e Köhler (2001), a fluorescência variável provém exclusivamente do PSII e seu valor é proporcional à transferência fotossintética de elétrons (atividade do PSII). A contribuição para F_v proveniente do fechamento de centros de reação do PSI pode ser considerada insignificante (KRAUSE; WEIS, 1991).

O típico efeito Kautsky, com sinal de indução da fluorescência em cloroplastos *in vivo*, ocorre quando uma amostra é exposta a pulsos contínuos de iluminação actínica (AL, $\lambda = 655$ nm). A fluorescência emitida por amostras irradiadas com AL passa a apresentar novos níveis, particulares da adaptação à luz. Após alguns minutos, o rendimento da fluorescência atinge um nível terminal de fluorescência basal, também chamada de fluorescência em estado estável, F_s (KRAUSE; WEIS, 1991). Quando este estado é alcançado, a fluorescência em adaptação à luz atinge um valor máximo (F'_m) a cada pulso de AL. A diferença entre F'_m e F_s é simbolizada por ΔF . Uma vez desligada a AL, é possível medir a fluorescência mínima de células adaptadas à luz (F'_o) por meio de um pulso com iluminação fraca, na faixa de comprimento de onda do vermelho-extremo ($\lambda > 700$ nm), usada para acelerar a reoxidação do sítio aceptor do PSII (VAN KOOTEN; SNEL, 1990; ROHÁČEK; BARTÁK, 1999). A diferença entre F'_m e F'_o representa a fluorescência variável para amostras adaptadas à luz actínica (F'_v).

A partir dos cinco sinais básicos de fluorescência da clorofila *a*, (F_o , F_m , F' , F'_m e F'_o), é possível calcular uma série de variáveis importantes para estudos fisiológicos envolvendo a fotoquímica da fotossíntese, incluindo: os rendimentos quânticos máximo e efetivo do PSII, os coeficientes de decaimento da fluorescência, a taxa de transporte de elétrons e as três medidas fundamentais extraídas das chamadas Curvas Rápidas de Luz. O procedimento prático de medição e cálculo dessas variáveis será descrito em detalhes em Materiais e Métodos.

1.7.3 Produção primária a partir da fluorescência

Mais do que a avaliação rápida e não-invasiva de parâmetros fotoquímicos, a fluorometria PAM pode ser usada para estimar a taxa de fixação de carbono de organismos produtores, ou seja, a quantidade de CO₂ fixado por volume de cultura (ou massa de clorofila) por unidade de tempo (PERKINS et al., 2010). Por não levar em conta o processo de respiração celular, essa taxa está relacionada à produção primária bruta e pode ser representada pelo símbolo P^B (KROMKAMP; FORSTER, 2003).

Técnicas tradicionais de medição da produção primária em organismos aquáticos envolvem, por exemplo, a detecção da atividade de um isótopo radioativo do carbono (ex.: carbono-14 – C¹⁴) incorporado pelo organismo fotossintetizante ou a medição do O₂ produzido na fotossíntese (HALSEY; MILLIGAN; BEHRENFELD, 2010; MILLIGAN; HALSEY; BEHRENFELD, 2015). A variável P^B estudada no presente trabalho deriva da taxa absoluta de transporte de elétrons (*ETR*), aferida, por sua vez, a partir de leituras de fluorescência da clorofila. Em um trabalho com comunidades fitoplanctônicas de água doce, Goto et al. (2008) concluíram que existe uma relação linear tanto entre *ETR* estimada pela técnica PAM e fixação de C¹⁴ quanto entre *ETR* e produção de O₂, o que corrobora o uso da fluorometria em estudos de mitigação de CO₂. Os autores destacam, no entanto, que essa linearidade ocorre em amostras de fitoplâncton sob intensidades luminosas baixas a médias. Devido à possibilidade comprovada de comprometimento da precisão de P^B em condições de alta irradiância (PERKINS et al., 2010), é fundamental que a quantidade ótima ou subótima de luz seja cuidadosamente aplicada em cultivos que sirvam ao propósito de associar fluorometria PAM e fixação de carbono em microalgas.

Além das leituras fluorométricas PAM, o cálculo de P^B envolve uma medida quantitativa da clorofila *a*, que pode ser obtida a partir de leituras da fluorescência emitida por uma suspensão de células *in vivo* ou por meio de um processo de extração, que envolve a ruptura celular. Um dos compostos frequentemente utilizados para extrair pigmentos de algas é o dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente aprótico de alta polaridade (WELLBURN, 1994). O DMSO possui viscosidade e propriedades ópticas distintas das de uma solução aquosa (LEBEL; GORING, 1962), o que, hipoteticamente, poderia resultar em leituras de fluorescência distintas das registradas em uma amostra com células vivas em suspensão no meio de cultura. O quanto o processo de extração pode interferir na precisão da produção primária é algo passível de investigação.

2. JUSTIFICATIVA, HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A importância primária deste estudo reside na criação de uma base sólida para futuros projetos, como parte da iniciativa de ampliar a variedade de microalgas verdes em pesquisas na área da ficologia e, principalmente, em cultivos expandidos para aplicações industriais. Sem esse tipo de documentação, espécies novas ou pouco exploradas correm o risco de terem qualquer potencial não aproveitado. Informações fornecidas a partir desta prospecção sobre candidatos promissores à produção de biomoléculas e à biofixação do CO₂ também poderão ser usadas para orientar testes de manipulação bioquímica, voltados à otimização da produção de compostos com apelo comercial. Apesar da grande diversidade do filo Chlorophyta, o cultivo em massa de microalgas verdes ainda se restringe a poucos gêneros, como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Tetraselmis* e *Haematococcus* (TOMASELLI, 2004; SKJÅNES; REBOURS; LINDBLAD, 2013).

Em termos metodológicos, este estudo explora o uso da fluorometria PAM como ferramenta prática não apenas na análise fisiológica, mas na mensuração da produção primária bruta de microalgas verdes, em condições controladas de laboratório. Os poucos trabalhos que já investigaram, em detalhes, a aplicação da fluorescência da clorofila na determinação de P^B , são, em sua maioria, estudos de campo, focados em comunidades fitoplanctônicas (GILBERT et al., 2000; KROMKAMP; FORSTER, 2003; MORRIS; KROMKAMP, 2003; MORRIS et al., 2008; KROMKAMP et al., 2008; ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010; PERKINS et al., 2010). A propagação do uso da técnica PAM na produção algal com finalidades biotecnológicas pode contribuir para aprimorar projetos voltados à mitigação do CO₂, cada vez mais necessários na área científica. No presente trabalho, uma atenção especial foi destinada à quantidade de luz fornecida às microalgas, para evitar a fotoinibição e assegurar a precisão das estimativas de P^B a partir da fluorescência da clorofila. A estratégia de aplicação diferenciada da intensidade luminosa para cada espécie é uma medida preventiva que pode ajudar futuras pesquisas a definir melhor essa condição essencial de cultivo.

A partir dos dados obtidos com a prospecção, considerou-se investigar a existência de uma possível relação entre P^B e a taxa específica de crescimento das microalgas, o que, em caso positivo, facilitaria muito o processo de estimativa de fixação de carbono em empresas ou instituições de pesquisa desprovidas de equipamentos especializados para

tal finalidade. Seria, em termos metodológicos, mais simples, acessível e barato se a taxa de crescimento, por si só, conseguisse descrever, com um mínimo de precisão, o desempenho de assimilação bruta de carbono inorgânico em microalgas verdes. Apenas testes em condição controlada, com uma quantidade razoavelmente grande de espécies, podem elucidar tal questão. Aproveitando o grande conjunto amostral obtido a partir da prospecção e considerando que a fotossíntese está fisiologicamente interligada a todo o metabolismo dos organismos fotoautotróficos, é igualmente válido e natural examinar a relação que P^B possa apresentar com outras variáveis estudadas, tanto fotoquímicas quanto bioquímicas.

2.2 Hipóteses

A hipótese principal desta pesquisa é a de que a taxa de crescimento, em microalgas verdes, seria um reflexo direto da biofixação do CO_2 , o que possibilitaria a inferência de P^B a partir do simples monitoramento do crescimento de uma cultura. Conjecturou-se, também, a possibilidade de P^B estar relacionada a outros parâmetros fisiológicos. Em termos metodológicos, foi investigada a hipótese de haver uma interferência nos resultados de P^B em decorrência da adição de um processo de extração da clorofila ao protocolo fluorométrico empregado neste estudo.

2.3 Objetivos

O presente estudo teve como intuito:

1. Realizar uma prospecção fisiológica em 30 espécies de microalgas verdes, tendo como foco da análise o seu crescimento, parâmetros fotoquímicos, produção primária bruta e capacidade de acúmulo de biomoléculas (clorofila, carotenoides, proteínas e carboidratos);
2. Comparar dados de P^B provenientes da amostragem *in vivo* com aqueles oriundos de amostras submetidas à extração de pigmentos;
3. Verificar a existência de uma possível relação entre P^B e outras variáveis fisiológicas avaliadas neste trabalho, particularmente a taxa específica de crescimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Espécies estudadas

As 30 espécies investigadas no estudo de bioprospecção foram listadas em ordem alfabética na tabela 1. Todas as cepas identificadas com “CCMA-UFSCar” foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce, mantida no Laboratório de Ficologia, no Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, Brasil). Esta coleção é cadastrada sob o código 835 no Centro de Dados Mundiais para Microrganismos (WDCM). São oriundas de coleções estrangeiras as espécies *Chlorella sorokiniana* 211-32, proveniente do Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese (IBVF, *Universidad de Sevilla*, Espanha), e *Scenedesmus quadricauda* FWAC 276, do Centro Canadense para Cultura de Microrganismos (CCCM, *Botany Department, University of British Columbia*, Canadá).

3.2 Condições de cultivo

Todas as microalgas selecionadas foram cultivadas em sistema do tipo batelada (ANDERSEN, 2005), sempre em triplicata, com 300 mL de meio BG11 modificado (RIPPKA et al., 1979). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave (120 °C, 1 atm) e o inóculo inicial de 10^5 células mL⁻¹ foi obtido de uma cultura em fase exponencial de crescimento. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0. O cultivo foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL. Tampões de gaze, preenchidos com algodão, foram usados para vedar os frascos e, ao mesmo tempo, possibilitar a troca gasosa com o meio externo. A agitação da cultura foi feita manualmente, duas vezes ao dia.

Os cultivos foram mantidos em temperatura constante (25 ± 1 °C) e iluminados por diodos emissores de luz (LED), com fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro). Os frascos foram iluminados por baixo, usando suportes de metal com altura regulável (figura 5). A altura do suporte foi ajustada para proporcionar a intensidade luminosa necessária a cada espécie. Escolhemos esse tipo de iluminação por ela ser mais homogênea e possibilitar um caminho ótico de apenas 4 cm, conforme a altura da coluna d'água. Em frascos Erlenmeyer, o autossombreamento celular seria maior com iluminação lateral e apenas parte do frasco receberia a irradiância adequada.

Tabela 1. Espécies de microalgas verdes investigadas na prospecção. Cada espécie tem sua própria identificação (número da cepa), abreviação (empregada em alguns resultados gráficos), tempo de cultivo (em dias) e respectivos valores de irradiância saturante (E_k). Os números entre parênteses correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$).

Espécies	Número da cepa	Abreviação	Duração do cultivo (dias)	E_k^* ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>Ankistrodesmus bernardii</i> Kom\u00e1rek	CCMA-UFSCar 423	Ab	2	329 (4,41)
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> Kom\u00e1rkov\u00e1-Legnerov\u00e1	CCMA-UFSCar 277	As	7	100 (0,07)
<i>Chlorella sorokiniana</i> Shihira & R.W.Krauss	211-32	Cs	3	249 (4,67)
<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck [Beijerinck]	CCMA-UFSCar 012	Cv	2	236 (9,64)
<i>Chlorolobion braunii</i> (N\u00e4geli) Kom\u00e1rek	CCMA-UFSCar 477	Cb	3	298 (6,10)
<i>Chlorolobion lunulatum</i> Hind\u00e1k	CCMA-UFSCar 500	Cl	3	321 (30,5)
<i>Choricystis minor</i> (Skuja) Fott	CCMA-UFSCar 261	Cm	3	399 (13,2)
<i>Curvastrum pantanale</i> T.S.Garcia	CCMA-UFSCar 350	Cp	3	229 (19,4)
<i>Desmodesmus communis</i> (E.Hegewald) E.Hegewald	CCMA-UFSCar 609	Dc	2	322 (4,59)
<i>Desmodesmus spinosus</i> (Chodat) E.Hegewald	CCMA-UFSCar 062	Ds	4	254 (2,50)
<i>Dictyosphaerium</i> sp. N\u00e4geli	CCMA-UFSCar 663	D	2	237 (1,63)
<i>Hariotina reticulata</i> P.A.Dangeard	CCMA-UFSCar 493	Hr	3	309 (11,7)
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) M\u00f6bius	CCMA-UFSCar 443	Kl	4	155 (17,6)
<i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West	CCMA-UFSCar 345	Ko	3	346 (7,17)
<i>Kirchneriella pseudoaperta</i> Kom\u00e1rek	CCMA-UFSCar 346	Kp	3	318 (27,5)
<i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hind\u00e1k	CCMA-UFSCar 024	Ma	4	146 (6,03)
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Kom\u00e1rkov\u00e1-Legnerov\u00e1	CCMA-UFSCar 349	Mc	3	237 (11,8)

Espécies	Número da cepa	Abreviação	Duração do cultivo (dias)	E_k^* ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Kom\u00e1rkov\u00e1-Legnerov\u00e1	CCMA-UFSCar 140	Mg	4	201 (11,0)
<i>Monoraphidium komarkovae</i> Nygaard	CCMA-UFSCar 353	Mk	2	258 (16,1)
<i>Monoraphidium pseudobraunii</i> (J.H.Belcher & Swale) Heynig	CCMA-UFSCar 325	Mp	3	327 (6,35)
<i>Muriella decolor</i> Vischer	CCMA-UFSCar 320	Md	3	311 (6,13)
<i>Nephrochlamys subsolitaria</i> (G.S.West) Korshikov	CCMA-UFSCar 132	Ns	3	252 (2,05)
<i>Planktococcomyxa lacustris</i> (Chodat) I.Kostikov, T.Darienko, A.Lukesov\u00e1, & L.Hoffmann	CCMA-UFSCar 258	Pl	11	206 (3,96)
<i>Pseudokirchneriella elongata</i> (G.M.Smith) Hind\u00e1k	CCMA-UFSCar 498	Pe	3	277 (0,02)
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (Korshikov) Nygaard, Kom\u00e1rek, J.Kristiansen & O.M.Skulberg	CCMA-UFSCar 478	Rs	2	278 (12,2)
<i>Scenedesmus bijugus</i> (Turpin) Lagerheim	CCMA-UFSCar 029	Sb	2	213 (7,47)
<i>Scenedesmus ecornis</i> (Ehrenberg) Chodat	CCMA-UFSCar 088	Se	4	226 (3,95)
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turpin) Br\u00e9bisson	FWAC 276	Sq	2	337 (6,27)
<i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch	CCMA-UFSCar 125	S	3	152 (12,1)
<i>Selenastrum gracile</i> Reinsch	CCMA-UFSCar 005	Sg	3	239 (12,3)

* Valores determinados por meio de Curvas R\u00e1pidas de Luz a partir de um cultivo preliminar (procedimento descrito na se\u00e7\u00e3o 3.3)

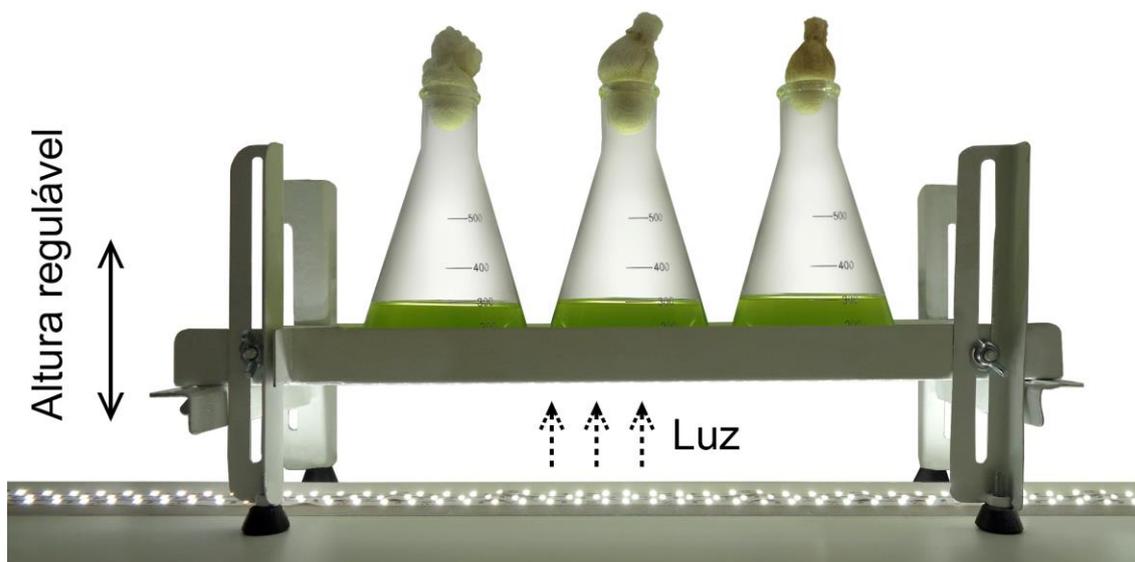


Figura 5. Esquema ilustrativo do arranjo experimental, com o sistema de iluminação dos cultivos. Os frascos em triplicata foram mantidos sobre suportes de altura regulável e iluminados por baixo com fitas de LED.

3.3 Etapas experimentais e intensidade luminosa

O experimento com cada espécie apresentou duas etapas: cultivo preliminar (etapa 1) e cultivo principal (etapa 2), como ilustra a figura 6. Ambos os cultivos, preliminar e principal, foram conduzidos até o final da fase exponencial de crescimento das microalgas. As condições experimentais empregadas nas duas etapas foram as mesmas, exceto por uma variável: a irradiância (E , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) do sistema de iluminação. O objetivo do cultivo preliminar foi determinar o valor mais apropriado de E para cada cepa, valor este usado durante o cultivo principal. A irradi\u00e2ncia aplicada na etapa 1 foi sempre $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor considerado como uma refer\u00eancia inicial, com intensidade intermedi\u00e1ria. Na fase exponencial de crescimento do cultivo preliminar, retirou-se o in\u00f3culo para a etapa 2 do experimento. Nesse mesmo per\u00edodo de amostragem, uma al\u00edquota de 3 mL tamb\u00e9m foi coletada para a elabora\u00e7\u00e3o de uma Curva R\u00e1pida de Luz por meio da fluorimetria PAM, seguindo o procedimento detalhado na se\u00e7\u00e3o 3.6.7. A partir dessa curva, a irradi\u00e2ncia saturante (E_k , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de cada esp\u00e9cie foi calculada. Esse valor obtido \u00e9 apresentado na tabela 1. Com base na E_k , ficou estabelecido o valor adequado de E que seria usado na etapa 2 para cada uma das cepas.

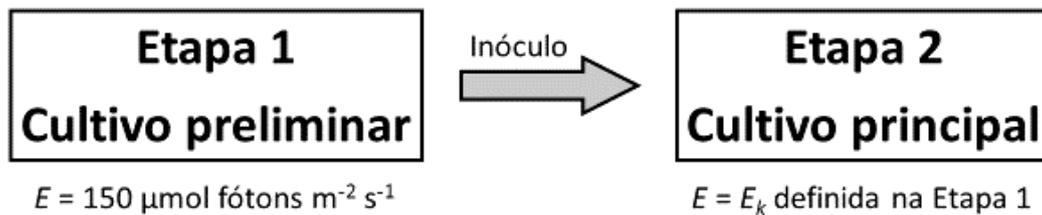


Figura 6. Esquema ilustrativo do procedimento experimental adotado para o cultivo de cada espécie de microalga estudada. Um cultivo preliminar (etapa 1) forneceu o inóculo para o cultivo principal (etapa 2), assim como uma referência para a irradiância (E) com base no valor calculado de irradiância saturante (E_k).

Essa abordagem experimental foi adotada para garantir a melhor condição de intensidade luminosa às microalgas, uma vez que a intenção era não subestimar sua capacidade fotossintética e, ao mesmo tempo, evitar os efeitos nocivos decorrentes da exposição à luz em excesso. Sabe-se que níveis muito elevados de E podem causar fotoinibição e aquecimento das culturas, além de comprometer a precisão das leituras de fluorescência na estimativa da fixação de carbono (PERKINS et al., 2010; AL KETIFE; JUDD; ZNAD, 2016). De acordo com Sakshaug et al. (1997), a E_k é um indicador conveniente do estado de fotoaclimação do fitoplâncton. Ela sinaliza a irradiância na qual a taxa fotossintética de transporte de elétrons atinge seu limite teórico máximo para uma determinada condição ambiental (RUNCIE; GURGEL; MCDERMID, 2008). A E_k também possui a vantagem de ser comparável entre espécies e entre diferentes estudos, independentemente da unidade fotossintética usada para a construção da Curva Rápida de Luz (HENLEY, 1993).

3.4 Duração dos cultivos

A etapa 1 do experimento proporcionou um conhecimento prévio sobre o tempo necessário para cada espécie atingir a fase exponencial de crescimento e a duração de tal fase nas condições experimentais presentes, além de fornecer o valor apropriado de E para as diferentes microalgas. O tempo total de cultivo na etapa 2 variou, portanto, conforme a espécie considerada (tabela 1). As culturas foram mantidas até o final da fase exponencial de crescimento das microalgas. As curvas de crescimento para todas as espécies serão apresentadas na seção 4.1 de Resultados e Discussão.

3.5 Monitoramento diário

As variáveis descritas nesta categoria foram monitoradas uma vez por dia, ao longo das etapas experimentais 1 e 2, com base em amostras de 3 mL de cultura *in vivo*. Todo o procedimento de amostragem e manipulação dos frascos de cultivo foi realizado dentro de uma cabine de fluxo laminar.

3.5.1 Crescimento das culturas

O monitoramento diário do crescimento das microalgas foi feito por meio da medição da absorbância (expressa em unidades relativas, AU) e da concentração de clorofila *a in vivo* ($C_{a \text{ in vivo}}$, mg L⁻¹) das amostras. A absorbância foi aferida com um espectrofotômetro digital UV/VIS (NANOCOLOR, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemanha) em dois comprimentos de onda (λ): 684 e 750 nm. A absorbância em 684 nm (A_{684}) está associada a um pico de absorção da luz pela clorofila *a* (KIRK, 2010), presente em todas as microalgas; a absorbância em 750 nm (A_{750}) foi incluída no monitoramento como uma medida recomendada para minimizar processos de reabsorção luminosa pelos pigmentos fotossintéticos e evitar imprecisões na estimativa do crescimento algal, ocasionadas por mudanças nas propriedades ópticas de uma suspensão celular. Tais alterações estariam relacionadas à “idade” da cultura, à morfologia e à composição das células (HOFSTRAAT; RUBELOWSKY; SLUTTER, 1992; GRIFFITHS et al., 2011). A $C_{a \text{ in vivo}}$ foi calculada a partir de determinações de fluorescência (em unidades relativas, RFU) com um fluorômetro digital (Turner Designs, Trilogy, EUA). A base para a conversão de RFU para $C_{a \text{ in vivo}}$ foi uma calibração feita com extrato de clorofila *a* obtido de uma cultura de *C. sorokiniana*, resultando na curva-padrão de calibração exibida na figura 7.

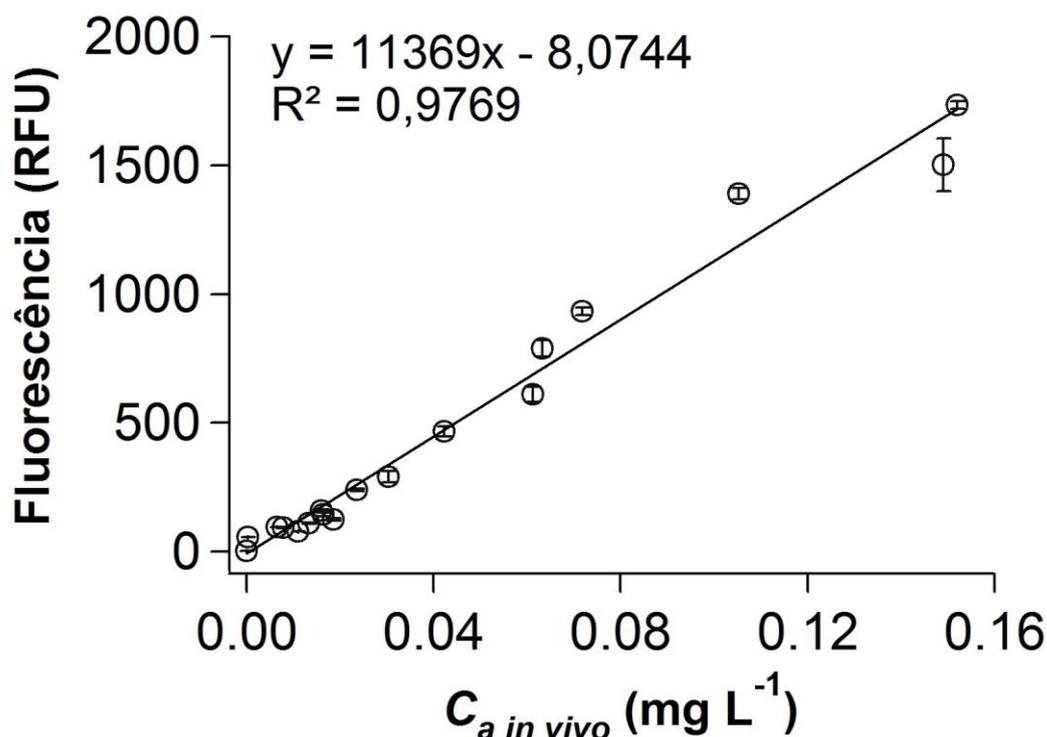


Figura 7. Curva-padrão de calibração da concentração de clorofila *a* em amostras *in vivo* ($C_a \text{ in vivo}$) a partir da medição de fluorescência (em unidades relativas, RFU). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

A taxa de crescimento específica (μ , d^{-1}) de cada cepa cultivada foi calculada a partir da construção de curvas de crescimento com base no logaritmo natural de A_{684} , A_{750} e $C_a \text{ in vivo}$ versus tempo de cultivo (d). O valor de μ equivale ao coeficiente angular do ajuste linear da curva durante a fase exponencial de crescimento das microalgas. Os símbolos μ_{684} , μ_{750} e μ_{Ca} foram adotados para diferenciar a taxa calculada a partir dos dados de A_{684} , A_{750} e $C_a \text{ in vivo}$, respectivamente.

3.5.2 Rendimento quântico máximo

Os parâmetros de fluorometria PAM foram medidos por meio de um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (*Phytoplankton Analyzer*, PHYTO-PAM, Heinz Walz GmbH, Alemanha) em ambiente com temperatura controlada de 24 ± 1 °C.

Para as medições diárias, avaliou-se apenas a fase rápida da curva Kautsky. Antes das medições, as amostras de cultura foram pré-adaptadas ao escuro por 20 min. A partir da emissão de ML e SP, o equipamento detectou os níveis basal (F_o) e máximo (F_m) de

fluorescência das microalgas, calculou sua diferença (F_v) e estimou, então, a razão F_v/F_m (equação 1). É comprovado que essa razão é um indicador robusto do chamado “rendimento quântico máximo do PSII” (MURCHIE; LAWSON, 2013). Além de ser designada como tal, a razão F_v/F_m pode ser encontrada na literatura de várias outras formas, dentre elas: “taxa F_v/F_m ”, “eficiência quântica máxima”, “rendimento quântico ótimo”, Φ_M , Φ_{Po} , Φ_P^{max} , Φ_{PSII}^{max} ou $\Delta\Phi_m$ (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002; SCHREIBER, 2004; COSGROVE; BOROWITZKA, 2010; ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010; LOMBARDI; MALDONADO, 2011).

$$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m \quad (1)$$

O valor de F_v/F_m é um parâmetro de fácil medição, sensível a condições ambientais estressantes, capazes de afetar a eficiência do PSII, e pode ser empregado como sinalizador do estado fisiológico do aparato fotossintético (KRAUSE; WEIS, 1991; PARKHILL; MAILLET; CULLEN, 2001). Esse foi motivo pelo qual o seu monitoramento foi realizado diariamente, juntamente com o crescimento das culturas.

3.6 Medições finais

Todas as medições dessa categoria foram feitas apenas no último dia do cultivo principal, com as culturas em fase exponencial de crescimento. O dia da amostragem variou conforme a espécie, como discriminado na tabela 1. Cada análise teve um volume específico de amostra coletada.

3.6.1 Densidade celular

A densidade celular de amostras (3 mL) da cultura foi aferida por meio da contagem de células *in vivo*, realizada em hemocitômetro (Fuchs-Rosenthal), sob microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon, Japão).

3.6.2 Extração de pigmentos

Cada espécie estudada teve sua composição de pigmentos determinada a partir do método de extração descrito por Shoaf e Lium (1976). Um determinado volume de cultura

(V , mL) foi coletado e filtrado em membrana de acetato de celulose (0,45 μm de diâmetro de poro; 25 mm de diâmetro; Sartorius-Stedim Biotech, Alemanha). O valor de V foi determinado no momento da filtração, com base no quão concentrada estava a cultura de cada espécie. O filtro com biomassa retida foi dissolvido em 3 mL de DMSO. A concentração (em mg L^{-1}) de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) e carotenoides totais (CT) no extrato foi calculada com base na medição da absorbância em 665 (A_{665}), 649 (A_{649}) e 480 nm (A_{480}), cujos valores são aplicados nas equações 2, 3 e 4, adaptadas de Wellburn (1994).

$$C_a = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad (2)$$

$$C_b = 25,06 \cdot A_{649} - 6,5 \cdot A_{665} \quad (3)$$

$$CT = [(1000 \cdot A_{480}) - (1,29 \cdot C_a) - (53,78 \cdot C_b)] / 220 \quad (4)$$

O resultado de cada equação foi, então, multiplicado pela razão $3/V$, que leva em consideração a quantidade fixa de solvente (DMSO) e o volume variável de soluto (cultura algal) usados neste protocolo.

3.6.3 Proteínas e carboidratos

Amostras retiradas para a determinação de carboidratos totais (30 mL) e proteínas totais (50 mL) foram centrifugadas (4221 g, 20 °C, 15 min), seu conteúdo sobrenadante foi descartado e o *pellet*, mantido a -22 °C até a realização das análises. A extração de proteínas foi realizada de acordo com o protocolo de Rausch (1981), adaptado. A modificação consistiu em deixar o *pellet* com 1,5 mL de NaOH (0,5 N), por 1 h, a 80 °C. A quantificação proteica foi efetuada de acordo com o método de Bradford (1976), tendo albumina sérica bovina (1 mg mL^{-1}) como referência para elaboração de uma curva-padrão (figura 8a). A determinação de carboidratos totais nas culturas foi feita segundo Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), com uma curva-padrão (figura 8b) elaborada com base em uma solução de glicose (1 mg mL^{-1}).

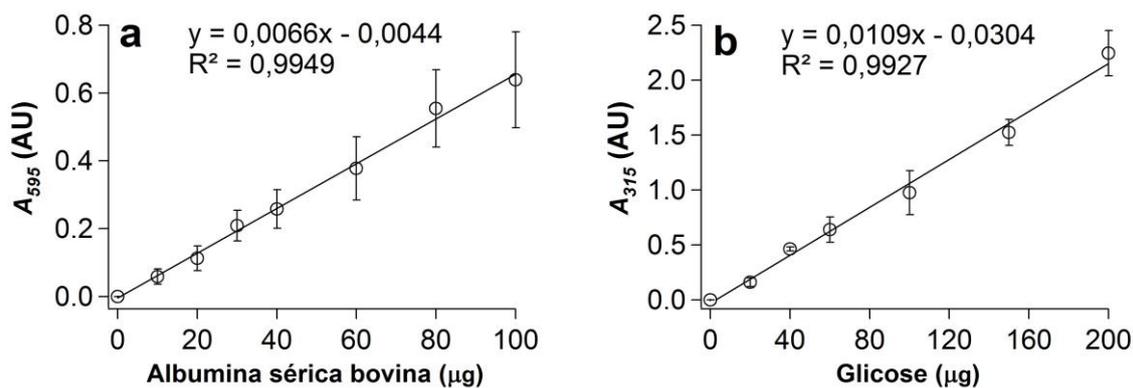


Figura 8. Curvas-padrão de calibração usadas na determinação de (a) proteínas totais, a partir de leituras de absorbância a 595 nm (A_{595}), e (b) carboidratos totais, com base em valores de absorbância a 315 nm (A_{315}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

A concentração resultante de ambas as análises foi multiplicada por μ , resultando, deste modo, na produtividade específica ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) de proteínas e carboidratos durante a fase exponencial de crescimento de cada cepa (SHULER; KARGI, 2002; GRIFFITHS; HARRISON, 2009). Foram usados para esse cálculo os dados da taxa de crescimento baseada em A_{750} , por se tratar de uma medida menos susceptível a imprecisões metodológicas, conforme a explicação detalhada na seção 3.5.1.

3.6.4 Rendimento quântico efetivo

Amostras de 3 mL foram retiradas ao final dos cultivos para avaliação dos parâmetros fluorométricos nas fases rápida e lenta da curva Kautsky. As microalgas foram previamente adaptadas ao escuro durante 20 min e, então, submetidas a um SP, para que o fluorômetro PAM pudesse registrar seus dados de F_o e F_m (fase rápida). O valor de F_v/F_m também foi medido neste mesmo instante. Logo na sequência, conforme orientam Murchie e Lawson (2013), iniciaram-se as leituras da fase lenta por meio do acionamento da AL, com intensidade ajustada para um valor próximo ao da irradiância E especificado na tabela 1, apropriado para cada espécie de microalga. Pulsos sequenciais de AL foram disparados a cada 20 s, durante 10 min, tempo suficiente para a amostra alcançar o estado estável de adaptação a uma condição luminosa similar à usada durante o cultivo principal do experimento. Após esse período, dados de F_s e F'_m foram registrados pelo equipamento. A diferença entre ambos (ΔF) pôde ser, então, usada na equação 5 para o

cálculo da razão $\Delta F/F'_m$, considerada um indicador do rendimento quântico efetivo, ou “operacional”, do PSII (MASOJÍDEK; VONSHAK; TORZILLO, 2010; MURCHIE; LAWSON, 2013). Na literatura, $\Delta F/F'_m$ é identificado de diversas formas: $\Delta\Phi_F/\Phi_{Fm}$, Φ'_M , Φ_{PSII} , Φ_E , Y , $Y(II)$ ou F'_q/F'_m (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; SCHREIBER et al., 1995a; JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002; SAROUSSI; BEER, 2007; ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010; FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013; MCKEW et al., 2013; MURCHIE; LAWSON, 2013; ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017).

$$\Delta F/F'_m = (F'_m - F_s) / F'_m \quad (5)$$

3.6.5 Decaimento de fluorescência

A fluorescência da clorofila é, segundo Kolber e Falkowski (1993), controlada por um fenômeno chamado de “decaimento” (*quenching*). Em termos gerais, a palavra *quenching* é atribuída a todos os processos que reduzem o rendimento da fluorescência abaixo do seu nível máximo (HUOT; BABIN, 2010). A análise de decaimento da fluorescência fornece informações quantitativas a respeito do estado estável da fotossíntese (SCHREIBER et al., 1995b). A extensão do decaimento no processo fotossintético é expressa por meio de coeficientes, cuja interpretação fornece informações relevantes a respeito do estado funcional do aparato fotossintético e da própria eficiência do PSII (KRAUSE; WEIS, 1991). Existem dois tipos principais de decaimento: o fotoquímico e um conjunto de processos coletivamente caracterizados como decaimento não-fotoquímico.

O coeficiente de decaimento fotoquímico (qP) é um sinal que indica a proporção de centros de reação do PSII que se encontram abertos, podendo converter a energia oriunda dos fótons capturados em energia química (KRAUSE; WEIS, 1991; MAXWELL; JOHNSON, 2000). O qP foi calculado conforme a equação 6 (ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017):

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_o) \quad (6)$$

Os dados de F_s e F'_m foram os mesmos usados no cálculo de $\Delta F/F'_m$. O valor de F'_o , difícil de ser medido diretamente (SUGGETT et al., 2003), foi estimado a partir dos

registros de F_o , F_v , F_m e F'_m , de acordo com a equação 7, proposta por Oxborough e Baker (1997).

$$F'_o = F_o / [(F_v / F_m) + (F_o / F'_m)] \quad (7)$$

A energia não direcionada à via fotoquímica é dissipada por meio de diferentes processos, incluindo a liberação de calor (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). Um coeficiente denominado NPQ (do inglês, *non-photochemical quenching*) é capaz de descrever numericamente a magnitude do decaimento não-fotoquímico da fluorescência via dissipação de calor. Seu cálculo (equação 8) envolve apenas as medidas de F_m e F'_m registradas pelo fluorômetro (BUSCHMANN, 1999):

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (8)$$

Uma forma antiga de medir o decaimento não-fotoquímico da fluorescência (simbolizada por qN) utiliza tanto valores de F_o quanto de F'_o em seu cálculo: $qN = 1 - (F'_m - F'_o) / (F_m - F_o)$ (BUSCHMANN, 1999). Maxwell e Johnson (2000) esclarecem que, enquanto qN varia em uma escala de 0 a 1 (inversamente proporcional a qP), o NPQ pode apresentar valores de 0 a infinito. Neste estudo, o coeficiente NPQ foi escolhido como medida do decaimento não-fotoquímico devido à sua robustez, pelo fato de não depender da difícil mensuração de F'_o e por não ser afetado pela redução de F_o , conforme argumentam Ralph e Gademann (2005).

Ambos os coeficientes de decaimento (qP e NPQ) foram calculados e avaliados a partir das mesmas amostras de 3 mL coletadas para a medição de F_v/F_m e $\Delta F/F'_m$.

3.6.6 Absorção de luz e produção primária

O fluxo linear de elétrons movimentados na etapa fotoquímica é o que permite a mensuração da fixação de carbono por meio da fluorescência da clorofila a . Diretamente proporcional à eficiência operacional do PSII, a atividade fotossintética pode ser expressa como taxa absoluta de transporte de elétrons (ETR , $\mu\text{mol elétrons} [\text{mg } C_a]^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou, em uma versão mais simplificada, como taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$, $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A $rETR$ é calculada multiplicando $\Delta F/F'_m$ pela irradiância E incidente em um cultivo, conforme a equação 9 (RALPH; GADEMANN, 2005).

$$rETR = \Delta F/F'_m \cdot E \quad (9)$$

Para o cálculo de ETR , não se considera toda a luz incidente sobre a cultura, apenas a radiação absorvida pela clorofila, ou seja, a energia de fato destinada ao PSII (SCHREIBER, 2004; FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013; JEREZ et al., 2016a). A quantidade de luz capturada pelas microalgas pode ser estimada a partir do coeficiente médio específico de absorção da clorofila a (a^* , $m^2 [mg C_a]^{-1}$), medido por meio da varredura espectrofotométrica de absorbância das amostras no intervalo de comprimento de onda da luz visível ($\lambda = 400\text{--}700$ nm). Esse coeficiente também recebe o nome de “secção transversal espectral média de absorção específica da clorofila” e pode ser representado por a^{chl} (FLAMELING; KROMKAMP, 1997; VONSHAK; TORZILLO, 2004; COSGROVE; BOROWITZKA, 2010). Em estudos com plantas, a^* é comumente substituído por 0,84, considerado uma constante de absorção em folhas (RITCHIE, 2008; PERKINS et al., 2010). Para suspensões algais, esse valor não pode ser simplesmente assumido com base na teoria, pois cada cultura tem propriedades ópticas intrínsecas, que afetam o caminho da luz de diferentes formas (SATHYENDRANATH; LAZZARA; PRIEUR, 1987). No presente trabalho, a^* foi calculado por meio da equação 10, adaptada de Cosgrove e Borowitzka (2010).

$$a^* = (2,303 \cdot A^* / l) / C_a \quad (10)$$

A variável A^* (AU) corresponde à média aritmética das absorbâncias registradas em dois picos de absorção luminosa quando uma amostra é submetida à varredura espectrofotométrica; l (m^{-1}) equivale ao comprimento do percurso óptico através da cultura em suspensão (neste caso, o comprimento da cuveta inserida no espectrofotômetro); C_a ($mg m^{-3}$) é a concentração de clorofila a da amostra (FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013).

O mesmo procedimento de cálculo de a^* foi realizado tanto para amostras *in vivo* ($a^*_{in vivo}$, $m^2 [mg C_a]^{-1}$) quanto para amostras submetidas à extração da clorofila com DMSO (a^*_{DMSO} , $m^2 [mg C_a]^{-1}$), portanto para seus extratos. Considerou-se, em cada caso, o valor da concentração de clorofila determinado exatamente nessas mesmas condições.

Para o coeficiente $a^*_{in vivo}$, foram usados valores de $C_a in vivo$, determinados conforme o método descrito na seção 3.5.1. No caso de a^*_{DMSO} , mediu-se, a partir da mesma amostra de extrato, a concentração de clorofila a indicada para algas verdes (C_a^* ; $mg\ m^{-3}$), de acordo com a equação 11, adaptada de Jeffrey e Humphrey (1975):

$$C_a^* = (11,93 \cdot A_{664} - 1,93 \cdot A_{647}) \cdot 3/V \cdot 10^3 \quad (11)$$

sendo A_{664} e A_{647} os valores de absorvância para $\lambda = 664$ e 647 nm, respectivamente. Também foram considerados no cálculo: o volume apropriado de cultura filtrada para a extração do pigmento (V), executada conforme o protocolo descrito na seção 3.6.2, e o fator 10^3 , para conversão das unidades de $\mu g\ mL^{-1}$ para $mg\ m^{-3}$.

Uma vez conhecidos os dados de a^* , E e $\Delta F/F'_m$, tornou-se possível o cálculo da ETR conforme a equação 12 (KROMKAMP; FORSTER, 2003):

$$ETR = a^* \cdot 0,5 \cdot E \cdot \Delta F/F'_m \quad (12)$$

A multiplicação por 0,5 assume que 50% da luz incidida recai sobre o PSII, com participação significativa na fotossíntese, e 50%, sobre o PSI, cuja contribuição em termos de emissão de fluorescência pode ser considerada desprezível quando se trabalha com luz em comprimentos de onda menores do que 700 nm (BAKER, 2008; KROMKAMP et al., 2008; OBATA; TODA; TAGUCHI, 2009). Cada *quantum* de luz (fóton) que excita uma molécula de clorofila leva à transferência de 1 elétron para a cadeia transportadora. Considera-se, portanto, 1 fóton = 1 elétron. Por isso, a unidade de medida de ETR é dada em elétrons, não em fótons.

A produção primária bruta (P^B , $mg\ C\ L^{-1}\ h^{-1}$) foi estimada a partir da ETR , conforme a equação 13, adaptada de Kromkamp e Forster (2003):

$$P^B = ETR \cdot \Phi_e \cdot C_a \cdot 0,012 \cdot 3600 \quad (13)$$

O cálculo leva em consideração um coeficiente de rendimento de elétrons para fixação de carbono (Φ_e ; $\mu mol\ C\ [\mu mol\ elétrons]^{-1}$), correspondente ao número necessário de separações de carga no PSII para a fixação de uma molécula de CO_2 (BARRANGUET; KROMKAMP, 2000). Neste caso, assumiu-se *a priori* um rendimento ideal de $0,25\ \mu mol\ C\ [\mu mol\ elétrons]^{-1}$, ou seja, quatro elétrons seriam necessários para a incorporação de

uma molécula de CO₂ (GILBERT et al., 2000). A mesma razão Φ_e também pode ser reportada como mol C [mol elétrons]⁻¹. Não se adotou tal unidade neste caso, pois a *ETR* é mais comumente expressa em μmol de elétrons. Três fatores de conversão de unidades foram acrescentados à equação original: o valor de C_a (em mg L^{-1}) da amostra, que permite calcular a fixação por volume de cultura (L^{-1}); o fator aproximado de 0,012, necessário para converter a quantidade de carbono fixado de μmol para mg (considerando que 1 mol de carbono equivale a 12,0107 g); e a multiplicação por 3600, que altera a unidade temporal de s^{-1} para h^{-1} .

A taxa P^B foi calculada com base em $a^*_{in vivo}$ ($P^B_{in vivo}$) e a^*_{DMSO} (P^B_{DMSO}), permitindo, desse modo, uma comparação da produção primária estimada em duas condições distintas: uma com amostras íntegras da cultura, outra com extrato de clorofila a à base de DMSO.

3.6.7 Curva Rápida de Luz

A Curva Rápida de Luz (RLC) é outro instrumento de análise importante na fluorometria PAM. Trata-se de um gráfico do tipo “fotossíntese vs. irradiância” (FALKOWSKI; RAVEN, 2007), que contém uma variável indicativa da atividade fotossintética (eixo Y) *versus* uma sequência crescente de intensidade luminosa (eixo X). Amostras *in vivo* (3 mL), previamente adaptadas ao escuro por 20 min, foram expostas a dezenove pulsos graduais de E (0–2000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com 20 s de intervalo a cada pulso. O fluor\u00f4metro registrou valores sucessivos de $\Delta F/F'_m$ e os multiplicou por E , resultando na $rETR$ como medida da atividade fotossint\u00e9tica. A $rETR$ tem ampla aceita\u00e7\u00e3o em trabalhos que empregam curvas de luz (ENR\u00cdQUEZ; BOROWITZKA, 2010). Por considerar apenas a irradi\u00e2ncia incidente em seu c\u00e1lculo, ela \u00e9 uma medida n\u00e3o suscept\u00edvel a discrep\u00e2ncias em coeficientes de absor\u00e7\u00e3o luminosa, necess\u00e1rios quando se pretende adotar *ETR* como indicador da atividade fotossint\u00e9tica (RALPH et al., 2002).

O ajuste da RLC foi feito de acordo com Platt, Gallegos e Harrison (1980). A partir dele, obtivemos o valor da inclina\u00e7\u00e3o inicial de cada curva (α ; $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [$\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$]⁻¹), a taxa relativa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons ($rETR_{max}$; $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a irradi\u00e2ncia saturante (E_k ; $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), calculada conforme a equa\u00e7\u00e3o 14 (RALPH; GADEMANN, 2005).

$$E_k = rETR_{max} / \alpha \quad (14)$$

A E_k pode ser encontrada na literatura como I_k (YENTSCH; LEE, 1966; HENLEY, 1993; COSGROVE; BOROWITZKA, 2006), embora alguns autores (SAKSHAUG et al., 1997) desaconselhem esse termo, pois ele pode ser confundido com “intensidade radiante” (medida em $W\ sr^{-1}$).

O mesmo procedimento de elaboração da RLC foi realizado tanto na etapa experimental 1 quanto na 2. No primeiro caso, definiu-se apenas a E_k , usada como referência para a E durante o cultivo principal de cada cepa; no segundo caso, com as microalgas cultivadas na condição luminosa apropriada, todos os três parâmetros da RLC (α , $rETR_{max}$ e E_k) foram avaliados.

3.7 Análise dos dados

O programa Igor PRO 5,03 (Wavemetrics, EUA) foi usado para a elaboração de gráficos. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados estatisticamente com o teste de Tukey (HSD) no programa R, versão 3.6.0 (R CORE TEAM, 2019). A correlação entre as variáveis investigadas no presente estudo foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de Pearson (r) no programa Minitab 17 (Minitab Inc., EUA). Os resultados de r foram exibidos em uma matriz de correlação. Uma Análise de Componentes Principais (PCA), executada no programa *Paleontological Statistics* (PAST), versão 4.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), forneceu informações adicionais sobre a inter-relação de determinados parâmetros em duas dimensões inerentes. Foram incluídos na PCA os valores médios normalizados de: μ_{684} , densidade celular, CT , $\Delta F/F'_m$, NPQ , α , $rETR_{max}$ e $P^B_{in\ vivo}$. As demais variáveis não foram consideradas por apresentarem, de acordo com a matriz de r , uma forte correlação com os parâmetros listados anteriormente. O nível de significância em todos os testes mencionados foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento das culturas

O tempo total de cultivo da maior parte das cepas foi de 2 a 4 dias, como evidenciam as curvas de crescimento obtidas a partir do monitoramento diário de A_{684} (figura 9), A_{750} (figura 10) e C_a *in vivo* (figura 11). Duas espécies apenas tiveram de ser cultivadas por um tempo maior: *A. stipitatus* (7 dias) e *P. lacustris* (11 dias). Das três variáveis de crescimento estudadas, C_a *in vivo* foi a que resultou em curvas com comportamento ligeiramente diferente das obtidas com base em A_{684} e A_{750} , o que é justificável, por se tratar de uma medição realizada em um equipamento diferente, tendo como padrão uma curva de calibração não usada na aferição de absorvância.

Essa coerência também foi observada entre os valores de μ_{684} (figura 12), μ_{750} (figura 13) e μ_{Ca} (figura 14). Uma espécie apenas (*C. sorokiniana*) teve μ significativamente maior de acordo com A_{684} ($1,20 \pm 0,04$), A_{750} ($1,18 \pm 0,06$ d⁻¹) e C_a *in vivo* ($1,32 \pm 0,04$ d⁻¹). Nas duas leituras de absorvância, destacou-se também a microalga *M. decolor*, com valores médios de $1,10 \pm 0,03$ d⁻¹ obtidos tanto para μ_{684} quanto μ_{750} . Esta foi a única microalga verde com resultado significativo para μ_{Ca} ($1,59 \pm 0,04$ d⁻¹). A espécie que apresentou menor taxa de crescimento foi *A. stipitatus*, com $\mu_{684} = 0,20 \pm 0,01$, $\mu_{750} = 0,19 \pm 0,03$, e $\mu_{Ca} = 0,17 \pm 0,01$. Outras espécies de crescimento lento incluem *P. lacustris*, *S. ecornis*, *P. elongata*, *S. bibraianum* e *K. obesa*.

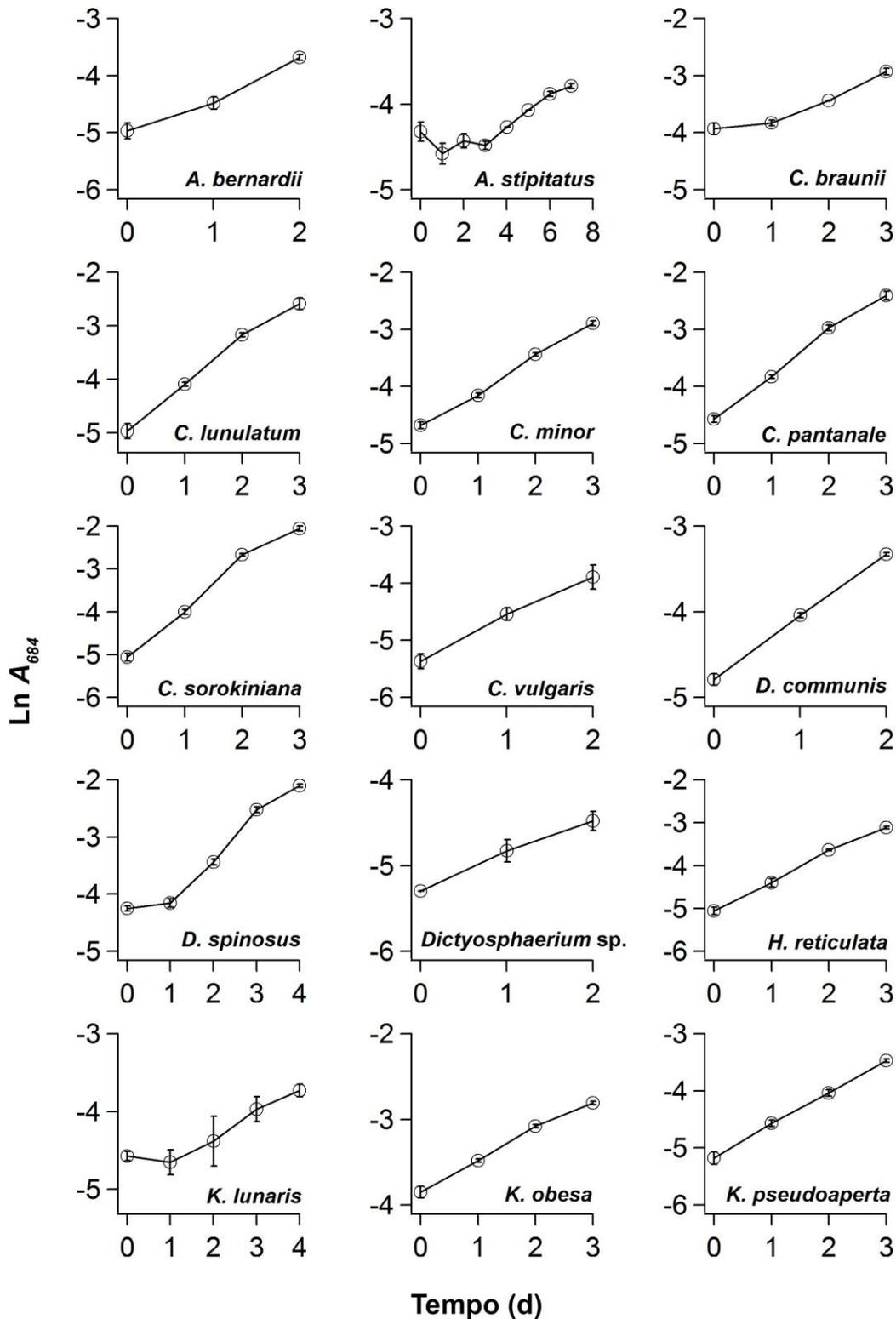


Figura 9. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorbância a 684 nm (A_{684}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

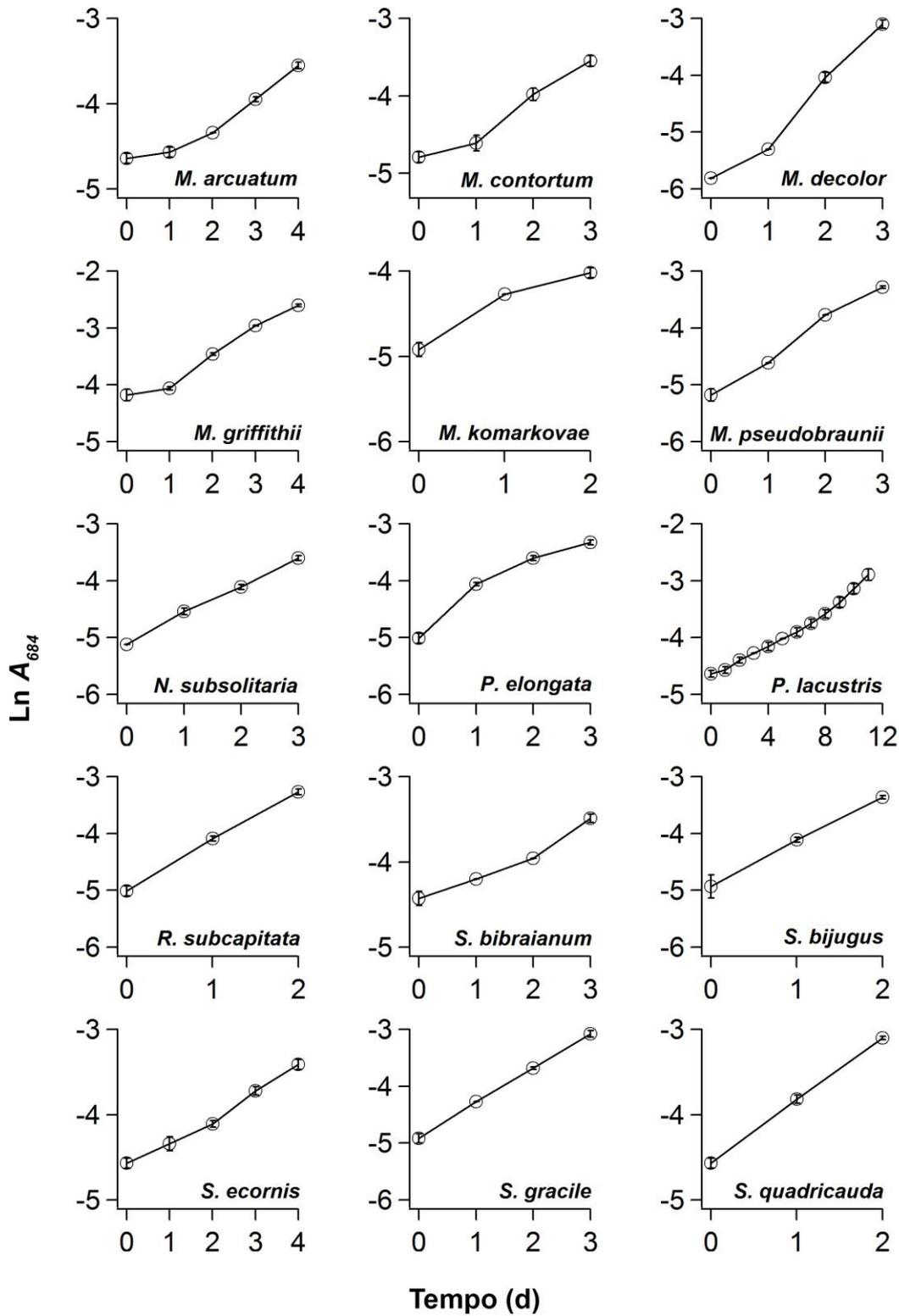


Figura 9 (continuação). Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorvância a 684 nm (A_{684}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

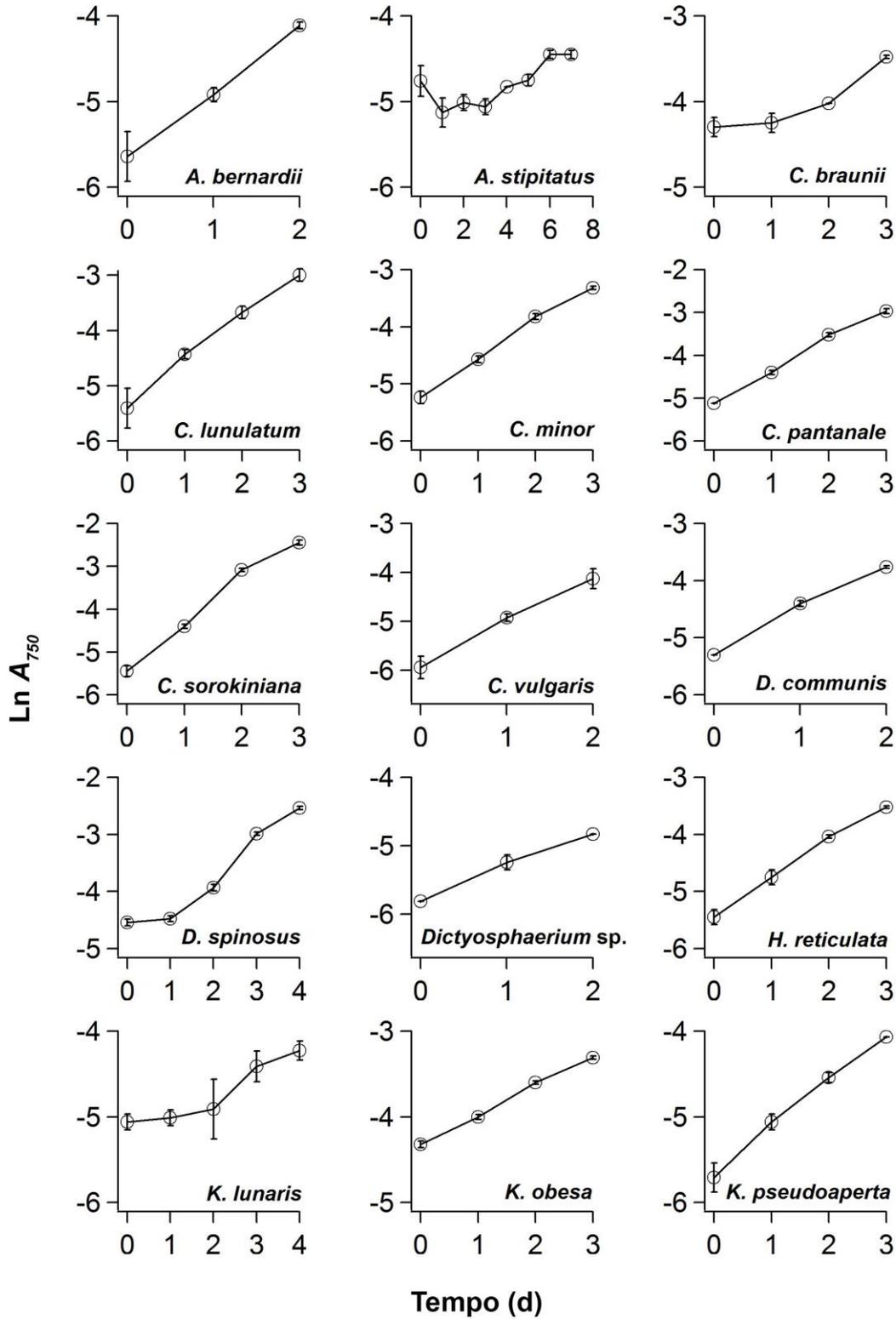


Figura 10. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorvância a 750 nm (A_{750}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

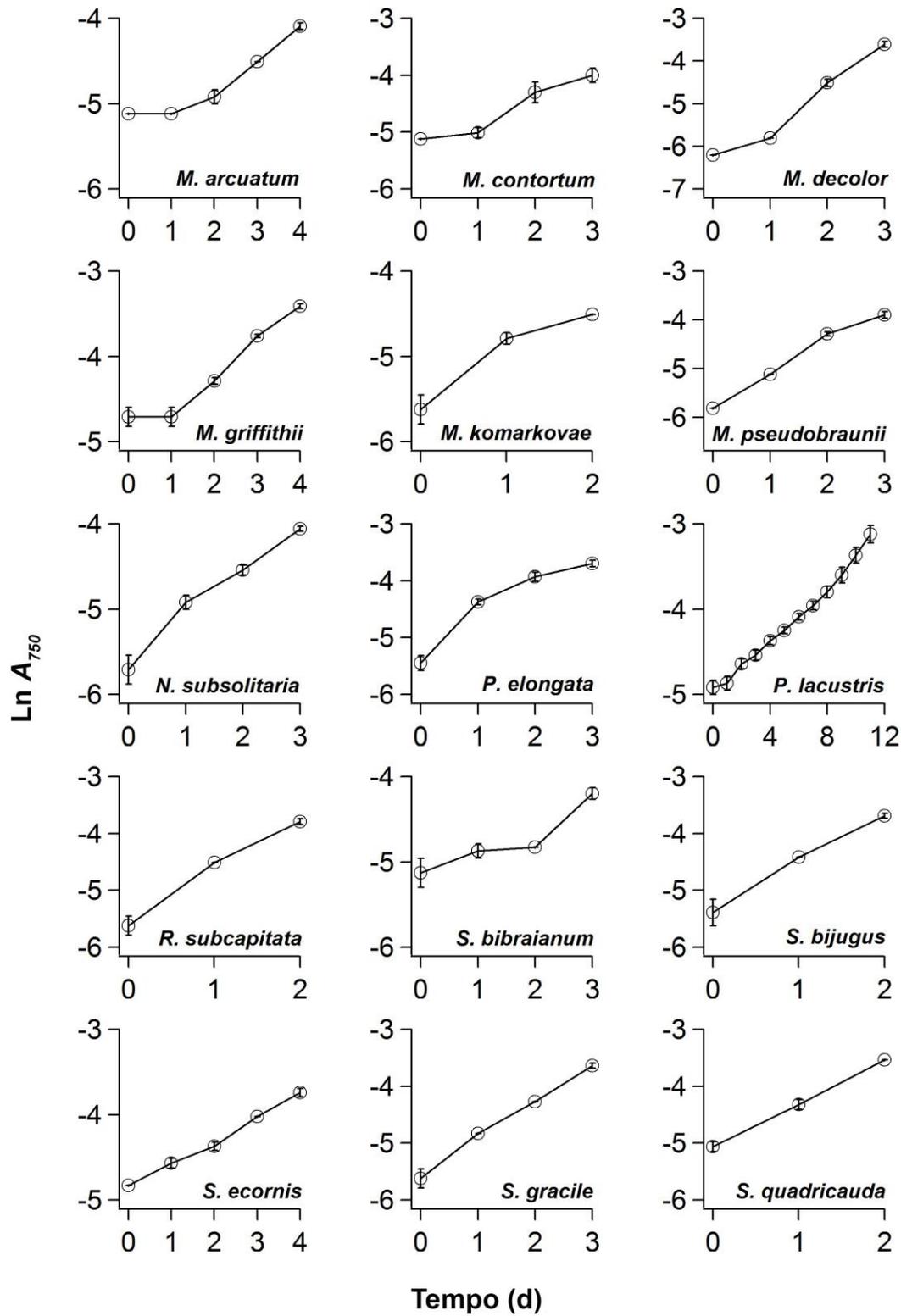


Figura 10 (continuação). Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural de absorvância a 750 nm (A_{750}). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

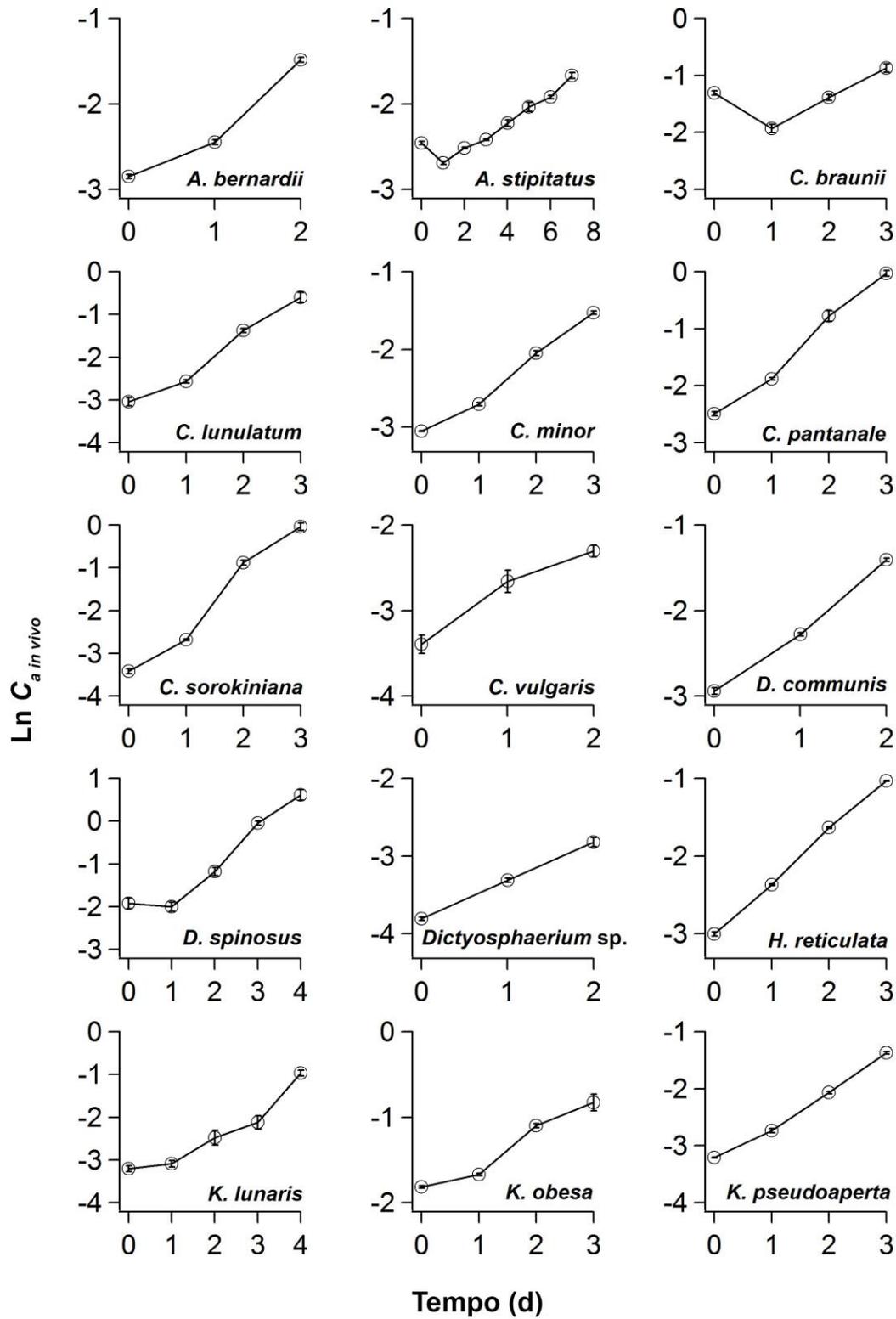


Figura 11. Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural da concentração de clorofila *a in vivo* ($C_{a \text{ in vivo}}$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

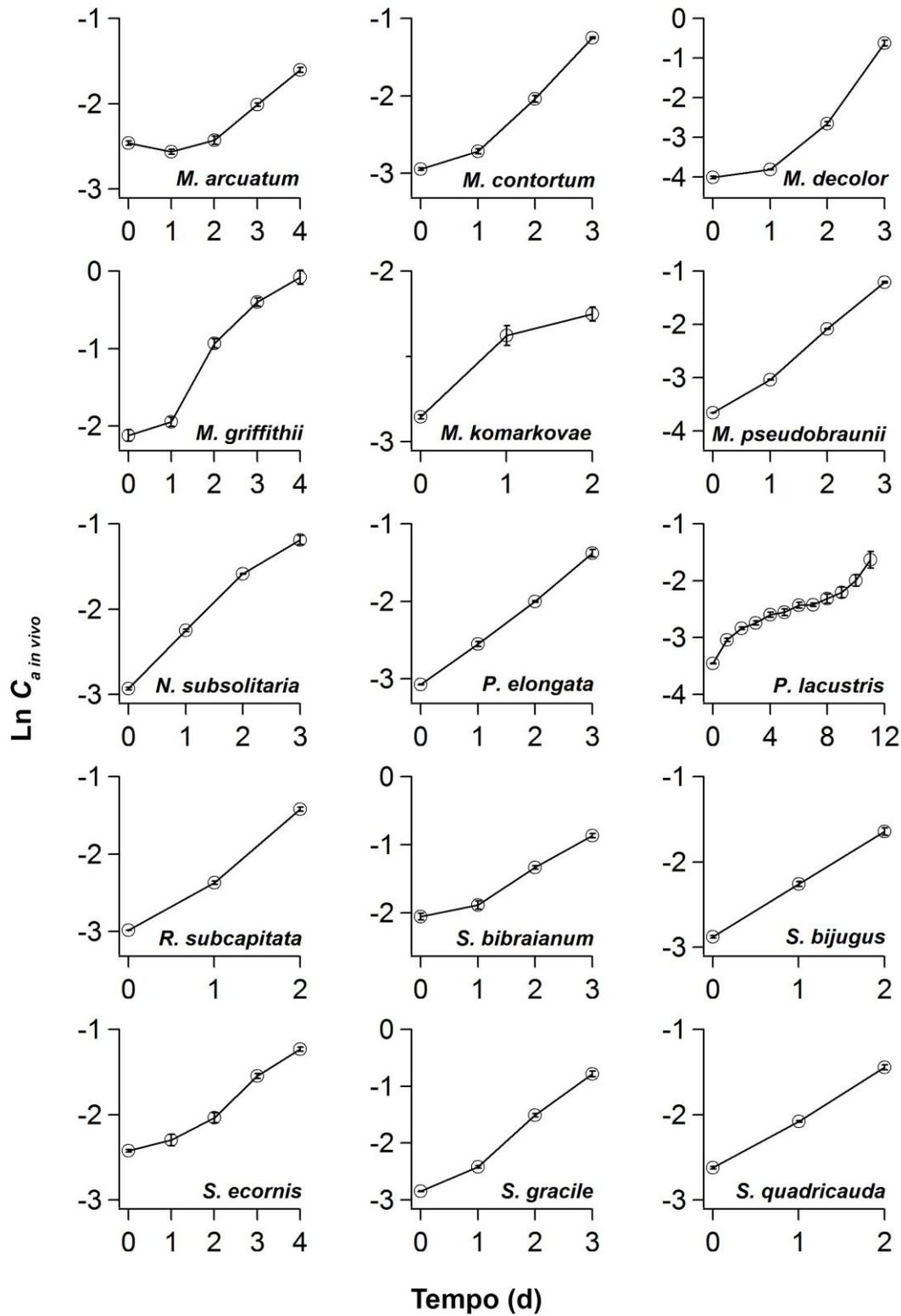


Figura 11 (continuação). Curvas de crescimento para 30 espécies de microalgas verdes, construídas com base no logaritmo natural da concentração de clorofila *a in vivo* ($C_{a \text{ in vivo}}$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

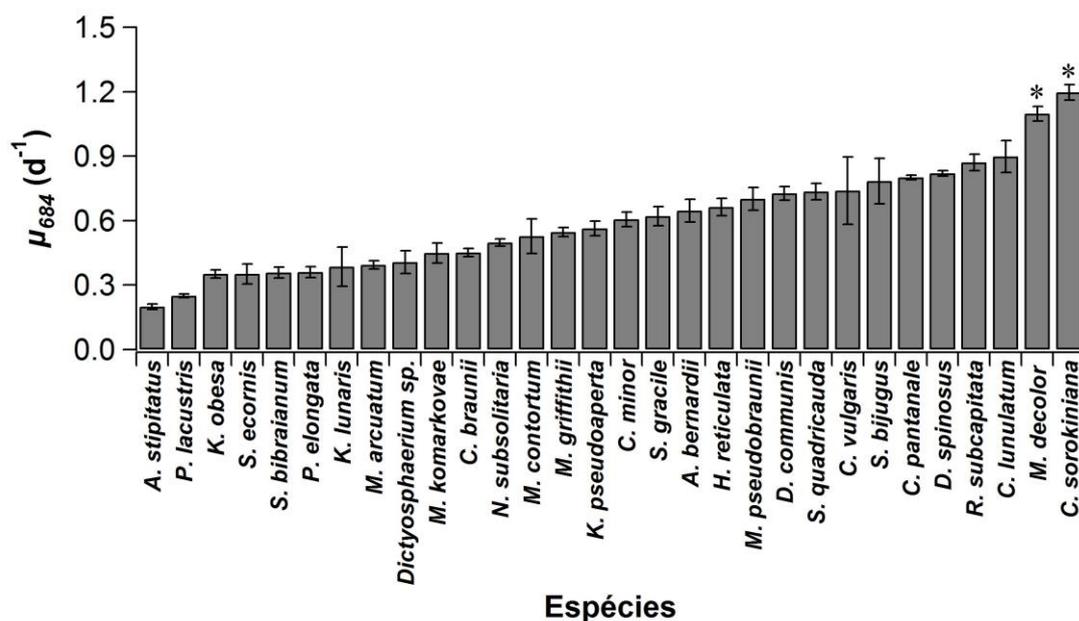


Figura 12. Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base em absorbância a 684 nm. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

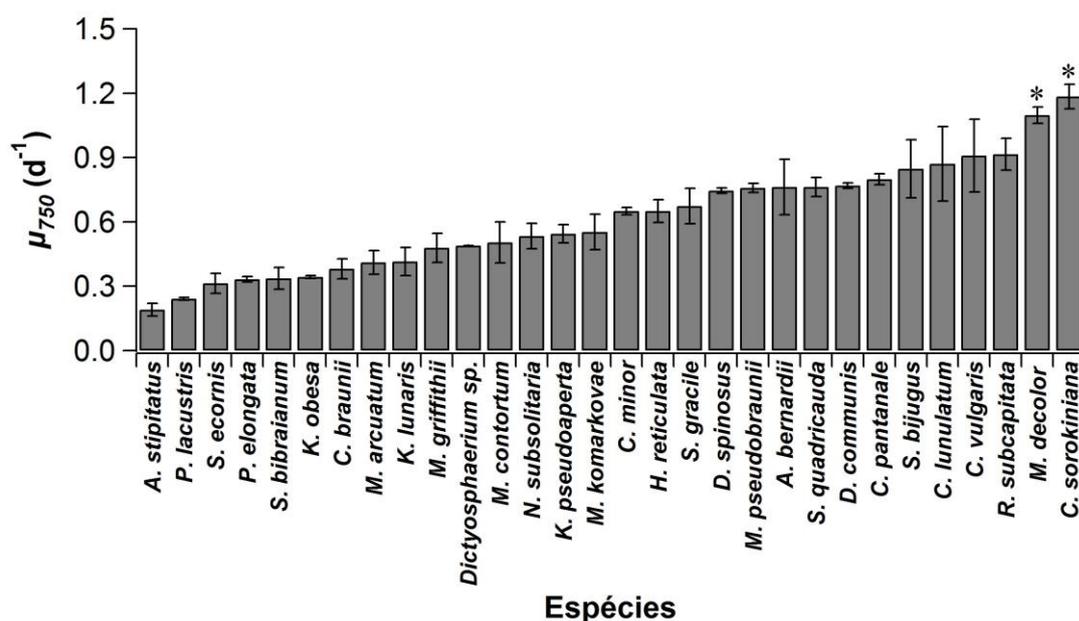


Figura 13. Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base em absorbância a 750 nm. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

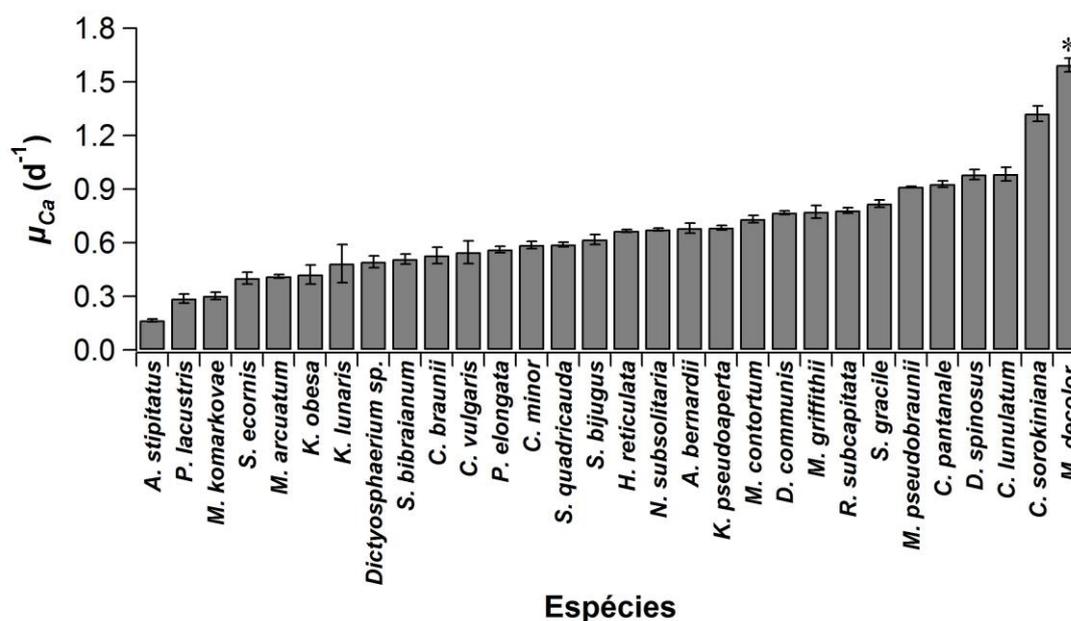


Figura 14. Taxa de crescimento em 30 espécies de microalgas verdes, com base na concentração de clorofila *a* *in vivo*. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Os resultados de μ foram, em sua grande maioria, superiores aos obtidos por Song et al. (2013) para *K. lunaris* ($0,21 d^{-1}$), *Selenastrum capricornutum* ($0,20 d^{-1}$), *Staurastrum* sp. ($0,10 d^{-1}$), *C. vulgaris* ($0,17 d^{-1}$) e *Scenedesmus obliquus* ($0,16 d^{-1}$) em cultivos de 500 mL com meio BG11. Comparativamente, com apenas 150 mL de meio BG11, Candido e Lombardi (2020) conseguiram taxas de crescimento mais elevadas do que as reportadas por Song et al. para as microalgas verdes *Monoraphidium* sp. ($1,62 d^{-1}$), *C. sorokiniana* ($1,50 d^{-1}$), *D. spinosus* ($1,23 d^{-1}$), *C. vulgaris* ($1,20 d^{-1}$) *Chlamydomonas* sp. ($0,84 d^{-1}$), *S. quadricauda* ($0,75 d^{-1}$), *T. gracilis* ($0,64 d^{-1}$) e *H. pluviialis* ($0,24 d^{-1}$). Krzemińska et al. (2014) trabalharam com meio de cultura Kessler e observaram valores intermediários de μ durante os três primeiros dias de cultivo de *Neochloris terrestris* ($0,75 d^{-1}$), *Neochloris texensis* ($0,71 d^{-1}$), *Neochloris conjuncta* ($0,66 d^{-1}$), *Scenedesmus obliquus* ($0,60 d^{-1}$) e *Botryococcus braunii* ($0,52 d^{-1}$). Além do tipo de meio, sabe-se que a escala do cultivo também pode resultar em diferenças nítidas de μ . No trabalho de Luangpipat e Chisti (2017), verificou-se que o valor de μ em *C. vulgaris* ($0,649 d^{-1}$), *C. minor* ($0,698 d^{-1}$), *Neochloris* sp. ($0,517 d^{-1}$) e *Pseudococcomyxa simplex* ($0,423 d^{-1}$) é maior em culturas de 1 L de meio BG11 do que em 2 L ($\mu = 0,359 d^{-1}$, $0,212 d^{-1}$, $0,105 d^{-1}$ e $0,291 d^{-1}$, respectivamente).

Neste estudo, as duas espécies de *Chlorella* (*C. vulgaris* e *C. sorokiniana*) foram consideradas, inicialmente, uma referência em termos de crescimento, conforme consta na literatura (LIU; HU, 2013; GUCCIONE et al., 2014; KOTRBÁČEK; DOUBEK; DOUCHA, 2015). A significância estatística de *C. sorokiniana* em praticamente todos os aspectos analisados ($p < 0,05$) comprova o seu potencial para aplicações biotecnológicas. A taxa de crescimento da cepa estudada foi quase cinco vezes maior do que a de *C. sorokiniana* UTEX 1670 ($0,24 \text{ d}^{-1}$), cultivada em condições autotróficas (KIM et al., 2013). Comparando quinze espécies de microalgas isoladas de diferentes ambientes naturais, Ratha et al. (2012) também verificou que *C. sorokiniana* estava entre as espécies com alta taxa de crescimento. Sabe-se que *C. sorokiniana* UTEX 1230, quando cultivada em meio BBM borbulhado com gases de combustão contendo 12% de CO_2 , pode crescer a uma taxa de até $1,68 \text{ d}^{-1}$ (LIZZUL et al., 2014). Além disso, já se constatou que algumas cepas dessa espécie podem possuir taxas de crescimento de até $1,6 \text{ d}^{-1}$ (LI et al., 2013) e $1,77 \text{ d}^{-1}$ (ROSENBERG et al., 2014) quando cultivadas em condições heterotróficas.

Os altos valores de μ em *M. decolor* ($p < 0,05$) constituem um dado novo importante. Os poucos trabalhos publicados até o momento a respeito dessa espécie focam mais em sua morfologia, ecologia e potencial para produção de carotenoides e ácidos graxos (DEL CAMPO et al., 2000; DEL RÍO et al., 2015; CZERWIK-MARCINKOWSKA et al., 2015). O rápido crescimento de *M. decolor*, assim como de *C. sorokiniana*, caracteriza um aspecto adaptativo verificado em espécies que adotam a chamada estratégia demográfica do tipo “r”, cujas populações produzem um elevado número de descendentes a cada ciclo reprodutivo (BLINOVÁ; BARTOŠOVÁ; GERULOVÁ, 2015). Segundo Begon, Townsend e Harper (2006), estrategistas “r” costumam ter alta resiliência e elevada robustez em ambientes com condições variáveis. A transferência de inóculo para início de culturas constitui uma mudança brusca das condições ambientais, sendo, portanto, vantajoso o uso desse tipo de espécie para obtenção de culturas densas em um curto período de tempo. Estrategistas “k”, por sua vez, apresentam um ritmo de crescimento menor, baixa resiliência e costumam predominar em ambientes mais estáveis (ANDERSEN, 2005; BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006). O metabolismo mais lento desses organismos pode explicar por que espécies como *A. stipitatus* e *P. lacustris* demoraram mais tempo para crescer, mesmo quando inseridas em um meio rico em nutrientes e com irradiância adequada.

Outras espécies, relevantes quanto à taxa de crescimento, merecem uma breve menção, independentemente da significância estatística. É o caso de *C. lunulatum*, com

$\mu_{684} = 0,90 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$, $\mu_{750} = 0,87 \pm 0,17 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_{Ca} = 0,98 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$, sendo este o primeiro registro de taxa de crescimento para esta microalga na literatura. No caso de *R. subcapitata*, também nomeada *S. capricornutum*, *Kirchneriella subcapitata* ou *Pseudokirchneriella subcapitata* (GUIRY; GUIRY, 2020), o valor de μ_{750} chegou a $0,91 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$. Frequentemente usada em testes de toxicidade, *R. subcapitata* chegou a apresentar, em tratamentos controle, uma taxa específica de crescimento de apenas $0,38\text{--}0,54 \text{ d}^{-1}$ (EXPÓSITO et al., 2017). *D. spinosus*, previamente conhecida como *Scenedesmus spinosus*, apresentou um valor máximo de $\mu = 0,98 \pm 0,03$, com base em *Ca in vivo*. Sabe-se, porém, que *D. spinosus* consegue crescer a uma taxa de até $1,23 \text{ d}^{-1}$ em condições autotróficas (CANDIDO; LOMBARDI, 2020). A maior taxa de crescimento obtida para *S. bijugus* foi $0,85 \pm 0,13 \text{ d}^{-1}$ (μ_{750}), embora essa mesma cepa consiga crescer a uma taxa comprovada de $1,05 \text{ d}^{-1}$ (BARRETO; LOMBARDI, 2016). Uma informação nova para a literatura é a taxa específica de crescimento da recentemente descrita *C. pantanale* (GARCIA et al., 2017), que pode ser de $0,80 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ (μ_{684}), $0,80 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ (μ_{750}) e $0,93 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ (μ_{Ca}).

4.2 Densidade celular

Os dados de densidade celular das culturas no último dia de experimento foram reunidos em ordem crescente na figura 15. Com aproximadamente 10^7 células mL^{-1} , *M. decolor* foi a microalga verde que se destacou nesse parâmetro ($p < 0,05$). Com células adultas esféricas medindo cerca de $6 \mu\text{m}$ em diâmetro, essa espécie se reproduz de forma assexual via autósporos, podendo um único esporângio conter até 32 autósporos (CZERWIK-MARCINKOWSKA et al., 2015). Comparativamente, células de *Chlorella*, pertencentes à mesma família de *M. decolor* (Chlorellaceae), tendem a se reproduzir assexuadamente pela liberação de 2, 4 ou 8 autósporos da célula-mãe, raramente chegando a 16 ou 32 (JOHN; TSARENKO, 2002). Essa alta capacidade de divisão em *M. decolor* explica os resultados de μ observados anteriormente.

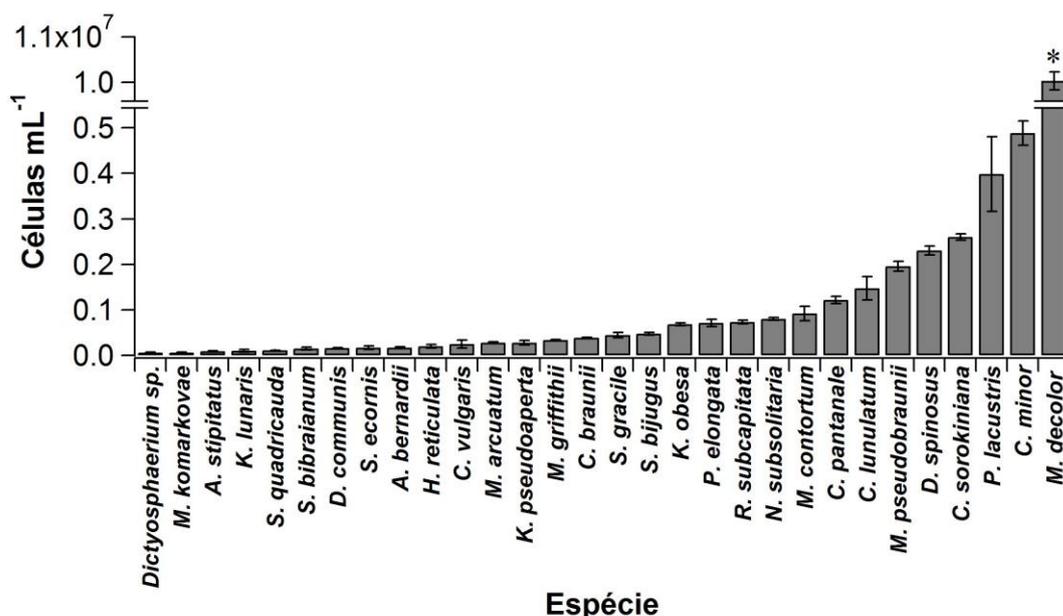


Figura 15. Densidade celular de 30 espécies de microalgas verdes, determinada no último dia de cultivo. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

C. minor e *P. lacustris* assumem a segunda e terceira posições na lista, ambas com menos da metade da quantidade de células em *M. decolor*. A cosmopolita *C. minor* cresce bem em ambientes ricos em nutrientes e tem elevado potencial para a produção de lipídios (SOBCZUK; CHISTI, 2010). Pouco se sabe a respeito de *P. lacustris*. Uma breve menção a essa espécie é feita em registros taxonômicos e de levantamento florístico (FERNANDES; BICUDO, 2009; GUIRY; GUIRY, 2020). Por ter apresentado um crescimento mais lento, comparado ao das demais espécies ($p < 0,05$), seu uso na produção de biomassa para finalidades biotecnológicas é desaconselhável, a menos que seu crescimento exponencial consiga ser mantido em um sistema contínuo de produção (ANDERSEN, 2005). *C. sorokiniana* 211-32, por sua vez, apresentou uma densidade média de $2,6 \times 10^6$ células mL, somada a um bom desempenho bioquímico e fotossintético, a ser detalhado mais adiante. Já foi constatado, inclusive, que essa mesma cepa pode atingir $\sim 10^7$ células mL⁻¹ em apenas 4 dias de cultivo, em fotobioreatores de 180 L (HANEDA et al., 2015), tendo iniciado o cultivo com $\sim 10^5$ células mL⁻¹.

A partir do observado, nas condições testadas, as espécies não recomendadas para a produção de biomassa, a julgar apenas pela baixa densidade celular ($p < 0,05$), foram *Dictyosphaerium* sp. (com uma média de $5,7 \times 10^4$ células mL⁻¹), *M. komarkovae* ($6,1 \times 10^4$ células mL⁻¹) e *A. stipitatus* ($9,3 \times 10^4$ células mL⁻¹).

4.3 Biomoléculas

4.3.1 Pigmentos

Os resultados referentes à concentração de pigmentos (figura 16) evidenciaram *C. sorokiniana* como a única espécie com conteúdo significativamente maior de clorofila *a* ($1,18 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$; $p < 0,05$). Em contrapartida, nove espécies (*S. quadricauda*, *C. lunulatum*, *C. sorokiniana*, *C. braunii*, *D. spinosus*, *M. griffithii*, *D. communis*, *H. reticulata* e *C. pantanale*) tiveram uma concentração mais elevada de clorofila *b*, variando entre $0,42$ e $0,59 \text{ mg L}^{-1}$ ($p < 0,05$). O acúmulo de carotenoides totais foi significativo ($p < 0,05$) em *C. sorokiniana* ($0,32 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$), *M. griffithii* ($0,29 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$), *C. braunii* ($0,28 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e *C. pantanale* ($0,27 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$).

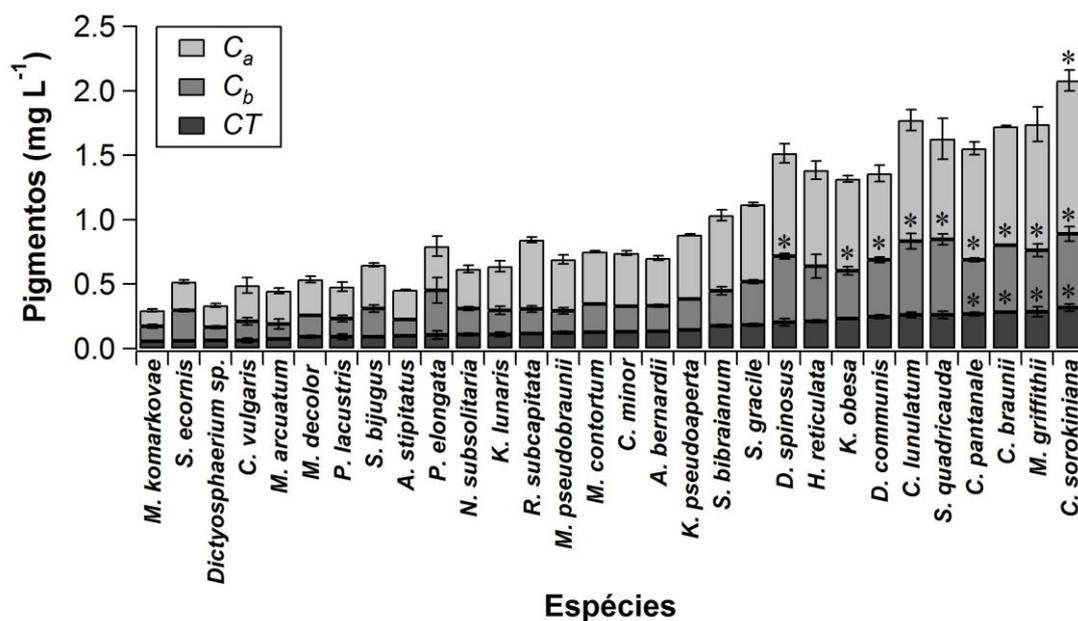


Figura 16. Concentração de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) e carotenoides totais (CT) em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Observou-se, conforme o esperado em Chlorophyta, que a quantidade de clorofila *a* por volume de cultura foi aproximadamente o dobro da clorofila *b*. A concentração de clorofila total, por sua vez, foi cerca de 4–6 vezes maior do que a de carotenoides totais. Tais proporções condizem com o fato da clorofila *a* ser o pigmento essencial da fotossíntese, da clorofila *b* ser o principal pigmento acessório e dos carotenoides tenderem

a aumentar principalmente quando as microalgas são submetidas a condições indutoras de estresse (MULDERS et al., 2014), o que não foi o caso. Essa ordem decrescente de composição pigmentar (clorofila *a* > clorofila *b* > carotenoides totais) também foi verificada em um estudo de caracterização com *C. sorokiniana* e *Chlorella zofingiensis* (AZAMAN et al., 2017).

A significância encontrada neste experimento para a produção de clorofila *a* em *C. sorokiniana* 211-32 ($p < 0,05$), é corroborada por Schuurmans et al. (2015). Eles cultivaram outra cepa de *C. sorokiniana* (211-8K) em meio BG11, a 30 °C, e obtiveram uma média de C_a igual a $3,61 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$. Bashan et al. (2016) observou um conteúdo de clorofila *a* próximo a 2 mg L^{-1} em *C. sorokiniana* UTEX 2714 e *C. sorokiniana* UTEX 2805 após três dias de cultivo, tempo similar à duração do cultivo principal de *C. sorokiniana* no presente trabalho. Valores substanciais de C_a (5,3 e $3,83 \text{ mg L}^{-1}$), C_b (3,19 e $2,54 \text{ mg L}^{-1}$) e CT (2,29 e $2,41 \text{ mg L}^{-1}$) também podem ser encontrados nas microalgas verdes marinhas *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis gracilis*, respectivamente (GORGÔNIO; ARANDA; COURI, 2013).

Neste trabalho, os valores de CT variaram de 0,06 a $0,31 \text{ mg L}^{-1}$, intervalo este comparável ao conteúdo máximo de carotenoides encontrado por Orosa et al. (2000) em outras espécies de microalgas verdes, como *Scenedesmus vacuolatus* ($0,19 \text{ mg L}^{-1}$), *Scotiellopsis oocystiformis* ($0,26 \text{ mg L}^{-1}$), *C. zofingiensis* ($0,34 \text{ mg L}^{-1}$), *Protosiphon botryoides* ($0,46 \text{ mg L}^{-1}$) e *Neochloris wimmeri* ($0,76 \text{ mg L}^{-1}$). Na presente prospecção, *M. griffithii*, *C. braunii* e *C. pantanale* foram evidenciadas como potenciais produtoras de carotenoides. No caso de *M. griffithii*, essa capacidade também foi confirmada em um estudo com 14 microalgas de rápido crescimento, isoladas de uma floração em águas eutrofizadas (SANTHAKUMARAN; KOOKAL; RAY, 2018). Em cultivos voltados à produção de carotenoides a partir de *C. braunii*, não é aconselhável submeter esta espécie a condições de estresse por cobre, pois sua resposta fisiológica pode incluir, dependendo da concentração do metal, uma redução no rendimento de pigmentos (BARACHO; SILVA; LOMBARDI, 2019). Esta pesquisa é o primeiro caso a destacar *C. pantanale* como uma candidata promissora em termos de acúmulo de carotenoides totais.

4.3.2 Proteínas e carboidratos

Três espécies se destacaram na produtividade diária de proteínas (figura 17): *C. sorokiniana* ($6,62 \pm 1,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), *C. lunulatum* ($5,40 \pm 2,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e *H. reticulata*

($5,30 \pm 1,03 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). De todas as 30 espécies, apenas *C. sorokiniana* teve uma produtividade de carboidratos totais estatisticamente superior: $9,29 \pm 0,43 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($p < 0,05$), como mostra a figura 18. Isso ocorreu devido à elevada taxa de crescimento dessa espécie em particular, que aumentou drasticamente a sua produção de carboidratos em comparação à das demais microalgas. Por esse motivo, a mesma análise de variância foi realizada uma segunda vez, sem considerar *C. sorokiniana* no conjunto de dados. O resultado ressaltou a produtividade de carboidratos de outras cinco espécies ($p < 0,05$): *C. lunulatum* ($6,48 \pm 1,81 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), *C. pantanale* ($6,11 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), *H. reticulata* ($5,89 \pm 0,86 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), *S. quadricauda* ($5,53 \pm 0,69 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e *D. spinosus* ($5,11 \pm 0,21 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

Dois motivos justificam a importância desses resultados. Primeiro, os dados tanto de proteínas quanto de carboidratos confirmam o conhecido potencial de *C. sorokiniana* para aplicações biotecnológicas voltadas à produção de biomoléculas (ROSENBERG et al., 2014; HANEDA et al., 2015; LIZZUL et al., 2018). Segundo, este trabalho fornece informações novas a respeito da capacidade intrínseca de *H. reticulata* e *C. lunulatum* para o acúmulo de proteínas.

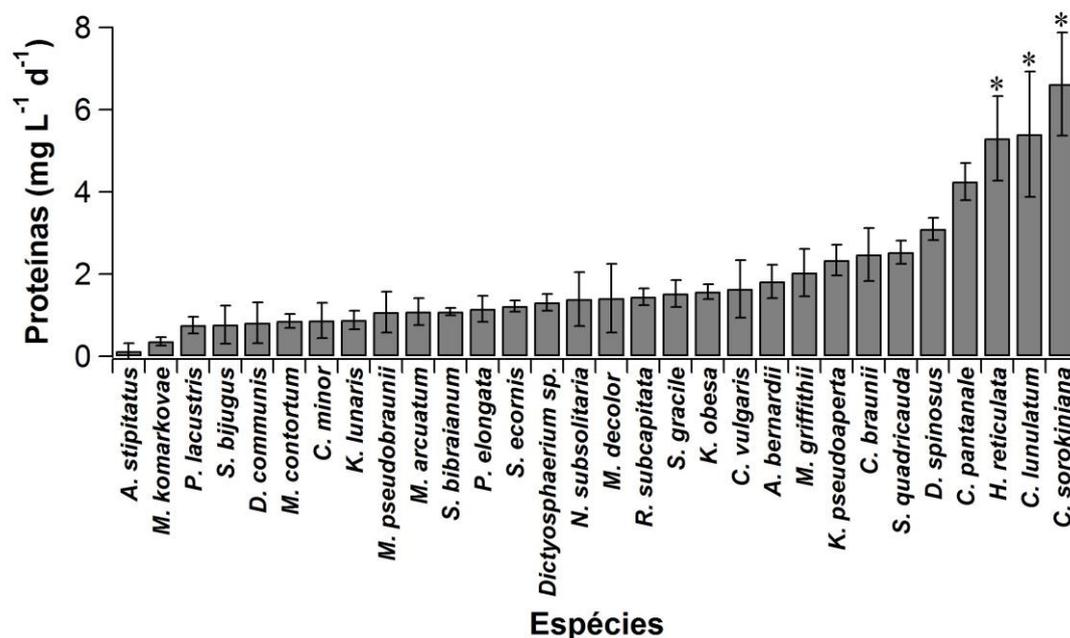


Figura 17. Produtividade específica de proteínas totais em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

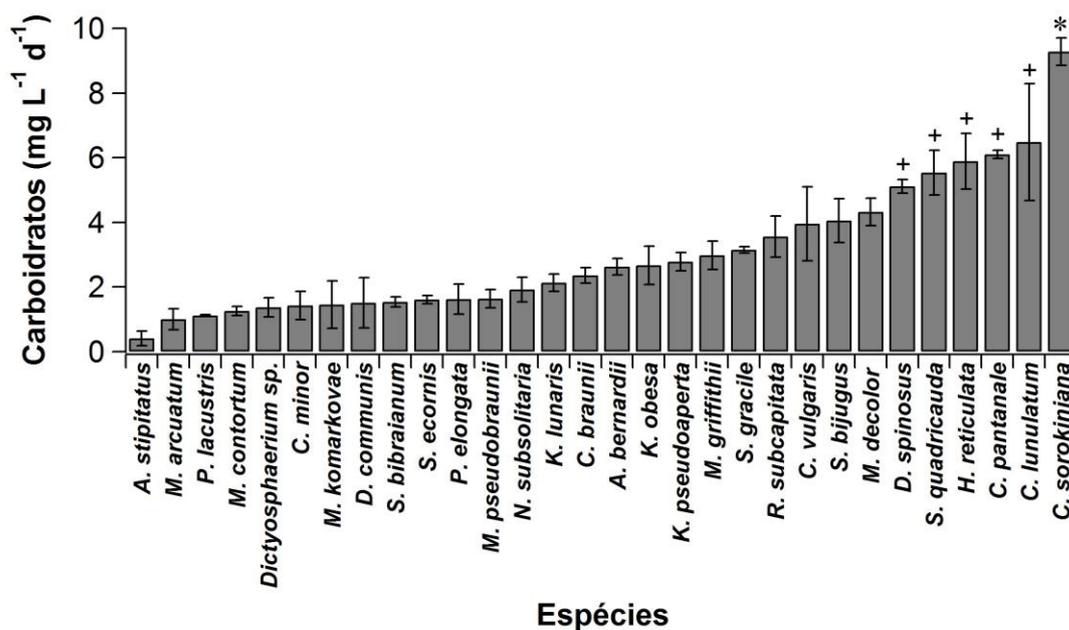


Figura 18. Produtividade específica de carboidratos totais em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). O sinal de adição (+) indica espécies cuja produtividade ganha destaque se *C. sorokiniana* não for considerada na análise estatística. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Apesar de não crescer excepcionalmente rápido se comparada a espécies oportunistas, *H. reticulata* apresentou uma média de μ igual a $0,66 \pm 0,04$ (μ_{684}), $0,65 \pm 0,05$ d⁻¹ (μ_{750}) e $0,66 \pm 0,01$ (μ_{Ca}). São valores maiores do que a taxa de crescimento reportada para diversas microalgas verdes no trabalho de revisão feito por Singh e Singh (2015). *H. reticulata* foi previamente denominada *Coelastrum reticulatum* (HEGEWALD et al., 2010). De acordo com Anusuya Devi e Venkataraman (1983), microalgas pertencentes aos gêneros *Coelastrum*, *Spirulina*, *Scenedesmus* e *Chlorella* são consideradas apropriadas para cultivos em larga escala. Quanto ao uso de biomassa, o conteúdo proteico da espécie *Coelastrum proboscideum*, por exemplo, justificou seu valor nutricional na alimentação de ratos (SALEH et al., 1985). A alta produtividade de carboidratos observada em *H. reticulata* neste experimento pode estar relacionada ao fato das células de *Hariotina* sintetizarem mucilagem (KRIENITZ; BOCK, 2012).

Esta pesquisa também revelou *C. lunulatum* como uma nova e promissora candidata para a produção de proteínas em condições livres de estresse. Sabe-se que espécies de *Chlorolobion*, como *C. braunii*, podem acumular quantidades consideráveis de lipídios quando expostas a cobre em concentrações ambientais (BARACHO; SILVA;

LOMBARDI, 2019). Dependendo do objetivo da produção de microalgas, diferentes estratégias podem, portanto, ser usadas para manipular a síntese de biomoléculas. Se cultivadas com sucesso em condições de larga escala, *H. reticulata* e *C. lunulatum* podem se tornar valiosas contribuições a listas de microalgas destinadas à produção de alimentos funcionais e à suplementação alimentar, tanto humana quanto animal (SHAH et al., 2018; CAMACHO; MACEDO; MALCATA, 2019).

Outras espécies, ressaltadas pelo seu potencial, merecem uma investigação mais aprofundada em trabalhos futuros. Além de ser uma produtora proeminente de carotenoides, *C. pantanale* também teve um bom desempenho em termos de acúmulo de proteínas, carboidratos e clorofila. *S. quadricauda* e *D. spinosus* ficaram entre as maiores produtoras, tanto de proteínas quanto de carboidratos. *S. quadricauda* é uma espécie versátil, frequentemente empregada em estudos ecotoxicológicos, com comprovada eficiência para fixação de CO₂ (SURESH KUMAR et al., 2015; MARYSHAMYA; RAJASEKAR; RENGASAMY, 2019) e uma taxa de crescimento de $0,75 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ em meio BG11 (CANDIDO; LOMBARDI, 2020), similar à obtida neste estudo ($0,76 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$). *D. spinosus*, em contrapartida, é uma espécie pouco estudada, sendo este estudo o primeiro a trazer informações sobre sua produtividade diária de proteínas e carboidratos.

Apesar de sua taxa de crescimento significativa (conforme descrito na seção 4.1), *M. decolor* não se sobressaiu em termos de acúmulo de biomoléculas. Essa constatação é reforçada por Del Campo et al. (2000). Os autores observaram que *M. decolor* não possui quantidades elevadas de astaxantina, cantaxantina, β -caroteno, luteína e violaxantina, embora produza mais biomassa do que outras microalgas Chlorophyceae. Submeter essa espécie a testes de manipulação bioquímica, com aplicação de estresse fisiológico controlado, pode ser uma alternativa para superar tal limitação.

Uma observação importante a respeito dos dados provenientes das análises bioquímicas foi o fato de todas as espécies terem tido valores iguais ou até mesmo maiores de carboidratos, comparado a proteínas ($p < 0,05$), o que contradiz a expectativa de haver mais proteínas na composição bioquímica de microalgas em crescimento exponencial, sob condições ambientalmente favoráveis (HU, 2004; SILVA; BERTUCCO, 2016; VUPPALADADIYAM et al., 2018). Essa constatação é reforçada pelo trabalho de Rizza et al. (2017). Os autores compararam o conteúdo bioquímico em dezessete cepas de microalgas Chlorophyta, cultivadas em meio BG11, e obtiveram uma porcentagem média de carboidratos maior do que a de proteínas para *Chlorella* sp. (58% carboidratos, 18% proteínas) e *Desmodesmus* sp. (54% carboidratos, 16% proteínas).

A produção abundante de carboidratos pode ocorrer em cepas produtoras de mucilagem, algo relativamente comum em microalgas, particularmente em Chlorophyta (BAUDELET et al., 2017). Apesar disso, não se pode descartar a possibilidade da quantidade de proteínas ter sido subestimada. Nossa principal preocupação é o protocolo de Rausch, usado para a extração proteica, cuja eficiência não atinge 100%. Tal protocolo foi modificado no presente trabalho com o objetivo de aumentar o rompimento celular em todas as 30 espécies investigadas. Encontrar um método eficiente, capaz de extrair com eficácia todo o conteúdo proteico de microalgas ainda é um desafio frequentemente observado (BARBARINO; LOURENÇO, 2005; SAFI et al., 2014a).

De acordo com Barbarino e Lourenço (2005), as proteínas podem ser quantificadas a partir da determinação do conteúdo de nitrogênio total na biomassa algal, usando métodos como a análise elementar CHN, ou por meio de técnicas colorimétricas, empregando, por exemplo, cobre em meio alcalino (LOWRY et al., 1951) ou corante *Coomassie Brilliant Blue* (BRADFORD, 1976). Medir o teor de nitrogênio por análise CHN era impraticável em nossas condições, pois requereria mais biomassa do que a quantidade produzida na pequena escala que usamos para a prospecção. Ademais, os procedimentos à base de corantes são considerados uma abordagem mais apropriada para estudos de triagem com ampla variedade de espécies (SLOCOMBE et al., 2013). Optouse, por fim, pelo método de Bradford, por ser mais simples, rápido e sensível do que o de Lowry (KRUGER, 2009).

4.4 Fotoquímica da Fotossíntese

4.4.1 Rendimentos quânticos do PSII e decaimentos de fluorescência

Os dados de monitoramento diário da razão F_v/F_m foram reunidos na figura 19. A maior parte das cepas apresentou um rendimento estável ao longo de seu cultivo, com valores que variaram, dependendo da espécie, de 0,65 a 0,73. Sabe-se que, em culturas saudáveis de microalgas, F_v/F_m varia de 0,6 a 0,8, podendo oscilar ao longo do ciclo diurno ou em resposta a fatores ambientais (MASOJÍDEK; VONSHAK; TORZILLO, 2010). Mesmo sob condições controladas, algumas espécies (*M. decolor*, *C. minor*, *M. griffithii*, *A. stipitatus* e *P. lacustris*) tiveram quedas pontuais de F_v/F_m durante o cultivo, principalmente nos dias posteriores à inoculação, o que pode ser interpretado como parte do processo de adaptação das algas ao meio fresco e à alteração da irradiância, que foi

ajustada com base na E_k definida na etapa 1 do experimento. No caso de *A. stipitatus* e *P. lacustris*, a inconstância de F_v/F_m e o próprio ritmo de crescimento mais lento evidenciam o comportamento fastidioso dessas duas espécies em comparação às demais.

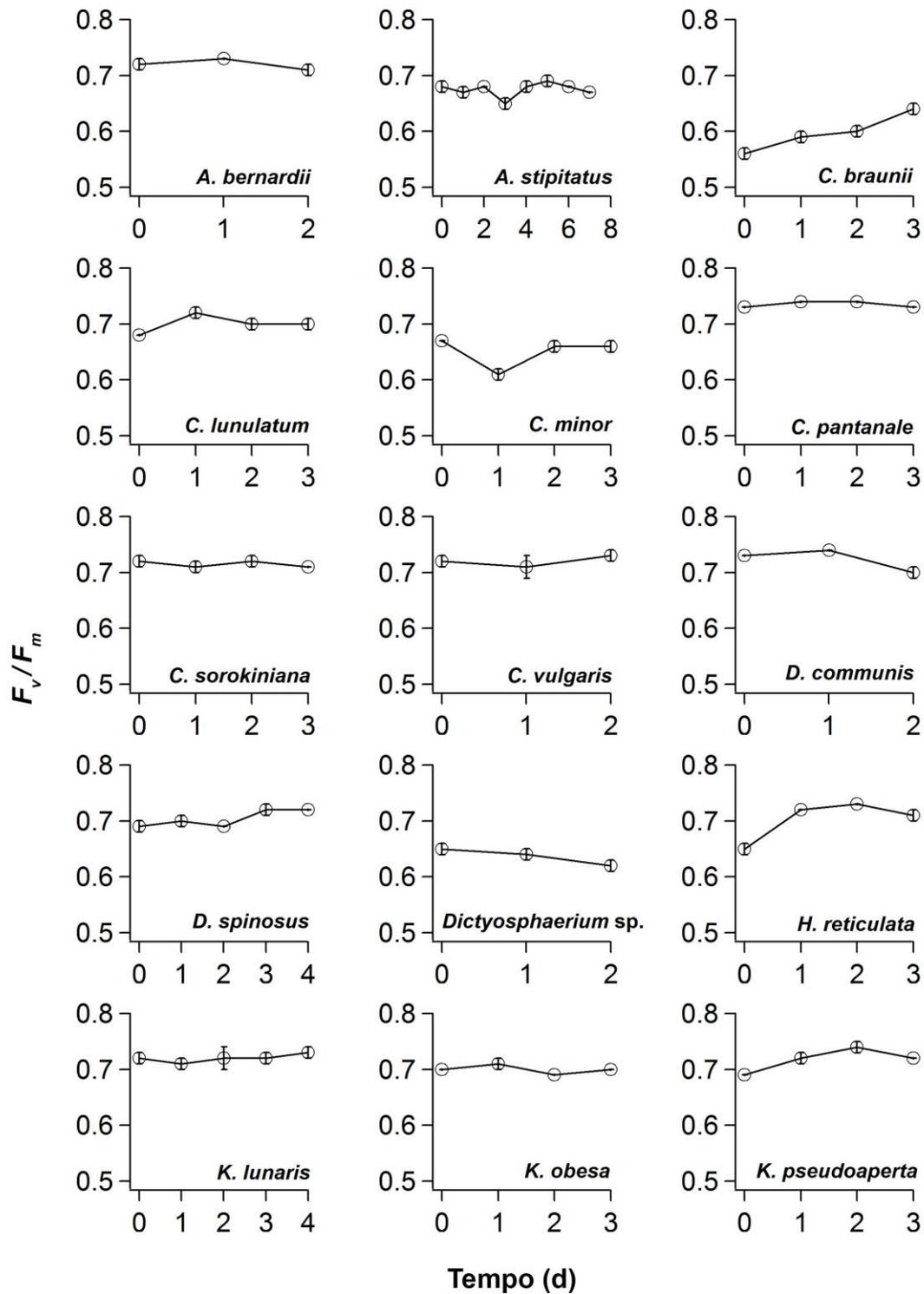


Figura 19. Monitoramento diário de F_v/F_m em 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

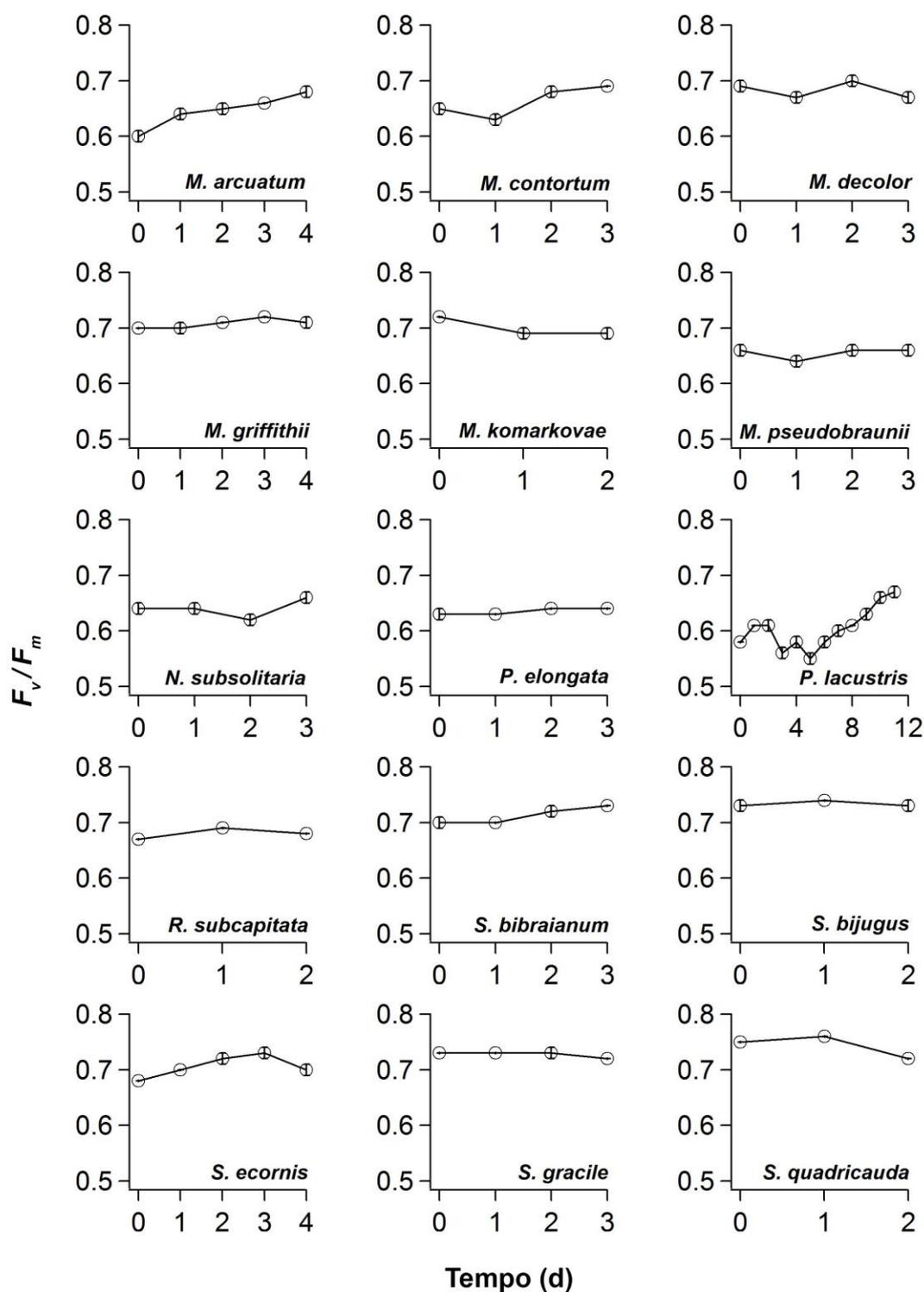


Figura 19 (continuação). Monitoramento diário de F_v/F_m em 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Mesmo com as microalgas em fase exponencial de crescimento, foi possível observar, durante o monitoramento diário, uma faixa relativamente constante e espécie-

específica de F_v/F_m , nem sempre dentro do intervalo ótimo teórico de 0,7–0,8 para culturas “saudáveis” de microalgas (VONSHAK; TORZILLO, 2004). Isso aconteceu, nas condições experimentais do presente trabalho, com as espécies: *A. stipitatus* (que apresentou um F_v/F_m médio de $0,67 \pm 0,01$ ao longo de todo o período de cultivo), *M. pseudobraunii* (com $0,66 \pm 0,01$), *M. arcuatum* ($0,65 \pm 0,03$), *C. minor* ($0,65 \pm 0,03$), *N. subsolitaria* ($0,64 \pm 0,02$), *Dictyosphaerium* sp. ($0,64 \pm 0,02$), *P. elongata* ($0,63 \pm 0,01$) e *P. lacustris* ($0,60 \pm 0,04$).

Os resultados das medições de F_v/F_m no último dia de cultivo (figura 20) foram comparados com os de $\Delta F/F'_m$ para o mesmo período (figura 21). Detectaram-se valores significativamente maiores de F_v/F_m em *C. vulgaris* ($0,75 \pm 0,00$), *S. bijugus* ($0,74 \pm 0,00$), *C. pantanale* ($0,73 \pm 0,00$), *S. bibraianum* ($0,73 \pm 0,01$) e *K. lunaris* ($0,73 \pm 0,01$). Apenas *C. vulgaris* apresentou uma média superior de $\Delta F/F'_m$ ($0,57 \pm 0,02$). De modo geral, observaram-se valores de F_v/F_m sempre maiores do que $\Delta F/F'_m$, o que condiz com a interpretação teórica dos níveis F_o , F_m , F_s , e F'_m esperados em uma típica curva de efeito Kautsky, com a diferença F_v mais pronunciada do que a ΔF (SCHREIBER, 2004).

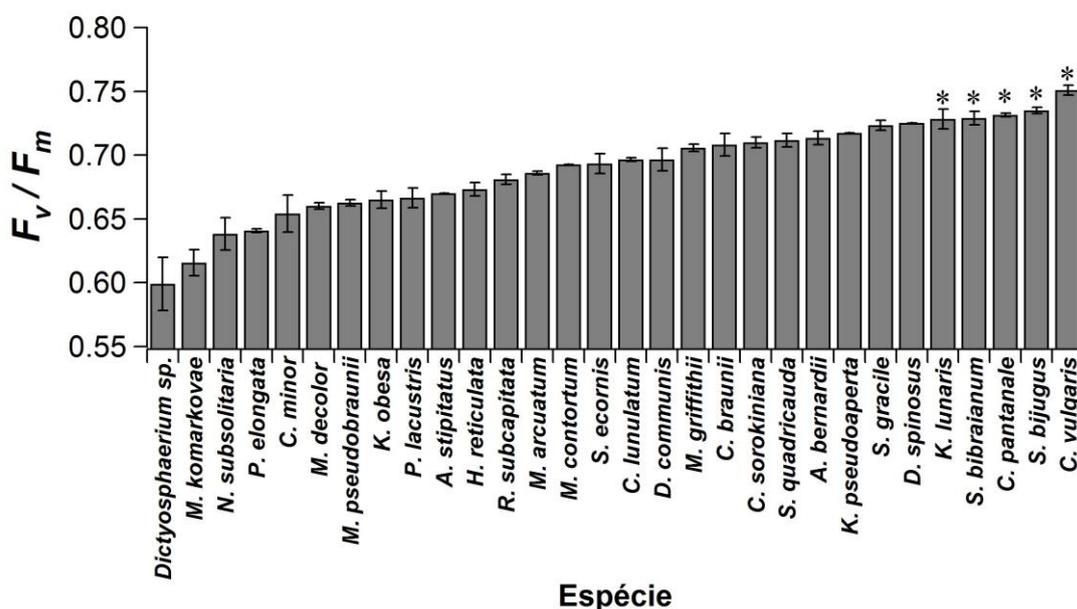


Figura 20. Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) do fotossistema II em 30 espécies de microalgas verdes. Medição realizada no último dia de cultivo, com as culturas em fase exponencial de crescimento. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

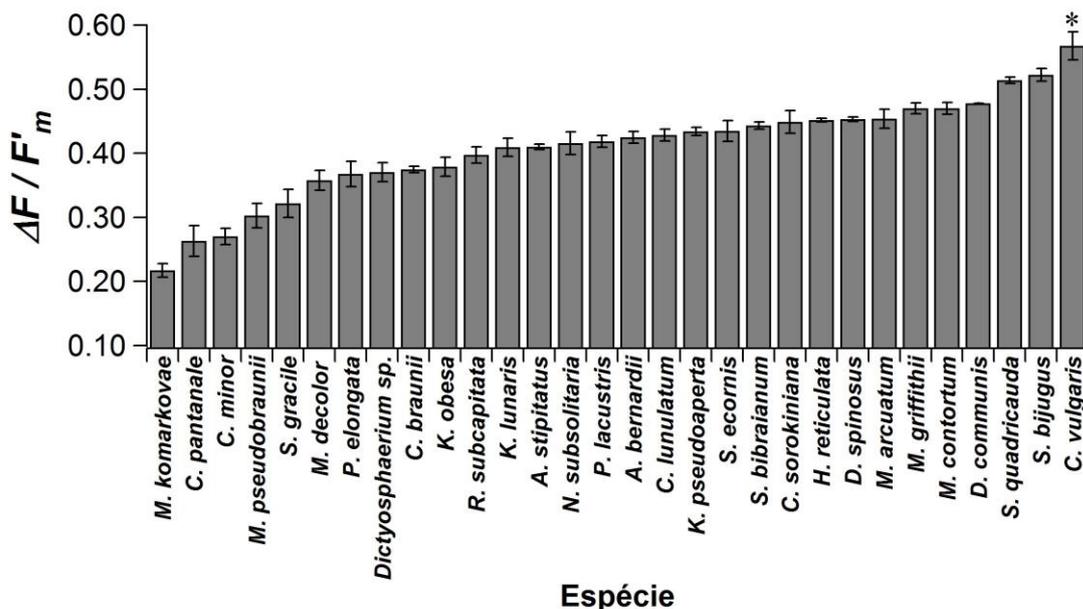


Figura 21. Rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'_m$) do fotossistema II em 30 espécies de microalgas verdes. Medição realizada no último dia de cultivo, com as culturas em fase exponencial de crescimento. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

É importante esclarecer que a razão F_v/F_m descreve um rendimento “ótimo” (potencial) do PSII, observado após a adaptação ao escuro, com saturação completa do acceptor primário de elétrons, a Q_A (SCHREIBER; BILGER; NEUBAUER, 1995). Trata-se, portanto, de uma condição não-natural, pois avalia a resposta do organismo fotossintetizante à súbita exposição a um pulso de luz saturante com elevada intensidade, o que não costuma ocorrer no ambiente. Segundo Hofstraat et al. (1994), F_v/F_m equivale ao produto das probabilidades de transferência da energia de excitação entre o complexo antena e o centro de reação do PSII. Seu valor reflete, em outras palavras, a probabilidade desses centros de reação usarem a energia de excitação fóptica disponível para a fotoquímica (FALKOWSKI; RAVEN, 2007). Por atuar como ferramenta de detecção de estresse, o cálculo de F_v/F_m pode ser aplicado não apenas no monitoramento de cultivos algais, mas em estudos oceanográficos, pesquisas com plantas e testes ecotoxicológicos (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987; PARKHILL; MAILLET; CULLEN, 2001; ADAMS; DEMMIG-ADAMS, 2004; FAI; GRANT; REID, 2007; NASH; QUAYLE, 2007; LOMBARDI; MALDONADO, 2011; SURESH KUMAR et al., 2014).

Ao contrário do que acontece com F_v/F_m , que indica o potencial fotossintético máximo, a variável $\Delta F/F'_m$ descreve, de forma mais realista, a atividade fotossintética de

organismos fotossintetizantes em um ambiente continuamente iluminado, seja ele natural ou artificial (KROMKAMP et al., 2008). Sob condições fisiologicamente “normais” de irradiância, um número pequeno de fotossistemas está sempre aberto à fotoquímica, razão pela qual a saturação total nunca é atingida quando $\Delta F/F'_m$ é calculado (LANEY, 2010). Segundo Mattos (2006), $\Delta F/F'_m$ mede a proporção da energia luminosa absorvida pelos centros de reação do PSII utilizada pela via fotoquímica. Podemos interpretar, então, que espécies como *C. vulgaris*, *S. bijugus* e *S. quadricauda* empregam em suas reações fotoquímicas cerca de duas vezes mais energia do que a usada por *M. komarkovae*, *C. pantanale* e *C. minor*.

Os resultados referentes ao cálculo do coeficiente qP foram reunidos na figura 22. A mesma espécie com o maior resultado de $\Delta F/F'_m$ (*C. vulgaris*) também foi a única a apresentar um qP significativamente mais alto ($0,95 \pm 0,04$). O menor valor de qP ($0,45 \pm 0,03$) foi detectado em *C. pantanale*, que teve, por sua vez, o segundo valor mais baixo de $\Delta F/F'_m$ ($0,26 \pm 0,02$). Foi possível perceber essa mesma relação em outras espécies (ex.: *C. minor*, *S. gracile*, *S. bijugus*, *S. quadricauda*, *D. communis* e *M. contortum*) com dados de $\Delta F/F'_m$ e qP próximos aos dois extremos da classificação crescente.

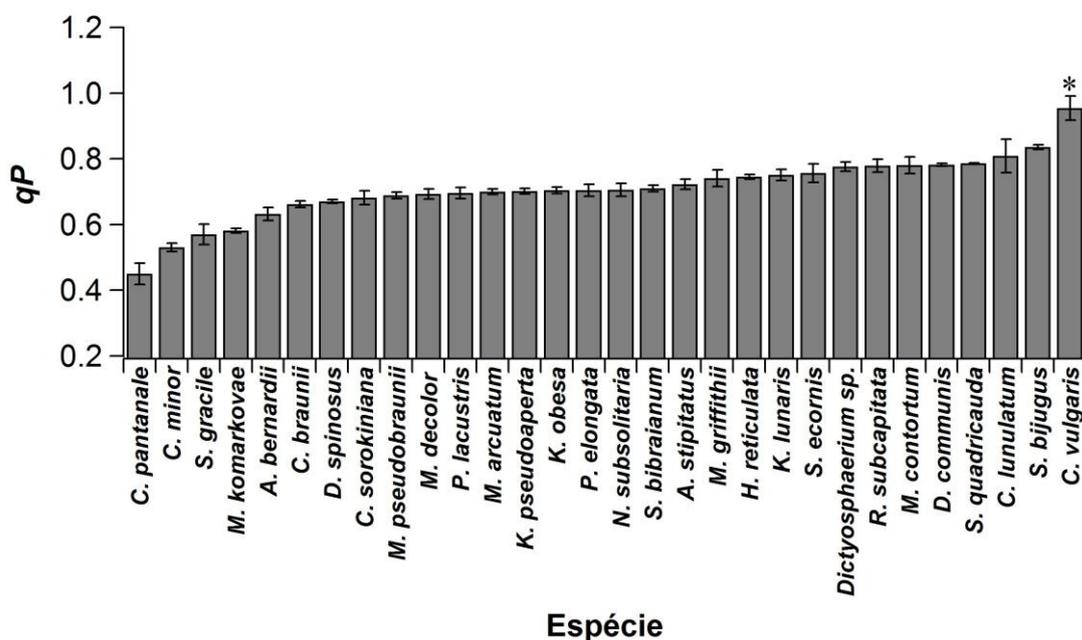


Figura 22. Decaimento fotoquímico (qP) de fluorescência em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Embora distintas, as variáveis $\Delta F/F'_m$ e qP se inter-relacionam no contexto fotoquímico. A eficiência fotoquímica efetiva, $\Delta F/F'_m$, sinaliza a habilidade de um organismo fotossintetizante de mover elétrons além do PSII na cadeia de transporte, uma vez atingido o estado estável de adaptação a uma determinada irradiância (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010). O decaimento qP está associado ao estado redox da Q_A e pode ser definido como a probabilidade do centro de reação ser capaz de realizar uma separação de cargas em um determinado instante (KOLBER; FALKOWSKI, 1993). Segundo Maxwell e Johnson (2000), enquanto $\Delta F/F'_m$ se relaciona com a eficiência atingida pelo PSII, qP e F_v/F_m fornecem informação sobre os processos subjacentes que modificam tal eficiência. Alterações de qP se devem ao fechamento dos centros de reação, devido à saturação luminosa da fotossíntese. Em outras palavras, qP indica a proporção dos centros de reação do PSII que permanecem abertos (MATTOS, 2006). Mudanças em F_v/F_m , por sua vez, estão relacionadas às alterações na eficiência da via não-fotoquímica da fotossíntese (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

O coeficiente NPQ calculado para as 30 espécies é reportado na figura 23. Os maiores valores de NPQ foram detectados em *M. komarkovae* ($1,66 \pm 0,10$) e *M. pseudobraunii* ($1,48 \pm 0,24$). Doze espécies (*M. arcuatum*, *A. bernardii*, *N. subsolitaria*, *C. sorokiniana*, *D. spinosus*, *S. quadricauda*, *P. lacustris*, *H. reticulata*, *C. braunii*, *M. griffithii*, *D. communis* e *M. contortum*) apresentaram os resultados estatisticamente mais baixos ($p < 0,05$), com NPQ variando de 0,19 a 0,48.

A interpretação fisiológica desse coeficiente segue um raciocínio inverso ao das demais variáveis fotoquímicas: valores menores de NPQ são desejáveis, pois sinalizam uma menor perda de energia por dissipação térmica. Esse coeficiente reflete um mecanismo de defesa dos organismos fotossintetizantes, que ajuda a proteger o aparato fotossintético de danos causados pelo excesso de energia luminosa e pela geração de formas reativas de oxigênio, como peróxidos e superóxidos (HORTON; RUBAN, 2005; MATTOS, 2006). Sua ativação envolve mudanças conformacionais no complexo antena, atuação reguladora da proteína PsbS, presente no PSII, e o acionamento do chamado “ciclo da xantofila”, fundamental na dissipação de calor como forma de fotoproteção (ESKLING; ARVIDSSON; AKERLUND, 1997; MASOJÍDEK et al., 1999; LARKUM, 2003; NIYOGI, 2004; LAVAUD; KROTH, 2006; LOGAN; ADAMS; DEMMIG-ADAMS, 2007; HUOT; BABIN, 2010).

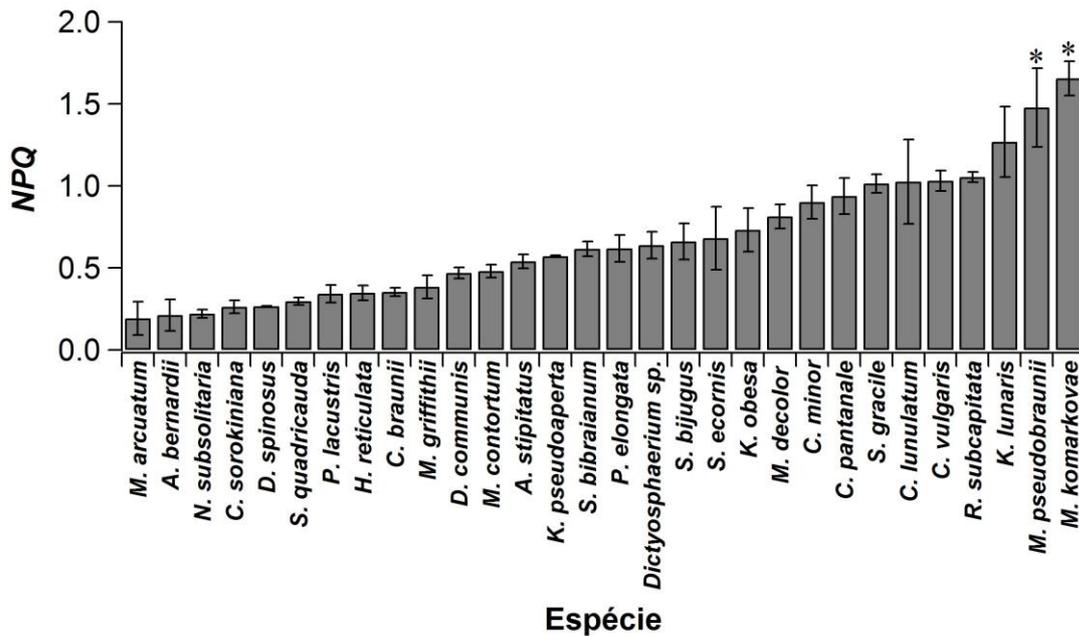


Figura 23. Decaimento não-fotoquímico (*NPQ*) da fluorescência em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Valores de *NPQ* maiores que 3,0 também já foram encontrados em diatomáceas e macroalgas marinhas (RMİKIL et al., 1996; LAVAUD; KROTH, 2006). Em um estudo com cinco espécies de Chlorophyta, cultivadas em fotobioreatores tubulares horizontais de 50 L e expostas à luz solar, Masojídek et al. (2004) verificaram que, ao longo de um dia, o *NPQ* pode variar de aproximadamente: 0,5 a 1,0 em *S. quadricauda*, 0,6 a 1,5 em *C. sorokiniana*, 0,25 a 1,25 em *Spongiochloris spongiosa*, 1,5 a 2,25 em *C. zofingiensis*, 0,5 a 1,25 em *Chlorococcum sp.* e 0,5 a 1,75 para *Haematococcus pluvialis*. São, de modo geral, valores comparáveis às médias de *NPQ* obtidas no presente trabalho. As diferenças interespecíficas de *NPQ* podem, portanto, ser atribuídas a particularidades comportamentais de cada cepa mediante as condições padronizadas adotadas ao longo do experimento. Além disso, é importante citar que, ao contrário do que ocorre nos vegetais superiores, a própria contribuição do ciclo da xantofila para a dissipação de energia nas algas verdes varia significativamente entre as espécies (MASOJÍDEK et al., 2004).

Sabendo que a intensidade luminosa do sistema de cultivo foi o único parâmetro modificado na transição da etapa experimental 1 para a 2, considerou-se a possibilidade de haver uma limitação na estratégia de uso da E_k para definição da E mais adequada para cada espécie. A E_k foi apenas uma referência, previamente calculada para cada microalga

investigada. Espécies com alto NPQ podem ter tido dificuldade de se adaptar à nova condição luminosa estabelecida durante o cultivo principal. Sabe-se que o aumento de NPQ em decorrência de danos induzidos por estresse no aparato fotossintético pode ser considerado uma compensação pela diminuição de $\Delta F/F'_m$ (MASOJÍDEK; VONSHAK; TORZILLO, 2010). Isso pode ter acontecido, por exemplo, com *M. komarkovae* e *M. pseudobraunii*, que tiveram baixo $\Delta F/F'_m$ em comparação às demais espécies.

Não obstante as considerações anteriores, deve-se ressaltar que os dados de F_v/F_m comprovam o estado fisiológico saudável das microalgas estudadas. Segundo Logan, Adams e Demmig-Adams (2007), valores baixos de F_v/F_m poderiam sinalizar tanto modificação/inativação do centro de reação do PSII quanto o acionamento da fotoproteção por xantofilas quando a dissipação térmica se faz necessária. Os autores indicam, inclusive, o F_v/F_m como medida alternativa ao NPQ para aferir a extensão da dissipação térmica, uma vez que o NPQ é vulnerável a imprecisões decorrentes da variação de força no sinal fluorescente dos níveis F_m e F'_m , medidos em momentos distintos, sob condições distintas. O uso sugerido de F_v/F_m como substituto de NPQ é sustentado pelo fato da redução dos níveis F_o e F_m indicar aumento da dissipação de energia em pigmentos do complexo antena por meio da excitação térmica (MAGNUSSON, 1997).

4.4.2 Curva Rápida de Luz

Cada espécie teve sua RLC traçada e representada graficamente na figura 24. Uma figura adicional (figura 25), com todas as 30 curvas reunidas em um único gráfico, permitiu a visualização e separação das espécies em três conjuntos enumerados: o conjunto 1 destaca as espécies bem adaptadas ao aumento progressivo de E , que apresentaram curvas de maior amplitude (*H. reticulata*, *S. quadricauda* e *D. communis*); o conjunto 2 contém curvas de amplitude intermediária, englobando a maior parte das espécies investigadas; e o conjunto 3 foca as espécies que atingem a saturação fotoquímica em intensidades luminosas mais baixas (*A. stipitatus*, *M. komarkovae* e *C. pantanale*), tendo, como consequência, curvas de menor amplitude.

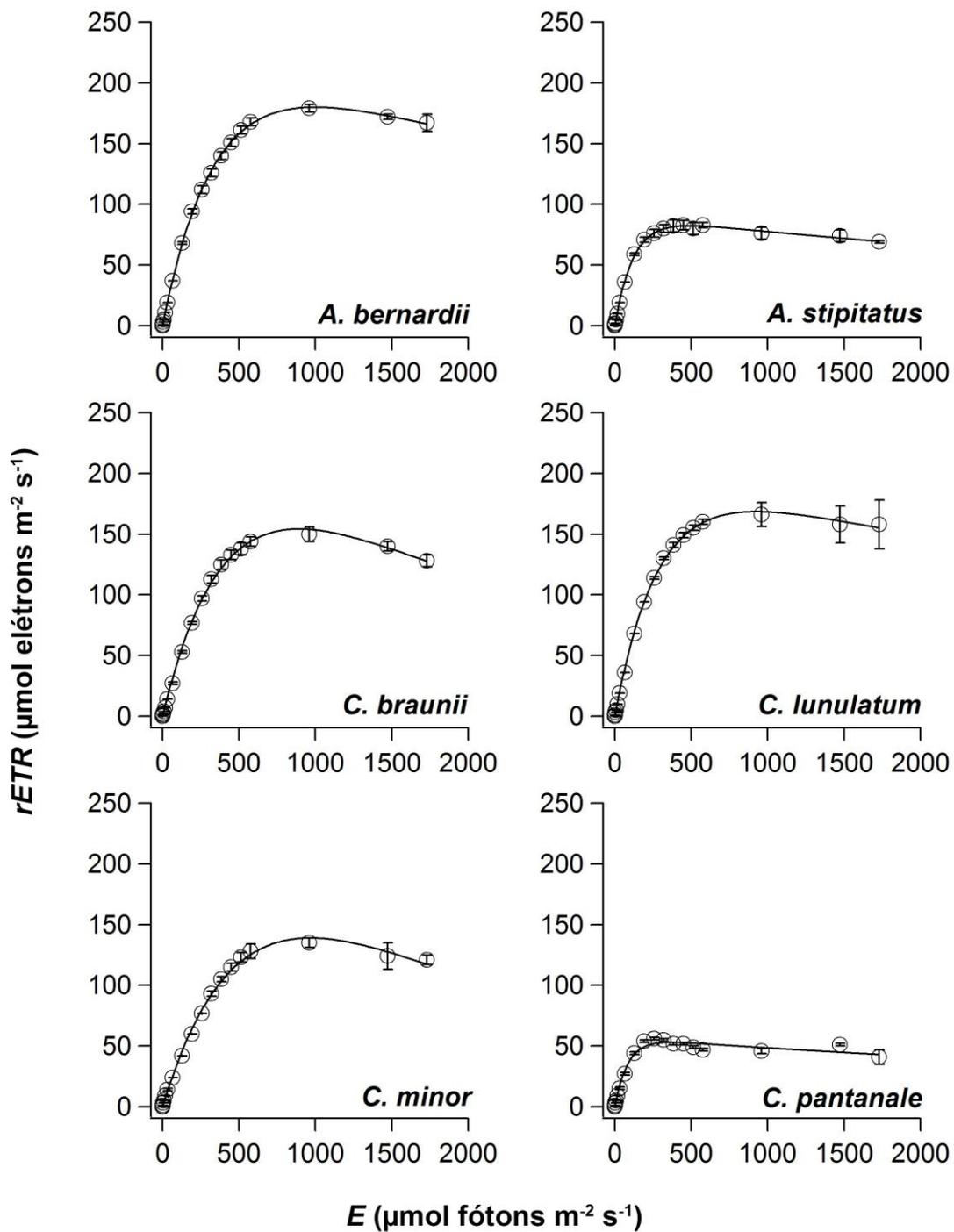


Figura 24. Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$) vs. irradiância (E), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

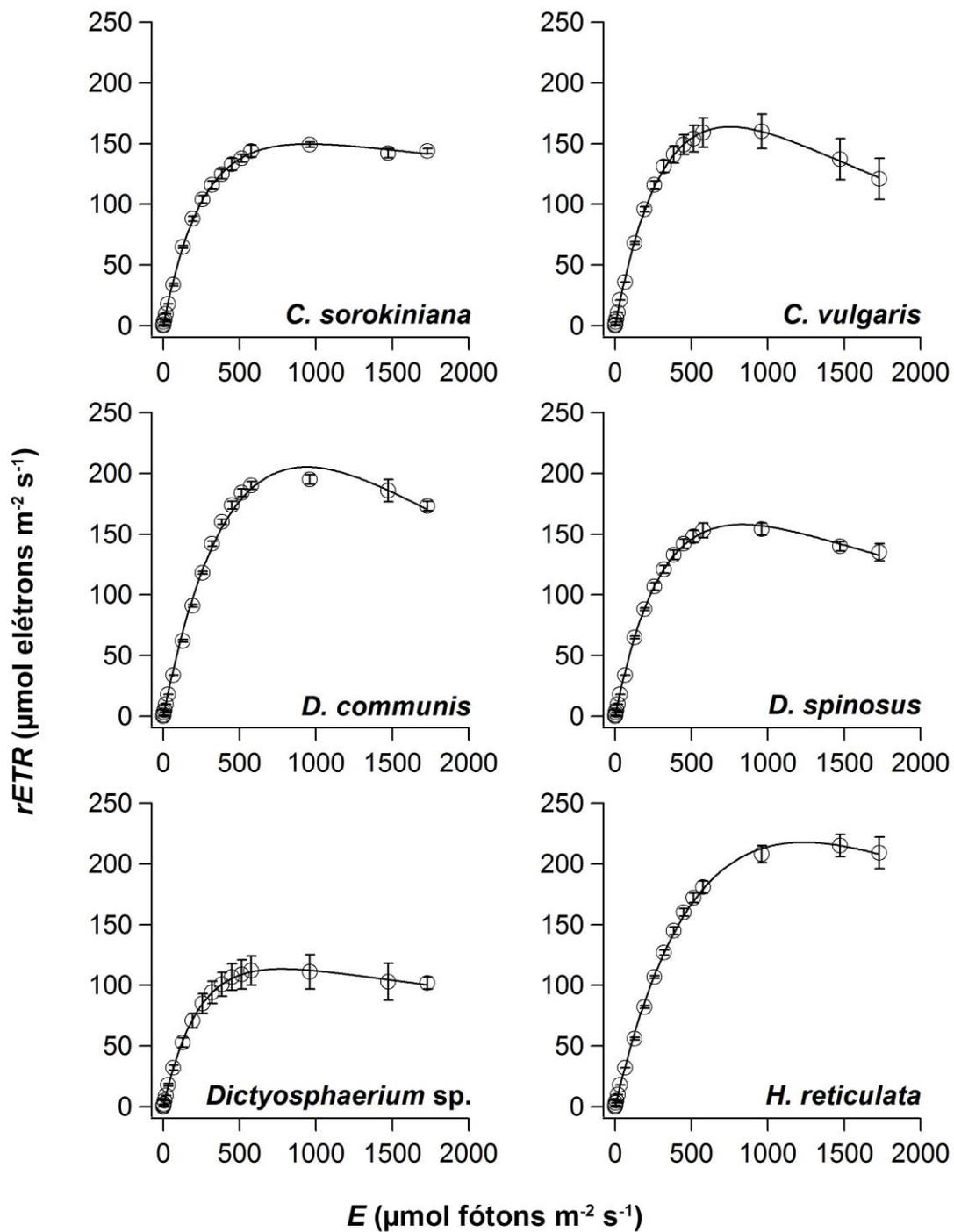


Figura 24 (continuação). Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$) vs. irradiância (E), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

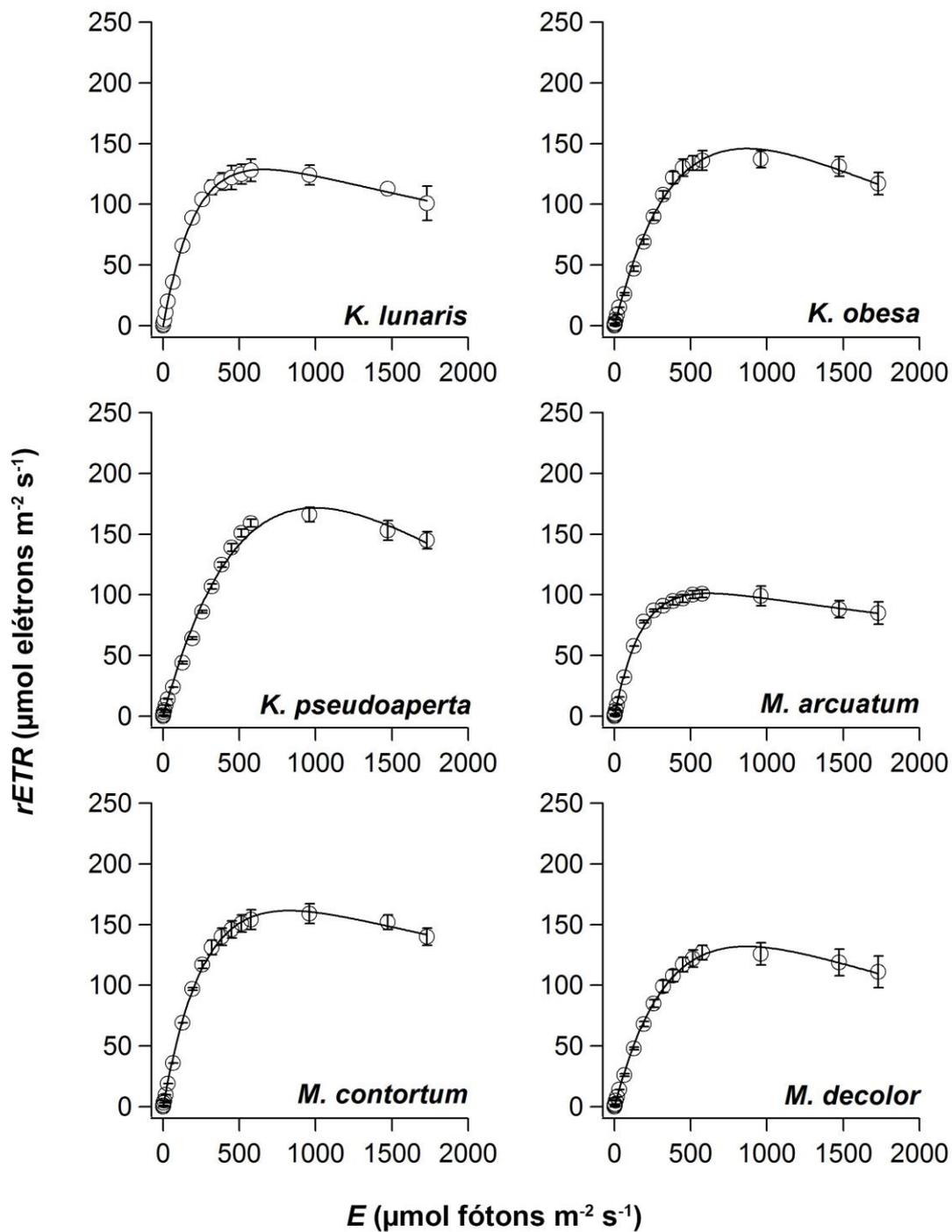


Figura 24 (continuação). Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons (*rETR*) vs. irradiância (*E*), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

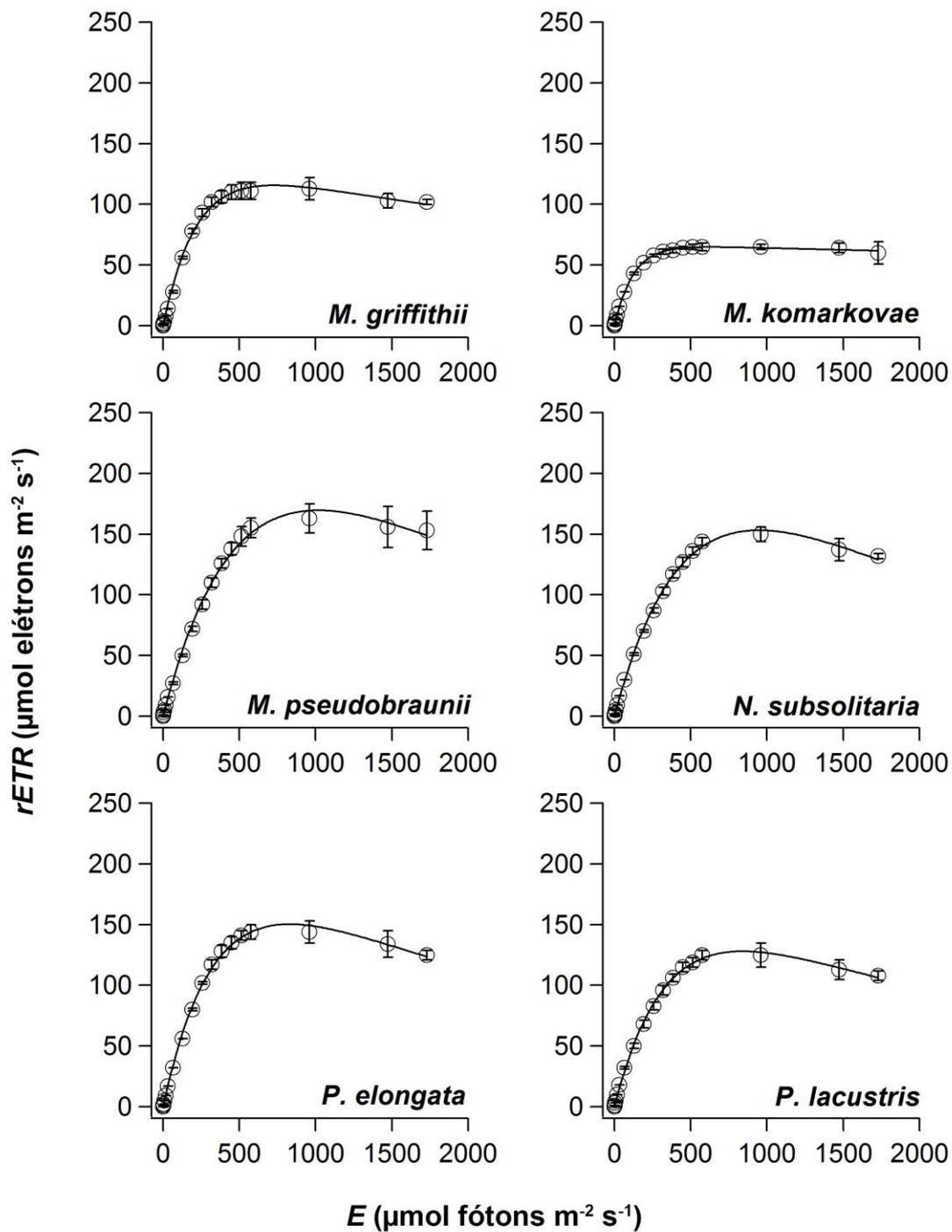


Figura 24 (continuação). Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$) vs. irradiância (E), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

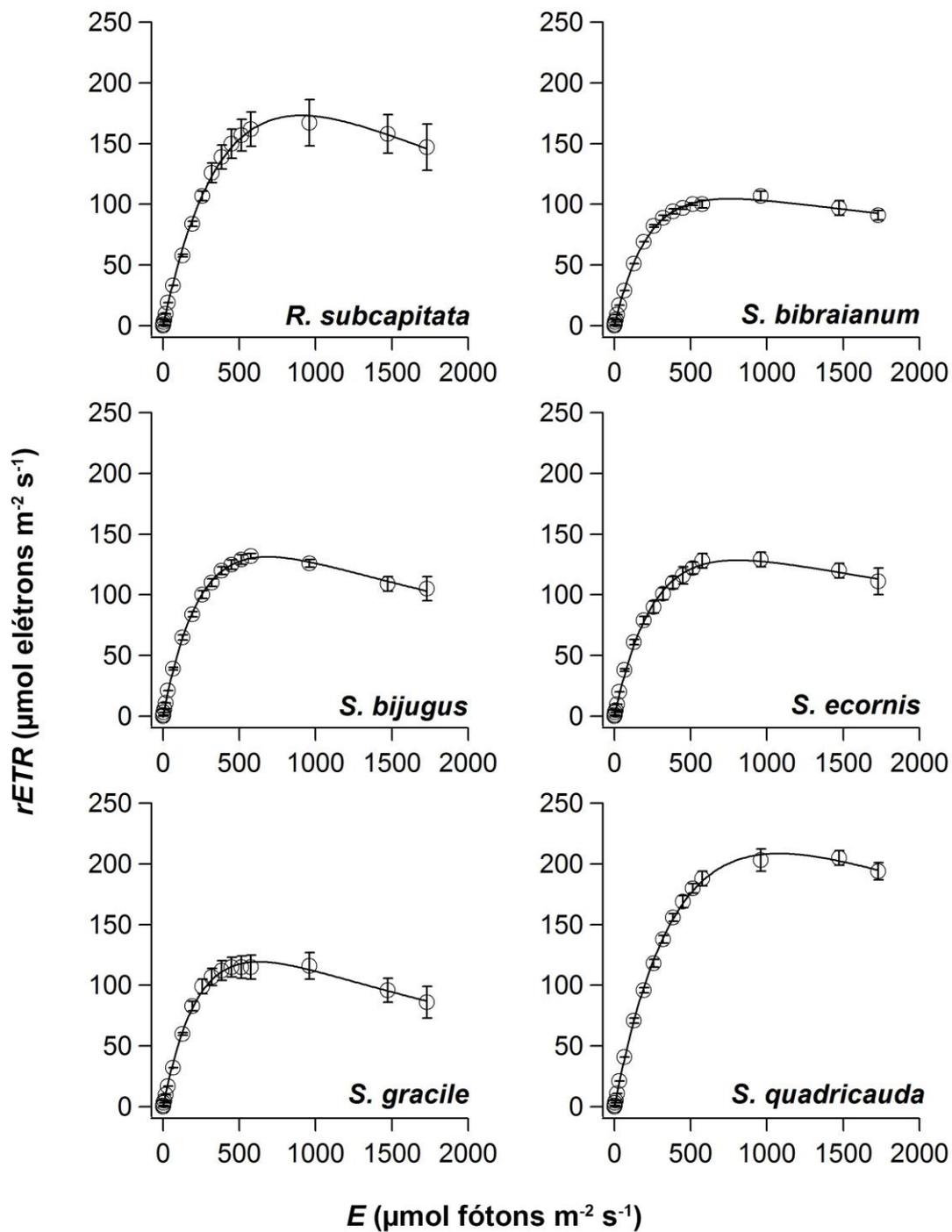


Figura 24 (continuação). Curvas rápidas de luz, baseadas em taxa relativa de transporte de elétrons ($rETR$) vs. irradiância (E), para 30 espécies de microalgas verdes. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

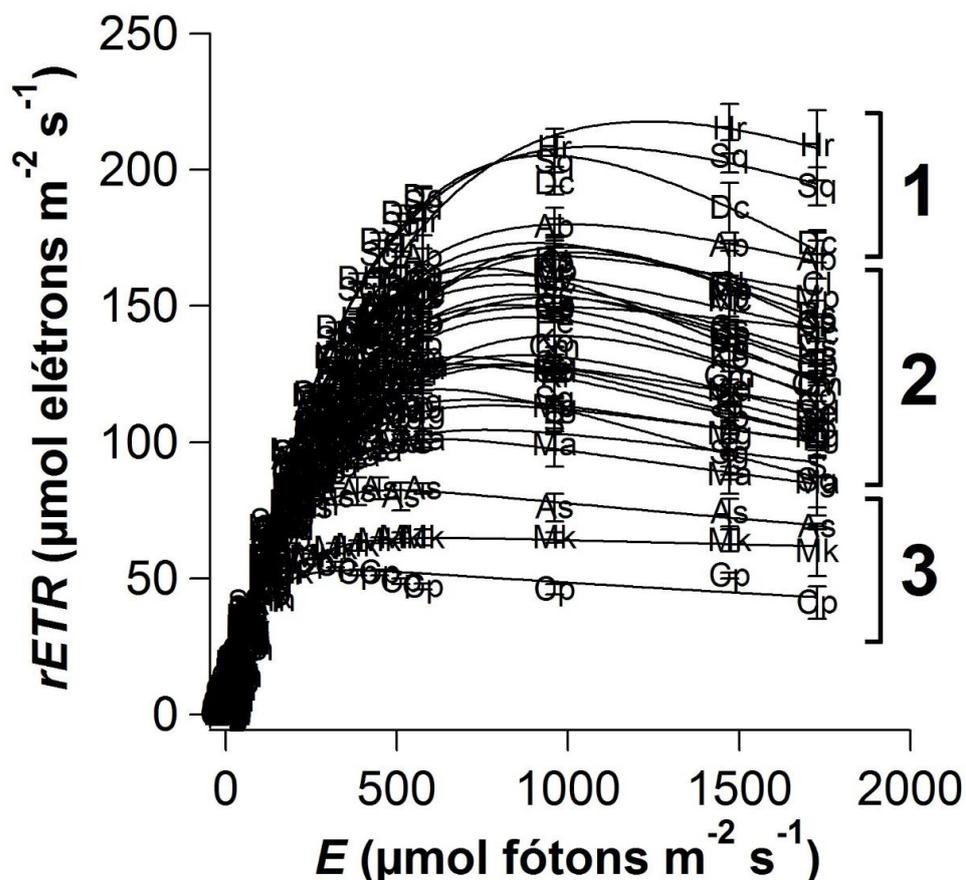


Figura 25. Curvas rápidas de luz das 30 espécies de microalgas verdes estudadas. As abreviações dos nomes das espécies estão de acordo com a tabela 1. Três conjuntos enumerados distinguem: as curvas de maior amplitude (conjunto 1, ao qual pertencem *H. reticulata*, *S. quadricauda* e *D. communis*), as intermediárias (conjunto 2) e as de menor amplitude (conjunto 3, com as espécies *A. stipitatus*, *M. komarkovae* e *C. pantanale*). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Reunidos na figura 26 encontram-se os valores da inclinação inicial, α , de cada RLC. Essa variável representa a eficiência celular de captura da luz (MARSHALL; GEIDER; FLYNN, 2000). Em todos os organismos fotossintéticos, a taxa inicial de fotossíntese é aumentada em proporção direta ao aumento de luz (SUKENIK; BENNETT; FALKOWSKI, 1987). Assume-se, desse modo, que, no começo da RLC, apenas a luz seja o fator limitante para a fotossíntese. Verificou-se que as espécies *A. stipitatus*, *M. contortum* e *K. lunaris* tiveram um α mais elevado (0,71–0,75), sendo, portanto, mais eficientes na captura da luz do que as demais. No outro extremo encontram-se *C. minor* e *K. pseudoaperta*, com os menores valores de α (0,42–0,47).

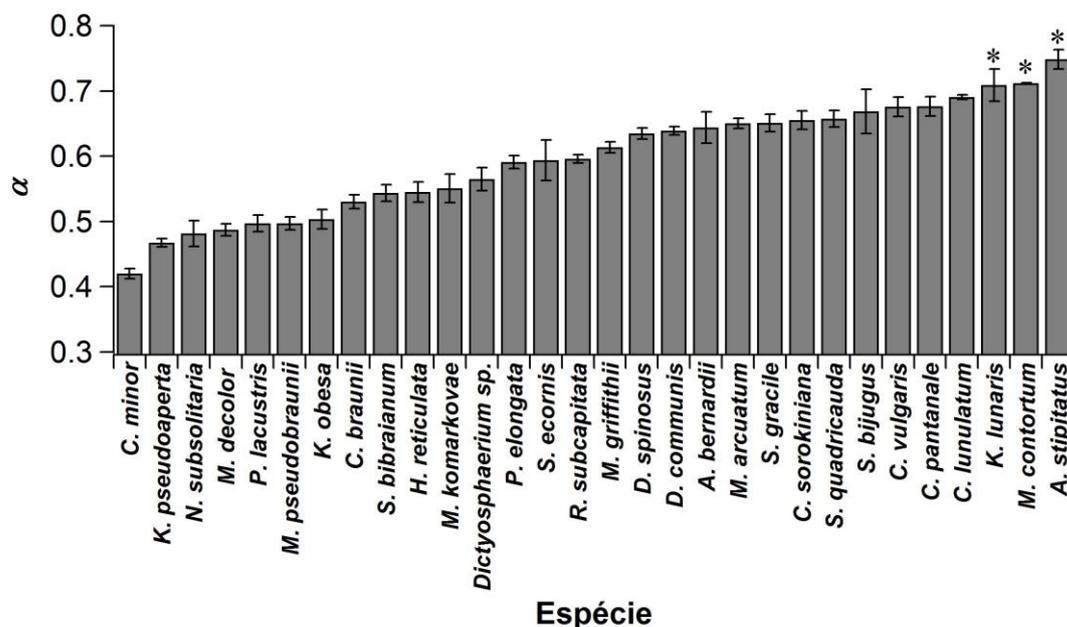


Figura 26. Valores de inclinação inicial da curva rápida de luz (α) para 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Os α observados para todas as 30 espécies foram maiores do que os resultados encontrados por White, Anandraj e Bux (2011) em *Chlorella* sp. cultivada em meio BG11 convencional (0,34) e submetida a estresse por escassez de nitrato (0,30), fosfato (0,32) e ferro (0,31). Em uma comparação entre diferentes grupos taxonômicos de fitoplâncton cultivados em meio WC, Schwaderer et al. (2011) observaram que algas verdes possuem maiores taxas máximas de crescimento e baixo α , o que indicaria, segundo os autores, uma adaptação à ambientes com elevada iluminação. Alguns trabalhos na literatura demonstram, porém, que a regulação de α nem sempre é proporcional à exposição à luz. Na diatomácea *Navicula phyllepta*, o α apresenta uma variação não-significativa de 0,3–0,5, independente de incubação prévia sob baixa ($25 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou alta ($400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) irradi\u00e2ncia (PERKINS et al., 2006). Embora α varie de 0,07 a 0,42 em diversas esp\u00e9cies de macroalgas marinhas, coletadas em diferentes habitats litor\u00e2neos, Campbell et al. (2007) n\u00e3o encontraram uma rela\u00e7\u00e3o significativa entre α e E ou entre α e profundidade do local de amostragem.

\u00c9 poss\u00edvel observar uma n\u00edtida diferen\u00e7a na ordem crescente das 30 esp\u00e9cies em uma compara\u00e7\u00e3o entre os dados de α e F_v/F_m . Essa diverg\u00eancia corrobora a cr\u00edtica feita por Saroussi e Beer (2007) de que a inclina\u00e7\u00e3o inicial das curvas “fotoss\u00edntese vs. irradi\u00e2ncia” \u00e9 frequente e erroneamente usada para representar o rendimento qu\u00e2ntico

máximo. Ambos os parâmetros se relacionam, porém α é definido pela luz do ambiente, enquanto F_v/F_m é definido em termos de luz absorvida (SAKSHAUG et al., 1997). Em um experimento com *Ulva* sp., Saroussi e Beer (2007) verificaram que existe, também, uma forte correlação entre α e o $\Delta F/F'_m$ medido exatamente no primeiro ponto de uma curva de luz. Essa relação, no entanto, também não ocorreu no presente trabalho.

As maiores médias de $rETR_{max}$ (figura 27) foram detectadas para *H. reticulata* ($217,52 \pm 8,56 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), *S. quadricauda* ($208,62 \pm 7,49 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e *D. communis* ($205,44 \pm 4,92 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os valores estatisticamente mais baixos ($p < 0,05$) foram constatados em *M. komarkovae* ($64,93 \pm 0,43 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e *C. pantanale* ($53,13 \pm 0,75 \mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A $rETR_{max}$ está relacionada à capacidade máxima fotossintética, obtida quando a taxa de fotossíntese é limitada pela atividade da cadeia de transporte de elétrons ou pelas enzimas do ciclo de Calvin (BEHRENFELD et al., 2004; SERÔDIO et al., 2006). Nota-se a partir dos dados desta pesquisa que essa “capacidade” é espécie-específica, uma vez que a determinação da irradiância E seguiu um comportamento particular das próprias microalgas ao final do cultivo preliminar e todas as demais condições controladas foram padronizadas durante o experimento.

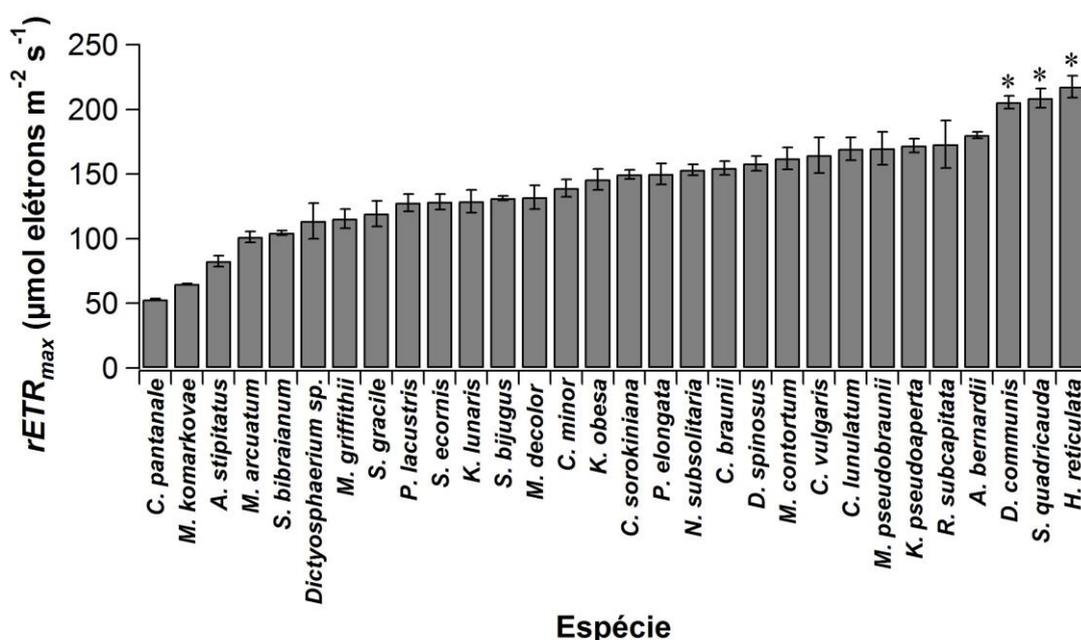


Figura 27. Taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$) em 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

O comportamento da RLC, sua amplitude e, conseqüentemente, a $rETR_{max}$ variam conforme a escala e o tipo de fotobiorreator, como observado em *Chlorella fusca* (MALAPASCUA et al., 2014). Também em *C. fusca* foram constatadas oscilações significativas de $rETR_{max}$ (ex.: 115–396 $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ao longo de vários dias cultivos sob exposição a luz solar (JEREZ et al., 2016b). Em *Chlorodesmis fastigiata*, medições *in situ* de RLC realizadas ao meio-dia, sob E de 800 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, registraram uma $rETR_{max}$ de aproximadamente 125 $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (SCHREIBER et al., 1997). A manipulação adequada do regime de iluminação de um cultivo pode ser uma abordagem estratégica para otimização da capacidade fotossintética. Em *N. phyllepta*, por exemplo, a $rETR_{max}$ foi aumentada para mais de 200 $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando amostras passaram por uma exposição prévia à luz actínica de 370 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até atingir o estado estável da curva de indução da fluorescência (PERKINS et al., 2006, 2010).

Os dados concernentes à E_k calculada no experimento principal (figura 28) revelaram *H. reticulata* e *K. pseudoaperta* como as espécies com maior nível de irradiância saturante: $399,28 \pm 15,97$ e $367,44 \pm 8,09$ $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. São, portanto, exemplos de microalgas com elevada tolerância à luz, embora uma maior E_k nem sempre resulte em maior $rETR_{max}$, como foi o caso de *K. pseudoaperta*. O limiar mais baixo de E_k foi observado em *M. komarkovae* ($118,04 \pm 4,55$ $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), *A. stipitatus* ($110,28 \pm 7,44$ $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e *C. pantanale* ($78,59 \pm 1,03$ $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), todos integrantes do conjunto 3 observado nas RLCs. Curiosamente, a E_k definida para *C. pantanale* no cultivo preliminar foi de aproximadamente 230 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e essa espécie apresentou uma média de F_v/F_m de 0,74 ao longo dos três dias de seu cultivo principal, demonstrando estar fisiologicamente saudável. Pode-se atribuir a queda drástica de E_k a uma aguçada sensibilidade à luz, pois, embora *C. pantanale* tenha sinalizado um limite de irradiância saturante razoavelmente elevado na etapa 1 do experimento, ela não se adaptou bem a essa nova condição na etapa 2, resultando em uma E_k três vezes menor do que a inicial. O mesmo aconteceu com *M. komarkovae*, que apresentou uma E_k média de 258 e 118 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao final dos cultivos preliminar e definitivo, respectivamente.

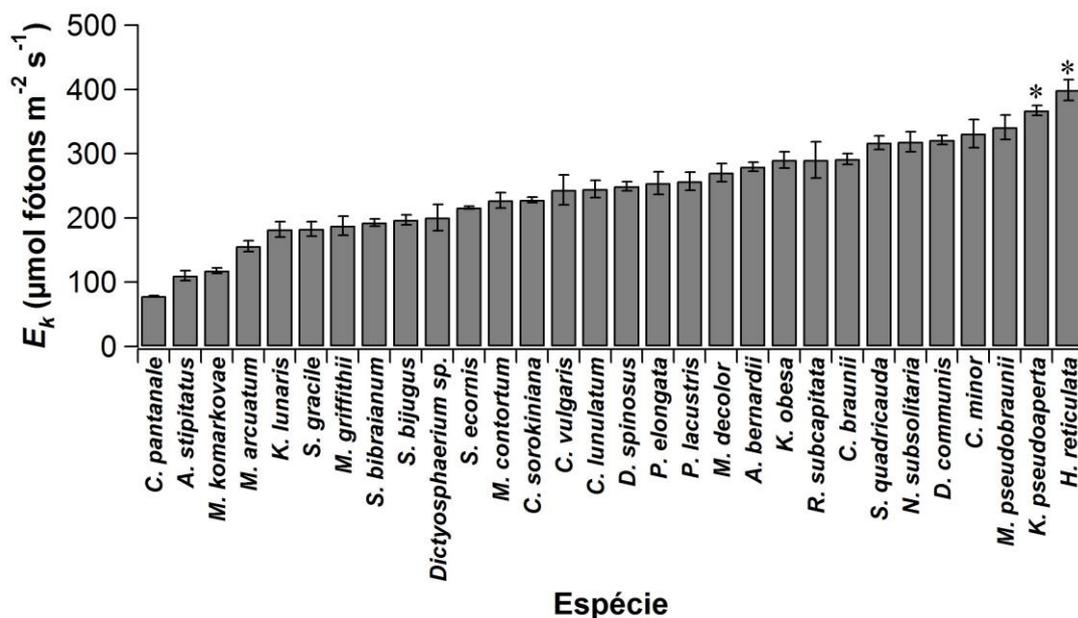


Figura 28. Irradi\u00e2ncia saturante (E_k) em 30 esp\u00e9cies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padr\u00e3o da m\u00e9dia ($n = 3$).

Casos como o de *C. pantanale* e *M. komarkovae* ilustram o fato constatado de que a variabilidade de E_k est\u00e1 amplamente relacionada \u00e0 fotoaclima\u00e7\u00e3o (BEHRENFELD et al., 2004). Todos os tr\u00eas par\u00e2metros da RLC podem mudar quando uma mesma esp\u00e9cie \u00e9 cultivada sob baixa ou alta irradi\u00e2ncia (PERKINS et al., 2006). A inconst\u00e2ncia da irradi\u00e2ncia saturante foi nitidamente constatada em tr\u00eas cultivos *in situ* de *C. fusca*, realizados em locais e \u00e9pocas distintos, podendo a mesma esp\u00e9cie apresentar uma E_k de 118 a 921 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (JEREZ et al., 2016b). Varia\u00e7\u00f5es significativas em E_k tamb\u00e9m ocorrem dependendo do intervalo de tempo estabelecido entre os pulsos de luz sequenciais da RLC e do tipo de modelo matem\u00e1tico escolhido para o ajuste da RLC (GILBERT; WILHELM; RICHTER, 2000; HERLORY; RICHARD; BLANCHARD, 2007; IHNKEN; EGGERT; BEARDALL, 2010).

Na discuss\u00e3o a respeito do efeito da luz na irradi\u00e2ncia saturante, \u00e9 fundamental ressaltar que a E_k determinada em RLCs tra\u00e7adas por um fluor\u00f4metro PAM, com uma ilumina\u00e7\u00e3o act\u00ednica restrita, neste caso, a um comprimento de onda de 655 nm, dificilmente ser\u00e1 igual \u00e0 E_k real das microalgas durante o cultivo com luz branca ou no ambiente natural, sob luz solar. Tal dedu\u00e7\u00e3o \u00e9 amparada pelo conhecimento de que fisiologia algal se adapta de formas distintas a altera\u00e7\u00f5es na qualidade da luz, mudan\u00e7as estas relacionadas \u00e0 quantidade de energia fornecida pelas diferentes cores do espectro

eletromagnético (SCHULZE et al., 2014). Outro detalhe importante a respeito da iluminação em análises de irradiância saturante: o fato de uma espécie de microalga possuir um valor baixo de E_k torna-se uma vantagem em casos de autossombreamento. O sombreamento mútuo de células é comum em cultivos densos e gera, como consequência, uma exposição desigual à luz para microalgas no centro de fotobioreatores, em comparação às que se encontram próximas à superfície (CARVALHO et al., 2011). Espécies com menor E_k podem, portanto, se beneficiar de uma quantidade reduzida de luz em condições de alta densidade celular, o que é vantajoso para indústrias.

É válido mencionar, também, que fatores ambientais, além da luz, podem exercer efeitos variados na E_k de microalgas. Em seu tratamento controle com *Chlorella* sp. cultivada em meio BG11, White, Anandraj e Bux (2011) obtiveram uma E_k de 528 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a qual decaiu para 264, 228 e 116 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em resposta à escassez de ferro, fosfato e nitrato, respectivamente. Isso demonstra o quão sensível à privação nutricional essa variável pode ser. Há também a possibilidade da E_k ser drasticamente afetada quando microalgas verdes são expostas a metais. Foi o caso de *C. braunii*, que apresentou uma queda de E_k de ~ 250 para 130 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante concentrações crescentes de cobre (BARACHO; SILVA; LOMBARDI, 2019). Em *C. sorokiniana*, embora tenha reduzido α e $rETR_{max}$, a acidificação do meio de cultura não resultou em alterações significativas de E_k , (CAMARGO; LOMBARDI, 2018). Tal efeito foi verificado após excessiva exposição das microalgas a uma mistura de gases de combustão, incluindo CO_2 . Em um caso análogo, porém, a exposição controlada de *C. vulgaris* a um tipo similar de mistura gasosa poluente chegou a aumentar os valores das três variáveis derivadas da RLC (ROSSI et al., 2018), demonstrando, pois, os bons resultados da aplicação estratégica de um agente potencialmente estressante na fotoquímica algal.

4.4.3 Absorção de luz

O coeficiente de absorção específico da clorofila em amostras *in vivo* ($a^*_{in vivo}$, figura 29) diferiu do observado no extrato à base de DMSO (a^*_{DMSO} , figura 30). As microalgas com maior $a^*_{in vivo}$ foram *C. minor* ($0,077 \pm 0,002 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$) e *P. lacustris* ($0,075 \pm 0,006 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$); as com a^*_{DMSO} mais elevado foram *A. stipitatus* ($0,099 \pm 0,003 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$), *M. komarkovae* ($0,095 \pm 0,005 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$), *Dictyosphaerium* sp. ($0,094 \pm 0,012 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$) e *A. bernardii* ($0,087 \pm 0,005 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$).

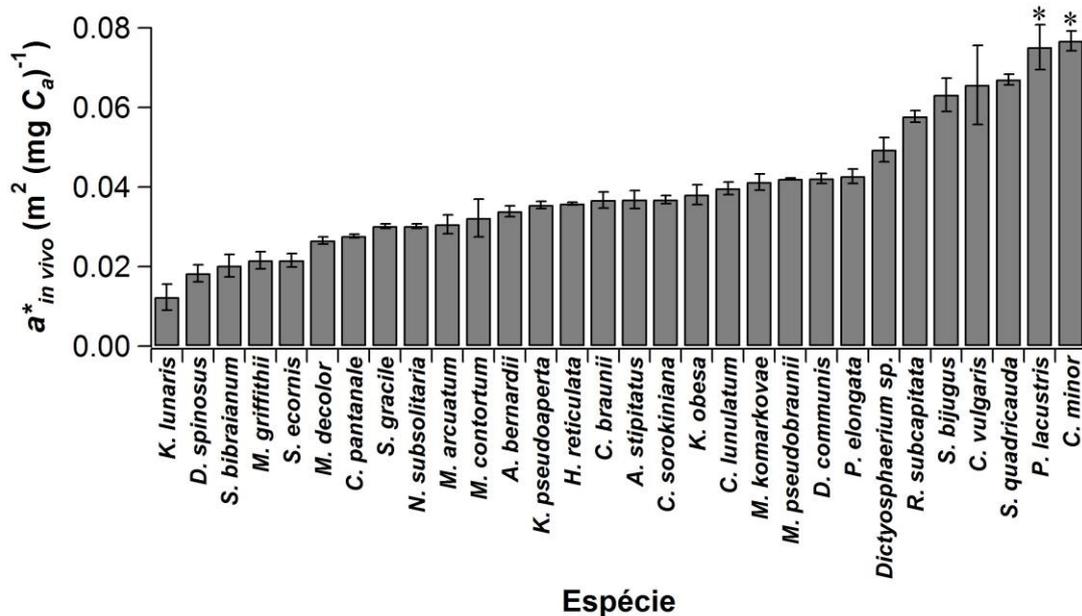


Figura 29. Coeficiente médio de absorção específico da clorofila *a* em amostras *in vivo* ($a^*_{in vivo}$) de 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

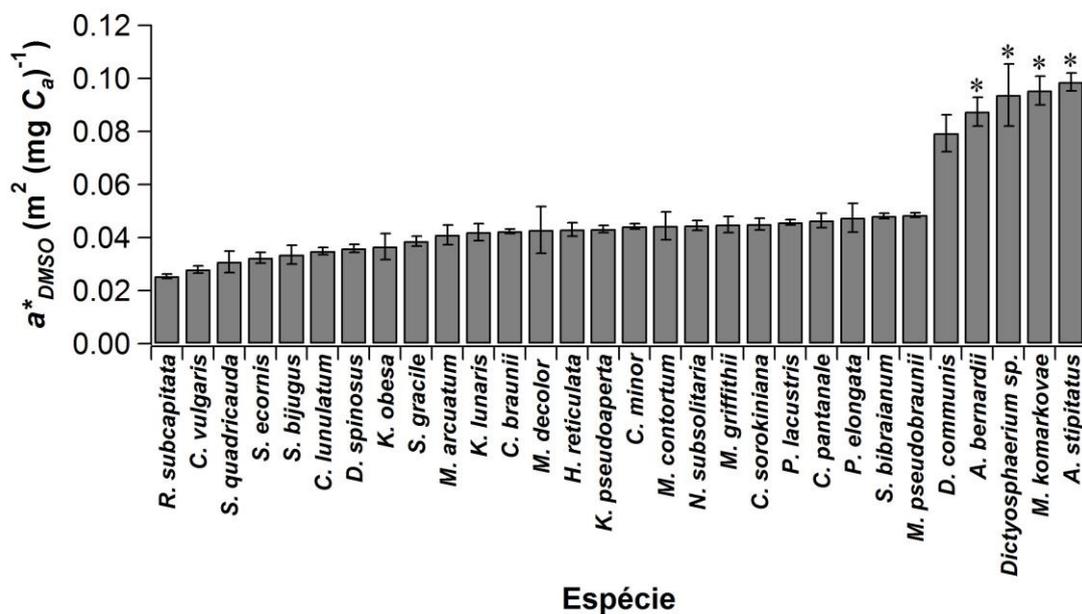


Figura 30. Coeficiente médio de absorção específico da clorofila *a* em amostras submetidas à extração com DMSO (a^*_{DMSO}) para 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Segundo Geider e Osborne (1992), o valor de a^* pode variar de 0,004 a 0,043 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$. As sete espécies com $a^*_{in vivo}$ mais alto ultrapassaram o máximo desse intervalo de referência. Em termos de a^*_{DMSO} , quinze espécies excederam tal limite. Os dados calculados para as duas categorias de a^* são, porém, comparáveis aos observados em diversos trabalhos. Flaming e Kromkamp (1998) registraram, ao longo de um mesmo dia, uma média de a^* de 0,007 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ para *Scenedesmus protuberans*, 0,017 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ para *Phaeocystis globosa*, 0,031 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ para *Emiliania huxleyi* e 0,014 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ para *Phaeodactylum tricornutum*. Trabalhando com uma comunidade fitoplanctônica, Hancke et al. (2015) mediu uma oscilação natural de a^* de 0,0104 a 0,0150 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$. Em microfítobentos, sabe-se que a^* pode variar de 0,005 a 0,01 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ (HARTIG et al., 1998) e de 0,008 a 0,0161 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ (KROMKAMP et al., 2008). Comparativamente, no trabalho de Greg Mitchell e Kiefer (1988), foi constatado que, durante a fase exponencial de crescimento, o a^* pode variar de 0,011 a 0,030 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ em *Pavlova lutheri*; de 0,011 a 0,027 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ em *Chaetoceros gracilis* e de 0,015 a 0,065 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ em *D. tertiolecta*. Neste último caso, o máximo citado de 0,043 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ foi extrapolado, demonstrando, assim, a possibilidade desse coeficiente atingir valores superiores a 0,05 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ em microalgas verdes. Além disso, sabe-se que em *Nannochloris atomus*, devido ao autossombreamento causado pelo aumento da concentração intracelular da própria clorofila, a^* diminui de ~ 0,006 para ~ 0,003 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$ (GEIDER; OSBORNE, 1986), o que ultrapassa o limite mínimo mencionado de 0,004 m^2 $[\text{mg } C_a]^{-1}$.

A comparação de ambos os tipos de a^* adveio da possibilidade de avaliar se a constituição intacta das células algais, presente em $a^*_{in vivo}$ e ausente em a^*_{DMSO} , poderia interferir na leitura do sinal de absorvância das amostras. Os dados observados comprovam essa possibilidade. Uma análise correlacional executada apenas com $a^*_{in vivo}$ e a^*_{DMSO} resultou em um valor de $r = -0,062$ ($p > 0,05$), demonstrando não haver qualquer correlação entre essas variáveis (AKOGLU, 2018).

Tal divergência pode ser explicada com base na literatura. De acordo com Falkowski e Raven (2007), o coeficiente óptico de absorção em pigmentos *in vivo* é sempre menor do que na condição *in vitro*, devido à própria organização espacial dessas moléculas nas membranas dos cloroplastos e à forma como estes se organizam dentro das células. A própria posição das células no meio aquoso é dinâmica. Vinte espécies tiveram valores maiores de a^*_{DMSO} em comparação a $a^*_{in vivo}$. Essa diferença foi mais pronunciada em *D. communis*, *A. bernardii*, *Dictyosphaerium* sp., *M. komarkovae* e *A. stipitatus*. Em

dez espécies (*C. lunulatum*, *C. minor*, *C. vulgaris*, *K. obesa*, *M. decolor*, *P. elongata*, *P. lacustris*, *R. subcapitata*, *S. bijugus* e *S. quadricauda*), porém, as médias de a^* foram estatisticamente iguais ou maiores para a condição *in vivo*, contrariando a afirmação feita por Falkowski e Raven.

A variabilidade espécie-específica da absorção luminosa no fitoplâncton é, geralmente, atribuída a mudanças no tamanho celular, concentração intracelular de pigmentos e atuação de pigmentos auxiliares, dependendo de seu estado fisiológico (SATHYENDRANATH; LAZZARA; PRIEUR, 1987). O detalhe da concentração de pigmentos ficou evidente durante a medição de A para o cálculo de a^* . A resolução do espectro de varredura, de 400 a 700 nm, era proporcional à quantidade de clorofila da cultura. Quanto mais clorofila, mais nítidos se tornavam os picos de A . Essa dificuldade de se obter uma definição clara da absorbância em suspensões de microrganismos vivos é um problema antigo, atribuído à dispersão da luz por fenômenos ópticos como a refração, reflexão e difusão (SHIBATA; BENSON; CALVIN, 1954). Uma vantagem constatada na varredura espectrofotométrica a partir de pigmentos diluídos em DMSO foi a visualização de uma curva mais bem definida, principalmente na delimitação dos picos de A . O processo destrutivo de extração, todavia, compromete a integridade celular, impossibilitando uma interpretação realista a respeito da absorção luminosa pelas microalgas. Dependendo do objetivo da pesquisa, esse dilema “precisão de aferição *versus* manutenção da integridade celular” deve ser levado em consideração quando se pretende escolher o método mais apropriado para a determinação de a^* .

Além das características intrínsecas da célula algal, aspectos da própria luz podem exercer efeitos pronunciados no coeficiente específico de absorção da clorofila. Greg Mitchell e Kiefer (1988) verificaram em *P. lutheri* e *D. tertiolecta* que a curva de a^* , medida ao longo de todo o espectro visível, apresenta uma queda de pico muito mais drástica na região do azul (435 nm) quando amostras crescem sob baixa irradiância, demonstrando a atuação tanto de E quanto de λ nos resultados observados. A mudança nítida de a^* em relação à taxa de suprimento de luz também foi avaliada por Zijffers et al (2010). Segundo os autores, em culturas de *D. tertiolecta* e *C. sorokiniana*, a^* aumenta em resposta à diminuição da luz até atingir um limite, a partir do qual o suprimento de luz se torna insuficiente para manter o valor máximo de a^* . Em determinadas microalgas, porém, a regulação de a^* pode não ser o mecanismo preferencial de reação fisiológica a alterações luminosas. Sabe-se, por exemplo, que o cultivo de *S. protuberans* em meio BG11, com diferentes ciclos de exposição à luz de 80 e 200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não

resulta em uma variação significativa de a^* ($0,006\text{--}0,007\text{ m}^2\text{ [mg C}_a\text{]}^{-1}$) (FLAMELING; KROMKAMP, 1997). Também foi verificado, nessa mesma espécie, que não há um padrão diurno de variação de a^* ao longo das horas (FLAMELING; KROMKAMP, 1998).

4.4.4 Produção primária bruta

A produção primária bruta das microalgas, estimada a partir de $a^*_{in\ vivo}$ ($P^B_{in\ vivo}$, figura 31), foi comparada com a calculada com base em a^*_{DMSO} (P^B_{DMSO} , figura 32). Os maiores valores de $P^B_{in\ vivo}$ foram registrados para *C. sorokiniana* ($22,02 \pm 0,84\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) e *D. spinosus* ($20,95 \pm 0,75\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$); no caso de P^B_{DMSO} , *C. sorokiniana* ($34,56 \pm 4,95\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) e *D. communis* ($33,93 \pm 7,23\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) se sobressaíram em comparação às demais espécies. Comparativamente, as microalgas com menor $P^B_{in\ vivo}$ foram *M. komarkovae* ($1,00 \pm 0,06\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$), *Dictyosphaerium* sp. ($1,16 \pm 0,19\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) e *K. lunaris* ($1,31 \pm 0,30\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$); em termos de P^B_{DMSO} , *M. komarkovae* ($2,90 \pm 0,14\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$), *K. lunaris* ($4,04 \pm 0,40\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) e *C. vulgaris* ($4,62 \pm 0,92\text{ mg C L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) tiveram menor desempenho.

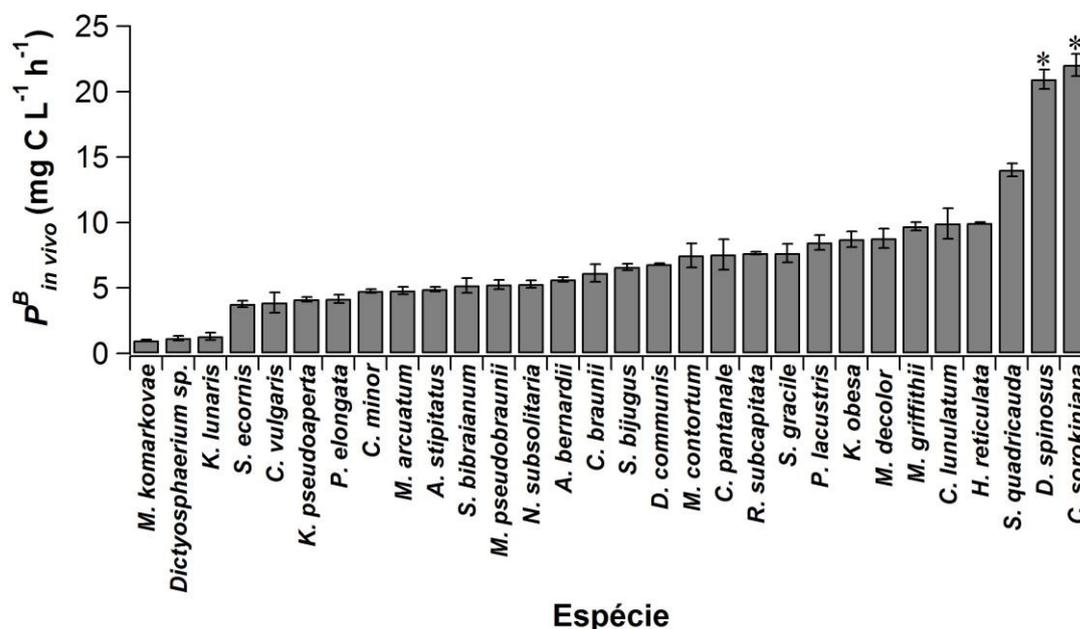


Figura 31. Produção primária bruta em amostras de cultura *in vivo* ($P^B_{in\ vivo}$) de 30 espécies de microalgas verdes. O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

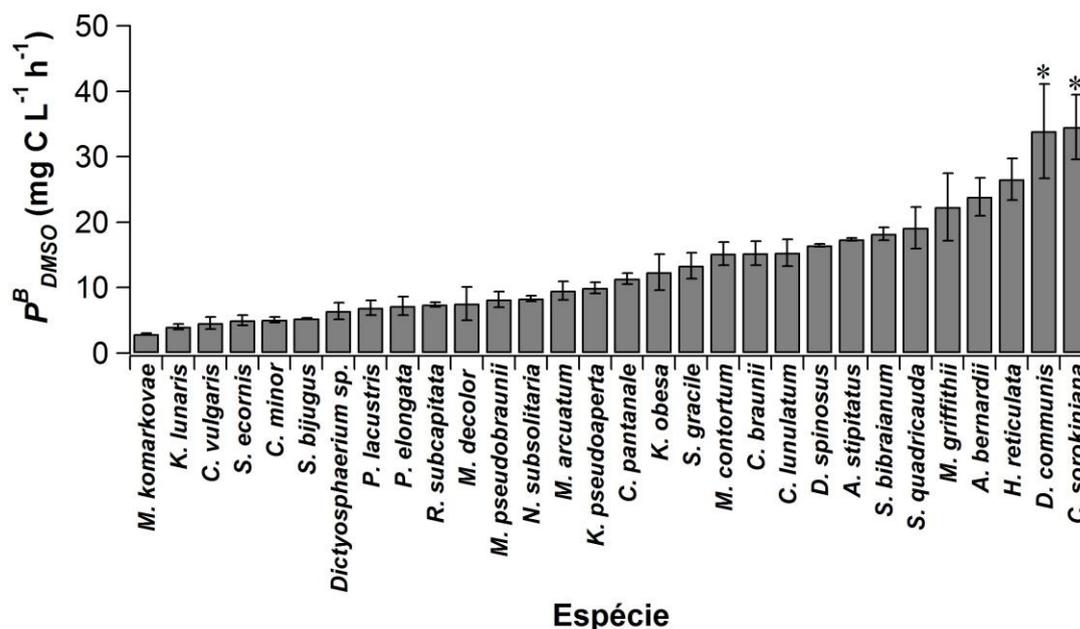


Figura 32. Produção primária bruta em 30 espécies de microalgas verdes, com amostras submetidas ao processo de extração de pigmentos à base de DMSO (P^B_{DMSO}). O asterisco (*) destaca os maiores resultados (ANOVA, $p < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n = 3$).

Em ambas as condições testadas, *C. sorokiniana* se sobressaiu na taxa de fixação de carbono. Esses resultados contribuem para realçar a relevância de espécies de *Chlorella* em pesquisas voltadas à biofixação de CO₂, conforme detalham Singh e Singh (2014). Sabe-se que *C. sorokiniana*, por ser termotolerante, é capaz de ter um desempenho fotossintético elevado quando cultivada até mesmo a 40 °C (MORITA; WATANABE; SAIKI, 2000). Outro exemplo de adaptabilidade foi demonstrado em *S. obliquus*, capaz de fixar o equivalente a 17,9 mg C L⁻¹ h⁻¹ quando cultivada em ambiente aberto, sob condições semicontroladas, a 32 °C, com 271 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (HO et al., 2017).

Além de *C. sorokiniana*, duas espécies de *Desmodesmus* se destacaram como potenciais fixadoras de carbono: *D. spinosus*, para $P^B_{in vivo}$, e *D. communis*, para P^B_{DMSO} . A produção de C_a *in vivo* por *D. spinosus*, no quarto e último dia de cultivo, o mesmo dia da medição de P^B , foi a maior de todas as espécies ($1,85 \pm 0,24$ mg L⁻¹), praticamente o dobro da C_a *in vivo* média encontrada nas amostras de *C. sorokiniana* ($0,97 \pm 0,08$). A razão $\Delta F/F'_m$ foi a mesma tanto para *D. spinosus* ($0,45 \pm 0,00$) quanto para *C. sorokiniana* ($0,45 \pm 0,02$). A incidência de luz nas culturas de ambas as espécies também não diferiu drasticamente (~ 254 e 249 μmol fótons m⁻² s⁻¹ para *D. spinosus* e *C. sorokiniana*,

respectivamente). A divergência marcante, que conferiu às duas microalgas valores próximos de P^B , ocorreu em relação ao coeficiente $a^*_{in vivo}$: $0,018 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$ para *D. spinosus* e $0,036 \text{ m}^2 [\text{mg } C_a]^{-1}$ para *C. sorokiniana*. Em outras palavras, *D. spinosus* possuía o dobro da concentração pigmento, porém *C. sorokiniana* conseguia absorver duas vezes mais luz. Este caso comparativo demonstra com clareza que, para ter uma elevada taxa de assimilação de carbono, uma microalga pode produzir muita clorofila ou otimizar a área de absorção de fótons por unidade do pigmento.

Os valores de P^B encontrados para a maior parte das espécies investigadas são superiores à produção máxima medida por Gentner (1983) para *Scenedesmus acutus* ($5,3 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Scenedesmus parisienses* ($3,6 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Scenedesmus bijugatus* ($3,5 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Scenedesmus basiliensis* ($3,4 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Ankistrodesmus braunii* ($2,3 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e *C. vulgaris* ($2 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Neste trabalho, *C. vulgaris* também não teve um bom desempenho em termos de produção primária, embora seus valores de $P^B_{in vivo}$ ($3,88 \pm 0,79 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e P^B_{DMSO} ($4,62 \pm 0,92 \text{ mg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tenham sido maiores do que a média reportada por Gentner. Isso mostra que *C. vulgaris*, uma espécie oportunista, robusta e altamente estudada na literatura (SAFI et al., 2014b), pode não ser necessariamente a melhor opção em termos de fixação de CO_2 . Percebe-se a presença expressiva de espécies de Scenedesmaceae no estudo de Gentner, o que é corroborado pelos bons resultados de P^B obtidos para *D. spinosus*, *D. communis*, *S. quadricauda* e *H. reticulata* nesta prospeção.

Em ambos os tipos de P^B , é perceptível o amplo intervalo de variação interespecífica da fotossíntese. Isso também é salientado no trabalho de Juneau e Harrison (2005): os autores verificaram que a atividade fotossintética de nove espécies de microalgas (*D. tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira oceanica*, *Thalassiosira weissflogii*, *Mantoniella squamata*, *Emiliunia huxleyi*, *Pavlova lutheri* e *Heterosigma akashiwo*) pode diferir significativamente quando são cultivadas sob condições idênticas. Sydney et al. (2010), por sua vez, obtiveram taxas de fixação de CO_2 relativamente próximas para *C. vulgaris* ($10,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *D. tertiolecta* ($11,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), *Spirulina platensis* ($13,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e *B. braunii* ($20,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) após cultivar cada espécie em um meio de cultura diferente. O objetivo dos autores era investigar o metabolismo de carbono em cada uma dessas espécies. Para experimentos comparativos, é, no entanto, aconselhável a padronização das condições de cultivo, como meio de cultura, biorreator utilizado, agitação, temperatura e tipo de iluminação, de modo a permitir uma identificação clara do comportamento fisiológico inerente a cada espécie.

Neste estudo, a variável P^B foi a principal estimativa obtida a partir da fluorometria PAM. Trata-se de um cálculo aproximado, pois considera, por meio do coeficiente Φ_e , que quatro elétrons seriam necessários para a incorporação de uma molécula de carbono (KROMKAMP; FORSTER, 2003; MORRIS; KROMKAMP, 2003). A base para tal fundamento é que quatro fótons devem incidir sobre o PSII para oxidar duas moléculas de H₂O (HUOT; BABIN, 2010). Alguns autores consideram cinco elétrons por carbono fixado, passando Φ_e a valer 0,2 $\mu\text{mol C} [\mu\text{mol elétrons}]^{-1}$ (MORRIS et al., 2008); outros assumem *a priori* um Φ_e de 0,1 $\mu\text{mol C} [\mu\text{mol elétrons}]^{-1}$ com base no número de fótons (dez) absorvidos para a separação de carga nas reações de óxido-redução tanto do PSII, quanto do PSI (KROMKAMP et al., 2008). Sabe-se, porém, que esse valor, na prática, muda consideravelmente entre espécies coletadas em diferentes ambientes naturais, podendo variar de 0,02 a 0,87 $\mu\text{mol C} [\mu\text{mol elétrons}]^{-1}$ (LAWRENZ et al., 2013).

A explicação para tamanha discrepância entre teoria e realidade encontra-se não apenas nas particularidades morfológicas de cada espécie ou em sua reação fisiológica aos estímulos ambientais, mas também na existência de processos metabólicos capazes de desviar elétrons da cadeia transportadora que supre a fixação do carbono. Exemplos de vias alternativas de elétrons são: a fotorrespiração; a clororespiração; o fluxo cíclico de elétrons ao redor tanto do PSII quanto do PSI; o processo de redução direta do O₂ pelo PSI, com consequente produção de ânion superóxido (O₂^{•-}), conhecido como “reação de Mehler” e, a partir dele, a ativação do chamado “ciclo água-água” (*water-water cycle*), quando elétrons extraídos da água no PSII fluem para a água produzida pela enzima ascorbato peroxidase, ativada em resposta à presença das espécies reativas de oxigênio (CARDOL; FORTI; FINAZZI, 2011; NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012; CURIEN et al., 2016; LYSENKO; GUO; CHUGUEVA, 2017). O acionamento de tais processos poderia, segundo Lawrenz et al. (2013), resultar em valores de Φ_e menores do que 0,2 $\mu\text{mol C} [\mu\text{mol e}^-]^{-1}$.

A possibilidade de desvio de elétrons para vias alternativas foi minimizada pelas condições controladas adotadas durante o experimento, particularmente no que tange à intensidade luminosa. Uma divergência entre ETR e P^B seria esperada, caso as culturas tivessem sido expostas à alta irradiância, acima da E_k (SUGGETT; MOORE; GEIDER, 2010; WARNER; LESSER; RALPH, 2010; NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012). Nessa condição de luz excessiva, a ETR tende a superestimar a produção primária bruta (FRANKLIN; BADGER, 2001; KROMKAMP et al., 2008). De acordo com Perkins et al. (2010), esse padrão independe do nível taxonômico e pode ser observado em

microalgas, macroalgas e cianobactérias. Sob baixo E , tanto a eficiência de assimilação bruta do carbono quanto a produção de oxigênio relacionam-se de forma linear com a ETR (GEEL; VERSLUIS; SNEL, 1997; BEER et al., 1998; HANCKE et al., 2015). É recomendável, portanto, a definição prévia e consistente da E a ser usada em pesquisas algais que envolvam o cálculo de P^B a partir de medições da fluorescência da clorofila, a exemplo do que foi feito neste trabalho.

Futuras pesquisas engajadas na mitigação de carbono e interessadas em obter compostos de relevância comercial devem, também, investigar, por meio de análises bioquímicas, como determinada espécie de microalga investe a energia incorporada pelo processo da fotossíntese. Sabe-se, por exemplo, que o fornecimento extra de CO_2 aumenta o acúmulo de lipídios totais e ácidos graxos poliinsaturados em *Chlorella pyrenoidosa* e *S. obliquus* (TANG et al., 2011). Yadav et al. (2015), por sua vez, verificaram uma redução no percentual de lipídios e um aumento de proteínas e carboidratos em *Chlorella* sp. com 5-10% CO_2 . Anjos et al. (2013), em contrapartida, não observaram alterações significativas na composição bioquímica de *C. vulgaris* cultivada com 2, 6 e 10% de CO_2 , embora a taxa de fixação do carbono tenha sido otimizada.

Uma vez empregado o presente método de estimativa da produção primária bruta, é fundamental definir sob qual condição amostral P^B deve ser calculada. Em decorrência do coeficiente a^* mais elevado para amostras de extrato (figura 30), valores de P^B_{DMSO} foram, em quase todos os casos, maiores do que $P^B_{in vivo}$. Embora a absorvância das amostras seja detectada com maior precisão no extrato, as moléculas de clorofila, nessa condição, não estão mais associadas ao aparato celular, porém diluídas no solvente. Além disso, foi observado um desvio padrão maior nas estimativas mais elevadas de P^B_{DMSO} , o que faz sentido, pois a realização de um processo metodológico adicional, como o rompimento de células para extração dos pigmentos, pode favorecer a introdução de erros na determinação de a^* e aumentar, conseqüentemente, a imprecisão dos resultados.

Também é importante mencionar nessa discussão outros problemas de ordem prática envolvendo P^B_{DMSO} . Eles incluem: o inconveniente de adicionar à determinação de P^B a etapa laboriosa da filtração, o risco à saúde humana com o uso do DMSO, comprovadamente tóxico (BRAYTON, 1986; GALVAO et al., 2014), e os custos de todo o material exigido para tal prática (ex.: seringa, suporte de filtração, membrana com porosidade apropriada para reter a biomassa algal e preço do solvente). É preferível, portanto, que a aferição da produção primária seja feita, sempre que possível, na condição

in vivo, embora haja, neste caso, a necessidade de uma cultura mais densa para a detecção, em alta resolução, dos picos de absorbância necessários para o cálculo de a^* .

4.5 Correlação entre variáveis

A matriz exibida na tabela 2 reúne os valores do coeficiente r para as principais variáveis investigadas nesta pesquisa. Foram realçados os resultados com r maior do que 0,7, que evidenciam a existência de uma correlação forte entre as variáveis comparadas (AKOGLU, 2018). Todos os destaques apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

As três taxas de crescimento (μ_{684} , μ_{750} e μ_{Ca}) estão, evidentemente, correlacionadas, uma vez que elas representam formas alternativas de medir o crescimento das mesmas culturas, a partir de amostras retiradas no mesmo período. Um detalhe matemático justifica a correlação praticamente perfeita entre a concentração de clorofila a e carotenoides totais: de acordo com as equações de Wellburn (1994), C_a é utilizada no cálculo de CT . Há, portanto, uma dependência do valor de clorofila a para se calcular a quantidade de carotenoides na amostra. Algo similar é observado na forte correlação entre $rETR_{max}$ e E_k , pois a primeira faz parte do cálculo da segunda (PLATT; GALLEGOS; HARRISON, 1980). Mencionada na literatura (MAXWELL; JOHNSON, 2000), a relação entre $\Delta F/F'_m$ e qP se confirma nos dados desta pesquisa. Em termos numéricos, a única diferença entre o rendimento quântico efetivo do PSII e o coeficiente de decaimento fotoquímico é que o último considera em seu cálculo a fluorescência mínima em adaptação à luz, F'_o (OXBOROUGH; BAKER, 1997). É esperado, portanto, que haja certa similaridade entre esses dois parâmetros fotoquímicos. A correlação entre as produtividades de carboidratos e proteínas pode, por sua vez, ser atribuída ao fato de ambas terem sido calculadas a partir dos mesmos dados de taxa específica de crescimento.

Tabela 2. Matriz de correlação para as principais variáveis analisadas neste estudo: taxa específica de crescimento, com base em absorvância, a 684 nm (μ_{684}) e 750 nm (μ_{750}), e em concentração de clorofila *a in vivo* (μ_{Ca}); densidade celular (*DC*); concentração de clorofila *a* (C_a) e carotenoides totais (*CT*); produtividade específica de proteínas totais (*ProtT*) e carboidratos totais (*CarbT*); rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e efetivo ($\Delta F/F'_m$) do fotossistema II; decaimento fotoquímico (*qP*) e não-fotoquímico (*NPQ*) da fluorescência; inclinação inicial da RLC (α); taxa relativa máxima de transporte de elétrons ($rETR_{max}$); irradiância saturante (E_k); produção primária bruta em amostras *in vivo* ($P^B_{in vivo}$) e em amostras de extrato à base de DMSO (P^B_{DMSO}). Coeficientes de Pearson maiores do que 0,7 foram destacados em negrito ($p < 0,05$).

	μ_{684}	μ_{750}	μ_{Ca}	<i>DC</i>	C_a	<i>CT</i>	<i>ProtT</i>	<i>CarbT</i>	F_v/F_m	$\Delta F/F'_m$	<i>qP</i>	<i>NPQ</i>	α	$rETR_{max}$	E_k	$P^B_{in vivo}$	P^B_{DMSO}
μ_{684}	1																
μ_{750}	0,964	1															
μ_{Ca}	0,863	0,781	1														
<i>DC</i>	0,427	0,376	0,597	1													
C_a	0,373	0,236	0,353	-0,093	1												
<i>CT</i>	0,275	0,152	0,279	-0,106	0,967	1											
<i>ProtT</i>	0,571	0,497	0,504	0,042	0,673	0,582	1										
<i>CarbT</i>	0,801	0,747	0,663	0,177	0,601	0,502	0,856	1									
F_v/F_m	0,324	0,3	0,208	-0,164	0,298	0,236	0,219	0,384	1								
$\Delta F/F'_m$	0,108	0,094	-0,026	-0,256	0,148	0,101	0,119	0,169	0,52	1							
<i>qP</i>	0,038	0,071	-0,11	-0,231	-0,111	-0,167	-0,081	0,008	0,179	0,799	1						
<i>NPQ</i>	0,063	0,138	-0,008	0,05	-0,289	-0,312	-0,237	-0,067	-0,074	-0,552	-0,1	1					
α	0,107	0,114	-0,02	-0,404	0,267	0,248	0,134	0,208	0,52	0,403	0,287	-0,052	1				
$rETR_{max}$	0,33	0,314	0,235	-0,037	0,168	0,15	0,253	0,265	0,121	0,494	0,463	-0,29	-0,091	1			
E_k	0,212	0,192	0,2	0,168	0,035	0,03	0,154	0,119	-0,134	0,204	0,221	-0,22	-0,551	0,87	1		
$P^B_{in vivo}$	0,594	0,469	0,564	0,257	0,681	0,605	0,631	0,724	0,316	0,293	-0,029	-0,434	0,168	0,308	0,163	1	
P^B_{DMSO}	0,312	0,242	0,306	-0,14	0,712	0,743	0,504	0,398	0,238	0,34	0,025	-0,517	0,263	0,391	0,194	0,577	1

No caso da relação entre carboidratos totais e as taxas μ_{684} e μ_{750} , além dessa questão matemática, é possível considerar a existência de uma conexão entre a taxa de crescimento das culturas e um incremento natural de carboidratos na cultura. Consta na literatura que, em Chlorophyta, os carboidratos tem participação fundamental não apenas no acúmulo de uma reserva energética, mas na constituição da parede celular das algas verdes, principalmente na forma de celulose e hemicelulose (MOROCHO-JÁCOME et al., 2017). O engrossamento substancial da parede celular polissacarídica faz parte do processo de divisão celular. Isso é bem detalhado, por exemplo, em células de *Chlorella* (BAUDELET et al., 2017). Essa correlação positiva entre crescimento e produção de carboidratos, contudo, deixaria de existir em condições ambientais adversas, uma vez que o comprometimento do crescimento é uma dificuldade conhecida em estudos que tentam otimizar a produção de carboidratos por meio da exposição controlada de microalgas a estresse (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012).

As correlações envolvendo os dois tipos de produção primária bruta investigados são de particular interesse a esta pesquisa. Pela análise, percebe-se que $P^B_{in vivo}$ correlaciona-se fortemente com carboidratos totais. Trata-se de uma constatação coerente do ponto de vista bioquímico, uma vez que carboidratos são o tipo principal de biomolécula produzido a partir da atividade fotossintética e do metabolismo de fixação de carbono (TAIZ; ZEIGER, 2002). Esse resultado traz uma perspectiva promissora para pesquisas envolvendo biofixação de CO₂ em microalgas verdes, pois evidencia a tendência que esses organismos têm de investir o carbono fixado na síntese de açúcares, cuja composição pode ser útil a diversas aplicações industriais (CHEN et al., 2013; SHAHID et al., 2020).

No caso de P^B_{DMSO} , a forte correlação com C_a e CT pode ser atribuída à medição dessas três variáveis a partir do mesmo tipo de amostra, ou seja, o extrato à base de DMSO. Além disso, P^B_{DMSO} é calculada a partir de C_a , que também está presente na equação de CT , como explicado anteriormente. Logo, P^B_{DMSO} também se associou, indiretamente, à concentração de carotenoides totais. Em termos fisiológicos, a correlação entre P^B e C_a faria sentido, por ser a clorofila *a* o pigmento mais comum em células fotossintéticas (GOLTERMAN, 1975). O mesmo não necessariamente se aplicaria a CT , uma vez que síntese de carotenoides é induzida não apenas pelo processo fotossintético em si, mas por fatores externos, causadores de estresse (EGELAND, 2016).

A constatação mais relevante para uma das hipóteses desta pesquisa foi a correlação moderada, ou seja, com valor de r no intervalo de 0,4 a 0,69 (SCHOBER; BOER;

SCHWARTE, 2018), entre $P^B_{in vivo}$ e os três tipos de taxa específica de crescimento. Se considerarmos P^B_{DMSO} , a relação com crescimento passa a ser baixa ($r < 0,4$). Isso reforça o problema discutido nas seções 4.4.3 e 4.4.4 de que a extração de pigmentos altera o estado das amostras, comprometendo a interpretação fisiológica dos dados experimentais. Explica-se menos quanto maior a interferência na integridade de uma cultura. Logo, é preferível o uso de amostras intactas, ou submetidas ao mínimo possível de modificação, em estudos que envolvam leituras de fluorescência da clorofila.

Embora a correlação moderada de $P^B_{in vivo}$ e μ corrobore a teoria de que existe uma associação direta entre o crescimento de microalgas e a taxa da fotossíntese (PANAHI et al., 2019), ela não permite uma inferência precisa da fixação de CO_2 a partir, unicamente, do valor de μ . A dificuldade em concretizar tal feito se deve não apenas à complexidade físico-química da fotossíntese (ZHAO; SU, 2014), mas à quantidade de fatores, intrínsecos ou extrínsecos, que influenciam o crescimento algal, problema este que limita a formulação de modelos matemáticos capazes de descrevê-lo com fidelidade (LEE; JALALIZADEH; ZHANG, 2015). Segundo Masojídek, Torzillo e Koblížek (2004), em uma situação ideal, a taxa máxima de crescimento de uma cultura algal deveria ser, em teoria, igual à taxa máxima da fotossíntese. Embora ambas estejam fisiologicamente vinculadas, essa expectativa teórica não é correspondida na prática. Um exemplo disso é a desproporcionalidade de resposta da taxa específica máxima de crescimento em relação à porcentagem de fixação diária de CO_2 em *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *S. obliquus* e *Spirulina* sp. (DE MORAIS; COSTA, 2007). Dependendo do fotobiorreator em que foram cultivadas e da quantidade de CO_2 presente no ar borbulhado nas culturas, essas microalgas podem diminuir seu crescimento e aumentar a incorporação do carbono. Espécies e condições de cultivo diversas comparadas por Bhola et al. (2014) também evidenciam aumentos ou reduções desiguais em termos de μ e fixação de CO_2 .

É válido mencionar nesta discussão que o tipo de produção calculada pode ou não variar de acordo com μ . Segundo Halsey, Milligan e Behrenfeld (2010), na microalga verde *D. tertiolecta*, a taxa de fixação de C^{14} específica da clorofila (identificada pelos autores como P^*_{Clg}) aumenta de maneira proporcional a μ em condição de limitação de nitrato. Esse mesmo comportamento, porém, não foi observado em relação à produção primária líquida, tanto em *D. tertiolecta* quanto em *Thalassiosira weissflogii* (HALSEY; MILLIGAN; BEHRENFELD, 2010; HALSEY et al., 2013). Na cianobactéria *Synechococcus* sp., por sua vez, uma correlação linear entre produção primária líquida e μ foi encontrada, também mediante escassez de nitrato (DITTRICH, 2013). A partir dos

resultados mencionados de P^*_{Clg} , Halsey, Milligan e Behrenfeld (2010) inferiram que o metabolismo do fotossintato, ou seja, dos produtos gerados pela fotossíntese, difere entre taxas de crescimento altas e baixas.

De Moraes e Costa (2007) argumentam que o crescimento de microrganismos fotossintéticos é diretamente relacionado à taxa de fixação de CO_2 e à intensidade de iluminação. A princípio, foi cogitada a possibilidade da correlação moderada entre P^B e μ ter sido influenciada pela adoção de diferentes valores de E , próprios para cada espécie, a partir da definição preliminar da E_k . A alternativa metodológica, em contrapartida, não solucionaria essa questão, pois a padronização da irradiância para todo o experimento incorreria, inevitavelmente, em uma falha séria: não há uma única intensidade luminosa que seja ótima a todas as microalgas. A escolha de um único valor para E no experimento principal subestimaria a fotossíntese nas espécies que poderiam fixar mais carbono, se tivessem mais luz, e estressaria aquelas que requerem uma iluminação mais baixa, podendo, inclusive, levar à fotoinibição.

Além da relação de P^B com crescimento e variáveis bioquímicas, a matriz também revelou como a produção primária bruta se comporta em comparação às variáveis fotoquímicas nas 30 espécies cultivadas. Ambos os tipos de P^B possuem uma correlação fraca com F_v/F_m , $\Delta F/F'_m$, qP , α , $rETR_{max}$ e E_k . Percebe-se, assim, que nenhum desses parâmetros fluorométricos reflete, por si só, a variação observada na fixação de carbono. Isso é justificado não apenas pela conhecida complexidade metabólica da fotossíntese em microalgas (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2004), mas pelo motivo prático de P^B carregar consigo a variabilidade de diversos fatores, incluindo a concentração de clorofila e o quanto de luz ela consegue absorver (a^*). Um exemplo nítido que ilustra essa baixa associação é a microalga *C. vulgaris*, que apresentou, neste estudo, a maior razão F_v/F_m ($\sim 0,75$) dentre as espécies cultivadas e uma das menores médias de $P^B_{in vivo}$ ($\sim 3,88$ mg C L⁻¹ d⁻¹). Isso não apenas salienta a ressalva feita por Baker (2008) a respeito do uso de F_v/F_m como um valor quantitativo preciso do rendimento quântico da fotoquímica do PSII, mas demonstra o quão pouco tal rendimento pode estar necessariamente associado à quantidade de CO_2 fixada pela fotossíntese. O comportamento da produção primária, nas condições experimentais atuais, também não pode ser vinculado a aspectos como a proporção de centros de reação disponíveis do PSII (qP), a eficiência de captura da luz (α) e o valor da irradiância saturante (E_k). Uma constatação coerente do ponto de vista fisiológico, no entanto, foi a correlação negativa moderada entre P^B e o coeficiente NPQ . É esperado que espécies com menor necessidade de dissipar calor tendam a ter mais

energia disponível para investir na assimilação de carbono. Essa lógica, contudo, não se aplica a todos os casos, pois há espécies com baixo NPQ e valores intermediários de $P^B_{in vivo}$ (ex.: *M. arcuatum*, *A. bernardii* e *N. subsolitaria*).

4.6 Análise de Componentes Principais

O gráfico *biplot* gerado pela PCA (figura 33) proporcionou uma visão da correlação entre determinadas variáveis avaliadas neste estudo sob a perspectiva bidimensional de dois componentes principais. Os componentes 1 e 2 explicam, juntos, cerca de 58% da variação total observada: 34,88% atribuídos ao primeiro componente (com um autovalor de 2,79) e 22,91% ao segundo (com autovalor de 1,83). Reportados na tabela 3, os coeficientes r indicaram, de modo geral, que $P^B_{in vivo}$ é a variável-chave por trás do componente 1; a densidade celular explica, por sua vez, a maior parte da variação observada no componente 2 ($p < 0,05$).

Percebe-se na representação gráfica da PCA que *M. decolor* foi a espécie nitidamente direcionada à densidade celular, como evidenciam os dados discutidos na seção 4.2. *C. sorokiniana* e *D. spinosus* são as mais propensas a investir em fixação de carbono. A proximidade de $P^B_{in vivo}$ com $\mu 684$ reforça a existência de uma correlação entre a produção primária bruta e a variação encontrada na taxa específica de crescimento. Não se trata, porém, de uma correlação forte, como observado na tabela 2. A partir da PCA, é possível inferir o potencial de *C. lunulatum* para fixar carbono e acumular pigmentos carotenoides, o que é amplamente vantajoso do ponto de vista biotecnológico. *S. quadricauda*, *H. reticulata* e *D. communis* se confirmam como espécies capazes de atingir uma elevada $rETR_{max}$. A análise sugere que *C. vulgaris*, *S. bijugus*, *A. bernardii* e *M. contortum* apresentam uma tendência em investir na eficiência de captura da luz, embora, de acordo com os resultados obtidos (figura 26), apenas *M. contortum* tenha, de fato, apresentado um valor de α estatisticamente elevado ($p < 0,05$).

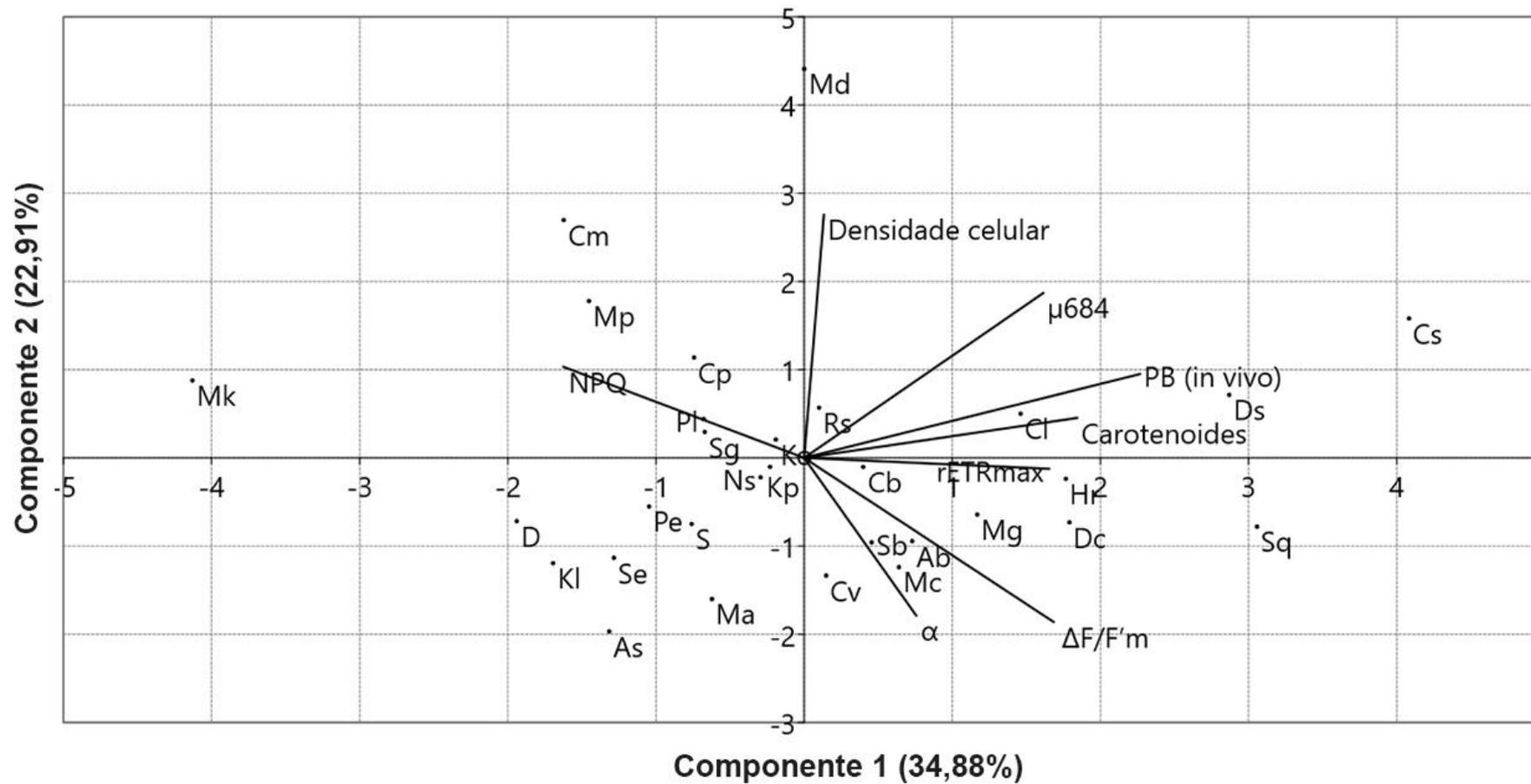


Figura 33. Gráfico *biplot* da PCA para diferentes variáveis em 30 espécies de microalgas verdes. As abreviações dos nomes das espécies estão de acordo com a tabela 1.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas na PCA e os componentes principais 1 e 2.

Componente 1		Componente 2	
Variável	Valor de r	Variável	Valor de r
$P^B_{in vivo}$	0,85	Densidade celular	0,84
Carotenoides	0,69	μ_{684}	0,57
$\Delta F/F'_m$	0,63	NPQ	0,31
$rETR_{max}$	0,62	$P^B_{in vivo}$	0,29
μ_{684}	0,60	Carotenoides	0,14
α	0,28	$rETR_{max}$	-0,04
Densidade celular	0,05	α	-0,54
NPQ	-0,61	$\Delta F/F'_m$	-0,56

Nota-se que NPQ é a única variável negativamente correlacionada às demais na dimensão do componente 1. A clara oposição entre NPQ e $\Delta F/F'_m$ condiz com a interpretação do destino da energia fótica, que pode ser dissipada em processos regulatórios de proteção à fotossíntese, ao invés de seguir para a via fotoquímica (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989; MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). Espécies com maior propensão a apresentar alto NPQ (ex.: *M. komarkovae*, *M. pseudobraunii*, *C. minor* e *C. pantanale*) tenderão, portanto, a ter uma menor eficiência quântica do PSII. No caso de *C. pantanale*, é possível estabelecer uma conexão entre essa tendência de dissipar energia via processos relacionados à liberação de calor, a produção significativa de carotenoides e a menor amplitude da RLC. Trata-se, portanto, de uma espécie que reage facilmente a alterações na intensidade de luz, acionando mecanismos que atuam particularmente na fotoproteção.

5. CONCLUSÕES

A prospeção realizada neste trabalho evidenciou espécies distintas de microalgas verdes com destaque em diferentes aspectos fisiológicos. O elevado desempenho de *C. sorokiniana* em praticamente todos os pontos analisados corrobora sua proeminência em pesquisas na área da ficologia. *M. decolor* se destacou por sua taxa de crescimento e densidade celular. O acúmulo de carotenoides totais foi significativo em *M. griffithii*, *C. braunii* e *C. pantanale*. As espécies *H. reticulata* e *C. lunulatum* são novas candidatas a estudos que visam a produção de proteínas. Em termos de produtividade específica de carboidratos, além de *C. sorokiniana*, são promissoras as microalgas *C. lunulatum*, *C. pantanale*, *H. reticulata*, *S. quadricauda* e *D. spinosus*.

Mesmo sob condições controladas, cada espécie responde de uma forma quanto à constância do rendimento quântico máximo do PSII durante o monitoramento do estado fisiológico algal. No experimento atual, os valores mais altos desse rendimento (~ 0,73–0,75) foram registrados ao final do cultivo de *C. vulgaris*, *S. bijugus*, *C. pantanale*, *S. bibrainum* e *K. lunaris*. *C. vulgaris* apresentou os maiores resultados de rendimento quântico efetivo e decaimento fotoquímico, mas não se destacou em produtividade primária. Esse caso ilustra com clareza que a fixação bruta de carbono nem sempre resulta da alta eficiência do PSII e elevada proporção de centros de reação disponíveis.

Pelos dados de decaimento não-fotoquímico, observou-se que *M. pseudobraunii* e *M. komarkovae* foram as espécies que mais dissipam energia na forma de calor. O comportamento da Curva Rápida de Luz realçou as microalgas bem adaptadas à alta intensidade luminosa (*H. reticulata*, *S. quadricauda* e *D. communis*) e as que atingem a saturação fotoquímica com menos luz (*A. stipitatus*, *M. komarkovae* e *C. pantanale*). As espécies mais relevantes em termos de produção primária bruta *in vivo* foram *C. sorokiniana* e *D. spinosus*; as que se sobressaíram na produção primária a partir do extrato de pigmentos foram *C. sorokiniana* e *D. communis*.

No que tange as hipóteses inicialmente levantadas, essa pesquisa comprova que existe uma correlação entre taxa específica de crescimento e produção primária bruta. Essa correlação, entretanto, é moderada e não permite a inferência acurada da biofixação de CO₂ com base apenas em dados de crescimento. Ademais, detectou-se que a produção primária bruta *in vivo* está fortemente correlacionada à produtividade específica de carboidratos. Quando calculada com base em amostras de extrato à base de DMSO, a

produção passou a ter forte correlação com a concentração de clorofila *a* e carotenoides totais.

Foi constatada uma diferença substancial quanto à absorção de luz pela clorofila *a* em amostras intactas de cultura e em amostras submetidas ao processo de extração com DMSO, disparidade esta que se refletiu, como consequência, nos resultados de produção primária. Isso confirma outra hipótese deste estudo. Embora aumente a resolução dos picos de absorbância na determinação do coeficiente específico de absorção da clorofila *a*, o processo de extração compromete a precisão dos dados e impossibilita uma interpretação realista acerca da fisiologia algal. Por esse motivo, a condição *in vivo* foi considerada, neste trabalho, a forma mais apropriada de expressar a taxa fotossintética. Outra recomendação importante é a medição prévia da irradiância saturante como referência no estabelecimento da intensidade luminosa mais apropriada para cada espécie, principalmente em pesquisas voltadas à determinação da produção primária a partir da taxa de transporte de elétrons.

Os resultados encontrados, de modo geral, ressaltam o valor da prospecção, do estudo fisiológico e da atividade fotossintética, tanto em ecologia quanto em biotecnologia. Espera-se que esta investigação possa contribuir para aumentar o número de espécies de Chlorophyta em projetos voltados ao cultivo algal em escala industrial, criando, assim, novas oportunidades comerciais e reforçando o combate às mudanças climáticas globais por meio da mitigação do carbono atmosférico.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, W. W.; DEMMIG-ADAMS, B. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis**. Advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2004. v. 19, p. 583–604.

AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91–93, 2018.

AL KETIFE, A. M. D.; JUDD, S.; ZNAD, H. A mathematical model for carbon fixation and nutrient removal by an algal photobioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 153, p. 354–362, 2016.

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. USA: Elsevier Academic Press, 2005.

ANJOS, M. et al. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 149–154, 2013.

ANUSUYA DEVI, M.; VENKATARAMAN, L. V. The effect of algal protein diets on the regeneration of serum and liver proteins in protein depleted rats. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 287–297, 1983.

AZAMAN, S. N. A. et al. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. **PeerJ**, v. 5, p. e3473, 2017.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 89–113, 2008.

BARACHO, D. H.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. **Journal of Phycology**, v. 55, n. 6, p. 1335-1347, 2019.

BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 5, p. 447–460, 2005.

BARRANGUET, C.; KROMKAMP, J. Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. **Marine Ecology Progress Series**, v. 204, p. 39–52, 2000.

BARRETO, D. M.; LOMBARDI, A. T. Environmentally relevant concentrations of TiO₂ nanoparticles affected cell viability and photosynthetic yield in the chlorophyceae *Scenedesmus bijugus*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 12, p. 450, 2016.

- BASHAN, Y. et al. *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 113–121, 2016.
- BAUDELET, P.-H. et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, v. 25, p. 333–371, 2017.
- BEER, S. et al. Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. **Marine Ecology Progress Series**, v. 174, p. 293–300, 1998.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecology: from individuals to ecosystems**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- BEHRENFELD, M. J. et al. In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 1, p. 4–25, 2004.
- BELLARD, C. et al. Impacts of climate change on the future of biodiversity. **Ecology Letters**, v. 15, n. 4, p. 365–377, 2012.
- BHOLA, V. et al. Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 2103–2118, 2014.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, n. 4, p. 489–504, 1987.
- BLINOVÁ, L.; BARTOŠOVÁ, A.; GERULOVÁ, K. Cultivation of microalgae (*Chlorella vulgaris*) for biodiesel production. **Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology**, v. 23, n. 36, p. 87–95, 2015.
- BONOTTO, S. Food and chemicals from microalgae. **Progress in Oceanography**, v. 21, p. 207–215, 1988.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 1, p. 3–15, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61–90, 1986.
- BUSCHMANN, C. Photochemical and non-photochemical quenching coefficients of the chlorophyll fluorescence: comparison of variation and limits. **Photosynthetica**, v. 37, n. 2, p. 217–224, 1999.
- CAHOON, A. B.; TIMKO, M. P. Biochemistry and regulation of chlorophyll biosynthesis. In: **Photosynthesis in algae**. Dordrecht, The Netherlands: [s.n.]. v. 14, p.

95–131, 2003.

CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 312, 2019.

CAMARGO, E. C.; LOMBARDI, A. T. Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 861–871, 2018.

CAMPBELL, S. J. et al. Patterns in tropical seagrass photosynthesis in relation to light, depth and habitat. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 73, p. 551–562, 2007.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 20, 2020.

CARDOL, P.; FORTI, G.; FINAZZI, G. Regulation of electron transport in microalgae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 912–918, 2011.

CARVALHO, A. P. et al. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1275–1288, 2011.

CHEN, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

COLE, S.; MCCARTHY, L. **Long-term global warming trend sustained in 2013**. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/news/1029/>>. Acesso em: 2 abr. 2020.

COSGROVE, J.; BOROWITZKA, M. Applying Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry to microalgae suspensions: stirring potentially impacts fluorescence. **Photosynthesis Research**, v. 88, n. 3, p. 343–350, 2006.

COSGROVE, J.; BOROWITZKA, M. A. Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 1–17.

COSGROVE, J. J. **Marine phytoplankton primary production and ecophysiology using chlorophyll-*a* fluorescence**. Perth, WA: Murdoch University, 2007.

CUÉLLAR-FRANCA, R. M.; AZAPAGIC, A. Carbon capture, storage and utilisation technologies: A critical analysis and comparison of their life cycle environmental impacts. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 9, p. 82–102, 2015.

CURIEN, G. et al. The water to water cycles in microalgae. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 7, p. 1354–1363, 2016.

CZERWIK-MARCINKOWSKA, J. et al. Morphology, ultrastructure and ecology of *Muriella decolor* (Chlorophyta) from subaerial habitats in Poland and the Antarctic.

Polish Polar Research, v. 36, n. 2, p. 163–174, 2015.

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

DE ORTE, M. R. et al. Metal mobility and toxicity to microalgae associated with acidification of sediments: CO₂ and acid comparison. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 136–144, 2014.

DEL CAMPO, J. A. et al. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 51–59, 2000.

DEL RÍO, E. et al. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 103–107, 2015.

DIETZE, M. C. Gaps in knowledge and data driving uncertainty in models of photosynthesis. **Photosynthesis Research**, v. 119, n. 1–2, p. 3–14, 2014.

DITTRICH, J. E. **Cyclic electron flow : Powering unique motility and alternative nitrogen uptake in *Synechococcus* WH8102 during nitrogen limited growth.** Trabalho de conclusão de curso (Honors Bachelor of Science in BioResource Research) – Oregon State University. Corvallis, p. 23. 2013.

DIXON, C.; WILKEN, L. R. Green microalgae biomolecule separations and recovery. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 14, 2018.

ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A. T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 228–235, 2017.

EGELAND, E. S. Carotenoids. In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). **The physiology of microalgae.** Developments in applied phycology. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 507–563.

ENRÍQUEZ, S.; BOROWITZKA, M. A. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: SUGGETT, D. J.; BOROWITZKA, M.; PRÁŠIL, O. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications.** Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 187–208.

ESKLING, M.; ARVIDSSON, P.-O.; AKERLUND, H.-E. The xanthophyll cycle, its regulation and components. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 4, p. 806–816, 1997.

EXPÓSITO, N. et al. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 865–873, 2017.

FAI, P. B.; GRANT, A.; REID, B. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1520–1531, 2007.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. 2. ed. Princeton, New Jersey, USA: Princeton University Press, 2007.

FALKOWSKI, P.; KOLBER, Z. Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 341–355, 1995.

FERNANDES, S.; BICUDO, C. E. DE M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP: algas, 26: Chlorophyceae (famílias Chlorococcaceae e Coccomyxaceae). **Hoehnea**, v. 36, n. 1, p. 173–191, 2009.

FIGUEROA, F. L.; JEREZ, C. G.; KORBEE, N. Use of *in vivo* chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 5, p. 801–819, 2013.

FLAMELING, I. A.; KROMKAMP, J. Photoacclimation of *Scenedesmus protuberans* (Chlorophyceae) to fluctuating irradiances simulating vertical mixing. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 8, p. 1011–1024, 1997.

FLAMELING, I. A.; KROMKAMP, J. Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. **Limnology and Oceanography**, v. 43, n. 2, p. 284–297, 1998.

FRANKLIN, L. A.; BADGER, M. R. A comparison of photosynthetic electron transport rates in macroalgae measured by Pulse Amplitude Modulated chlorophyll fluorometry and mass spectrometry. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 5, p. 756–767, 2001.

FU, W. et al. Advances in microalgal research and engineering development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, p. 157–164, 2019.

GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317–1330, 2014.

GARCIA, T. DA S. et al. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum gen. nov.* and *Curvastrum gen. nov.* **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

GEEL, C.; VERSLUIS, W.; SNEL, J. F. H. Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow. **Photosynthesis Research**, v. 51, n. 1, p. 61–70, 1997.

GEIDER, R. J.; OSBORNE, B. A. Light absorption, photosynthesis and growth of *Nannochloris atomus* in nutrient-saturated cultures. **Marine Biology**, v. 93, n. 3, p. 351–360, 1986.

GEIDER, R. J.; OSBORNE, B. A. Light utilization and optical properties of algae. In: DRING, M. J.; MELKONIAN, M. (Eds.). **Algal photosynthesis: the measurement of algal gas exchange**. Current Phycology. Boston, MA, United States: Springer, 1992. p. 122–155.

- GENTNER, S. R. Measurement of primary productivity in dense algal cultures. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 40, n. 6, p. 807–810, 1983.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.
- GEST, H. History of the word photosynthesis and evolution of its definition. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 7–10, 2002.
- GILBERT, M. et al. Estimation of primary productivity by chlorophyll *a* *in vivo* fluorescence in freshwater phytoplankton. **Photosynthetica**, v. 38, n. 1, p. 111–126, 2000.
- GILBERT, M.; WILHELM, C.; RICHTER, M. Bio-optical modelling of oxygen evolution using *in vivo* fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P-I) curves in four representative phytoplankton species. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 3, p. 307–314, 2000.
- GOLTERMAN, H. L. Algae and their pigments. In: GOLTERMAN, H. L. (Ed.). **Physiological limnology: an approach to the physiology of lake ecosystems**. Developments in Water Science. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1975. v. 2, p. 233–247.
- GORGÔNIO, C. M. DA S.; ARANDA, D. A. G.; COURI, S. Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. **Natural Science**, v. 05, n. 07, p. 783–791, 2013.
- GOTO, N. et al. Relationships between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated (PAM) chlorophyll fluorescence and photosynthetic rates by traditional and common methods in natural freshwater phytoplankton. **Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie**, v. 172, n. 2, p. 121–134, 2008.
- GOVINDJE, E. Sixty-three years since kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 131–160, 1995.
- GREG MITCHELL, B.; KIEFER, D. A. Chlorophyll *a* specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 35, n. 5, p. 639–663, 1988.
- GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, 2009.
- GUCCIONE, A. et al. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 84, p. 1–12, 2014.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057–1063, 2012.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase. World-wide electronic publication.** Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 2 abr. 2020.

HALSEY, K. H. et al. A common partitioning strategy for photosynthetic products in evolutionarily distinct phytoplankton species. **New Phytologist**, v. 198, n. 4, p. 1030–1038, 2013.

HALSEY, K. H.; MILLIGAN, A. J.; BEHRENFELD, M. J. Physiological optimization underlies growth rate-independent chlorophyll-specific gross and net primary production. **Photosynthesis Research**, v. 103, n. 2, p. 125–137, 2010.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.

HANCKE, K. et al. Phytoplankton productivity in an Arctic fjord (West Greenland): Estimating electron requirements for carbon fixation and oxygen production. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133275, 2015.

HANEDA, R. N. et al. Biochemical composition of *Chlorella sorokiniana* grown in a novel design of hybrid photobioreactor. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, p. 76–82, 2015.

HARTIG, P. et al. Photosynthetic activity of natural microphytobenthos populations measured by fluorescence (PAM) and ¹⁴C-tracer methods: a comparison. **Marine Ecology Progress Series**, v. 166, p. 53–62, 1998.

HEGEWALD, E. et al. ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. **Phycologia**, v. 49, n. 4, p. 325–335, 2010.

HENLEY, W. J. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 6, p. 729–739, 1993.

HERLORY, O.; RICHARD, P.; BLANCHARD, G. F. Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. **Marine Biology**, v. 153, n. 1, p. 91–101, 2007.

HILL, R.; BENDALL, F. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. **Nature**, v. 186, n. 4719, p. 136–137, 1960.

HO, S.-H. et al. Feasibility of CO₂ mitigation and carbohydrate production by microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation under outdoor conditions: effects of seasonal changes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 27, 2017.

HOFSTRAAT, J. et al. Simple determination of photosynthetic efficiency and photoinhibition of *Dunaliella tertiolecta* by saturating pulse fluorescence measurements.

Marine Ecology Progress Series, v. 103, p. 187–196, 1994.

HOFSTRAAT, J. W.; RUBELOWSKY, K.; SLUTTER, S. Corrected fluorescence excitation and emission spectra of phytoplankton: toward a more uniform approach to fluorescence measurements. **Journal of Plankton Research**, v. 14, n. 5, p. 625–636, 1992.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 365–373, 2005.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 83–94.

HUANG, C.-H.; TAN, C.-S. A review: CO₂ utilization. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 14, p. 480–499, 2014.

HUOT, Y.; BABIN, M. Overview of fluorescence protocols: theory, basic concepts, and practice. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 31–74.

IHNKEN, S.; EGGERT, A.; BEARDALL, J. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. **Aquatic Botany**, v. 93, n. 3, p. 185–194, 2010.

JACOBSON, M. Z. Review of solutions to global warming, air pollution, and energy security. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 148–173, 2009.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191–194, 1975.

JEREZ, C. G. et al. Relation between light absorption measured by the quantitative filter technique and attenuation of *Chlorella fusca* cultures of different cell densities: application to estimate the absolute electron transport rate (ETR). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1635–1648, 2016a.

JEREZ, C. G. et al. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: Estimation of biomass productivity by *in-vivo* chlorophyll *a* fluorescence monitoring. **Algal Research**, v. 17, p. 21–30, 2016b.

JOHN, D. M.; TSARENKO, P. M. Order Chlorellales. In: JOHN, D. M.; WHITTON, B. A.; BROOK, A. J. (Eds.). **The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae**. 2. ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2002. p. 335.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

JUNEAU, P.; HARRISON, P. J. Comparison by PAM fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 3, p. 649–653, 2005.

KALAJI, H. M. et al. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis Research**, v. 122, n. 2, p. 121–158, 2014.

KAUTSKY, H.; HIRSCH, A. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. **Naturwissenschaften**, v. 19, n. 48, p. 964–964, 1931.

KENNEDY, J. **Green algae (Chlorophyta): Sea life and humans can use green algae for food**. Disponível em: <thoughtco.com/green-algae-chlorophyta-2291973>. Acesso em: 18 fev. 2020.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 36, 2018.

KIM, S. et al. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 8–13, 2013.

KIRK, J. T. O. The photosynthetic apparatus of aquatic plants. In: JOHN T. O. KIRK (Ed.). **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. 3. ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2010. p. 265–307.

KNUTTI, R.; ROGELJ, J. The legacy of our CO₂ emissions: a clash of scientific facts, politics and ethics. **Climatic Change**, v. 133, n. 3, p. 361–373, 2015.

KOLBER, Z.; FALKOWSKI, P. G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. **Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 8, p. 1646–1665, 1993.

KOTRBÁČEK, V.; DOUBEK, J.; DOUCHA, J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 6, p. 2173–2180, 2015.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313–349, 1991.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295–326, 2012.

KROMKAMP, J. C. et al. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 327–344, 2008.

KROMKAMP, J. C.; FORSTER, R. M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 103–112, 2003.

- KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Protein Protocols Handbook**. 3. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 17–24.
- KRZEMIŃSKA, I. et al. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 4, p. 735–741, 2014.
- LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456–469, 2012.
- LANEY, S. R. *In situ* measurement of variable fluorescence transients. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 19–30.
- LARKUM, A. W. Photosynthesis and light harvesting in algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. (Eds.). **The physiology of microalgae**. Developments in applied phycology. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2016. v. 6, p. 67–87.
- LARKUM, A. W. D. Light-harvesting systems in algae. In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. (Eds.). **Photosynthesis in algae**. Advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2003. v. 14, p. 277–304.
- LAUERSEN, K. J. et al. Phototrophic production of heterologous diterpenoids and a hydroxy-functionalized derivative from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Metabolic Engineering**, v. 49, p. 116–127, 2018.
- LAVAUD, J.; KROTH, P. G. In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 7, p. 1010–1016, 2006.
- LAWRENZ, E. et al. Predicting the electron requirement for carbon fixation in seas and oceans. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58137, 2013.
- LEBEL, R. G.; GORING, D. A. I. Density, viscosity, refractive index, and hygroscopicity of mixtures of water and dimethyl sulfoxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 7, n. 1, p. 100–101, 1962.
- LEE, E.; JALALIZADEH, M.; ZHANG, Q. Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. **Algal Research**, v. 12, p. 497–512, 2015.
- LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- LELIAERT, F. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.
- LI, T. et al. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Bioresource technology**, v. 131, p. 60–7, 2013.

- LIU, J.; HU, Q. *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Eds.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 2. ed. Oxford, UK: John Wiley & Sons, 2013. p. 327–338.
- LIZZUL, A. et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, p. 25, 2018.
- LIZZUL, A. M. et al. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 12–18, 2014.
- LOGAN, B. A.; ADAMS, W. W.; DEMMIG-ADAMS, B. Viewpoint: avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 9, p. 853–859, 2007.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, p. 77–87, 2011.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUANGPIPAT, T.; CHISTI, Y. Biomass and oil production by *Chlorella vulgaris* and four other microalgae — Effects of salinity and other factors. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 47–57, 2017.
- LYSENKO, V.; GUO, Y.; CHUGUEVA, O. Cyclic electron transport around photosystem II: mechanisms and methods of study. **American Journal of Plant Physiology**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2017.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAGNUSSON, G. Diurnal measurements of F_v/F_m used to improve productivity estimates in macroalgae. **Marine Biology**, v. 130, n. 2, p. 203–208, 1997.
- MALAPASCUA, J. et al. Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 123–140, 2014.
- MARISCAL, V.; HERRERO, A.; FLORES, E. Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1139–1145, 2007.
- MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 631–645, 2012.
- MARSHALL, H. L.; GEIDER, R. J.; FLYNN, K. J. A mechanistic model of photoinhibition. **New Phytologist**, v. 145, n. 2, p. 347–359, 2000.
- MARYSHAMYA, A.; RAJASEKAR, T.; RENGASAMY, R. Carbon sequestration potential of *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) and evaluation on Zebra fish (*Danio*

rerio). **Aquaculture Reports**, v. 13, p. 100178, 2019.

MASOJÍDEK, J. et al. Photoadaptation of two members of the Chlorophyta (*Scenedesmus* and *Chlorella*) in laboratory and outdoor cultures: changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. **Planta**, v. 209, n. 1, p. 126–135, 1999.

MASOJÍDEK, J. et al. The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): Its role in the photosynthetic apparatus. **Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 342–349, 2004.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 20–39.

MASOJÍDEK, J.; VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Chlorophyll fluorescence applications in microalgal mass cultures. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 277–292.

MATTOS, E. A. O estudo da fluorescência da clorofila e a detecção de estresses ambientais em plantas. In: PRADO, C. H. B. A.; CASALI, C. A. (Eds.). **Fisiologia vegetal: práticas em relações hídricas fotossíntese e nutrição mineral**. 1. ed. Barueri, SP, Brazil: Manole, 2006. p. 255–266.

MAUZERALL, D.; GREENBAUM, N. L. The absolute size of a photosynthetic unit. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 974, n. 2, p. 119–140, 1989.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MCKEW, B. A. et al. The trade-off between the light-harvesting and photoprotective functions of fucoxanthin-chlorophyll proteins dominates light acclimation in *Emiliana huxleyi* (clone CCMP 1516). **New Phytologist**, v. 200, n. 1, p. 74–85, 2013.

MELIS, A.; HAPPE, T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 740–748, 2001.

MILLIGAN, A. J.; HALSEY, K. H.; BEHRENFELD, M. J. Advancing interpretations of ¹⁴C-uptake measurements in the context of phytoplankton physiology and ecology: Fig. 1. **Journal of Plankton Research**, v. 37, n. 4, p. 692–698, 2015.

MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH, R. Chlorophyll fluorescence in plant biology. In: MISRA, A. N. (Ed.). **Biophysics**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 171–192.

MONDAL, P. et al. Oil from algae. In: MONDAL, P.; DALAI, A. K. (Eds.). **Sustainable Utilization of Natural Resources**. Boca Raton, United States: CRC Press, 2017. p. 213–253.

MONTOYA, J. M.; RAFFAELLI, D. Climate change, biotic interactions and ecosystem services. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, p. 2013–2018, 2010.

- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 203–218, 2000.
- MOROCHO-JÁCOME, A. L. et al. Carbohydrates in *Ankistrodesmus braunii* biomass cultivated in tubular photobioreactors. **Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 14, n. 2, p. 242–248, 2017.
- MORRIS, E. et al. Coupling between photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 50, p. 301–311, 2008.
- MORRIS, E. P.; KROMKAMP, J. C. Influence of temperature on the relationship between oxygen- and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*). **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 133–142, 2003.
- MULDERS, K. J. M. et al. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 229–242, 2014.
- MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 2001.
- MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013.
- NAPOLÉON, C.; CLAQUIN, P. Multi-parametric relationships between PAM measurements and carbon incorporation, an *in situ* approach. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40284, 2012.
- NASH, S. M. B.; QUAYLE, P. A. Biomaterial culture conditions impacting the performance of a PAM fluorometry based aquatic phytotoxicity assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 276–280, 2007.
- NICKLISCH, A.; KÖHLER, J. **Estimation of primary production with Phyto-PAM-fluorometry. Annual Report**. Berlin: Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 2001.
- NIYOGI, K. K. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 375–382, 2004.
- NUGENT, J. H. A.; PURTON, S.; EVANS, M. C. W. Oxygenic photosynthesis in algae and cyanobacteria: electron transfer in photosystems I and II. In: LARKUM, A. W. D.; DOUGLAS, S. E.; RAVEN, J. A. (Eds.). **Photosynthesis in algae**. Advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2003. v. 14, p. 133–156.
- OBATA, M.; TODA, T.; TAGUCHI, S. Using chlorophyll fluorescence to monitor yields of microalgal production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 3, p. 315–319, 2009.
- OROSA, M. et al. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3–5, p. 553–556, 2000.

- OXBOROUGH, K.; BAKER, N. R. Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_o' . **Photosynthesis Research**, v. 54, n. 1989, p. 135–142, 1997.
- PANAHI, Y. et al. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 182–194, 2019.
- PAPAGEORGIU, G. C.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: slow changes – Scaling from the past. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 1–2, p. 258–270, 2011.
- PARKHILL, J.-P.; MAILLET, G.; CULLEN, J. J. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 4, p. 517–529, 2001.
- PERKINS, R. G. et al. Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms. **Marine Biology**, v. 149, n. 4, p. 703–712, 2006.
- PERKINS, R. G. et al. The application of variable chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 237–275.
- PLATT, T.; GALLEGOS, C.; HARRISON, W. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 38, p. 687–701, 1980.
- RALPH, P. J. et al. Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. **Marine Biology**, v. 141, n. 4, p. 639–646, 2002.
- RALPH, P. J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82, p. 222–237, 2005.
- RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 1, p. 50–54, 2011.
- RATHA, S. K. et al. Bioprospecting and indexing the microalgal diversity of different ecological habitats of India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1657–1667, 2012.
- RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. **Hydrobiologia**, v. 78, n. 3, p. 237–251, 1981.
- RAVEN, J. A.; GIRARD-BASCOU, J. Algal model systems and the elucidation of photosynthetic metabolism. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 6, p. 943–950, 2001.
- RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de

Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

R CORE TEAM (2019). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22 jul. 2020.

REHAN, R.; NEHDI, M. Carbon dioxide emissions and climate change: policy implications for the cement industry. **Environmental Science & Policy**, v. 8, n. 2, p. 105–114, 2005.

REYNOLDS, C. S. **Ecology of phytoplankton**. New York: Cambridge University Press, 2006.

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

RITCHIE, H.; ROSER, M. **CO₂ and greenhouse gas emissions**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

RITCHIE, R. J. Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. **Photosynthesis Research**, v. 96, n. 3, p. 201–215, 2008.

RIZZA, L. S. et al. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140–147, 2017.

RMIKIL, N.-E. et al. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. **Hydrobiologia**, v. 326–327, n. 1, p. 407–413, 1996.

ROHÁČEK, K.; BARTÁK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. **Photosynthetica**, v. 37, n. 3, p. 339–363, 1999.

ROSENBERG, J. N. et al. Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92460, 2014.

ROSSI, R. A. et al. Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to real cement flue gas under controlled conditions. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 8, p. 259, 2018.

RUNCIE, J. W.; GURGEL, C. F. D.; MCDERMID, K. J. *In situ* photosynthetic rates of tropical marine macroalgae at their lower depth limit. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 377–388, 2008.

SAFI, C. et al. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61–65, 2014a.

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 2014b.

- SAKSHAUG, E. et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637–1670, 1997.
- SALEH, A. M. et al. The nutritional quality of drum-dried algae produced in open door mass culture. **Zeitschrift für Ernährungswissenschaft**, v. 24, n. 4, p. 256–263, 1985.
- SANTHAKUMARAN, P.; KOOKAL, S. K.; RAY, J. G. Biomass yield and biochemical profile of fourteen species of fast-growing green algae from eutrophic bloomed freshwaters of Kerala, South India. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 155–165, 2018.
- SAROUSI, S.; BEER, S. Alpha and quantum yield of aquatic plants derived from PAM fluorometry: Uses and misuses. **Aquatic Botany**, v. 86, n. 1, p. 89–92, 2007.
- SATHYENDRANATH, S.; LAZZARA, L.; PRIEUR, L. Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 32, n. 2, p. 403–415, 1987.
- SCHOBBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 5, p. 1763–1768, 2018.
- SCHREIBER, U. et al. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 209–220, 1995a.
- SCHREIBER, U. et al. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 5, p. 873–882, 1995b.
- SCHREIBER, U. et al. Assessment of photosynthetic performance of prochloron in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. **Plant Cell Physiology**, v. 38, n. 8, p. 945–951, 1997.
- SCHREIBER, U. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications. In: GARAB, G. (Ed.). **Photosynthesis: mechanisms and effects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. v. 5p. 4253–4258.
- SCHREIBER, U. et al. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: RAGHAVENDRA, A. (Ed.). **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 320–335.
- SCHREIBER, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE (Eds.). **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. Advances in photosynthesis and respiration. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2004. v. 19, p. 279–319.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: SCHULZE, E.-D.; CALDWELL, M. M. (Eds.). **Ecophysiology of Photosynthesis**. Springer Study Edition. 1. ed. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p. 49–70.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 10, p. 51–62, 1986.

SCHULZE, P. S. C. et al. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014.

SCHUURMANS, R. M. et al. Comparison of the photosynthetic yield of cyanobacteria and green algae: different methods give different answers. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0139061, 2015.

SCHWADERER, A. S. et al. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 56, n. 2, p. 589–598, 2011.

SERÔDIO, J. et al. Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. **Photosynthesis Research**, v. 90, n. 1, p. 29–43, 2006.

SHAH, M. R. et al. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 197–213, 2018.

SHAHID, A. et al. Microalgal carbohydrates and proteins: synthesis, extraction, applications, and challenges. In: ALAM, A.; XU, J.-L.; WANG, Z. (Eds.). **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**. Singapore: Springer, 2020. p. 433–468.

SHIBATA, K.; BENSON, A. A.; CALVIN, M. The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 15, n. 4, p. 461–470, 1954.

SHOAF, W. T.; LIUM, B. W. Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethyl sulfoxide. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 6, p. 926–928, 1976.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall, 2002.

SILVA, C. E. DE F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1833–1842, 2016.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596–2610, 2010.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of CO₂ concentration on algal growth: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 172–179, 2014.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431–444, 2015.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process.

Critical Reviews in Biotechnology, v. 33, n. 2, p. 172–215, 2013.

SLOCOMBE, S. P. et al. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51–57, 2013.

SOBCZUK, T. M.; CHISTI, Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 100–108, 2010.

SOLOMON, S. et al. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1704–1709, 2009.

SONG, M. et al. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 245–251, 2013.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 1–2, p. 236–257, 2011.

STIRK, W. A. et al. Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 348–353, 2013.

SUGANYA, T. et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

SUGGETT, D. J. et al. Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll *a* fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 4, p. 371–384, 2003.

SUGGETT, D. J.; MOORE, C. M.; GEIDER, R. J. Estimating aquatic productivity from active fluorescence measurements. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 103–127.

SUKENIK, A.; BENNETT, J.; FALKOWSKI, P. Light-saturated photosynthesis — Limitation by electron transport or carbon fixation? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 891, n. 3, p. 205–215, 1987.

SURESH KUMAR, K. et al. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, n. 1, p. 51–71, 2014.

SURESH KUMAR, K. et al. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 329–352, 2015.

SYDNEY, E. B. et al. Potential carbon dioxide fixation by industrially important

- microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892–5896, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TANG, D. et al. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 1–19.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre, RS: Artmed Editora S.A., 2006.
- VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147–150, 1990.
- VERNET, M.; SMITH, R. C. Measuring and modeling primary production in marine pelagic ecosystems. In: FAHEY, T. J.; KNAPP, A. K. (Eds.). **Principles and Standards for Measuring Primary Production**. Oxford: Oxford University Press, 2007. p. 142–174.
- VONSHAK, A.; TORZILLO, G. Environmental stress physiology. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 57–82.
- VREDENBERG, W.; PRASIL, O. On the polyphasic quenching kinetics of chlorophyll *a* fluorescence in algae after light pulses of variable length. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 321–337, 2013.
- VUPPALADADIYAM, A. K. et al. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 2, p. 304–324, 2018.
- WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008.
- WARNER, M. E.; LESSER, M. P.; RALPH, P. J. Chlorophyll fluorescence in reef building corals. In: SUGGETT, D. J.; PRÁŠIL, O.; BOROWITZKA, M. A. (Eds.). **Chlorophyll *a* fluorescence in aquatic sciences: methods and applications**. Developments in applied phycology. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands, 2010. p. 209–222.
- WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.
- WHITE, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1675–1682, 2011.

WOODWARD, F. I. et al. Biological approaches to global environment change mitigation and remediation. **Current Biology**, v. 19, n. 14, p. R615–R623, 2009.

YADAV, G. et al. Performance evaluation of a green process for microalgal CO₂ sequestration in closed photobioreactor using flue gas generated *in-situ*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 399–406, 2015.

YENTSCH, C. S.; LEE, R. W. A study of photosynthetic light reactions, and a new interpretation of sun and shade phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 24, n. 3, p. 319–337, 1966.

ZELLER, M. A. et al. Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 5, p. 3263–3275, 2013.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121–132, 2014.

ZIJFFERS, J.-W. F. et al. Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 708–18, 2010.