



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Departamento de Bioquímica

PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA DE MICROALGAS MARINHAS
PERTENCENTES A DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS

Projeto Final de Curso de Química com Atribuições Tecnológicas

Bruna Azevedo Hirsch

Rio de Janeiro

Maio de 2012

Bruna Azevedo Hirsch

PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA DE MICROALGAS
MARINHAS PERTENCENTES A DIFERENTES GRUPOS
TAXONÔMICOS

Projeto Final de Curso de Química com Atribuições Tecnológicas

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese do Departamento de Bioquímica – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub

Rio de Janeiro

Maio de 2012

AGRADECIMENTOS

Ao professor Chaloub, por ter compartilhado comigo seu conhecimento, pelos seus conselhos profissionais e agradável convivência afinal, “o que abunda não prejudica”.

À professora Anita que com sua dedicação e paciência muito contribuiu para minha formação. Sua amizade e alegria contagiante me ajudaram a concluir essa trajetória de minha vida.

Ao pessoal do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese - LEAF que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho e enriqueceram esse período com muito apoio e amizade incluindo, é claro, ótimas comidinhas: Silva, Nathânia, Yuri, Daniel, Daniele e Marcoaurélio, além daqueles que por descuido tenha esquecido de mencionar.

À minha orientadora acadêmica Lúcia Paiva, por ter estado ao meu lado em todas as circunstâncias ao longo de minha graduação, sempre me auxiliando a vencer os diversos obstáculos.

Aos grandes amigos Sarah Ozório, Renata Galdino, Gustavo Rocha e Francine Terra que tive o prazer de conviver na faculdade compartilhando momentos, não só de estresse de provas, como também de muitas alegrias.

Aos meus pais que com muito carinho me ajudaram para que eu chegasse ao fim dessa magnífica jornada.

Às minhas queridas amigas Vanessa e Taíssa, simplesmente por existirem.

Ao Jonatt por seu amor, apoio, amizade e companheirismo, inclusive aos finais de semana ensolarados no fundão.

RESUMO

PROJETO FINAL DE CURSO

TÍTULO: PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA DE MICROALGAS MARINHAS
PERTENCENTES A DIFERENTES GRUPOS TAXONÔMICOS

ALUNA: Bruna Azevedo Hirsch

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub

A performance fotossintética de quatro microalgas marinhas pertencentes a diferentes grupos taxonômicos foi comparada em termos de crescimento fotoautotrófico, da atividade de produção de O₂, da atividade de transporte de elétrons através do Fotossistema II e dos rendimentos quânticos de utilização da energia de excitação deste Fotossistema. Durante o crescimento em meio f/2 a 20°C e sob irradiância de 50 μmol fótons·m⁻²·s⁻¹, as microalgas *Phaeodactylum tricornutum* (Ochrophyta) e *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyta) apresentaram maiores taxas de crescimento (1,07-1,10 d⁻¹) quando comparados às espécies *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta) e *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). As curvas de Fotossíntese versus Irradiância (P-I) foram obtidas a partir da determinação polarográfica da concentração de O₂ em solução e descrevem a performance fotossintética de organismos autotróficos, na medida em que proporcionam acesso aos parâmetros α (eficiência fotossintética), P_m (fotossíntese máxima) e I_k (irradiância de saturação). Quando a atividade fotossintética de produção de O₂ foi normalizada pela quantidade de células, a melhor performance em termos de eficiência de absorção e de utilização de luz, bem como em termos de capacidade fotossintética máxima (P_m) foi apresentada por *T. gracilis*, enquanto essas características fotossintéticas foram bastante inferiores nas outras três espécies. Em virtude da diferença no conteúdo de clorofila-a entre as diferentes algas, a normalização da atividade de produção de O₂ pelo teor de clorofila-a mostrou que *I. galbana* e *T. gracilis* são as microalgas que apresentam a maior taxa fotossintética máxima nestas condições, embora todas as microalgas tenham apresentado essencialmente a mesma eficiência fotossintética (α). A influência da irradiância sobre a atividade fotossintética também foi acompanhada pela determinação da fluorescência da clorofila-a para descrever a taxa de transporte de elétrons (rETR) através do Fotossistema II em função da irradiância para construir as Curvas Rápidas de Luz (RLC). Novamente, *T. gracilis* e *I. galbana* apresentaram perfis de RLC muito semelhantes e os maiores valores de rETR_{máx}, enquanto *P. tricornutum* indicou ter menor performance fotossintética. Finalmente, observou-se a existência de uma correlação linear entre as medidas de produção de oxigênio e as de rETR em intervalos de intensidade luminosa particulares para cada espécie de microalga.

Palavras Chave: *Isochrysis galbana*; *Phaeodactylum tricornutum*; *Rhodomonas* sp.; *Tetraselmis gracilis*; Performance fotossintética; Curva Fotossíntese vs Irradiância (P-I); Curva Rápida de Luz (RLC); PAM

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina 5'-trifosfato
Chl- <i>a</i>	Clorofila- <i>a</i>
Chl- <i>b</i>	Clorofila- <i>b</i>
Chl- <i>c</i>	Clorofila- <i>c</i>
F_m	Fluorescência máxima do PS-II
F_m'	Fluorescência máxima do PS-II exposto à luz
F	Fluorescência estacionária
F_v	Fluorescência variável do PS-II
F_v/F_m	Potencial fotoquímico máximo do PS-II
I_k	Índice de saturação por luz da fotossíntese
F_0	Fluorescência basal quando adaptado ao escuro
F_0'	Fluorescência basal quando exposto à luz
F_0	Fluorescência basal quando adaptado ao escuro
F_0'	Fluorescência basal quando exposto à luz
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato
PAM	Fluorescência de pulso e amplitude modulada
P-I	Curva de atividade fotossintética
P_m	Taxa fotossintética máxima
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PS-I	Fotossistema I
PS-II	Fotossistema II
P_{680}	Doador primário de elétrons no PS-II
P_{700}	Doador primário de elétrons do PS-I
rETR	Taxa relativa de transporte de elétrons
$rETR_{máx}$	Valor máximo de rETR
RLC	Curva rápida de luz
Q_A	Quinona aceptora primária de elétrons no PS-I
Q_B	Quinona aceptora secundária de elétrons no PS-II
α	Eficiência fotossintética
Φ_{II}	Rendimento quântico de utilização fotoquímica da energia no PS-II
Φ_{NPQ}	Rendimento quântico de dissipação não fotoquímica regulada da energia de excitação no PS-II
Φ_{NO}	Rendimento quântico da dissipação não fotoquímica não regulada da energia de excitação no PS-II

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1	Fixação fotossintética de CO ₂ em eucariotos	2
Fig. 2	Diagrama das reações no eletrodo de oxigênio	3
Fig. 3	Canalização da excitação da antena ao centro de reação	4
Fig. 4	Esquema em z da fotossíntese	5
Fig. 5	Princípio da análise de dissipação da fluorescência	8
Fig. 6	Imagens de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i> obtidas a partir de microscopia óptica	11
Fig. 7	Disposição dos frascos na bancada de cultivo	14
Fig. 8	Esquema integrado das metodologias utilizadas	16
Fig. 9	Papel registrador para monitoramento da concentração de O ₂	18
Fig. 10	Interface do programa WinControl em uma RLC	19
Fig. 11	Curvas de crescimento de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	25
Fig. 12	Teores de clorofila- <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	26
Fig. 13	Curvas P-I de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	29
Fig. 14	RLCs de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	33
Fig. 15	Rendimentos quânticos de utilização fotoquímica de energia pelo PS-II e da dissipação não fotoquímica regulada e não regulada da excitação de energia pela clorofila- <i>a</i> no PS-II de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	35
Fig. 16	Correlação entre produção de O ₂ (normalizado por chl- <i>a</i>) e rETR de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	38
Fig. 17	Correlação entre produção de O ₂ (normalizado por células) e rETR de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tab. 1	Distribuição de pigmentos fotossintéticos em alguns grupos taxonômicos	9
Tab. 2	Composição do meio de cultura f/2	13
Tab. 3	Parâmetros fotossintéticos das curvas P-I de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	30
Tab. 4	Parâmetros fotossintéticos das RLCs de <i>P. tricornutum</i> , <i>I. galbana</i> , <i>Rhodomonas</i> sp. e <i>T. gracilis</i>	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	O processo e o aparato fotossintético	1
1.2.	As microalgas marinhas	8
2.	JUSTIFICATIVA	9
3.	OBJETIVOS	10
3.1.	Objetivos Específicos	10
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1.	Organismos	11
4.2.	Meio de cultura	12
4.3.	Condições de cultivo	13
4.4.	Determinação da intensidade luminosa	14
4.5.	Crescimento celular	14
4.6.	Determinação da concentração de clorofilas	15
4.7.	Preparo das amostras	15
4.8.	Determinação da atividade fotossintética através da troca líquida de O ₂ (polarografia)	17
4.9.	Determinação da atividade fotossintética através da fluorescência da clorofila-a.....	18
4.10.	Utilização da energia de excitação no PS-II	20
4.11.	Ajuste dos dados experimentais	21
4.11.1.	Atividade fotossintética através da troca líquida de O ₂ (polarografia)	21
4.11.2.	Atividade fotossintética estimada através fluorescência da clorofila	22
4.12.	Reagentes.....	22
4.13.	Análise estatística	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1.	Crescimento celular	23
5.2.	Análise de clorofila	26
5.3.	Atividade fotossintética	27
5.3.1.	Curva P-I	27
5.3.2.	Curva Rápida de Luz	31

5.4. Comparação entre os métodos de polarografia e de fluorescência.....	36
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

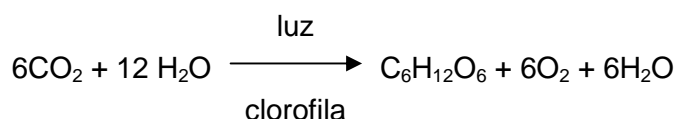
1. INTRODUÇÃO

1.1. Fotossíntese

O sol é a fonte primária de energia para a grande maioria dos ecossistemas, exceto para aqueles que ocorrem em grandes profundidades marinhas, cuja fonte de energia é constituída por ventos hidrotermais. A utilização da luz solar ocorre através de um processo denominado fotossíntese, responsável pela transformação de energia eletromagnética em energia química, que é utilizada para a redução e/ou incorporação de nutrientes inorgânicos (CO_2 , N_2 , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ e SO_4^{2-}) em compostos orgânicos, como glicídeos, lipídeos e proteínas. Como os produtos formados possuem maior quantidade de energia livre que os reagentes, este processo é termodinamicamente desfavorável, ocorrendo somente às custas do fornecimento de energia; em ambientes naturais, a luz solar (Hall e Rao, 1994; Lawlor, 1987). A habilidade em reduzir carbono inorgânico em compostos orgânicos é restrita a relativamente poucas rotas metabólicas. Algumas bactérias e archaeas usam reações não fotoquímicas para reduzir carbono inorgânico, mas a fotossíntese é o processo mais eficiente e difundido para esse fim (Falkowski e Raven, 2007).

Praticamente todo oxigênio da atmosfera terrestre foi e tem sido gerado pela fotossíntese oxigênica. A atmosfera primitiva era extremamente redutora e anóxida, constituída por uma mistura de CH_4 , H_2 , H_2S , CO_2 , CO , NH_3 , etc., sem O_2 livre. Como consequência da atividade fotossintética, O_2 foi liberado na atmosfera, alterando sua concentração, praticamente zero, para o valor atual de 21%. Assim sendo, a atmosfera passou a ter caráter oxidante, alterando fundamentalmente a pressão de seleção para os organismos e favorecendo aqueles que eram capazes de se proteger do oxigênio e, principalmente, de utilizá-lo. Nas camadas superiores da atmosfera, o O_2 levou à formação da camada de ozônio, que absorve radiação na região espectral do ultravioleta, possibilitando o desenvolvimento de organismos mais complexos e a ocupação do ambiente terrestre. A utilização do O_2 como aceptor final nos processos respiratórios aumentou significativamente a quantidade de energia disponibilizada a partir da oxidação de matéria orgânica, resultando na explosão e diversificação das formas de vida (Lawlor, 1987).

A reação global da fotossíntese é geralmente descrita como uma reação de oxi-redução, na qual a água doa elétrons para a redução de CO_2 (Hall e Rao, 1994):



Conceitualmente, a fotossíntese pode ser dividida em duas etapas: enquanto a primeira envolve a captura de energia luminosa e sua conversão em energia química (ATP) e equivalentes redutores (ferredoxina e NADP^+ reduzidos), a segunda reutiliza o ATP e o NADPH no processo de fixação do dióxido de carbono através do Ciclo Fotossintético de Redução do Carbono (figura 1). A taxa de fotossíntese pode ser definida como a taxa de evolução de O_2 produzido na fase biofísica da fotossíntese ou pela taxa de consumo de CO_2 , ou seja, através de trocas gasosas. De maneira geral, a taxa de evolução de O_2 pode ser determinada polarograficamente, enquanto o consumo de CO_2 pode ser estimado com o uso de radioisótopos (^{14}C) (Hipkins e Baker, 1986; Geider e Osborne, 1991).

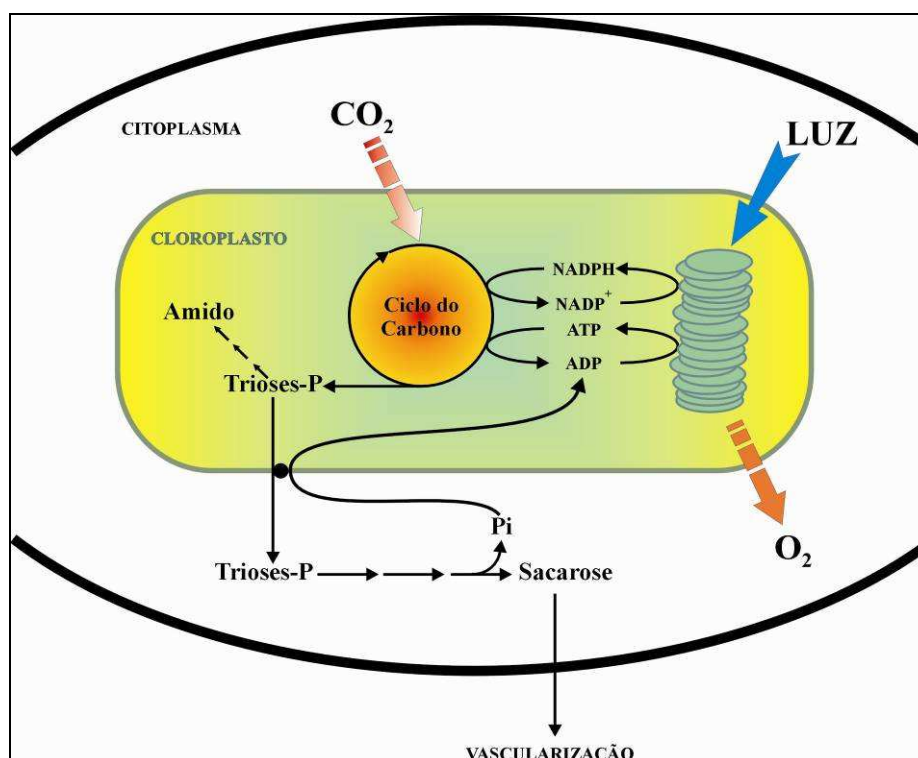


Figura 1: Representação do processo global de fixação fotossintética de CO_2 em eucariotos. Esquema concebido por Chaloub, 2005.

O protocolo experimental para determinação da taxa de evolução do oxigênio fotossintético, formulado por *Emerson* entre os anos 1930 e 1940, requiritava o uso de manômetros e altas densidades de algas, tornando a técnica lenta e tediosa (Falkowski e Raven, 2007). Ao final dos anos 40, *Lawrence Blinks* e seu estudante *Francis Haxo*, desenvolveram um eletrodo sensível ao oxigênio que permitia medir diretamente a taxa de evolução de O_2 (Falkowski e Raven, 2007). Quando uma diferença de potencial é aplicada entre os dois eletrodos, o de platina se torna negativo (catodo) e o de prata se torna positivo (anodo). Os eletrodos são separados do meio reacional por uma fina membrana de polietileno ou teflon permeável ao O_2 .

Após exposição à luz, o O_2 produzido é difundido pela membrana e reduzido na superfície do catodo, de forma a gerar uma corrente no circuito (que está completo por uma fina camada de solução KCl saturada). A prata é oxidada, ocorrendo o depósito de AgCl no anodo. A corrente gerada é direta e estequiometricamente relacionada com a quantidade de O_2 reduzido, que é geralmente capturada como voltagem, por meio de um registrador linear. A figura 2 representa um diagrama com as reações químicas envolvidas no eletrodo de oxigênio. A medida da evolução de oxigênio em um sistema fechado é uma das maneiras mais simples e baratas de demonstrar, ou acompanhar, o processo de fotossíntese em um organismo (Walker, 1990). As concentrações de oxigênio obtidas são plotadas contra as irradiância aplicadas, resultando nas curvas denominadas Fotossíntese versus Irradiância (P-I). Curvas P-I são amplamente usadas em modelos de produtividade e para caracterizar a fotoaclimatação (Henley, 1993).

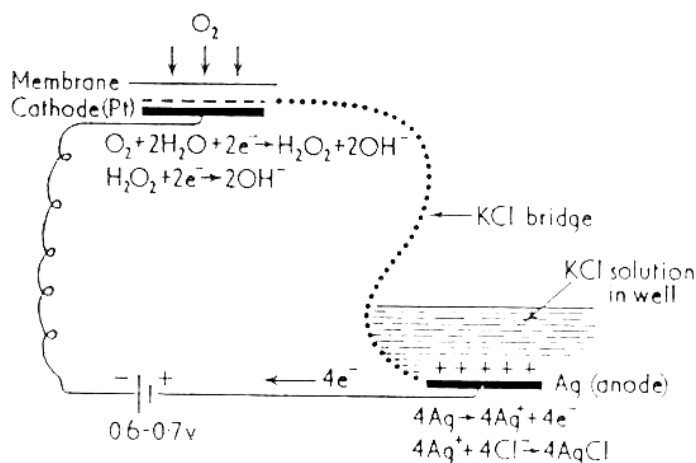


Figura 2: Diagrama representativo das reações que ocorrem no eletrodo de oxigênio (Walker, 1990).

Os organismos fotossintéticos oxigênicos apresentam duas unidades fotossintéticas distintas: o fotossistema I (PS-I) e fotossistema II (PS-II). Cada fotossistema é capaz de absorver luz, na região espectral do visível (400 a 700 nm), devido à presença de pigmentos fotorreceptores (clorofila-*a* e pigmentos acessórios) associados a proteínas, formando complexos conhecidos como antenas ou complexos coletores de luz. Quando os fotossistemas são excitados, a energia absorvida pelos pigmentos fotorreceptores é transferida no complexo antena até moléculas fotoativas de clorofila-*a* (P_{700} e P_{680} , respectivamente nos fotossistemas I e II) que se encontram associadas a proteínas em um microambiente designado centro de reação do fotossistema (figura 3).

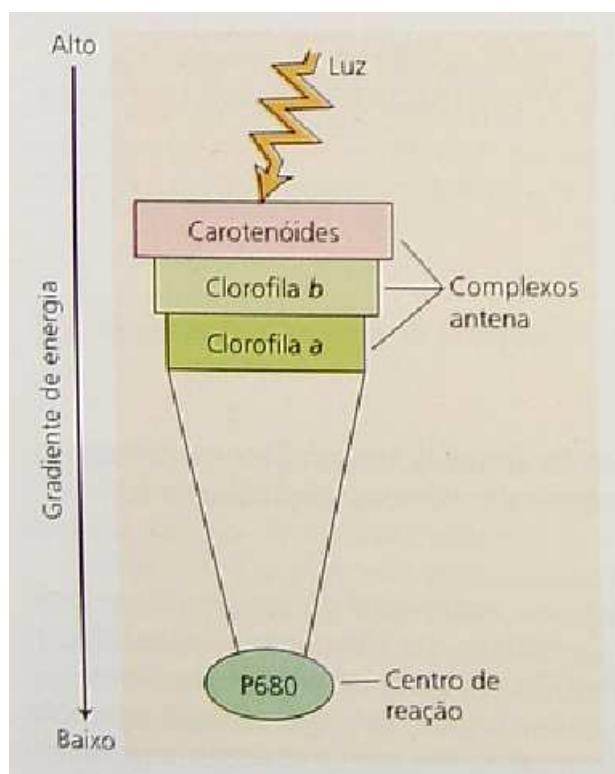


Figura 3: Canalização da excitação do sistema de antena em direção ao centro de reação. A transferência de energia do complexo antena para o centro de reação é favorável na medida em que os pigmentos mais próximos do centro de reação possuem menor energia que os mais distantes (Taiz e Zeiger, 2006).

Os dois fotossistemas (PS-I e PS-II) estão arranjados em série e podem ser conectados esquematicamente através de um diagrama de potencial de redução, o chamado esquema em Z da fotossíntese (figura 4), onde encontra-se delineado o fluxo de elétrons entre os dois fotossistemas bem como a relação energética entre os mesmos. O esquema em Z é desenhado em uma escala de potencial redox, onde os compostos de menor potencial (fortes agentes redutores) localizam-se no topo do diagrama, podendo-se identificar dois conjuntos distintos de reações: um de reações endergônicas nos centros de reação, onde a energia de um fóton é usada para excitar o doador primário de elétrons (P_{700} e/ou P_{680}), gerando um agente redutor; e outro de reações exergônicas, onde a energia na forma de elétrons passa de agentes redutores mais fortes para redutores mais fracos (Hall e Rao, 1994).

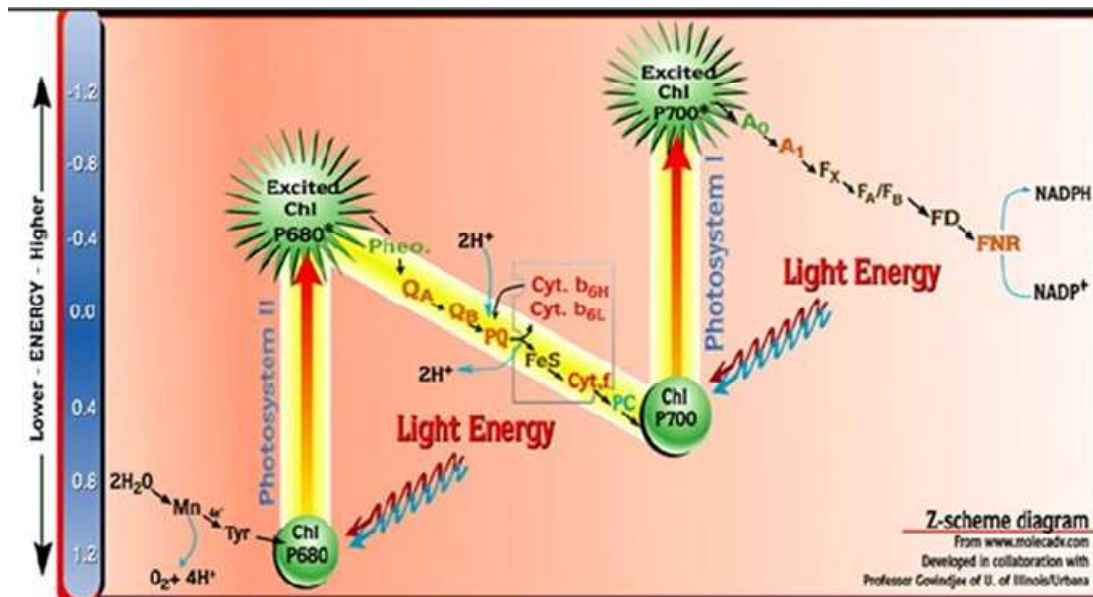


Figura 4: Esquema em Z da fotossíntese (Veit and Govindjee, 2000)

Plantas, algas e cianobactérias são capazes de utilizar a água como doadora de elétrons, uma matéria prima abundante, e oxidá-la a oxigênio. Como a diferença entre os potenciais de redução do NADP⁺/NADPH ($E_o' = -320$ mV) e do par $\frac{1}{2}O_2/H_2O$ ($E_o' = +820$ mV) é muito grande, este processo requer a presença de dois fotossistemas distintos (PS-I e PS-II), que possam ser excitados individualmente, mas que funcionem em conjunto (Hipkins e Baker, 1986). Esta atividade conjunta é obtida através da participação do complexo denominado citocromo *b₆/f*, um complexo protéico que transfere elétrons entre os dois fotossistemas, ou seja, do plastoquinol solubilizado na membrana tilacóide para uma cuproproteína, a plastocianina, que é um carreador de elétrons que se difunde através da fase aquosa do lúmem da membrana tilacóide até o PS-I. Finalmente, os elétrons são transferidos do PS-I para o NADP⁺ mediado pela Ferredoxina/NADP⁺ redutase.

O transporte fotossintético de elétrons tem início com a captura de fótons pelos pigmentos das antenas coletoras de luz. A transferência de energia para os centros de reação do PS-I e PS-II resulta na excitação de um dímero de clorofila em cada fotossistema e causa a ejeção de elétrons para aceptores primários, iniciando o transporte de elétrons através da cadeia de componentes redox. A excitação dos dímeros de clorofila-*a* no centro de reação do PS-II e do PS-I promove uma transição reversível nas propriedades espectroscópicas desses pigmentos, resultando numa maior diferença de absorção em 682 nm (P₆₈₀) e em 700 nm (P₇₀₀), respectivamente. O PS-II possui uma antena proximal formada por clorofila-*a*, localizada próxima ao centro de reação e uma antena distal formada por clorofilas-*a* e pigmentos acessórios. A excitação do dímero de clorofila do PS-II (P₆₈₀) resulta na sua oxidação (P₆₈₀⁺) e na

transferência de um elétron para um aceptor primário, a feoftina e, subsequentemente, para as quinonas primária e secundária, Q_A e Q_B , respectivamente. O elétron transferido do P_{680}^+ é repostado por um resíduo de tirosina (Y_Z), que, por sua vez, recebe do centro $(Mn)_4$ elétrons, provenientes da oxidação da água, numa reação que libera, como subproduto, oxigênio molecular. A quinona Q_A é fixa, ao passo que a quinona Q_B , após receber dois elétrons, associa-se a dois H^+ e, na sua forma totalmente reduzida (plastoquinol), dissocia-se do seu sítio, difundindo-se pela membrana para ser substituída por uma quinona oxidada proveniente do “pool” de quinonas (Hall e Rao, 1994).

Da mesma forma que no PS-II, a excitação do dímero de clorofila presente no centro de reação do PS-I (P_{700}) leva à formação de uma espécie oxidada (P_{700}^+) decorrente da transferência de um elétron para uma clorofila monomérica (A_0), e desta para uma filoquinona (A_1). Subsequentemente, o elétron é transferido através de três centros Fe-S, e destes para a ferredoxina. Concomitantemente, o P_{700} é reduzido por um elétron oriundo da plastocianina (Hipkins e Baker, 1986; Lawlor, 1987). Em linhas gerais o PS-I catalisa a transferência de elétrons da plastocianina reduzida para a ferredoxina oxidada que, por sua vez, reduz o $NADP^+$ na presença da enzima ferredoxina $NADP$ redutase. A transferência fotossintética de elétrons da água para o $NADP^+$ envolve a transferência de H^+ para o lúmen do tilacóide através da atividade do complexo citocromo b_6/f resultando na formação de um gradiente de prótons, cuja dissipação através do complexo ATPsintase promove a síntese de ATP. A síntese de ATP resultante do transporte de elétrons que envolve os fotossistemas I e II é conhecida como fotofosforilação não-cíclica. Alternativamente, elétrons oriundos do PS-I podem fluir através da ferredoxina para o complexo b_6/f e deste novamente para o PS-I. Este processo também resulta na formação de um gradiente de prótons e consequente síntese de ATP, sendo conhecido como fotofosforilação cíclica (Hall e Rao, 1994). Assim, a fotossíntese promove a síntese de ATP bem como a redução de ferredoxina e do $NADP^+$ a partir da energia solar para, então, armazená-la a partir da incorporação de nutrientes inorgânicos na forma de biomassa vegetal (Nelson e Ben-Shen, 2004).

A fotossíntese envolve a absorção da energia eletromagnética por pigmentos fotossinteticamente ativos, sendo a clorofila-a o principal deles. Entretanto, outros pigmentos, chamados pigmentos acessórios (clorofila-b, clorofila-c, carotenóides e ficobilinas), também participam deste processo (Falkowski e Raven, 2007). Tal energia absorvida pode sofrer três destinos: pode ser usada fotoquimicamente para realização da fotossíntese, dissipada como calor ou ainda re-emitida como fluorescência. Esses três processos de utilização da energia absorvida são competitivos, de modo que um

aumento na eficiência de um dos processos irá acarretar na diminuição do rendimento dos outros dois. Dessa forma, a determinação do rendimento da fluorescência da clorofila poderá fornecer informações sobre alterações tanto da eficiência fotoquímica quanto da dissipação da energia absorvida na forma de calor (Bolhàr–Nordenkampf e Oquist, 1993; Maxwell e Johnson, 2000; Fracheboud e Leipner, 2003).

A fluorescência da clorofila-a constitui uma valiosa “sonda” natural dos eventos biofísicos primários da fotossíntese e, nos últimos 15 anos, a medida da atividade fotossintética através da determinação da fluorescência da clorofila-a tem se destacado como um poderoso método de avaliação das propriedades do aparato fotossintético porque consiste numa metodologia em tempo real bastante sensível, não destrutiva e confiável, que proporciona rápida informação sobre a performance fotossintética como resposta a mudanças das condições ambientais (Schreiber e col., 1994). Além disso, a técnica de pulso e amplitude modulada (PAM) permite a separação entre o sinal de fluorescência e o de uma fonte de luz bastante intensa, sendo amplamente utilizada para medir a fluorescência da clorofila em diferentes tipos de fotobiontes (Krause e Weis, 1991; Schreiber e col., 1995), bem como de invertebrados que contêm foto simbiontes, como corais (Larkum e col., 2003) e esponjas (Beer e Ilan, 1998). Na medida em que o rendimento de fluorescência da clorofila-a associada ao PS-I é muito pequeno à temperatura ambiente, as respostas de fluorescência registradas nessas condições são decorrentes da emissão de fluorescência da clorofila-a associada ao PS-II (Krause e Weis, 1991).

Fluorímetros PAM usam três fontes distintas de luz para manipular o aparato fotossintético (especificamente a molécula de clorofila-a) que, por sua vez, emite diferentes quantidades de fluorescência. O princípio da análise de dissipação da fluorescência pelo método do pulso de saturação pode ser visto da figura 5. Primeiramente, uma luz não actínica ($\sim 0,15 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e modulada induz a emissão de fluorescência modulada sem induzir fotossíntese, sendo utilizada para acompanhar a utilização da energia absorvida pelo PS-II. A fluorescência emitida após período de escuro, apenas sob iluminação modulada e não actínica, é chamada fluorescência basal ou mínima (F_0). A segunda fonte de luz usada para acessar a atividade fotossintética é um pulso saturante de luz actínica ($5.000 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com duração de 0,6-0,8 s) utilizado para saturar a atividade fotoquímica de todos os centros de reação do PS-II, resultando na emissão de uma fluorescência substancialmente maior, chamada fluorescência máxima (F_m se adaptada ao escuro ou F_m' se adaptada à luz). A terceira fonte de luz (luz actínica) consiste na radiação fotossinteticamente ativa (PAR) com densidade de f\u00f3tons entre 10 e $2.500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, utilizada para manipular o aparato fotossintético induzindo a ocorrência

da fotossíntese (Ralph e Gademann, 2005). A fluorescência emitida sob iluminação actínica é chamada fluorescência estacionária (F).

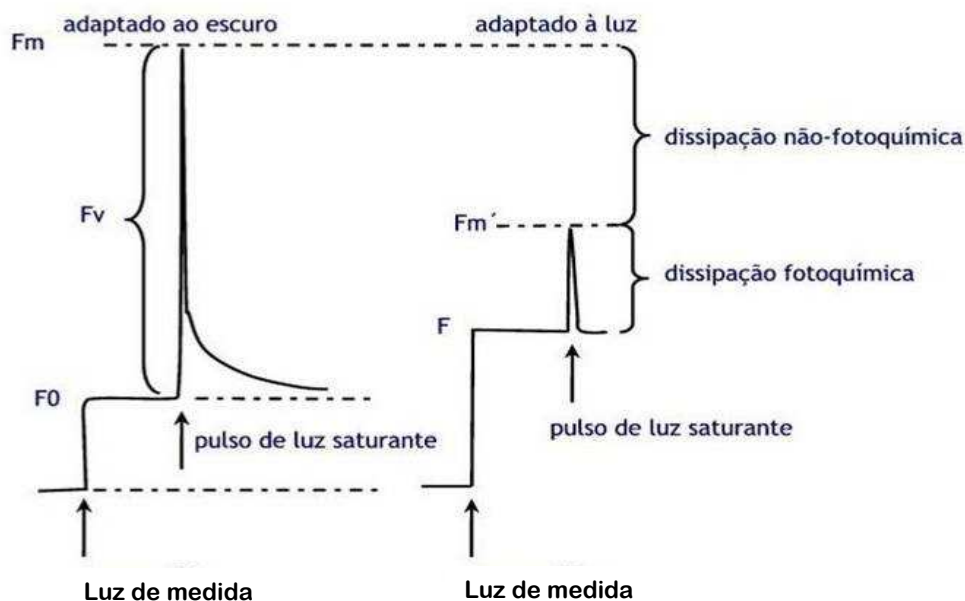


Figura 5: Definição dos níveis de fluorescência modulada em amostras adaptadas e não adaptadas ao escuro, sendo: fluorescência basal ou mínima (F_0), fluorescência máxima (F_m quando adaptado ao escuro e F_m' quando adaptado à luz), fluorescência variável (F_v) e fluorescência estacionária (F) (Heinz Walz GmbH, 1998).

1.2. As microalgas marinhas

No mar, a atividade fotossintética é realizada por vários tipos de organismos, como fitoplâncton, microfitobentos, macroalgas, plantas vasculares e associações simbióticas envolvendo algas, como corais e esponjas. Este vasto conjunto de organismos fotossintéticos apresenta papel ecológico equivalente ao das plantas terrestres. Calcula-se que pelo menos 90% da produção primária marinha seja derivada da atividade do fitoplâncton. A produtividade primária se refere à incorporação de carbono na biomassa e suas taxas são geralmente expressas como gramas de carbono fixado por área ou volume de água, por intervalo de tempo. Enquanto nem todos os produtores primários são fotossintéticos, todos os organismos fotossintéticos são produtores primários. (Geider e Osborne, 1991; Lindeman, 1942; Lourenço e Marques Jr., 2002).

As microalgas, que compõem o fitoplâncton, apresentam extraordinária importância ambiental e econômica. Além de importantes produtoras primárias, as microalgas podem ser utilizadas para a produção de biomassa para uso na

alimentação de animais de interesse comercial, na preparação de encapsulados ricos em proteínas e vitaminas na alimentação humana, tratamento de águas residuais, como matéria prima para indústria de cosméticos, como corantes de alimentos entre outros (Lourenço, 2006). Medidas da troca gasosa são fundamentais para a maioria das investigações biológicas, fisiológicas e ecológicas das algas. O presente trabalho busca o estudo comparativo da performance fotossintética das espécies *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Rhodomonas* sp. e *Tetraselmis gracilis* através da determinação da fluorescência da clorofila-*a* como também a partir da produção fotossintética de O₂.

Além da clorofila-*a* (pigmento principal), os organismos fotossintéticos apresentam pigmentos adicionais, designados de acessórios, como carotenoides, clorofila-*b* ou *c* e ficobilinas, que variam conforme o grupo taxonômico. A tabela 1 exemplifica a variedade de pigmentos contidos em algumas classes de fitoplâncton.

Tabela 1: Distribuição de pigmentos fotossintéticos em alguns grupos taxonômicos (Lee, 2008; Rowan, 1989).

Divisão	Pigmentos				
	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>b</i>	Chl- <i>c</i>	carotenóides	ficobilinas
Cyanophyta	x			x	x
Prymnesiophyta	x		x	x	
Cryptophyta	x		x	x	x
Chlorophyta	x	x		x	

2. JUSTIFICATIVA

Na medida em que a utilização das microalgas para fins biotecnológicos é uma área relativamente nova e de utilização crescente e que esses organismos ainda não têm a fisiologia totalmente compreendida, a utilização de diferentes metodologias para determinação de parâmetros fotossintéticos constitui uma contribuição genuína para melhor conhecimento das microalgas.

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de maior compreensão das características fisiológicas das microalgas, temos como propósito a comparação entre diferentes metodologias para caracterização da performance fotossintética de microalgas marinhas pertencentes a diferentes grupos taxonômicos.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Acompanhar o crescimento fotoautotrófico em batelada, através da determinação da densidade celular, caracterizar as diferentes fases do crescimento celular, determinar os rendimentos celulares e taxas específicas de crescimento;
- b) Caracterizar da performance fotossintética por meio da determinação da eficiência fotossintética (α), da taxa fotossintética máxima (P_m) e do índice de saturação de luz (I_k) estimados a partir de curvas P-I obtidas por polarografia;
- c) Estimar as respostas do aparato fotossintético a mudanças rápidas da intensidade de luz por meio da confecção de RLCs, utilizando a técnica de fluorescência de pulso e amplitude modulada (PAM fluorimetria);
- d) Determinar da taxa máxima de transporte fotossintético de elétrons (rETRmax), da eficiência fotossintética (α) e do índice de saturação por luz (I_k) estimados a partir de curvas rápidas de luz RLCs;
- e) Descrever o destino da energia de excitação do PS-II através da determinação dos rendimentos quânticos de conversão fotoquímica (ϕ_{II}) e não fotoquímica (ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO}) da energia no PS-II;
- f) Estabelecer uma correlação entre a atividade fotossintética determinada pela produção de oxigênio (polarografia) e a estimada pela fluorescência da clorofila-a.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Organismos

As microalgas marinhas (figura 6) *Phaeodactylum tricornutum* (Ochromphyta), *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyta), *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta) e *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta) fazem parte da Coleção de Microalgas em Cultivo do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), Instituto de Química – UFRJ. Enquanto as três primeiras cepas foram provenientes da Coleção de Microalgas Elisabeth Aidar do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, a última delas foi proveniente do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

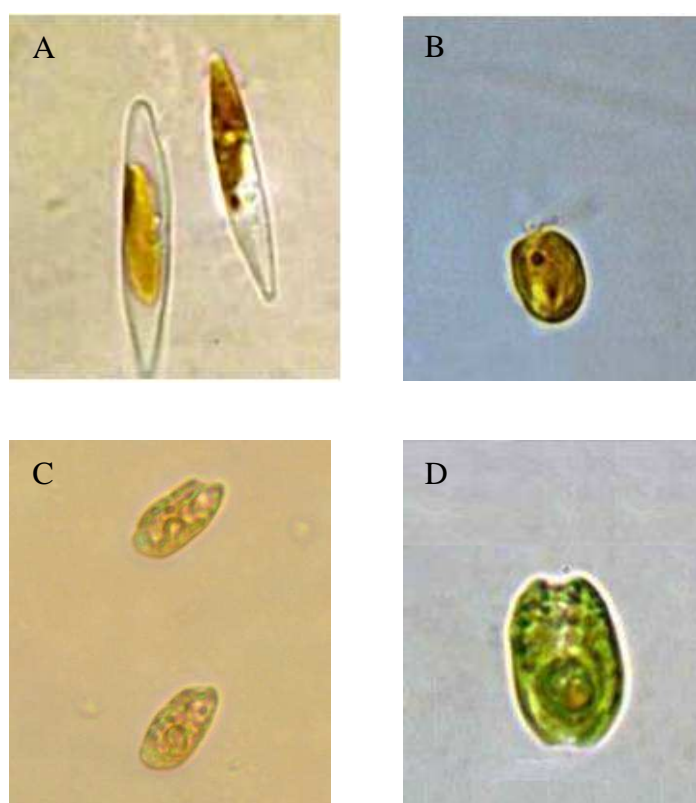


Figura 6: Imagens de *P. tricornutum* (A), *I. galbana* (B), *Rhodomonas* sp. (C) e *T. gracilis* (D) obtidas por microscopia óptica. Imagens: A, B e D: Raquel A. S. Samy; C: Silvia P. Araújo e Nathânia M. S. Motta (Laboratórios de Estudos Aplicados em Fotossíntese).

4.2. Meio de cultura

Os organismos foram cultivados em meio líquido constituído de água do mar enriquecida com nutrientes inorgânicos, resultando no meio designado f/2 (Guillard, 1975), conforme descrito na tabela 2. A água do mar, coletada na Área de Proteção Ambiental de Grumari (APA-Grumari), Rio de Janeiro-RJ, foi previamente filtrada em papel de filtro de celulose (poro de 5,0 µm; MFS®), em filtro de nitrato de celulose (poro de 0,45 µm; MFS®) para a remoção de material em suspensão e fitoplâncton, respectivamente, sendo em seguida filtrada em filtro de acetato de celulose (poro de 0,22 µm; MFS®), para remoção de bacterioplâncton, além de cistos de resistência de fungos. Depois de filtrada, a água do mar foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos. Adicionou-se 10% (v/v) de água deionizada à água do mar para evitar que a concentração salina fosse alterada após esterilização em autoclave.

As soluções de nutrientes foram preparadas com água deionizada filtrada em membrana de acetato de celulose (poro de 0,22 µm; MFS®) e também autoclavadas a 121 °C por 30 minutos, separadamente da água do mar. Adicionou-se 10% (v/v) de água deionizada a cada solução de nutriente para evitar que a concentração fosse alterada após esterilização em autoclave. A solução de vitaminas foi preparada em água deionizada e, subsequentemente, filtrada através de membrana de acetato de celulose (poro de 0,22 µm; MFS®) em câmara de fluxo laminar. Os meios de cultivo foram preparados através da adição das soluções de nutrientes à água do mar esterilizada. A salinidade média dos meios de cultura foi 34 psu e o valor de pH em torno de 8,2.

Tabela 2: Concentrações finais dos constituintes do meio de cultura (meio f/2) utilizado nesse trabalho. Foram desprezadas as concentrações dos nutrientes presentes na água do mar.

Macronutrientes	μM
NaNO ₃	880,0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	36,2
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	53,5
Quelantes	μM
Ácido cítrico	21,40
Citrato férrico	13,45
Metais traço	nM
CoCl ₂ .6H ₂ O	47
CuSO ₄ .5H ₂ O	40
MnCl ₂ .4H ₂ O	910
NaMoO ₄ .H ₂ O	26
ZnSO ₄ .7H ₂ O	75
Vitaminas	nM
Biotina	2,0
Cianocobalanina (B ₁₂)	0,4
Tiamina HCl	300,0

4.3. Condições de cultivo

Os cultivos fotoautotróficos foram realizados em batelada (em enlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura), sendo o CO₂ atmosférico a única fonte de carbono disponível. As culturas foram agitadas manualmente (cerca de três vezes por dia) e expostas à irradiância de 50 μmol fótons.m⁻².s⁻¹, sob fotoperíodo de 12:12 h (claro/escuro). A iluminação foi provida por um conjunto de lâmpadas fluorescentes dispostas lateralmente (Philips, 23 W, luz branca), sendo as culturas mantidas em sala climatizada a 20 ± 2 °C. Uma foto das culturas pode ser vista na figura 7.

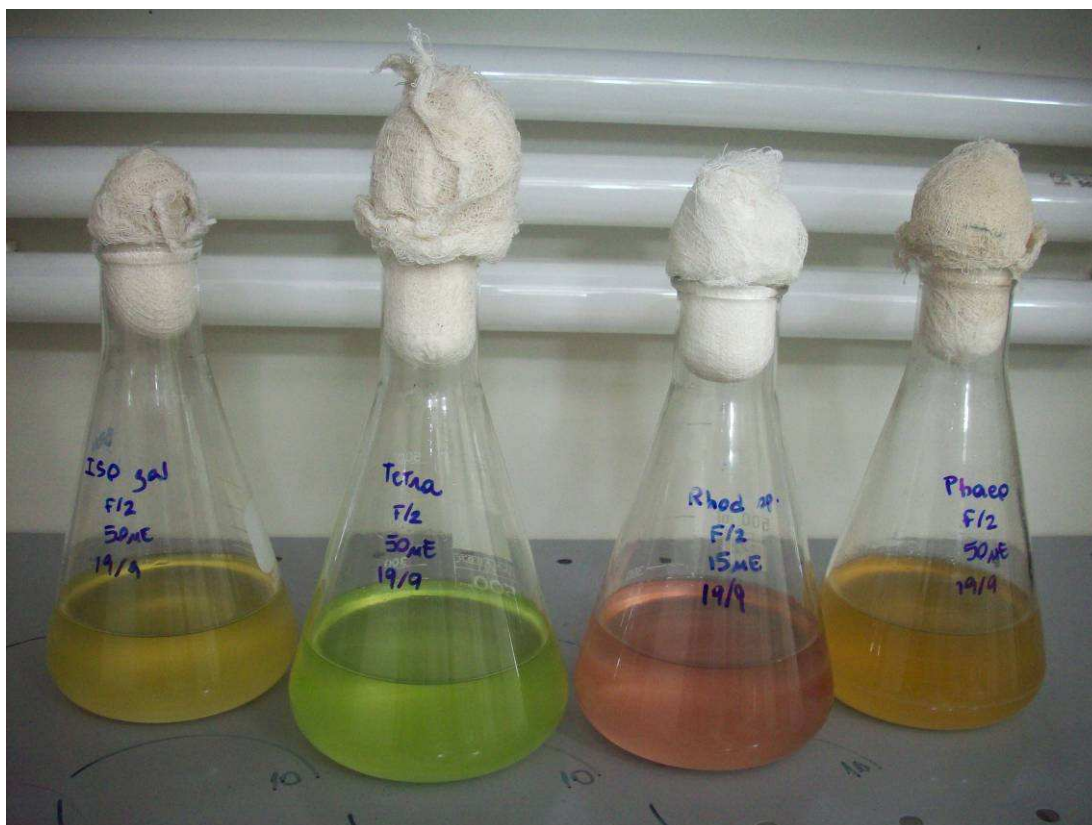


Figura 7: Disposição dos frascos na bancada de cultivo.

4.4. Determinação da intensidade luminosa

A densidade do fluxo de fótons da radiação fotossinteticamente ativa (PAR), compreendida entre 400 nm e 700 nm, foi estimada na superfície externa dos frascos de cultivo por meio de um sensor quântico co-seno corrigido LI-190SA (LI-COR Inc., EUA) acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (LI-COR Inc., EUA).

4.5. Crescimento celular

A variação da densidade celular foi acompanhada através da contagem do número de células em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal com o auxílio de microscopia óptica (Zeiss, Primo Star, Alemanha). Diariamente, alíquotas de 3 mL foram retiradas de cada cultivo e preservadas pela adição de 25 µL de lugol acético (10 g de I₂ + 10 g de KI em 100 mL de água destilada + 100 mL de ácido acético glacial). Em cada contagem, pelo menos 400 indivíduos foram registrados, multiplicando-se o valor obtido pelo fator correspondente à área de contagem.

Com o propósito de reduzir a fase inicial de adaptação celular (fase lag), bem como garantir renovação das células através da ocorrência de várias gerações em

fase exponencial, os cultivos foram iniciados através da adição de inóculo que resultou em densidades celulares iniciais entre 1,0 e 5,0 10⁴.células/mL.

4.6. Determinação da concentração de clorofilas

As clorofilas (*a*, *b* e *c*) foram quantificadas espectrofotometricamente em extratos metanólicos a 100% através das equações abaixo descritas:

Jeffrey e Haxo (1968):

$$\text{Chl-}a = 13,8 \times \text{Abs}_{668} - 1,3 \times \text{Abs}_{635}$$

$$\text{Chl-}c = 67,3 \times \text{Abs}_{635} - 14,1 \times \text{Abs}_{668}$$

Porra e col. (1989):

$$\text{Chl-}a = 16,29 \times \text{Abs}_{665} - 8,54 \times \text{Abs}_{652}$$

$$\text{Chl-}b = 30,66 \times \text{Abs}_{652} - 13,58 \times \text{Abs}_{665}$$

A extração ocorreu por cerca de 40 minutos no escuro e à temperatura ambiente, sendo o material vigorosamente agitado em aparelho de agitação tipo “Vortex” por 30 segundos no início e ao final da extração. Para evitar perdas por evaporação, os tubos permaneceram vedados por todo o período de extração. Em seguida, o material foi centrifugado a 7.700 g por 10 min a 10-15°C (Sorvall®, RC-5B, EUA) e as clorofilas determinadas nos sobrenadantes. As absorvâncias foram estimadas em 635, 652, 665 e 668 nm em espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu Corp., UV-1800, Japão). A cada valor de absorvância utilizado nas equações acima descritas foi diminuída a turbidez registrada em 750 nm.

4.7. Preparo das amostras

As amostras foram coletadas na segunda metade da fase exponencial de crescimento, próximo ao 3º dia de cultivo. Um esquema integrado de todo processo pode ser visto na figura 8, sendo o preparo para cada metodologia descrito a seguir.

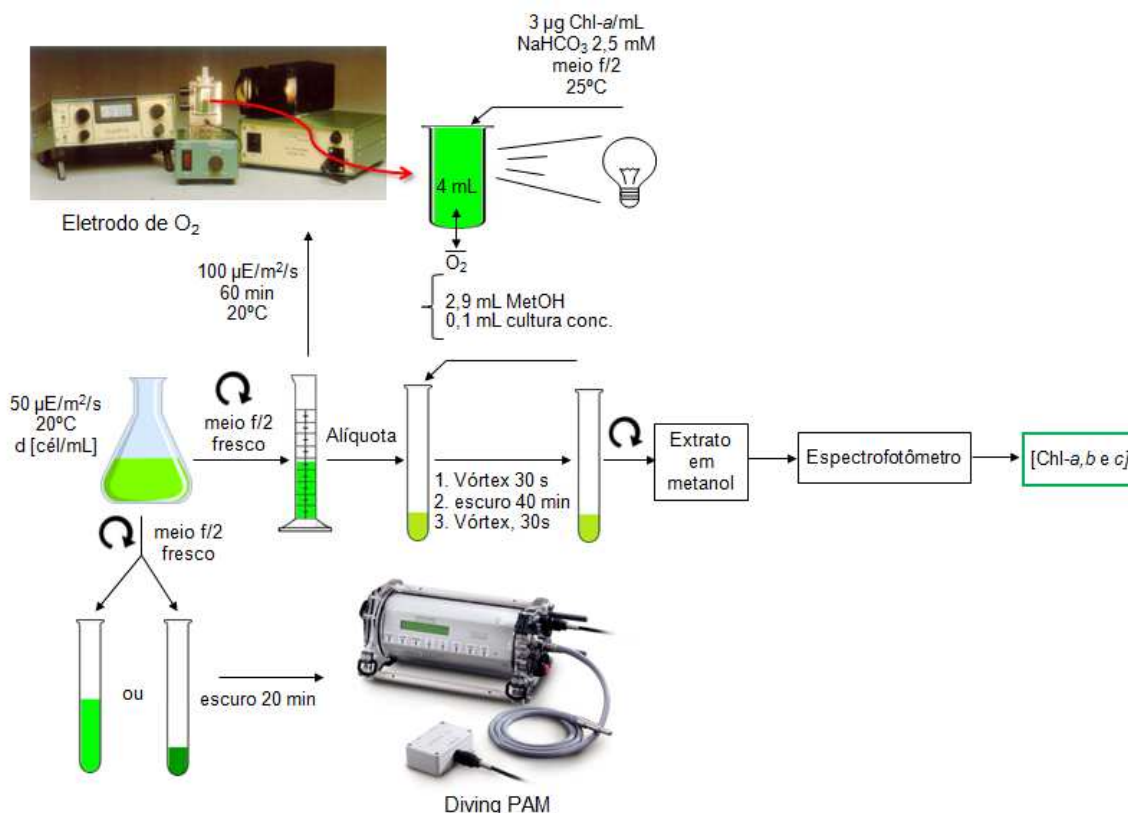


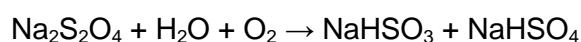
Figura 8: Esquema integrado da quantificação das clorofilas, determinação da atividade fotossintética por troca líquida de O₂ (polarografia) e fluorescência da clorofila-a.

Para a determinação polarográfica da atividade fotossintética, as células foram concentradas em centrífuga clínica (3.500 rpm/ 8 minutos em rotor tipo “swinging”) à temperatura ambiente e ressuspenso em meio f/2 recém preparado. A densidade celular desta suspensão foi estimada por contagem de células e o conteúdo intracelular de clorofila-a foi estimado espectrofotometricamente em extratos metanólicos. O volume de suspensão a ser usado foi determinado em função da concentração final de clorofila-a. Com o propósito de ativar o processo fotossintético, a suspensão celular concentrada foi mantida sob irradiância de 100 μmol fótons.m⁻².s⁻¹ por 60 minutos antes da determinação da atividade fotossintética.

A determinação da atividade fotossintética por fluorescência da clorofila-a foi obtida diretamente nas suspensões celulares correspondentes aos cultivos originais ou, quando necessário, em suspensões celulares concentradas à temperatura ambiente em centrífuga clínica (3.500 rpm por 5 minutos em rotor tipo “swinging”). Em ambos os casos, as células foram incubadas pelo menos por 20 minutos no escuro para manutenção do aceptor primário de elétrons (Q_A) do centro de reação do PS-II no estado oxidado.

4.8. Determinação da atividade fotossintética através da troca líquida de O₂ (polarografia)

A troca líquida de O₂ foi estimada polarograficamente, monitorando-se as variações na concentração de O₂ através de um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Rank and brothers, Reino Unido) acoplado a um registrador linear (figura 9). O compartimento da amostra foi mantido a 25 °C com o auxílio de um banho de circulação termostatizado. A quantidade de oxigênio dissolvido na água foi previamente calibrada pela adição de Ditionito de sódio



sendo a luz actínica conduzida até a superfície externa do eletrodo através de um cabo de fibras ópticas (Chaloub, 2005).

À suspensão celular contendo entre 3 e 4 µg clorofila-*a*/mL, foi adicionado bicarbonato de sódio (concentração final de 2,5 mM) para que a atividade fotossintética não fosse limitada pela disponibilidade de CO₂. Cada curva de Fotossíntese versus Irradiância (curva P-I) foi obtida com a mesma suspensão celular, da seguinte forma: após determinação da respiração no escuro, a amostra foi iluminada e as irradiâncias foram progressivamente aumentadas (entre 0 e 5.100 µmol fótons.m⁻².s⁻¹) mediante utilização de filtros de densidade neutra. A amostra foi iluminada com diferentes densidades de fluxo de fótons e mantida em cada uma delas pelo período de tempo necessário (3 a 5 min) para que se obtivesse uma velocidade de produção de oxigênio constante, conforme apresentado na figura 9.

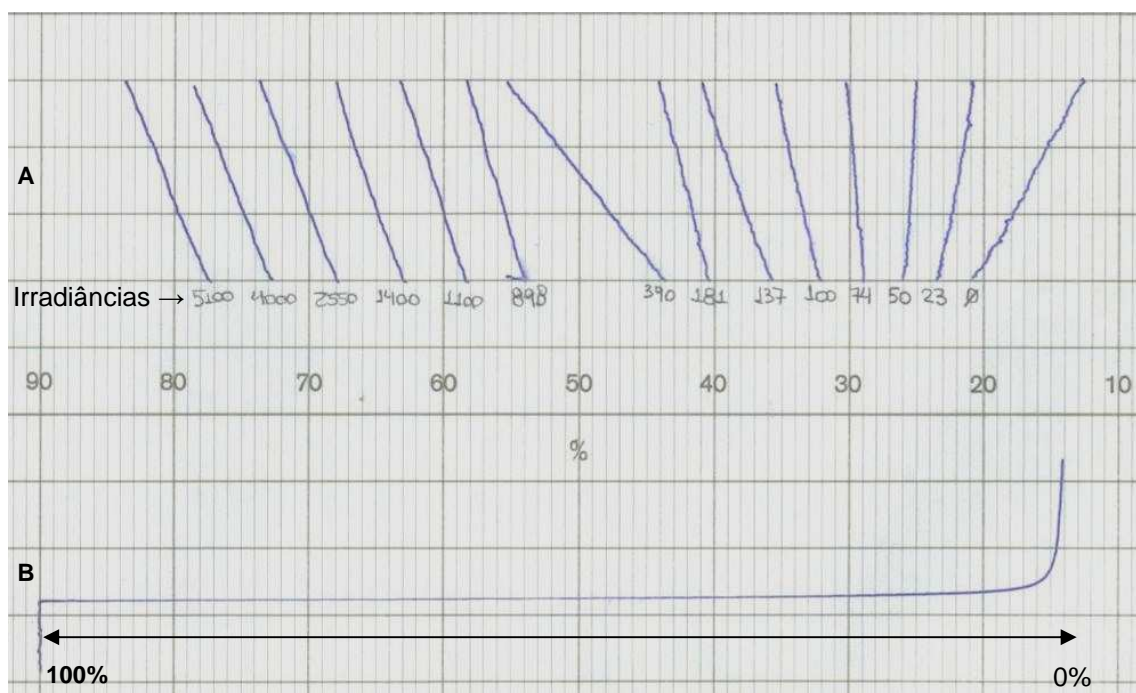


Figura 9: Exemplo de monitoramento das variações na concentração de O_2 em papel registrador. O papel é dividido em escala de 0 a 100 e a calibração com Ditionito de sódio pode ser vista no intervalo representado na parte inferior do papel (B), equivalente à resolução de 100%. Cada reta (A) equivale ao registro da produção ou do consumo de O_2 em determinada irradiância, que se encontra indicada na base de cada uma das retas. As retas registradas entre 0 e $50 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ têm inclinação negativa e portanto representam o consumo de O_2 pelas células. Já as retas no intervalo de 74 a $5100 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ têm inclinação positiva e assim representam a produção de O_2 . A velocidade do papel foi ajustada para cada intervalo de irradiância a fim de se obter a melhor inclinação, a partir da qual foram estimadas as razões de O_2 por intervalo de tempo.

4.9. Determinação da atividade fotossintética através da fluorescência da clorofila-a

As curvas rápidas de luz (RLCs) foram estimadas com o auxílio de um fluorímetro subaquático de pulso e amplitude modulada (diving-PAM, Walz, GmbH, Effeltrich, Alemanha), sendo a iluminação da amostra e a emissão de fluorescência conduzidas através de um cabo de fibras ópticas. As curvas de luz foram obtidas utilizando-se o software WinControl (figura 10), a partir dos valores de fluorescência denominados de F_0 , F , F_m e F_m' , descritos a seguir.

A fluorescência basal ou mínima (F_0) corresponde ao sinal de fluorescência emitido sob iluminação modulada não actínica ($\sim 1,5 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), enquanto a fluorescência máxima (F_m) foi obtida mediante exposição a um pulso de luz saturante ($5.000 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) na presença da luz modulada. A diferença entre esses valores extremos corresponde ao valor da fluorescência variável (F_v) e a razão F_v/F_m

representa o potencial fotoquímico máximo do PS-II quando o sistema foi mantido no escuro por, pelo menos, 20 minutos, para o desaparecimento dos processos não fotoquímicos de dissipação da energia de excitação do PS-II. Cabe lembrar que à temperatura ambiente, a quase totalidade da fluorescência é proveniente do Fotossistema II (Krause e Weis, 1991).

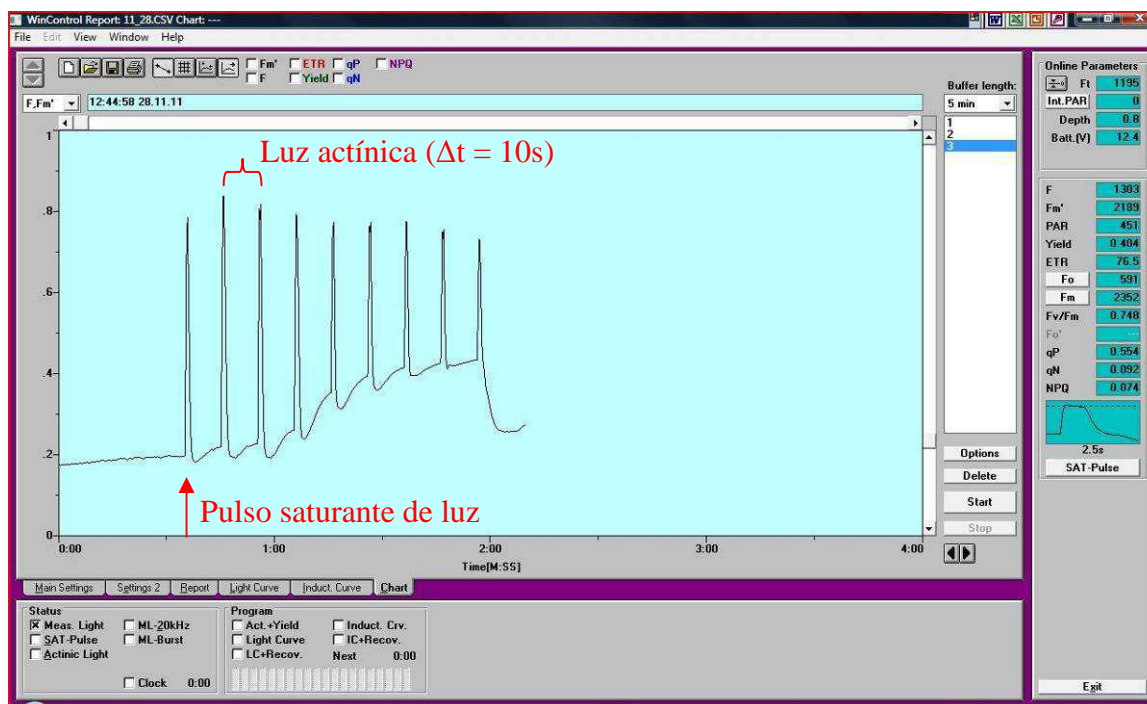


Figura 10: Interface do programa WinControl em uma curva rápida de luz de *T. gracilis*. Os picos ocorrem a cada pulso saturante de luz e representam F_m (primeiro pico, após período no escuro) e F_m' , após 10s sob iluminação actínica.

A partir da determinação dos valores de fluorescência estacionária na presença de luz actínica (F) e da fluorescência máxima obtida após exposição a um pulso de luz saturante da amostra (F_m na ausência de luz e F_m' na presença de luz), foi possível calcular o rendimento efetivo da conversão fotoquímica (ϕ_{II}), sendo ϕ_{II} igual a $(F_m' - F) / F_m'$.

A taxa relativa de transporte de elétrons (rETR) através do PS-II foi calculada como:

$$rETR = 0,5 \cdot \phi_{II} \cdot PAR \cdot Af \quad (\text{Genty e col., 1989})$$

onde 0,5 corresponde ao fator que considera o transporte fotossintético de elétrons ocorrendo em apenas um dos dois fotossistemas; ϕ_{II} o rendimento quântico real ou efetivo; PAR é o valor da densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativa e Af a fração da luz realmente absorvida (descontada a fração refletida e a espalhada). Foi

utilizado para Af o valor 0,84, correspondente ao valor encontrado em vegetais superiores por Genty e col. (1989).

A intensidade de cada nível de radiação actínica programada foi medida por um sensor quântico posicionado na extremidade do cabo de fibras ópticas. Cada curva de luz foi confeccionada mediante exposição da amostra a 8 intensidades distintas de luz compreendidas entre 0 e 2500 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, durante 10 segundos em cada nível de irradiância. Com o propósito de se obter valores de rETR tanto na região limitada pela luz, quanto na região de saturação, cada amostra foi submetida a duas curvas de luz com diferentes faixas de irradiâncias.

As RLCs foram realizadas com as seguintes configurações: Intensidade de luz de medida igual a 4 e duração do pulso de saturação entre 0,6s e 0,8s. Os parâmetros relacionados com ganho e amortecimento foram escolhidos caso a caso, visando a melhor resposta bem como um baixo ruído.

4.10. Utilização da energia de excitação no PS-II

O destino da utilização da energia de excitação absorvida pelo PS-II entre o processo fotoquímico e o de dissipação não fotoquímica (ϕ_{perdas}) pode ser acompanhado através da determinação dos rendimentos quânticos complementares: a eficiência fotoquímica (ϕ_{II}), a eficiência da dissipação não fotoquímica através de mecanismos regulatórios de fotoproteção (ϕ_{NPQ}) e a eficiência da dissipação não fotoquímica através de processos constitutivos de perda (ϕ_{NO}), sendo que a proporção relativa entre (ϕ_{NPQ}) e (ϕ_{NO}) proporciona o acesso a importantes informações sobre a performance fotossintética do fotobionte (Klughammer e Schreiber, 2008). Estes parâmetros podem ser obtidos a partir da determinação dos valores de fluorescência estacionária na presença de luz (F), e da fluorescência máxima obtida após exposição a um pulso de luz saturante da amostra que se encontrava na ausência (F_m) ou na presença de luz (F_m'). Desta forma, foram calculados os rendimentos quânticos da distribuição da energia absorvida pelo PS-II:

- rendimento efetivo da conversão fotoquímica:

$$\phi_{\text{II}} = (F_m' - F) / F_m'$$

- rendimento da dissipação não fotoquímica através de mecanismos regulatórios de fotoproteção:

$$\phi_{NPQ} = F / F_m' - F / F_m$$

- rendimento da dissipação não fotoquímica através de processos constitutivos de perda na forma de calor e de fluorescência:

$$\phi_{NO} = F / F_m'$$

sendo que $\phi_{II} + \phi_{NPQ} + \phi_{NO} = 1$

4.11. Ajuste dos dados experimentais

4.11.1. Atividade fotossintética através da troca líquida de O₂ (polarografia)

As curvas de Fotossíntese versus Irradiância (P-I) determinadas polarograficamente proporcionaram o acesso a parâmetros que expressam diferentes aspectos do estado de aclimação do aparato fotossintético. Enquanto a inclinação inicial da curva (α) está relacionada com a capacidade de absorção, transferência e processamento da energia luminosa, ou seja, representa a eficiência fotossintética, a atividade obtida em condições de saturação por luz corresponde à taxa fotossintética máxima (P_m), que está relacionada com a atividade de aquisição (transporte/captação) e fixação propriamente dita do CO₂ através do ciclo de Calvin. A divisão de P_m por α resulta no índice de saturação de luz (I_k), que é o valor da irradiância correspondente ao início da saturação luminosa. Para determinar esses parâmetros, os dados experimentais foram ajustados por uma regressão não linear, a função tangente hiperbólica, proposta por Jassby e Platt (1976), descrita a seguir:

$$P = P_m \cdot \tanh \cdot (\alpha \cdot E / P_m) + R_d$$

onde, P representa a taxa fotossintética, P_m a taxa fotossintética máxima, α a inclinação inicial da curva, E a irradiância e R_d a respiração no escuro. Os dados foram exportados para o software Sigmaplot 10.0 (Software package, Jandel Scientific Inc., EUA), onde "Regression Wizard" foi usada para o ajuste.

O parâmetro P_m foi obtido a partir da função tangente hiperbólica, enquanto o parâmetro α , correspondente à região limitada por luz, foi obtido através de uma regressão linear, no software Excel 2010 (Microsoft) para os valores iniciais e positivos da curva P-I.

4.11.2. Atividade fotossintética estimada através da fluorescência da clorofila

As curvas obtidas através da fluorescência da clorofila-a, ou curvas rápidas de luz (RLCs), foram ajustadas pelo modelo proposto por Platt e colaboradores (1980) e recomendado por Ralph e Gademann (2005). Os dados foram exportados para o software Sigmaplot 10.0 (Software package, Jandel Scientific Inc., EUA), onde "Regression Wizard" foi usada para o ajuste, segundo a equação:

$$P = P_s [1 - \exp(-\alpha \cdot E_d/P_s)] \cdot \exp(-\beta \cdot E_d/P_s)$$

onde P_s é rETR máximo potencial, α a inclinação inicial da RLC, E_d a intensidade de radiação actínica (400-700 nm) e β caracteriza a inclinação negativa da RLC. Quando β é igual a zero a função se torna uma hipérbole retangular com um valor de rETR máximo e a equação pode ser simplificada para:

$$P = P_m [1 - \exp(-\alpha \cdot E_d/P_m)]$$

onde, P_m é a capacidade fotossintética obtida sob luz saturante.

4.12. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, U.S.A.).

4.13. Análise estatística

Nas situações em que eram aplicáveis, os resultados foram comparados através de análise de variância (ANOVA) ou de teste t de Student. Em ambos os casos foi adotado um nível de significância igual a 0,05 (Zar, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Crescimento celular

Os painéis apresentados na figura 11 descrevem o crescimento autotrófico em batelada das quatro espécies estudadas em meio de cultivo f/2, a 20°C, sob densidade de fluxo de fótons de 50 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O crescimento celular foi determinado pelo incremento diário da densidade celular de cada uma das culturas.

Os cultivos de *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis* foram iniciados a partir de densidades celulares correspondentes a 5,0; 2,5; 2,0 e 1,0. 10^4 células.mL⁻¹, respectivamente. As microalgas *P. tricornutum* e *I. galbana* apresentaram crescimento exponencial até o 3º dia de cultivo e velocidades específicas de crescimento essencialmente iguais ($p > 0,05$): $1,07 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ (*P. tricornutum*) e $1,10 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$ (*I. galbana*). Taxas de crescimento cerca de 1,3 vezes menores foram encontrados por Nogueira (2011) para *P. tricornutum* ($0,87 \text{ d}^{-1}$) e *I. galbana* ($0,84 \text{ d}^{-1}$) cultivados sob constante aeração, 50 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 20°C e meio f/2. Valores ainda menores foram encontrados por Lee (2011) para *P. tricornutum* ($0,26 \text{ d}^{-1}$) e *I. galbana* ($0,13 \text{ d}^{-1}$) cultivados em um volume de 15 L com meio f/2 sob constante aeração, 36 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 20°C. Essas comparações sugerem que o aumento do volume de cultivo possa resultar numa diminuição da penetração de luz nos cultivos e promover uma diminuição da taxa de crescimento. A fase estacionária foi atingida no 9º dia por *P. tricornutum* e no 10º dia por *I. galbana*. Por outro lado, *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis* cresceram exponencialmente por 4 dias, entrando em seguida na fase de desaceleração, não tendo sido acompanhada a fase estacionária de crescimento. Em comparação com as microalgas anteriores, *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis* apresentaram taxas de crescimento inferiores, correspondentes a $0,63 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ e $0,80 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

Cabe mencionar que as curvas de crescimento foram construídas em diferentes escalas, uma vez que além dos cultivos terem sido iniciados com inóculos distintos, apresentaram diferentes rendimentos celulares. Os rendimentos celulares de *P. tricornutum* e *I. galbana* foram de 5,4 e 6,6 $\cdot 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente. Recentemente, Nogueira (2011) observou rendimento celular cerca de 1,6 vezes maior para *P. tricornutum* e 1,3 vezes maior para *I. galbana*, em condições já anteriormente descritas. Mesmo sem o acompanhamento da fase estacionária, pode-se inferir que *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis* apresentariam rendimento celular inferior, em torno de 1,1 e 0,6 $\cdot 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Aidar e col. (1994) em cultivos de *T. gracilis* em meio f/2, a 21°C e 25 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\sim 0,6 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹) e por Rigobelo-Masini e col. (2003) ao cultivar *T. gracilis*

em meio f/2, a 20°C e 350 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sob aera\u00e7\u00e3o cont\u00ednua ($\sim 0,5.10^6$ c\u00e9lulas. mL^{-1}). O cultivo de *Rhodomonas* sp. nas mesmas condi\u00e7\u00f5es que as empregadas neste trabalho resultou em taxa de crescimento ($0,7 \text{ d}^{-1}$) e de rendimento celular ($\sim 1,0.10^6$ c\u00e9lulas. mL^{-1}) semelhantes aos valores aqui reportados (Silva, 2008). O cultivo de microalgas marinhas sob 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ilumina\u00e7\u00e3o cont\u00ednua), 25°C, meio f/2 e aera\u00e7\u00e3o constante resultou em valores superiores tanto da taxa de crescimento quanto do rendimento celular (Ohse e col., 2008), uma vez que nesse caso a disponibilidade de CO_2 atmosf\u00e9rico n\u00e3o foi limitada, sendo encontrados as seguintes taxas de crescimento e de rendimento celular, respectivamente: $1,2 \text{ d}^{-1}$ e 15.10^6 c\u00e9lulas. mL^{-1} para *P. tricornutum*, $1,6 \text{ d}^{-1}$ e 25.10^6 c\u00e9lulas. mL^{-1} para *I. galbana* e $1,3 \text{ d}^{-1}$ e $1,1.10^6$ c\u00e9lulas. mL^{-1} para *T. chuii*. Comparativamente, *Tetraselmis* foi o g\u00eanero que atingiu menor rendimento, provavelmente por apresentar tamanho celular superior \u00e0s demais esp\u00e9cies estudadas, completando seu ciclo de crescimento em densidades celulares menores (Ohse e col., 2008).

As an\u00e1lises de clorofila e atividade fotossint\u00e9tica (P-I e RLC) foram realizadas com amostras coletadas na segunda metade da fase exponencial de crescimento, aproximadamente no 3\u00b0 dia de cultivo. A condi\u00e7\u00e3o de estado estacion\u00e1rio de crescimento \u00e9 obtida na fase exponencial, onde a concentra\u00e7\u00e3o m\u00e9dia dos principais constituintes celulares se mant\u00e9m constante e a taxa de varia\u00e7\u00e3o desses constituintes na cultura \u00e9 constante (Wood e col., 2005). Os pontos de coleta est\u00e3o sinalizados por setas nas curvas de crescimento representadas na figura 11.

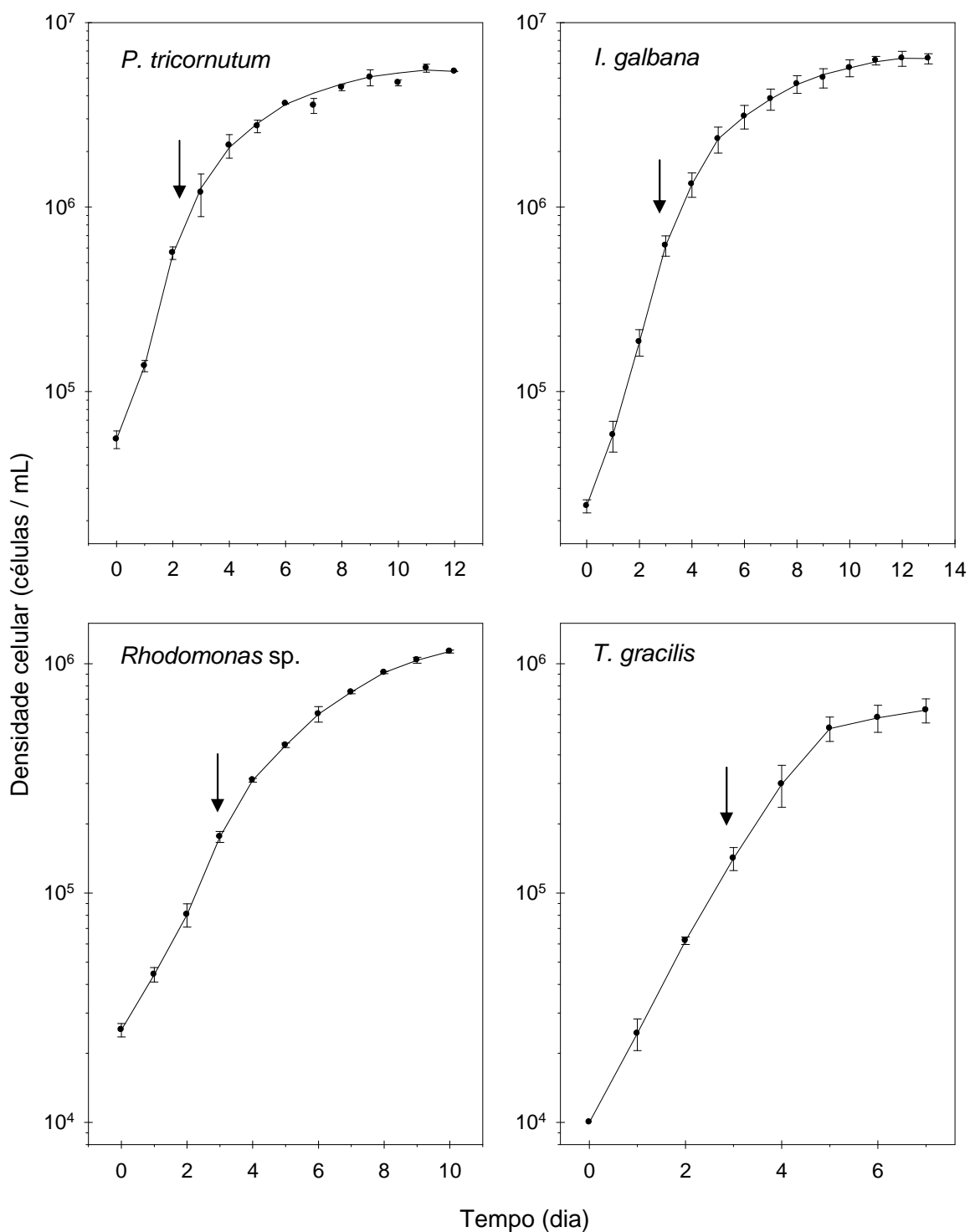


Figura 11: Curvas de crescimento de *I. galbana*, *P. tricornutum*, *T. gracilis* e *Rhodomonas sp.* em meio $f/2$, a 20 ± 2 °C sob densidade de fluxo de fótons de $50 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. As curvas são baseadas em contagens celulares e representam a média de, pelo menos, 3 experimentos independentes ($n \geq 3$). As barras verticais representam o desvio padrão e as setas indicam o momento de coleta das amostras para análises posteriores.

5.2. Análise de clorofila

Tendo em vista a normalização da atividade fotossintética por clorofila-*a*, os conteúdos de clorofila foram determinados espectrofotometricamente em extratos metanólicos para as diferentes espécies aqui analisadas e estão apresentados na figura 12.

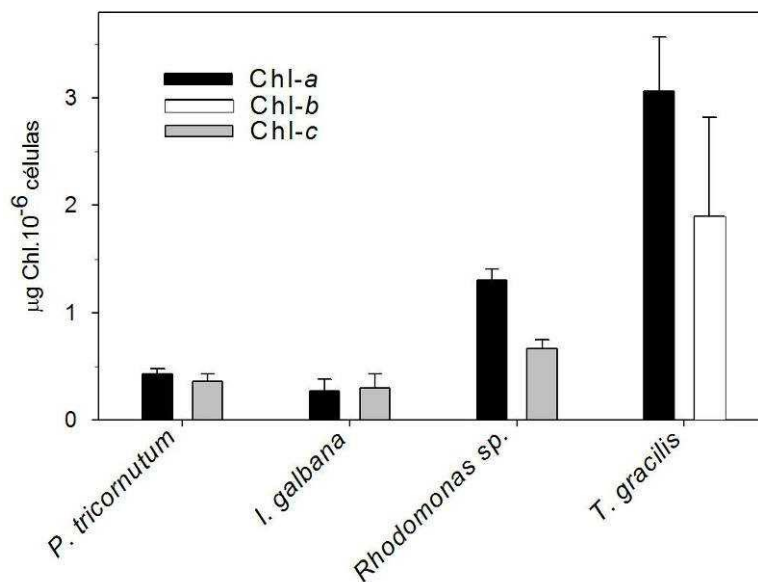


Figura 12: Teores de clorofila-*a*, *b* e *c* de *I. galbana*, *P. tricornutum*, *Rhodomonas sp.* e *T. gracilis* nos dias assinalados na figura 11. As colunas em preto representam os teores de clorofila-*a*, em branco os teores de clorofila-*b* e em cinza os teores de clorofila-*c* representativos de 3 a 7 experimentos independentes e as barras verticais o desvio padrão ($3 \leq n \leq 7$). Chl: Clorofila.

A figura 12 mostra que enquanto os menores teores de clorofila-*a* e *c* foram encontrados em *I. galbana*, os maiores teores de clorofila-*a* e *b* foram apresentados por *T. gracilis*. Os teores de clorofila-*a* foram essencialmente iguais ($p > 0,05$) aos de clorofila-*c* tanto em *P. tricornutum* quanto em *I. galbana*.

Teores muito semelhantes de clorofilas ($1,15 \mu\text{g Chl-a}$ e $0,66 \mu\text{g Chl-c} \cdot 10^{-6}$ células) foram encontrados em *Rhodomonas sp.* cultivada nas mesmas condições que as utilizadas no presente estudo (Silva, 2008), enquanto *P. tricornutum* cultivada em cultivo contínuo sob $15 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apresentou essencialmente o mesmo teor de clorofila-*a* que o por nós encontrado (Jakob e col., 2007). Cabe ainda mencionar que Blache e col. (2011) encontraram um teor de $1,75 \mu\text{g Chl-a} \cdot 10^{-6}$ células para a diatomácea *Cyclotella meneghiniana* (Ochrophyta) cultivada sob condições flutuantes de iluminação.

5.3. Atividade fotossintética

5.3.1. Curvas P-I

As curvas P-I são amplamente utilizadas em modelos de produtividade de algas, bem como para caracterizar um processo de fotoaclimatação (Henley, 1993). A atividade fotossintética foi avaliada para as diferentes espécies, sendo a taxa fotossintética normalizada por número de células (figura 13-A) e por clorofila-*a* (figura 13-B). As curvas de produção de oxigênio apresentam duas regiões distintas. O coeficiente angular da região limitada por luz correspondente aos valores iniciais positivos de produção de oxigênio está relacionado à eficiência fotossintética (α). Na região de saturação observa-se um platô, correspondente à taxa fotossintética máxima (P_m) que, em condições naturais, é primeiramente limitada pela taxa de carbono disponível ou ainda pelas reações enzimáticas do Ciclo Fotossintético de Redução do Carbono. Ao dividir-se P_m por α obtêm-se um parâmetro (I_k) que corresponde à irradiância de saturação da fotossíntese (Henley, 1993).

Descrições matemáticas ou modelos de curva P-I são empíricos já que tentam descrever as influências de todos os fatores que possam afetar a taxa fotossintética em termos de um número mínimo de parâmetros que descrevam adequadamente a curva P-I. A literatura descreve diferentes equações de ajuste para curvas P-I (Geider e Osborne, 1991), sendo a função tangente hiperbólica citada por Jassby e Platt (1976), Chalker (1981) e Coutinho e Zingmark (1987) como a de melhor ajuste para estimativa dos parâmetros α e P_m , (Geider e Osborne, 1991). Os parâmetros α , P_m e I_k apresentados na tabela 3 foram obtidos pelo ajuste através da função tangente hiperbólica, independente do tipo de normalização da taxa de produção de oxigênio.

As curvas P-I podem diferir quali ou quantitativamente entre si em função do parâmetro utilizado para normalização (Henley, 1993). A normalização por clorofila-*a* fornece informações sobre um processo de fotoaclimatação, enquanto a normalização por número de células é capaz de adicionar informações sobre o aparato fotossintético. A figura 13-A representa o conjunto de curvas P-I onde a produção de O_2 foi normalizada por clorofila-*a*, onde se pode observar a ocorrência de dois comportamentos distintos. Com performances fotossintéticas inferiores e semelhantes ($p > 0,05$), *Rhodomonas* sp. e *P. tricorutum* apresentaram valores de α , P_m , e I_k essencialmente iguais ($p > 0,05$). Com performances fotossintéticas superiores e equivalentes ($p > 0,05$), *T. gracilis* e *I. galbana* apresentaram valores de I_k essencialmente iguais ($p > 0,05$). Quando a produção de O_2 foi normalizada pelo número de células (figura 13-B), observou-se superioridade fotossintética de *T. gracilis* em termos de P_m e α . A análise dos resultados apresentados pelas outras três microalgas, apesar de parecerem semelhantes devido à escala utilizada, indicou que

os perfis de curva P-I foram diferentes, apesar de *P. tricornutum* e *I. galbana* apresentarem valores equivalentes de α ($p>0,05$) e relativamente próximos de P_m (ver tabela 3). Por outro lado, os altos valores de P_m observados em *T. gracilis* sugerem que esta microalga possui alta capacidade de obtenção e/ou de fixação de CO_2 , associada(s) a uma alta eficiência de captação e utilização da energia luminosa (alto valor de α), sugerindo que *T. gracilis* possa ter um grande número de unidades fotossintéticas. Inversamente, *P. tricornutum* apresentou eficiência fotossintética inferior às demais espécies independente do tipo de normalização da atividade fotossintética. Em *I. galbana*, a normalização por Chl-a resultou em alto valor de P_m , equivalente ($p>0,05$) ao encontrado em *T. gracilis*, enquanto a normalização pelo número células mostrou a ocorrência de um dos menores valores de P_m em decorrência desta microalga apresentar o menor teor de clorofila (figura 12). Segundo Henley (1993), a utilização de I_k tem a vantagem de ser independente das unidades usadas para expressar a fotossíntese (O_2 ou CO_2 , peso, área, células, carbono ou Chl). Um baixo valor de I_k sempre indica uso ineficiente de irradiâncias altas e não o uso eficiente de baixas irradiâncias (Henley, 1993). Dessa forma, os baixos valores de I_k apresentados por *Rhodomonas* sp. e *P. tricornutum* indicam um uso ineficiente da luz em valores de altas irradiâncias. Segundo Lee (2008) as Cryptophytas parecem ser sensíveis à luz, habitando sempre regiões mais profundas em lagos oligotróficos, embora sejam capazes de se aclimatar a altas irradiâncias (Silva, 2008.)

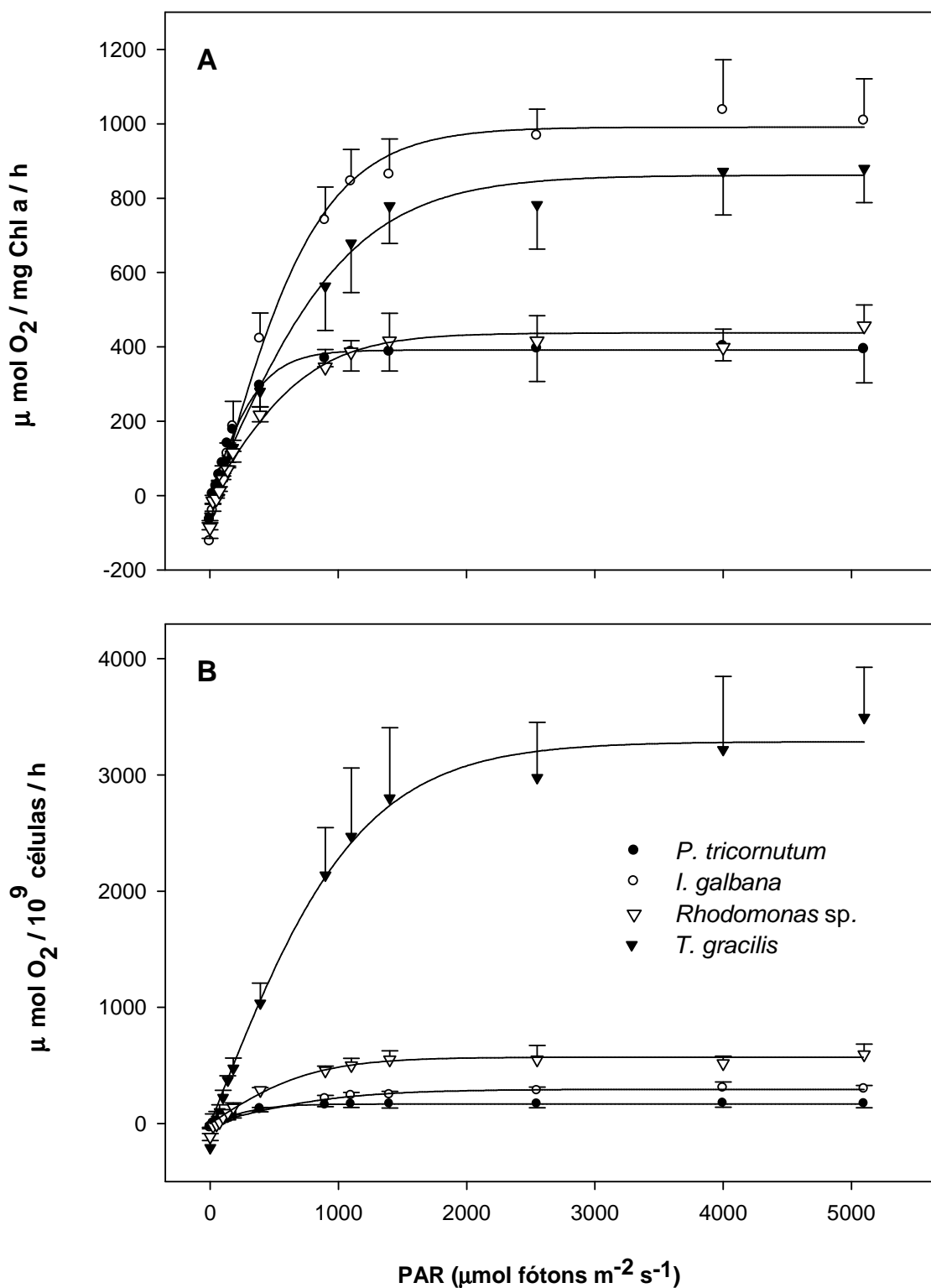


Figura 13: Curvas da atividade fotossintética de *I. galbana*, *P. tricornutum*, *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis* em função da irradiância. A produção fotossintética de O_2 foi normalizada por chl-a (A) e pelo número de células (B). Cada ponto representa a média de, no mínimo, 3 experimentos independentes ($n \geq 3$) e as barras verticais representam os desvios padrões. Cada curva representa o ajuste obtido através da equação função tangente hiperbólica (Jassby e Platt, 1976).

Tabela 3: Parâmetros fotossintéticos obtidos das curvas P-I normalizadas por chl-a e pelo número de células em cada uma das microalgas estudadas. Os valores representam a média de 4 experimentos independentes \pm desvios padrões (n=4). Chl-a: Clorofila-a; α : coeficiente angular; P_m : fotossíntese máxima; I_k : irradiância de saturação da fotossíntese.

Troca Líquida de O ₂			
Cultura	Índices	normalização por chl-a	normalização por 10 ⁻⁹ células
<i>P. tricornutum</i>	α^a	1,04 \pm 0,18	0,53 \pm 0,06
	P_m^b	435,38 \pm 47,68	177,82 \pm 16,54
	I_k^c	462,31 \pm 84,55	387,61 \pm 32,69
<i>I. galbana</i>	α^a	1,38 \pm 0,11	0,42 \pm 0,04
	P_m^b	1053,50 \pm 85,33	308,92 \pm 27,41
	I_k^c	763,22 \pm 71,13	686,62 \pm 31,36
<i>Rhodomonas</i> sp.	α^a	1,03 \pm 0,18	1,22 \pm 0,14
	P_m^b	441,39 \pm 40,96	553,57 \pm 50,26
	I_k^c	435,40 \pm 72,32	478,97 \pm 56,40
<i>T. gracilis</i>	α^a	1,05 \pm 0,17	4,30 \pm 0,29
	P_m^b	847,34 \pm 101,81	3618,75 \pm 195,85
	I_k^c	784,97 \pm 52,42	810,78 \pm 22,88

^a $[(\mu\text{mol O}_2).(\text{mg Chl-a})^{-1}.(\mu\text{mol fótons})^{-1}.\text{m}^2.(3600)^{-1}]$ ou $(\mu\text{mol O}_2).(10^{-9} \text{ células}).(\mu\text{mol fótons})^{-1}.\text{m}^2.(3600)^{-1}]$

^b $[(\mu\text{mol O}_2).(\text{mg Chl-a})^{-1}.\text{h}^{-1}]$ ou $(\mu\text{mol O}_2).(10^{-9} \text{ células}).\text{h}^{-1}]$

^c $(\mu\text{mol fótons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1})$

O cultivo da diatomácea *C. meneghiniana* sob condições flutuantes de iluminação resultou em valores de, aproximadamente, 380 $\mu\text{mol O}_2.\text{mg Chl-a}.\text{h}^{-1}$ (P_m), 1,3 $[(\mu\text{mol O}_2).(\text{mg Chl-a})^{-1}.(\mu\text{mol fótons})^{-1}.\text{m}^2.(3600)^{-1}]$ (α) e 280 $\mu\text{mol fótons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (I_k) quando a curva P-I foi normalizada por clorofila (Blache e col., 2011). O cultivo de *Rhodomonas* sp. nas mesmas condições que as utilizadas neste trabalho resultou em valores equivalentes aos aqui descritos: $P_m = 224 \mu\text{mol O}_2.\text{mg Chl-a}.\text{h}^{-1}$; $\alpha = 0,48 [(\mu\text{mol O}_2).(\text{mg Chl-a})^{-1}.(\mu\text{mol fótons})^{-1}.\text{m}^2.(3600)^{-1}]$ e $I_k = 469 \mu\text{mol fótons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Quando normalizada por número de células, a curva P-I também apresentou valores próximos aos aqui reportados: $P_m = 418 \mu\text{mol O}_2.10^{-9} \text{ células}.\text{h}^{-1}$; $\alpha = 0,90 [(\mu\text{mol O}_2).(10^{-9} \text{ células}).(\mu\text{mol fótons})^{-1}.\text{m}^2.(3600)^{-1}]$ e $I_k = 469 \mu\text{mol fótons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Silva, 2008).

5.3.2. Curva Rápida de Luz

A figura 14 apresenta as variações da taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) através do PS-II em função de diferentes intensidades de luz. A partir dessas curvas (RLCs) foram estimados os parâmetros relacionados com a eficiência fotossintética (α) e com a taxa fotossintética máxima ($rETR_{\text{máx}}$), bem como o índice de saturação luminosa (I_k), apresentados na tabela 4. Assim como as curvas P-I, as RLCs avaliam a atividade fotossintética em função das irradiâncias e parecem similares às curvas P-I tradicionais, embora não sejam nem devam ser interpretadas como tal. Em uma situação onde a incidência de luz está flutuando rapidamente, as RLCs fornecem uma avaliação segura da atividade fotossintética, integrando a habilidade da planta em tolerar flutuações luminosas, bem como refletindo, de imediato, seu histórico luminoso a curto prazo. Ao contrário das curvas P-I, as RLCs não atingem o estado estacionário durante o pequeno período de tempo (10s) sob iluminação actínica. Assim, as respostas de uma RLC indicam o estado atual da fotossíntese e não o estado ideal como em uma curva P-I que não dependente do histórico de luz (Ralph e Gademann, 2005).

As RLCs podem ser divididas em 3 regiões distintas: a de limitação pela luz, onde o aumento da irradiância acarreta um aumento linear da fotossíntese; a de saturação pela luz, onde a fotossíntese não é influenciada pelo aumento da intensidade luminosa, e a de diminuição da atividade de transporte de elétrons, onde se observa fotoproteção. A inclinação inicial da curva (α) é proporcional à eficiência de captura e de utilização da energia luminosa (rendimento efetivo), sendo obtida na região onde se observa linearidade entre $rETR$ e PAR (em irradiâncias mais baixas). Sob altas irradiâncias, a capacidade de fixação de CO_2 limita o fluxo de elétrons através do PS-II, e a curva adquire forma de um platô, onde ocorre o máximo da fotossíntese ($rETR_{\text{máx}}$), sendo a irradiância de saturação de luz (I_k) determinada a partir da divisão de $rETR_{\text{máx}}$ por α . O parâmetro I_k traz informações sobre o tipo de utilização da energia absorvida, na medida em que a fotoquímica predomina na região abaixo de I_k e a dissipação não fotoquímica predomina na região acima de I_k . Com a incidência de irradiâncias ainda mais altas, os valores de $rETR$ tendem a um declínio. Nas curvas P-I tradicionais, esse declínio é geralmente associado com a fotoinibição, no entanto, em RLCs esse declínio pode ser associado uma dinâmica de “*down-regulation*”, ou de fotoproteção do PS-II, visto que pequeno período de tempo de exposição à luz seria insuficiente para ocorrência de fotodano (Ralph e Gademann, 2005).

Além de apresentarem a maior taxa de $rETR$, *T. gracilis* e *I. galbana* apresentaram perfis de RLC semelhantes ($p > 0,05$), resultando em valores de $rETR_{\text{máx}}$,

α e I_k essencialmente iguais ($p > 0,05$), sendo que o índice de saturação por luz em *P. tricornutum* foi da mesma ordem de grandeza que o observado para as duas microalgas anteriores ($p > 0,05$). Em contrapartida, *Rhodomonas* sp. apresentou um uso ineficiente da luz em altas irradiâncias (baixos valores de $rETR_{m\acute{a}x}$ e de I_k) e uma alta eficiência fotossintética (alto valor de α). As RLCs obtidas com as diatomáceas *C. meneghiniana* (Blache e col., 2011) e *P. tricornutum* (Ma e col., 2011) proporcionaram valores de $rETR_{m\acute{a}x}$, α e I_k em torno de 120 e 69 $\mu\text{mol el\acute{e}trons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de 0,33 e 0,28 $\mu\text{mol el\acute{e}trons.}\mu\text{mol f\acute{o}tons}^{-1}$ e de 360 e 1700 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Os valores de PAR deveriam ser correspondentes aos valores realmente absorvidos e não aos valores nominais. O fator de absortividade (A_f), correspondente à porcentagem de luz absorvida pela folha, pode ser determinado experimentalmente e seu uso é uma condição essencial para o cálculo da taxa de transporte de elétrons absoluto (Silva e Santos, 2004). De acordo com Blache e col. (2011) a fração de radiação absorvida (A_f) irá diferir drasticamente em células com diferentes propriedades ópticas, como é o caso das microalgas utilizadas neste estudo. Cabe assinalar que utilizou-se o valor de $A_f = 0,84$ (encontrado para vegetais superiores; Genty e col., 1989) no cálculo de $rETR$ das quatro espécies aqui estudadas. Adicionalmente, Blache e col. (2011) mostraram que os valores de α e $rETR_{m\acute{a}x}$ obtidos a partir das RLCs dependem fortemente da absortividade celular específica, não podendo ser usados para comparar a performance fotossintética de células com diferentes propriedades ópticas, enquanto I_k é independente da absortividade celular e pode ser usado para comparar amostras com propriedades ópticas desconhecidas.

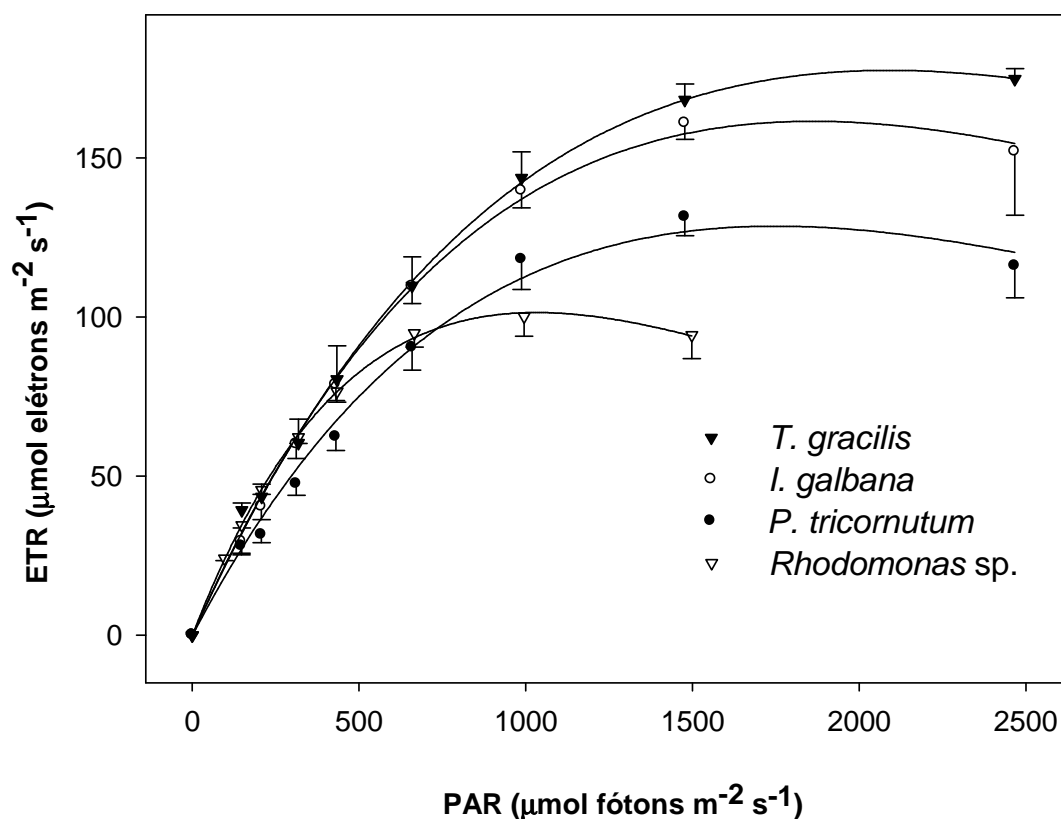


Figura 14: Curvas rápidas de luz das espécies *P. tricorutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas sp.* e *T. gracilis*. Cada ponto representa a média de 3 a 4 experimentos independentes ($3 \leq n \leq 4$) e as barras verticais representam o desvio padrão. Cada curva representa o ajuste obtido pelo modelo proposto por Platt e colaboradores (1980).

Tabela 4: Parâmetros fotossintéticos das RLCs encontrados para *P. tricorutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas sp.* e *T. gracilis*. Os valores representam a média de 3 a 4 experimentos independentes ($3 \leq n \leq 4$). α : coeficiente angular; $rETR_{\text{máx}}$: taxa máxima relativa de transporte de elétrons; I_k : irradiância de saturação da fotossíntese.

Curva Rápida de Luz			
Cultura	^a α	^b $rETR_{\text{máx}}$	^c I_k
<i>P. tricorutum</i>	0,18 ± 0,01	160,13 ± 6,74	898,10 ± 53,26
<i>I. galbana</i>	0,24 ± 0,01	199,62 ± 18,31	823,18 ± 103,59
<i>Rhodomonas sp.</i>	0,29 ± 0,01	106,89 ± 10,45	383,90 ± 35,96
<i>T. gracilis</i>	0,24 ± 0,01	201,24 ± 12,58	833,76 ± 75,05

^a($\mu\text{mol elétron. } \mu\text{mol fótons}^{-1}$); ^b($\mu\text{mol elétron.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e ^c($\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

Processos que relaxam após poucos minutos de cessada a iluminação podem ser considerados fotoproteção ou ainda fotoinibição dinâmica. Já os processos que relaxam após um longo período (horas) são geralmente conhecidos como fotoinibição crônica. É importante notar que o termo fotoinibição, quando aplicado para análises de fluorescência, geralmente se refere tanto a processos de proteção quanto de dano aos centros de reação do PS-II (Maxwell e Johnson, 2000). A proteção do aparato fotossintético contra o fotodano causado pela exposição a altas irradiâncias, geralmente está associada a processos que consomem e/ou dissipam energia. Mecanismos rápidos capazes de interconverter formas distintas de pigmentos, como os carotenoides, diminuem a possibilidade de fotoinibição por possibilitarem a dissipação do excesso de luz incidente. O ciclo das xantofilas é um dos mecanismos fotodissipativos que envolve a interconversão de carotenoides. Nesse ciclo, a xantofila violaxantina é convertida em anteraxantina e, a seguir, em zeaxantina com o aumento da irradiância em poucos minutos. A remoção de dois oxigênios funcionais presentes na anteraxantina por deepoxidação resulta no aumento de 9 para 11 duplas ligações conjugadas na molécula de zeaxantina, que facilita a absorção da energia de excitação do estado singlete da clorofila-a, dissipando, desta maneira, o excesso de luz (Deming-Adams e Adams, 1996).

A literatura especializada tem enfatizado a existência de diferentes caminhos de dissipação da energia de excitação da clorofila, que são competitivos entre si: a dissipação fotoquímica, que resulta no transporte fotossintético de elétrons, e a não fotoquímica, que resulta na emissão de fluorescência e emissão não radiativa na forma de calor (Krause e Weis, 1991; Schreiber e col., 1995; Ralph e Gademann, 2005; Klughammer e Schreiber, 2008). Segundo esses últimos autores, enquanto o rendimento efetivo do PS-II (ϕ_{II}) fornece indicações da quantidade de energia usada na fotoquímica, a extinção não fotoquímica pode ser obtida através da determinação dos seus rendimentos quânticos constituintes: o rendimento quântico da dissipação não fotoquímica resultante dos mecanismos regulatórios de fotoproteção (ϕ_{NPQ}) e o resultante de processos constitutivos de perda (ϕ_{NO}).

A figura 15 apresenta os rendimentos ϕ_{II} , ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO} calculados a partir das RLCs. Inicialmente, o aumento da irradiância promove uma diminuição de ϕ_{II} e aumento de ϕ_{NO} por conta do fechamento dos centros de reação e consequente dissipação de energia na forma de fluorescência. A diminuição progressiva de ϕ_{II} com a continuidade do aumento da irradiância é resultado do aparecimento e aumento progressivo do ϕ_{NPQ} ao mesmo tempo em que ϕ_{NO} estabiliza, ou mesmo diminui, indicando o desenvolvimento de um mecanismo fotoprotetor de dissipação não fotoquímica da energia de excitação.

Observa-se na figura 15 que o valor de ϕ_{NPQ} correspondente à irradiância de $1500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi maior para *Rhodomonas* sp., seguido por *P. tricornutum*, *I. galbana* e por fim *T. gracilis*. Na medida em que taxa de rETR \u00e9 decorrente da efici\u00eancia de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (ϕ_{II}) e que os rendimentos qu\u00e2nticos fotoqu\u00edmico (ϕ_{II}) e n\u00e3o fotoqu\u00edmico (ϕ_{NPQ} e ϕ_{NO}) s\u00e3o complementares, *Rhodomonas* sp. apresentou a menor rETR $1500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ devido \u00e0 maior ocorr\u00eancia da dissipa\u00e7\u00e3o n\u00e3o fotoqu\u00edmica da energia absorvida pelo PS-II. Estas mesmas considera\u00e7\u00f5es s\u00e3o evidenciadas pela microalga *P. Tricornutum* em maiores valores de irradi\u00e2ncia.

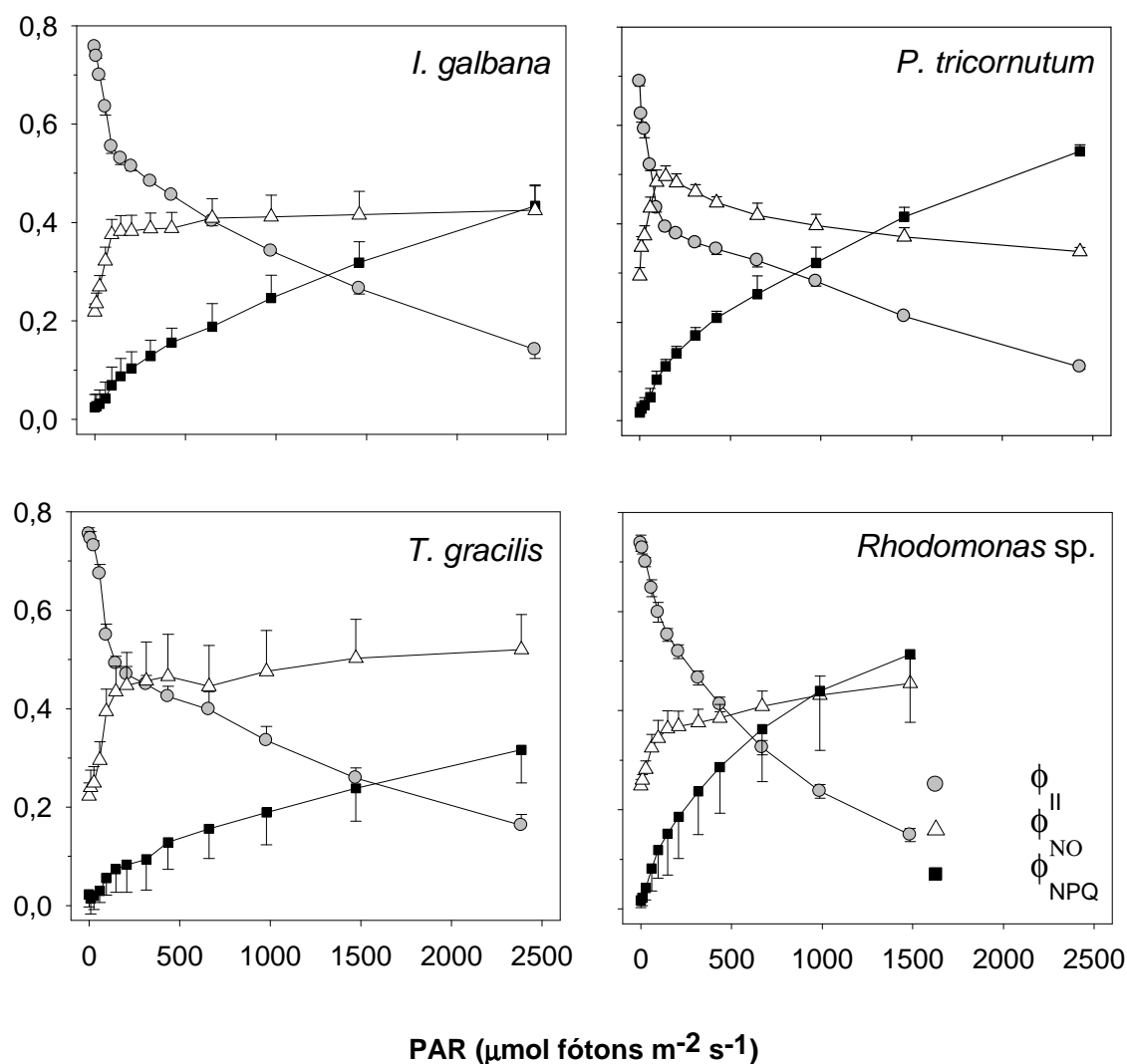


Figura 15: Rendimentos qu\u00e2nticos de utiliza\u00e7\u00e3o da energia de excita\u00e7\u00e3o do PS-II atrav\u00e9s da dissipa\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (ϕ_{II}), da dissipa\u00e7\u00e3o n\u00e3o fotoqu\u00edmica regulada (ϕ_{NPQ}) e da dissipa\u00e7\u00e3o n\u00e3o fotoqu\u00edmica n\u00e3o regulada (ϕ_{NO}) em *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis*. Cada ponto representa a m\u00e9dia de 3 a 4 experimentos independentes ($3 \leq n \leq 4$) e as barras verticais representam os desvios padr\u00f5es.

5.4. Comparação entre os métodos de polarografia e de fluorescência

Apesar do rendimento quântico do PS-II ser intimamente relacionado com a produção de O₂, um número relevante de etapas fisiológicas ocorre entre esses dois eventos mensuráveis. Cada etapa é condicionada pela etapa anterior, e as dissipações de energia ocorrem ao longo dos processos (Silva e Santos, 2004). Estudos de comparação de medidas de produção primária têm sido feitos usando diferentes metodologias, principalmente entre captura de carbono (C¹⁴), ETR (fluorescência da clorofila-a) e produção de oxigênio (eletrodos de O₂). Para validar as medidas de ETR como estimativa confiável da produção fotossintética efetiva requer-se que uma correlação linear significativa entre a produção de O₂ e ETR seja demonstrada, além de também comprovar a razão molar de 0,25 entre os dois métodos (Silva e Santos, 2004). A intenção do presente estudo foi verificar a correlação entre os métodos de fluorescência da clorofila-a e produção de O₂, bem como a região de correlação entre as curvas. Medidas de rETR não podem ser diretamente convertidas em valores absolutos de taxa fotossintética (Gilbert e col., 2000). Segundo Gilbert e col., medidas de rETR somente podem ser convertidas em valores absolutos de taxa fotossintética com informações confiáveis de Af. No entanto, como a intenção deste trabalho foi verificar se existe correlação entre os métodos, e não comprovar a razão esperada teoricamente, utilizou-se para Af um valor igual a 0,84, obtido por Genty e col. (1989) para vegetais superiores. Com esse objetivo, plotou-se em um gráfico os valores de rETR contra os de produção de O₂ (normalizado tanto por células quanto por clorofila-a), sendo cada ponto formado por medidas correspondentes a valores semelhantes de irradiâncias, obtidos para cada espécie. No entanto, como as medidas de produção de O₂ e rETR não foram feitas simultaneamente em um mesmo sistema, as condições luminosas não foram exatamente idênticas em cada ponto. Contudo, uma relação linear foi observada ($R^2 \geq 0,98$) entre as taxas médias de produção de oxigênio por clorofila-a (valores positivos) e a taxa de transporte de elétrons, obtidas em diversas irradiâncias (figura 16). A microalga *P. tricornutum* apresentou linearidade entre 25 e 800 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *I. galbana* entre 70 e 1400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que *Rhodomonas* sp. entre 70 e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e *T. gracilis* entre 25 e 1400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Da mesma forma uma relação linear ($R^2 \geq 0,98$) foi obtida entre as taxas médias de produção de oxigênio por células (valores positivos) e a taxa de transporte de elétrons (figura 17). A microalga *P. tricornutum* apresentou linearidade entre 25 e 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *I. galbana* entre 70 e 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que *Rhodomonas* sp. entre 140 e 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e *T. gracilis* entre 50 e 2500 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Estudos realizados por Gilbert e col. (2000) com quatro espécies representativas do fitoplâncton mostraram que os dois métodos foram equivalentes em escala absoluta apenas na região correspondente à inclinação inicial (α) das curvas. Lefebvre e col. (2007) observaram uma correlação linear entre as duas técnicas, estudando a diatomácea *Skeletonema costatum*, mesmo em irradiâncias de saturação, sendo que nenhuma das curvas, P-I ou RLC, apresentou fotoinibição. Silva e Santos (2004) encontraram linearidade ao correlacionar a produção de O₂ com ETR medidos para *Zostera noltii*, uma grama marinha, em uma razão molar de 0,15, menor do que a taxa teórica de 0,25 de O₂ produzido por elétron (4 elétrons são transportados para cada mol de O₂ produzido).

Finalmente, o presente estudo mostra que a atividade fotossintética estimada através da fluorescência da clorofila reflete informações similares às baseadas na produção de oxigênio, em intervalos de intensidade luminosa particulares para cada espécie. Enquanto *P. tricornutum*, *I. galbana* e *Rhodomonas* sp. apresentaram correlação linear na região limitada por luz e não linear em irradiâncias saturantes, *T. gracilis* apresentou linearidade em ambas as regiões. Essa correlação traz grandes vantagens na medida em que as análises realizadas por meio da fluorescência da clorofila-*a* apresentam respostas imediatas, enquanto que a execução experimental requerida para a determinação da produção fotossintética de O₂ é mais demorada, envolvendo inclusive o preparo de amostras.

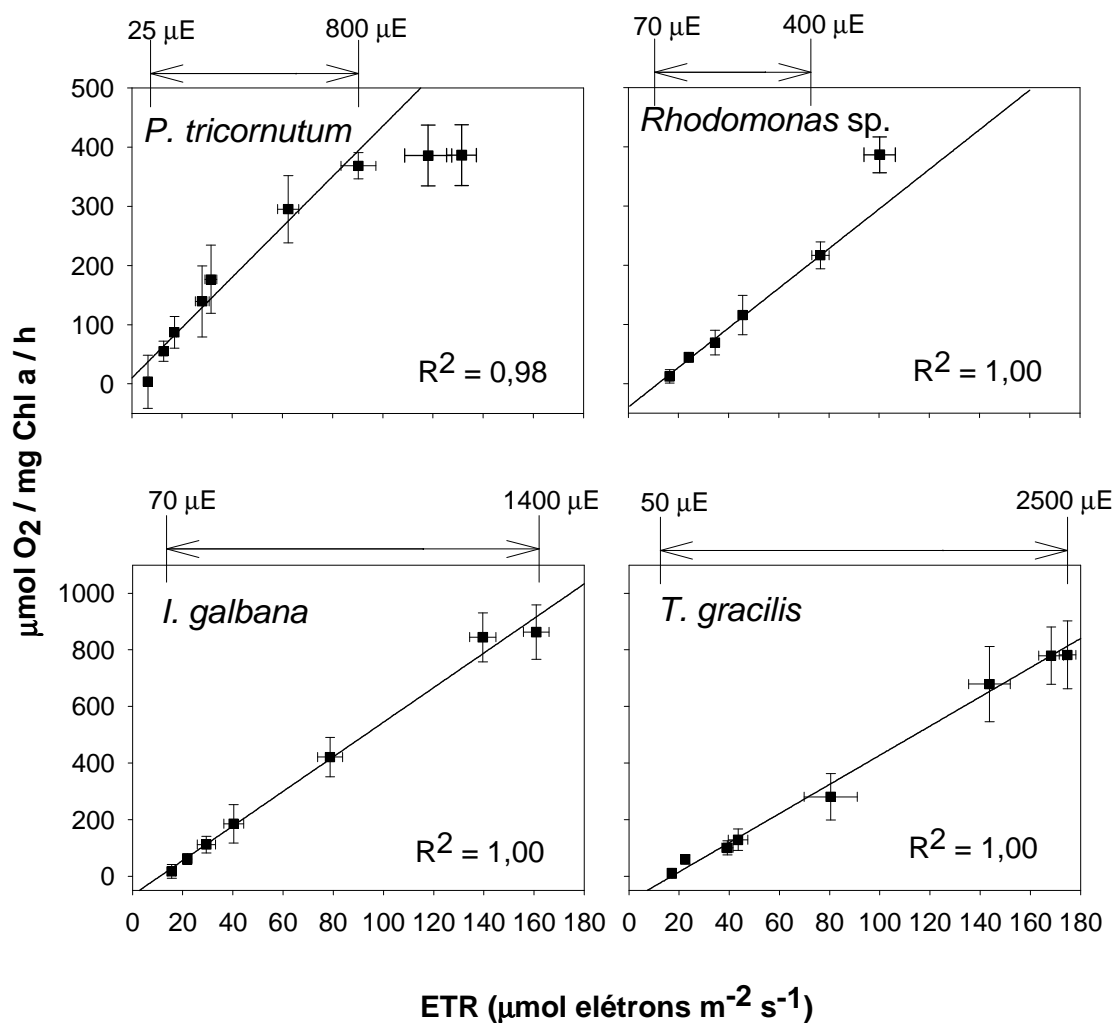


Figura 16: Valores médios de produção de oxigênio normalizado pelo conteúdo de clorofila-a versus taxa de transporte de elétrons medidos para as espécies *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas sp.* e *T. gracilis*. As barras representam os desvios padrões em cada ponto e as irradiancias aumentam da esquerda para a direita, variando entre 25 e 1400 $\mu\text{mol f} \ddot{\text{o}}\text{tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

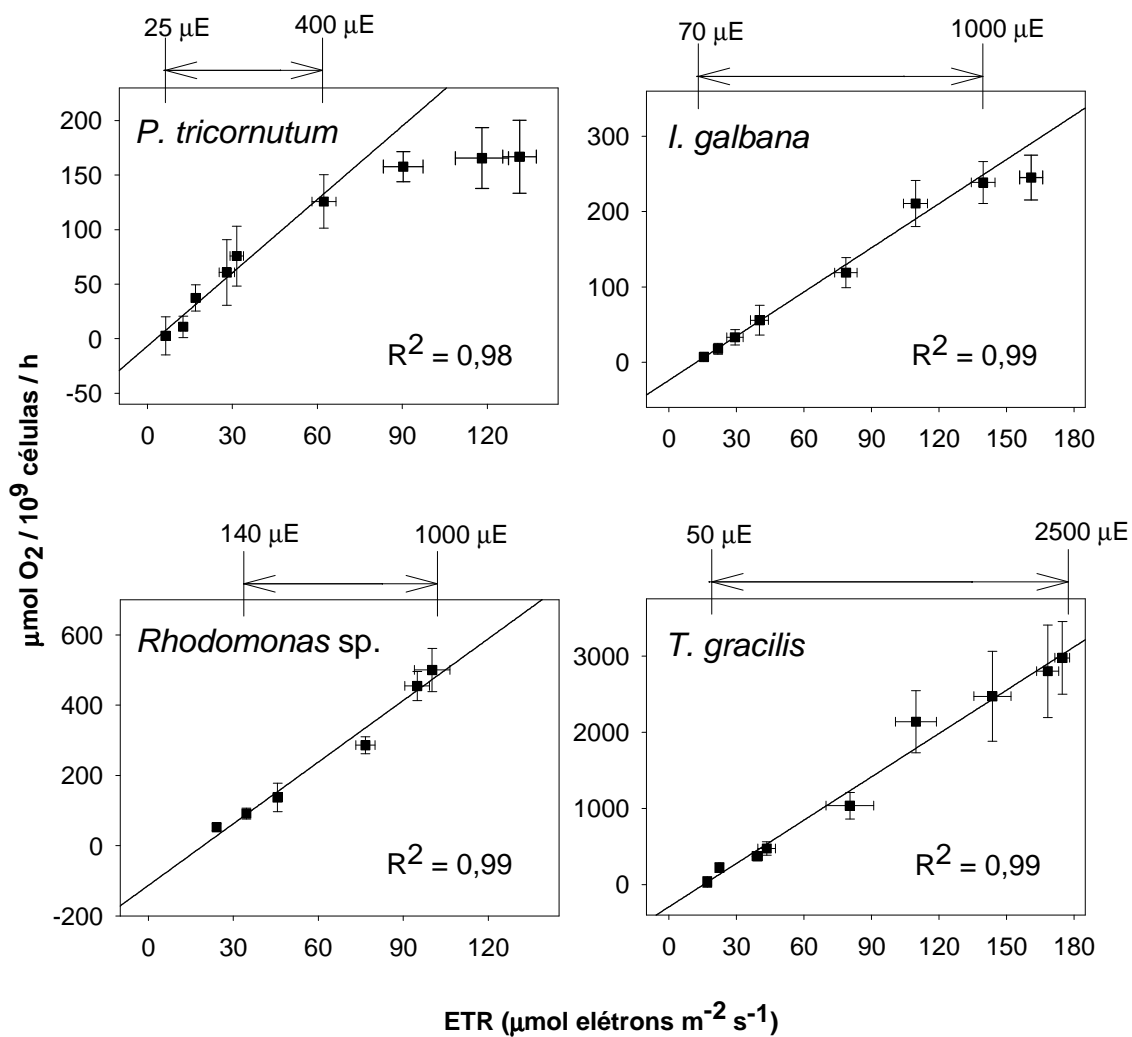


Figura 17: Valores médios de produção de oxigênio normalizado pelo número de células versus taxa de transporte de elétrons medidos para as espécies *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Rhodomonas sp.* e *T. gracilis*. As barras representam os desvios padrões em cada ponto e as irradiâncias aumentam da esquerda para a direita, variando entre 25 e 2500 $\mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

6. CONCLUSÕES

- O crescimento fotoautotrófico das microalgas *P. tricornutum* e *I. galbana* apresentou maior taxa de crescimento e rendimento celular mais alto do que *Rhodomonas* sp. e *T. gracilis*;
- *T. gracilis* apresentou a melhor performance fotossintética (maior α e maior P_m) quando a atividade fotossintética foi normalizada tanto pelo número de células como pelo teor de clorofila-a;
- Os maiores teores de clorofila-a e clorofila acessória foram observados em *T. gracilis*, enquanto *I. galbana* apresentou os menores teores de clorofila-a e clorofila acessória;
- Quando a atividade fotossintética foi normalizada pelos teores de clorofila-a, *I. galbana*, juntamente com *T. gracilis*, apresentou a maior taxa de produção de oxigênio (P_m), bem como maior índice de saturação por luz (I_k);
- *P. tricornutum* apresentou menor performance fotossintética quando a atividade fotossintética foi expressa em termos de produção de oxigênio;
- *T. gracilis* e *I. galbana* apresentaram perfis de RLC semelhantes e as maiores taxas de $rETR_{m\acute{a}x}$. Cabe mencionar que o menor rendimento de fotoproteção foi evidenciado em *T. gracilis*;
- Os baixos valores de I_k apresentados por *Rhodomonas* sp., tanto através da troca líquida de oxigênio como também pela fluorescência da clorofila-a, indicam uma baixa eficiência do uso de altas irradiâncias;
- A atividade fotossintética estimada através da fluorescência da clorofila reflete informações similares às baseadas na produção de oxigênio em intervalos de intensidade luminosa particulares para cada espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidar, E., Gíanesella-Galvão, S.M.F., Sigaud, T.C.S., Asano, C.S., Liag, T.H., Rezende, K.R.V., Oishi, M.K., Aranha, F.J., Milani, G.M. e Sandes, M.A.L., 1994. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180: 175-187.
- Beer, S. e Ilan, M., 1998. *In situ* measurements of photosynthetic irradiance responses of two Red Sea sponges growing under dim light conditions. *Mar. Biol.* 131: 613-617.
- Blache, U., Jakob, T., Su, W., Wilhelm, C., 2011. The impact of cell-specific absorption properties on the correlation of electron transport rates measured by chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen production in planktonic algae. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 801-808.
- Bolh ar-Nordenkamp, H.R. e Oquist, G., 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. Em: "Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a Field and laboratory manual" (Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolh ar – Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. & Long, S.P eds.). Chapman & Hall, London, p. 193-206.
- Chalker, B.E., 1981. Simulating Light-Saturation Curves for Photosynthesis and Calcification by Reef-Building Corals. *Mar. Biol.*, 63, 135-141.
- Chaloub, R.M., 2005. Efeitos tóxicos do zinco sobre o fotossistema II da cianobactéria *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis*. Tese de doutorado, Instituto de Química, UFRJ, 110p. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
- Coutinho, R. e Zingmark, R., 1987. Diurnal photosynthetic responses to light by macroalgae. *J. Phycol.* 23:336-343.
- Deming-Adams, B. e Adams, W.W., 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends. Plant Sci.* 1(1):21-26.
- Falkowski, P.G. e Raven, J.A., 2007. Aquatic Photosynthesis. Princeton, Princeton University Press.
- Fracheboud, Y., e Leipner, J., 2003. The application of chlorophyll Fluorescence to study light, temperature and drought stress. Em: "Practical of chlorophyll Fluorescence in Plant Biology" (DeEll, J.R. & Toivonen, P.M.A., eds.). Chapter 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Geider, R.J. e Osborne, B.A., 1991. Algal Photo-synthesis: the measurement of algal gas exchange. Chapman and Hall, New York, 256p.
- Genty, B., Briantais, J.-M. e Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990:87-92.
- Gilbert, M., Wilhelm, C. e Richter, M., 2000. Bio-optical modeling of oxygen evolution using *in vivo* fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P-I) curves in four representative phytoplankton species. *J. Plant Physiol.* 157: 307-314.

- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Em: W.L. Smith e M.H. Chanley (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals. New York, pp. 29-60.
- Hall, D.O. e Rao, K.K., 1994. Photosynthesis. 5^a ed. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 211p.
- Henley, W.J., 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* 29: 729-739.
- Hipkins, M.F e Baker, N.R., 1986. Spectroscopy. Em: "Photosynthesis energy transduction: a practical approach" (Hipkins, M.F. & Baker, N.R. eds.). IRL Press Limited, England, 199p.
- Jeffrey, S.W. e Haxo, F.T., 1968. Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. *Biol. Bull.* 135:149-165.
- Jakob, T., Wagner, H., Stehfest, K. e Wilhelm, C., 2007. A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 58 8: 2101–2112.
- Jassby, A.D. e Platt, T., 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 21, 540–547.
- Klughammer, C. e Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany.
- Krause, H. e Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-349.
- Larkum, A.W.D., Douglas, S.E. e Raven, J.A., 2003. Advance in photosynthesis and respiration: Photosynthesis in algae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, vol. 14, 500p.
- Lawlor, D.W., 1987. Photosynthesis: metabolism, control and physiology. Longman Singapore Publishers, Singapore, 262p.
- Lee, R.E., 2008. Phycology. Cambridge, Reino Unido, 4^a ed., 547p.
- Lee, S.-J., Go, S., Jeong, G.T. e Kim, S.K., 2011. Oil Production from Five Marine Microalgae from the Production of Biodiesel. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 16:561-566.
- Lefebvre, S., Mouget, J.L., Loret, P., Rosa, F. e Tremlin, G., 2007. Comparison between fluorimetry and oximetry techniques to measure photosynthesis in the diatom *Skeletonema costatum* cultivated under simulated seasonal conditions. *Photochem. Photobiol.* 86, 131–139.
- Lindeman, R., 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23: 399-418.
- Lourenço, S.O. e Marques Jr., A.N., 2002. Produção primária marinha. Em: "Biologia Marinha" (Pereira, R.C. e Soares-Gomes, A. org.), Editora Interciência, Rio de Janeiro, 195-227p.

- Lourenço, S.O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas princípios e aplicações. Rima editora, São Paulo, 606p.
- Ma, Z., Gao, K., Li, W., Xu, Z., Lin, H e Zheng, Y., 2011. Impacts of chlorination and heat shocks on growth, pigments and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 397: 214–219.
- Maxwell, K. e Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51 (345): 659-668.
- Nelson, N. e Ben-Shen, A., 2004. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev.* 5: 1-12.
- Nogueira, D.P.K., 2011. Crescimento e acumulação de triacilgliceróis em diferentes microalgas marinhas. Trabalho de monografia, Instituto de Biologia, UFRJ, 39p. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
- Ohse, S., Derner, R.B., Ozório, R.A., Braga, M.V.C., Cunha, P., Lamarca, C.P. e Santos, M.E., 2008. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas* 21 (2):7-18.
- Osmond, C.B., 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. Em: Baker, N.R. & Bower, J.R. (Eds), *Photoinhibition of Photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, p. 1-24.
- Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38, 687–701.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., e Kriedemann, D.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975:384-394.
- Ralph, P. J. e Gademann, R., 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* 82: 222-237.
- Rigobelo-Masini, M., Aidar, E. e Masini, J.C., 2003. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). *Braz. J. Microbiol.* 34:267-272.
- Rowan, K.S., 1989. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press, Nova York, 334p.
- Schreiber, U., Bilger, W. e Neubauer, C., 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-invasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Em: Schulze ED, Calswell MM (eds.) *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, p. 49-70.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H. e Asada, K., 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 36:873-882.
- Silva, A.F., 2008. Respostas fisiológicas e fotossintéticas da microalga marinha *Rhodomonas* sp. (cryptophyceae) variações de luz e fontes de carbono. Tese de doutorado, Instituto de Química, UFRJ, 119p. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

- Silva, J. e Santos, R., 2004. Can chlorophyll fluorescence be used to estimate photosynthetic production in the seagrass *Zostera noltii*? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 307: 207-216.
- Taiz, L. e Zeiger, E., 2006. *Fisiologia Vegetal*. Artmed, São Paulo, 3ª ed., 721p.
- Veit W. and Govindjee, 2000. Sítio www.life.illinois.edu/govindjee/ZSchemeG.html acessado em maio de 2012.
- Walker, D., 1990. The use of the oxygen electrode and fluoresce probes in sample measurements of photosynthesis. Robert Hill Institute, University of Sheffield, Reino Unido, 203p.
- Wood, A.M., Everroad, R.C. e Wingard, L.M., 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. Em: "Algal Culturing Techniques" (Andersen, R.A. ed), Elsevier Academic Press, China, 269-285p.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. 3ª ed., Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, EUA, 920p.