

**“TRATAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS: CONTROLO DO  
CRESCIMENTO DE MICROALGAS”**

Andreina Sofia Nunes da Silva

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Tecnologia Ambiental*

Orientado por

Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes

Professora Doutora Ana Geraldes

**Bragança**

**2012**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes pela belíssima orientação, apoio, amizade e dedicação, estando sempre disponível para ouvir as minhas dúvidas e tecer palavras de incentivo, agradeço também pelos bons comentários e sugestões que me facultou durante todas as fases desta dissertação.

À co-orientadora Professora Ana Maria Geraldês, pela orientação prestada, pela partilha do seu saber, pelo apoio e sobretudo pela amizade.

Agradeço aos meus pais Adelino Silva e Manuela Silva, por toda a dedicação, pela minha educação, pelo amor, pela confiança que depositaram sempre em mim e pelo apoio incondicional e financeiro, sem eles este grande sonho não teria sido possível.

Agradeço a minha irmã Liliana, por todo o incentivo, pelo apoio incondicional, pela preocupação, carinho e amizade.

Ao meu namorado, José Costa, que me apoiou em todos os momentos, abraçou, acarinhou, sorriu, e que acima de tudo nunca me deixou, levantando-me sempre a moral e o ânimo.

Ao Doutor Alfredo Aires, da UTAD, pela inestimável ajuda na análise por HPLC dos compostos fenólicos;

À Doutora Anabela Martins, pela cedência e uso da câmara de cultura da Escola Superior Agrária;

À técnica do laboratório de Agro – Industrias, Maria do Céu Fidalgo, pelo apoio prestado, pelo carinho e pela amizade;

Às técnicas do laboratório de Biologia, Amélia e Isabel, pelo apoio demonstrado;

Aos meus amigos académicos e padrinhos de curso, por toda ajuda prestada durante o curso, pela amizade e carinho.

A todos os meus amigos, desde os mais próximos até aos mais distantes, os meus sinceros agradecimentos, pela amizade, carinho, e por me ouvirem e me terem estendido a mão sempre que precisei.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

## RESUMO

Os impactos provenientes das atividades humanas são uma ameaça constante aos sistemas aquáticos, levando, entre outras, a um excesso de nutrientes e/ou matéria orgânica (eutrofização). O fenómeno de eutrofização causa problemas económicos e ambientais, entre os quais uma alteração na produção primária e no equilíbrio dos organismos presentes, bem como na qualidade da água.

As medidas implementadas para o controlo de *blooms* fitoplanctónicos abrangem a aplicação de algicidas, como o sulfato de cobre, que apresenta muitas limitações, nomeadamente toxicidade para organismos não-alvo, ausência de efeito estável e persistência no meio. Interessa pois desenvolver novas tecnologias de controlo direto das populações de algas fitoplanctónicas, que sejam eficientes, de baixo custo e amigas do ambiente. Assim, no Laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária - IPB, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar a utilização de extractos vegetais no controlo do crescimento de microalgas.

Nesse contexto, o objetivo da presente dissertação foi dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos, averiguando se as diferentes épocas de colheita do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) têm influencia na composição do seu extrato aquoso e no seu potencial efeito algicida/algistático em culturas da clorófito, *Chlorella vulgaris*. Os ensaios foram desenvolvidos em culturas *batch*, tendo-se avaliado a influência de diferentes concentrações (10%, 25%, 30%) de extratos aquosos de alecrim (a frio e a quente), e a influência de diferentes tempos de extração (5 e 21 dias), no caso dos extratos a frio. O potencial algicida e/ou algistático foi avaliado, comparativamente ao controlo, pelo incremento celular, taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), teor em clorofila *a* (Chl *a*), teor em feopigmentos, percentagem de degradação da clorofila e teor em proteínas. A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos de alecrim foram feitas por HPLC, tendo sido analisados os extratos aquosos, resultantes de alecrim colhido em Abril e testados neste estudo (a frio e a quente) e a decocção (extrato aquoso da hidrodestilação) resultante de alecrim colhido em Setembro e testado anteriormente pela equipa de investigação.

Os resultados mostram que dos extratos a frio, só o de 21 dias de extração afeta o crescimento da *C. vulgaris*, levando ao aumento de  $\mu$ , em função da concentração de

extrato testada, e ao aumento da densidade celular e do teor em Chl *a*. Os picos nos valores da proteína (pg/célula) observados nas culturas expostas a 25% e 30% de extrato com 21 dias poderão ser o resultado de uma resposta metabólica necessária para a degradação dos compostos presentes nestes extratos, sugerindo a presença de maior concentração e/ou existência de compostos que podem funcionar como suplemento nutricional, comparativamente aos extratos com 5 dias.

Também a presença de extrato aquosos de alecrim a quente aumentou a  $\mu$  e a densidade celular final da *C. vulgaris*. No entanto, quer os valores da Chl *a*, quer os valores da proteína são inferiores comparativamente aos valores do controlo, sugerindo efeitos tóxicos provavelmente advindos da presença de novos compostos e/ou do aumento da concentração de compostos, comparativamente ao extrato a frio de alecrim.

Os compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos são diferentes qualitativa e quantitativamente. No extrato de alecrim obtido a frio, foi quantificado o ácido rosmarínico e a quercetina e apesar destes compostos apresentarem ação antibacteriana, os resultados observados podem dever-se às concentrações testadas estarem abaixo da concentração inibitória, das diferentes vias metabólicas nos eucariotas e de condições de cultura que atenuem/revertam o efeito tóxico destes compostos.

O extrato a quente apresenta mais variedade de compostos fenólicos, já que foram identificados e quantificados 7 compostos distintos, sendo maioritário o ácido rosmarínico e o ácido gálico. O aumento da  $\mu$  da *C. vulgaris*, na presença destes extratos, aparentemente dependente da concentração testada, poderá ser devido à presença de mais variedade de compostos que atuam como substratos suplementares. Por outro lado, as baixas concentrações dos compostos fenólicos nestes extratos, comparativamente à decocção (anteriormente testada), não são suficientes para manifestar o potencial efeito algistático e/ou algicida.

Comparativamente ao extrato de alecrim a quente, a decocção do alecrim apresenta sempre maior concentração de compostos fenólicos, com um fator que variou de 7 a 58. Tendo em conta o perfil quantitativo de compostos fenólicos encontrado nestes dois tipos de extratos (a quente e decocção), coloca-se a hipótese de que os efeitos algistáticos anteriormente observados com a decocção se deverem à elevada concentração dos compostos, confirmando a ideia de que o grau de inibição/estimulo do

crescimento de microalgas mostra relação com a concentração de compostos fenólicos. Esta diferença na composição em fenólicos poderá maioritariamente dever-se ao efeito da sazonalidade, já que para o extrato a quente foi usado alecrim colhido em Abril e para a decocção alecrim colhido em Setembro.

Serão necessários mais trabalhos para saber de que modo a sazonalidade do alecrim influencia o perfil quantitativo e qualitativo dos compostos fenólicos e consequentemente o potencial efeito algicida/algistático.

**Palavras-chave:** efeito algicida/algistático, extratos de alecrim, compostos fenólicos, *Rosmarinus officinalis*, *Chlorella vulgaris*

## ABSTRACT

The impacts of human activities are a constant threat to aquatic systems, leading, among other things, to an excess of nutrients and/or organic matter (eutrophication). The phenomenon of eutrophication causes economic and environmental problems, including a change in primary production and in the aquatic organism equilibrium, influencing the water quality.

The measures implemented to control the planktonic *blooms* comprise the use of algicides such as copper sulfate, which has many limitations, including toxicity to non-target organisms, no stable effect and persistence in the environment. It is important to develop new technologies for direct control of populations of phytoplankton being efficient, inexpensive and environmentally friendly. Thus, at the Laboratory of Aquaculture School of Agriculture - IPB, studies are being developed to evaluate the use of plant extracts in controlling microalgae growth.

In this context, the aim of this study was to pursue the previous work, examining the impact of seasonality of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in the composition of their aqueous extracts and its potential effect as an algaecide in cultures of *Chlorella vulgaris*.

The tests were conducted in *batch* cultures, and we evaluated the effect of different concentrations of aqueous extracts of rosemary (10%, 25%, 30%), different kind of extraction (cold and hot) and the influence of different extraction times (5 and 21 days), in the case of cold extracts. The potential algaecide was evaluated by cellular increase, specific growth rate ( $\mu$ ), content of chlorophyll (Chl *a*), phaeopigments content, percentage of degradation of chlorophyll and protein content. The identification and quantification of the phenolic compounds present in aqueous extracts was carried out by HPLC. The extracts analysed include the rosemary harvested in April and tested in this study (cold and hot extract) and decoction (aqueous extract of hydrodistillation) resulting from rosemary harvested in September and previously tested by the research team.

The results showed that, between cold extracts, only the one with 21 days of extraction, affected the growth of *C. vulgaris*, leading to an increase in  $\mu$ , as a function of extract concentration. The increase in cell density and in Chl *a* content was also observed. The peaks of protein content (pg/cell) observed in cultures exposed to 25%

and 30% of extract with 21 days, may be the result of a metabolic answer induced by compounds present in these extracts, suggesting the presence of compounds which can act as a nutritional supplement.

Also the presence of hot extract increased  $\mu$  and final cell density of *C. vulgaris*. However, values of both, Chl *a* and protein, are lower when compared to control values, suggesting toxicity, probably arising from the presence of increasing concentration of compounds and/or from new compounds, compared to the cold extract.

The phenolic compounds present in aqueous extracts are qualitatively and quantitatively different. In rosemary cold extract it was quantified quercetin and rosmarinic acid. Despite antibacterial action of these compounds, the observed results may be due to lower concentrations tested (below the inhibitory concentration), or because different metabolic pathways in eukaryotes, or from culture conditions that attenuate/revert toxic effect of these compounds.

The hot extract presented more variety of phenolic compounds, seven different compounds were identified, the majority being rosmarinic acid and gallic acid. The increase in  $\mu$  of *C. vulgaris* observed in cultures with these extracts could be related with tested concentration and to the presence of more variety of compounds that act as additional substrates. Moreover, lowest concentration of phenolic compounds in these extracts, compared with decoction (previously tested), were not enough to express the potential algaecide effect.

Compared to the hot extract, decoction showed higher concentration of phenolic compounds, with a factor that ranged from 7 to 58. Regarding to the quantitative profile of phenolic compounds, found in these two types of extracts (hot and decoction), there is the possibility that the effects observed previously with the decoction were due to high concentration of compounds, confirming the notion that the degree of inhibition/stimulation of microalgae growth shows a relationship with the concentration of compounds phenolics. The difference in phenolic composition may be mostly due to the effect of harvest seasonality.

**Keywords:** algaecide/algaestatic effect, rosemary extracts, phenolic compounds, *Rosmarinus officinalis*, *Chlorella vulgaris*.

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE GERAL .....</b>	<b>VII</b>
<b>INDICE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. ENQUADRAMENTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
2.1. Eutrofização .....	3
2.2. Caracterização de <i>Chlorella vulgaris</i> (Beijerinck 1890) .....	7
2.3. Caracterização de <i>Rosmarinus officinalis</i> (L.).....	8
2.4. Objetivos .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1. Microalga utilizada .....	11
3.2. Extratos aquosos .....	12
3.2.1. Amostragem do alecrim .....	12
3.2.2. Obtenção dos extratos aquosos .....	13
3.3. Ensaio em Culturas <i>batch</i> .....	14
3.3.1. Avaliação da Densidade Celular.....	15
3.3.2. Quantificação dos pigmentos fotossintéticos .....	16
3.3.3. Quantificação das proteínas.....	17

3.4. Identificação dos Compostos Fenólicos nos Extratos Aquosos.....	17
3.4.1. Condições cromatográficas .....	18
3.5. Análise Estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
4.1. Ensaíos com extratos aquosos.....	20
4.1.1. Extrato aquoso a frio .....	20
4.1.2. Extrato aquoso a quente .....	30
4.2. Compostos Fenólicos nos Extratos Aquosos .....	38
<b>5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## INDICE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Processo de eutrofização - progressão de oligotrófico para eutrófico. ....	4
<b>Figura 2.2</b> Esquema da estratificação térmica em sistemas aquáticos. ....	5
<b>Figura 2.3</b> Aspeto da <i>C. vulgaris</i> ao microscópio ótico .....	8
<b>Figura 2.4</b> Flor de alecrim ( <i>Rosmarinus officiinalis</i> ) .....	9
<b>Figura 3.1</b> Manutenção de culturas em laboratório; A- Cultura em meio de Walne modificado com fluxo de ar; B- Cultura em meio de Walne modificado ..	12
<b>Figura 3.2</b> Alecrim recolhido: flores, folhas e caule .....	13
<b>Figura 3.3</b> Preparação do alecrim para a obtenção dos extratos aquosos .....	13
<b>Figura 3.4</b> Aspeto inicial da solução de alecrim para obtenção de extrato aquoso a quente .....	14
<b>Figura 3.5</b> Esquema representativo da metodologia usada com os ensaios .....	15
<b>Figura 4.1.</b> Curvas de crescimento para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	21
<b>Figura 4.2.</b> Culturas <i>batch</i> de <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração. ....	22
<b>Figura 4.3.</b> Curvas de crescimento para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	23
<b>Figura 4.4.</b> Culturas <i>batch</i> de <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração. ....	24

<b>Figura 4.5.</b> Variação da concentração da Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ), para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio com 5 dias de extração (1º Ensaio). .....	25
<b>Figura 4.6.</b> Variação da concentração da Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ), para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações aquosas de alecrim a frio com 21 dias de extração. ....	25
<b>Figura 4.7.</b> Relação entre a taxa específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) da <i>C. vulgaris</i> e a concentração de extrato aquoso de alecrim a frio com 21 dias. ....	26
<b>Figura 4.8.</b> Valores da proteína em pg/célula para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	29
<b>Figura 4.9.</b> Valores da proteína em pg/célula para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	30
<b>Figura 4.10.</b> Curvas de crescimento para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	31
<b>Figura 4.11.</b> Culturas <i>batch</i> de <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3ºensaio). ....	32
<b>Figura 4.12.</b> Curvas de crescimento para <i>C. vulgaris</i> incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C-Ensaio com 30% de extrato aquoso. ....	33
<b>Figura 4.13.</b> Culturas <i>batch</i> de <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4ºensaio). ....	34

- Figura 4.14.** Variação da concentração da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações aquosas de alecrim a quente (3º ensaio) ... 35
- Figura 4.15.** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente (3º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso. .... 37
- Figura 4.16.** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 30% de extrato aquoso. .... 38
- Figura 4.17.** Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em extratos de alecrim a frio, com 21 dias. .... 40
- Figura 4.18.** Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em extratos de alecrim a quente. .... 43
- Figura 4.19.** Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em decocção de alecrim. .... 44

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). ....	22
<b>Tabela 4.2.</b> Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). ...	24
<b>Tabela 4.3.</b> Variação da concentração de feopigmentos ( $\mu\text{g/mL}$ ), para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a frio com 5 e 21 dias de extração, respetivamente 1º ensaio e 2º ensaio. ....	27
<b>Tabela 4.4.</b> Percentagem de degradação para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a frio com 5 e 21 dias de extração, respetivamente 1º ensaio e 2º ensaio. ....	28
<b>Tabela 4.5.</b> Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3º Ensaio). ....	32
<b>Tabela 4.6.</b> Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para <i>C. vulgaris</i> incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). ....	34
<b>Tabela 4.7.</b> Variação da concentração da Chl <i>a</i> (pg/cel), para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. ....	35
<b>Tabela 4.8.</b> Variação da concentração de feopigmentos ( $\mu\text{g/mL}$ ), para <i>C. vulgaris</i> incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. ....	36

**Tabela 4.9.** Percentagem de degradação para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. .... 36

**Tabela 4.10.** Quantificação dos compostos fenólicos identificados nos três tipos de extrato de alecrim analisados. .... 39

## 1. ENQUADRAMENTO

A água é um componente essencial no sistema de sustentação da vida e como tal deve ser preservada. Apesar disso, o ecossistema aquático é o que apresenta maior risco de poluição já que os compostos químicos podem ser eventualmente depositados, por fenómenos de lixiviação, via efluentes ou via erosão, conduzindo inevitavelmente à acumulação de poluentes no meio aquático.

O excesso de nutrientes, aliado às condições climáticas, pode levar a que os sistemas aquáticos apresentem um desenvolvimento excessivo de fitoplâncton e de algas filamentosas, devido à eutrofização, com a consequente diminuição da qualidade da água, sendo este cada vez mais um problema mundial. Este incremento da biomassa de fitoplâncton, para além de provocar problemas estéticos, altera o sabor da água e afeta a sobrevivência da biota. Embora a eutrofização esteja geralmente associada ao desenvolvimento de cianobactérias, outros grupos, como as clorófitas, podem estar presentes.

Para mitigar os problemas ambientais e económicos resultantes da eutrofização, têm sido implementadas medidas que apresentam limitações relativas à eficácia, ao custo e aos efeitos secundários.

No Laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária, IPB, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar a utilização de extratos vegetais no controlo do crescimento de microalgas, como alternativa relativamente aos algicidas convencionais. Os resultados mostraram que as decocções (extrato aquoso resultante da hidrodestilação) de algumas das plantas, entre as quais o alecrim, têm efeito algistático nas culturas de *Chlorella vulgaris* e capacidade de diminuição da proliferação celular nas culturas de *Anabaena cylindrica*.

Nesse contexto, o objetivo da presente dissertação foi averiguar qual o impacto da sazonalidade no potencial efeito algistático do extrato aquoso de alecrim, em culturas de clorófitas. Concomitantemente, foi feita a caracterização quantitativa e qualitativa dos compostos fenólicos presentes nos extratos.

A dissertação encontra-se organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento e justificação do estudo realizado e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, em que se aborda a eutrofização, mencionando medidas de controlo deste problema, é caracterizada a microalga (*Chlorella vulgaris*) e a planta (*Rosmarinus officinalis*) em estudo, efectua-se ainda uma breve caracterização dos compostos presentes nos extratos do alecrim, bem como à definição dos objetivos deste trabalho. No capítulo 3, encontram-se referidos de forma resumida, os materiais e métodos utilizados na obtenção dos extratos da planta, na avaliação dos ensaios em *batch*, e na identificação dos compostos fenólicos e no capítulo 4, os resultados obtidos e consequente discussão dos mesmos. No capítulo 5, são sintetizadas as principais considerações alcançadas neste estudo e finalmente é apresentada a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

## 2. INTRODUÇÃO

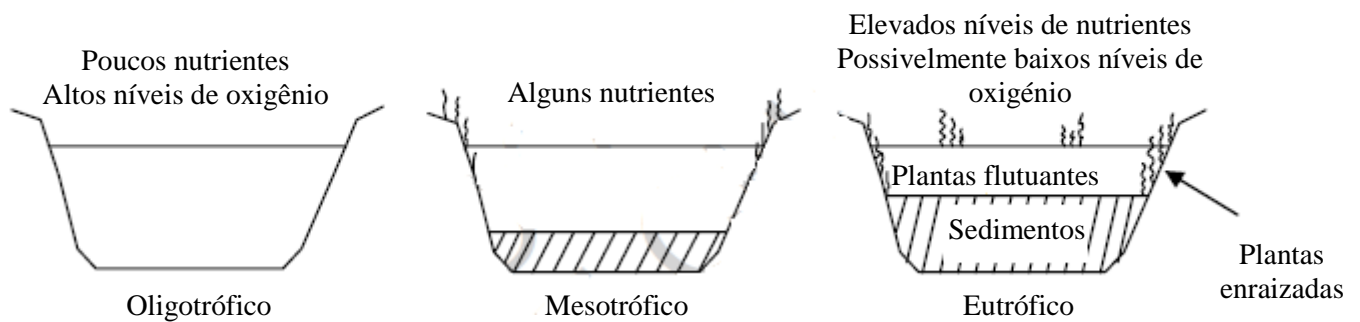
### 2.1. Eutrofização

Eutrofização é o enriquecimento dos ecossistemas aquáticos pelo aumento de nutrientes (fósforo e azoto) e/ou matéria orgânica, provocando uma alteração na produção primária e no equilíbrio dos organismos presentes, bem como na qualidade da água em causa (Rahman et al, 1999; E.U., 2002). O acréscimo da quantidade de nutrientes durante a fase inicial do processo de eutrofização, nomeadamente de fósforo e azoto, tem como consequência o aumento da biomassa fitoplanctónica, que prolifera rapidamente e originando fenómenos conhecidos por florescências ou *blooms* (Bakker et al., 2010).

Os *blooms* podem ser constituídos por grupos de organismos distintos, desde clorófitas, dinoflagelados, diatomáceas ou cianobactérias que por sua vez podem exercer efeitos nocivos.

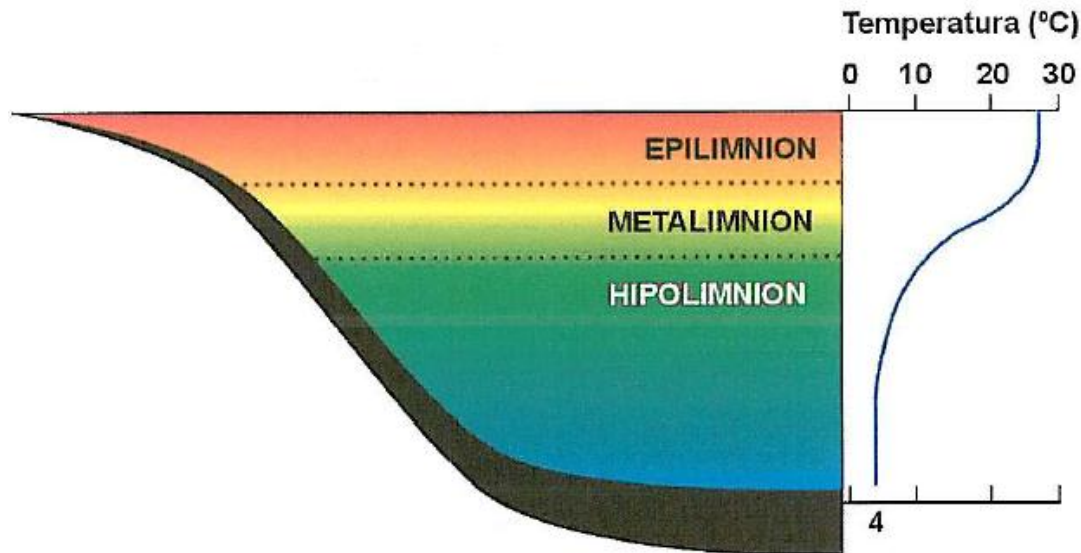
Os fatores adicionais que sustentam este processo dividem-se em duas categorias, dependendo se estão ligados a entrada de uma quantidade excessiva de nutrientes para o ecossistema aquático, desequilibrando a cadeia alimentar que resulta em altos níveis de biomassa de fitoplâncton; ou no excesso de consumo de oxigénio perto do fundo da massa de água (turbidez na água e diminuição da luz) (E.U., 2002, Pawlak et al, 2009).

Na figura 2.1. está representado o processo de eutrofização e terminologia do estado trófico do sistema aquático. Este processo engloba diferentes fases, sendo caracterizado pela evolução de uma massa de água desde a oligotrofia até à eutrofia/hipereutrofia, dependendo essencialmente das concentrações de fósforo e azoto e das populações fitoplanctónicas. Assim, o ecossistema aquático começa a partir de um estado nutricionalmente pobre (oligotrófico), passando para um estado mesotrófico com adição de nutrientes, até ao estado final (eutrófico) onde a diminuição da qualidade da água e o acúmulo de nutrientes é observado na água e nos sedimentos.



**Figura 2.1:** Processo de eutrofização - progressão de oligotrófico para eutrófico. (Adaptado de Shaw et al, 2003)

A fase final é caracterizada pelo aumento da produtividade fitoplanctónica, pela diminuição da profundidade (no caso de se tratar de um ecossistema aquático lântico, um lago por exemplo) e do oxigênio dissolvido na água, provocando a redução da biodiversidade aquática. A eutrofização está, igualmente, relacionada com a estratificação térmica que ocorre no sistema e com os sedimentos presentes. (Cortes et al, 1992). Portanto, o sistema passa verticalmente por diferentes distribuições de temperatura devido à entrada de energia sob a forma de radiação eletromagnética (luz e calor) e mecânica (vento) (figura 2.2). O compartimento superior é caracterizado como sendo menos denso e temperaturas da água elevadas e é denominado epilímnio, o compartimento inferior é de água fria e menos denso. Estes encontram-se separados por uma camada intermédia, chamada metalímnio, sendo marcada por uma grande variabilidade da sua temperatura (Termoclina) diminuído com a profundidade. (Cobo et al, 2012)



**Figura 2.2:** Esquema da estratificação térmica em sistemas aquáticos (Adaptado Cobo et al, 2012).

A carga de matéria orgânica, originada por células mortas de fitoplâncton sedimentadas que chega ao hipolimnion, contribui para a situação de anoxia.

A eutrofização pode ser de origem natural, considerado um processo lento, contínuo, pelo qual os ecossistemas vão gradualmente envelhecendo. Depende apenas da geologia local e das características naturais da captação (Ferreira et al, 2010), ou pode ser aumentado dramaticamente por atividade humana. A eutrofização é reconhecida como um problema ambiental global desde meados do século XX, sendo potenciada pelas atividades antropogênicas, tornando-o de evolução mais rápida – eutrofização cultural (Shaw et al, 2003).

As principais fontes de entradas de nutrientes por ação antropogênica ocorrem por más práticas agrícolas e florestais, uso intensivo de fertilizantes agrícolas, efluentes pecuários, bem como um aumento das atividades urbanas e industriais, da qual decorrem ainda a descarga dos seus efluentes. (Coelho et al., 2009). Segundo a Agência Europeia do Ambiente, "a principal fonte de poluentes azotados é a lixiviação de terras agrícolas, enquanto que a poluição associada ao fósforo vem de efluentes domésticos e da indústria, incluindo de detergentes à base de fósforo". Após a Segunda Guerra Mundial, a população humana generalizou o uso de artigos de limpeza sintéticos, como os detergentes, os quais possuem polifosfatos que em contato com a água resultam em fonte produtora de fosfato. Os efluentes industriais, principalmente da área agro-alimentar, são importantes fontes de substâncias orgânicas e eliminam óleos, ricos em fósforo e azoto (Pinto, 2012)

O processo de eutrofização também é influenciado pela chuva, principalmente onde há muita poluição atmosférica. A chuva provoca também processos de escorrência e de arrastamento de solo para o interior dos sistemas aquáticos, agudizando o processo de eutrofização. Este facto, é mais

acentuado quando o solo perdeu a vegetação e conseqüentemente os processos de erosão são acentuados.

A eutrofização favorece certas espécies de algas, destacando-se dois grandes grupos: *Chlorophyta* (algas verdes) e *Cyanobacteria* (cianobactérias). As cianobactérias apresentam a capacidade produzir toxinas em alguns casos, altamente prejudiciais ao ambiente (mortalidade de peixes e outros organismos aquáticos), à saúde pública (água inadequada para consumo humano) e economia (prejuízo no turismo, atividades recreativas e mortalidade de gado) (Vasconcelos, 2006; Addisie et al, 2012).

No que diz respeito às *Chlorophytas*, estas também causam problemas ecológicos, tal como, diminuição da transparência da água, da entrada de luz e decréscimo de oxigênio para outros organismos aquáticos, devido à sua decomposição. Além disso, acarretam problemas de carácter económico (sobrecarregam o equipamento de filtração) e redução da qualidade estética (Jančula et al., 2007).

A eutrofização tem inúmeros impactos negativos, quanto maior a carga de nutrientes num ecossistema maior o potencial impacto ecológico. De um modo geral, pode ter conseqüências nocivas na saúde humana e animal, na visão estética, lazer e na economia (Forestry, 2002; E.U., 2002).

Como impacto ecológico direto sobre os ecossistemas temos as invasões de macrófitas, algas e cianobactérias, uma vez que estas dificultam/impedem o crescimento de outras plantas aquáticas. Sobre a biodiversidade animal há a diminuição da integridade ecológica de um ecossistema, em que apenas as espécies mais tolerantes sobrevivem (Bricker et. al., 1999).

A proliferação de algas e cianobactérias tem impacto estético, particularmente pelo sedimento visível à superfície da água, sendo desagradável à vista, tendo mau odor e mau sabor da água. Estas características são também prejudiciais para uso recreativo, impossibilitando o uso da água para desportos aquáticos (vela, esqui e pesca) quando há existência excessiva de macrófitas inibindo/impedindo o acesso a cursos de água.

Praticamente todos os impactos mencionados acima têm efeitos negativos, tanto direta como indiretamente na economia. O tratamento (evitar o odor, sabor) da água devido ao aumento de algas ou cianobactérias tem custos elevados, podendo ocorrer ainda entupimento de filtros, aumentando por sua vez os custos de manutenção.

Quando o ecossistema aquático é afetado, devem-se tomar medidas preventivas para limitar sua dispersão ou para mitigar o problema nas áreas afetadas. As medidas implementadas abrangem geralmente a aplicação de algicidas e a redução do input de nutrientes, esta última difícil de controlar.

Os algicidas convencionais são geralmente substâncias químicas, como o sulfato de cobre, o cloro ou o permanganato de potássio, dependendo a eficiência das características da água e especialmente da qualidade do contacto estabelecido entre o produto e o alvo (E.U., 2002; R.S.S. WU, 2002; Forestry, 2002). As principais limitações do uso destes algicidas, inclui a toxicidade para organismos não-alvo, ausência de efeito estável e persistência no meio. Outras alternativas para mitigar os problemas gerados pela eutrofização, são os meios físicos (e.g. remoção mecânica e ultrassons), geralmente muito dispendiosos e unicamente viáveis em áreas pequenas.

Assim, interessa desenvolver novas tecnologias de controlo direto das populações de algas fitoplanctónicas. Estas deverão ser eficientes, de baixo custo e amigas do ambiente. Vários estudos, realizados na sua maioria em países do norte e centro da Europa, têm demonstrado que algumas plantas podem produzir e libertar para o meio envolvente compostos ativos que condicionam o desenvolvimento de algumas populações de algas (Gross, 2003; Geiger et al., 2005; Gross et. al., 2007)

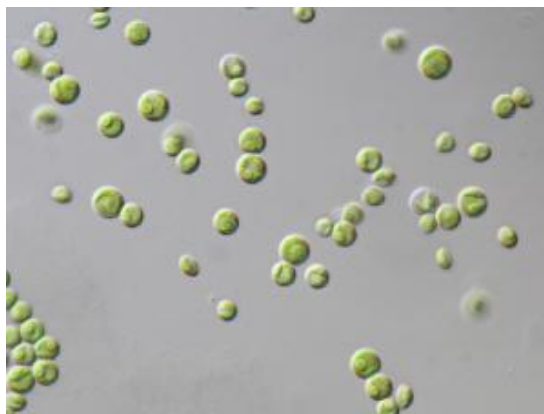
É neste contexto que no Laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária, IPB, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar a utilização de extractos vegetais no controlo do crescimento de microalgas, como alternativa relativamente aos algicidas convencionais. Os resultados da avaliação do crescimento de dois tipos de microalgas (clorófitas e cianobactéria) na presença de extratos de sete plantas da flora de Trás-os-Montes, mostrou que alguns dos extratos testados apresentam potencial algicida/algistático (Barros et al., 2011).

## **2.2. Caracterização de *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890)**

A *Chlorella vulgaris* é uma espécie de alga verde, apresentando uma forma de vida unicelular ou colonial, pertencente à classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorellales* e família *Chlorellaceae* (algaebase, 1996). É uma microalga eucariótica que cresce em água doce, tendo células com 5 a 6 µm de diâmetro (Queiroz et al, 2008). A reprodução pode ser feita por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual (Ohse et al., 2008).

Esta microalga pode acumular pigmentos como a clorofila *a* e *b*, o β-caroteno e xantofilas, sendo o amido a principal forma de reserva. Sob certas condições podem armazenar óleo, sendo também

uma boa fonte de sais minerais como, fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio, de proteínas e de vitaminas (Costa et al., 2006; Bertoldi et al., 2008; Ohse et al., 2008, Queiroz et al, 2008).



**Figura 2.3:** Aspeto da *C. vulgaris* ao microscópio ótico

(Fonte: [http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955\\_Chlorella\\_vulgaris.htm](http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm));

Trata-se de uma microalga facilmente cultivável em laboratório e para o presente estudo foi usada a *C. vulgaris* estirpe CBSC 15-2075 - Carolina Biological Supply Co., Burlington, USA (CBS).

### 2.3. Caracterização de *Rosmarinus officinalis* (L.)

O *Rosmarinus officinalis*, mais comumente referido como alecrim, é uma erva popular em muitos países de clima temperado, com uma utilização excepcionalmente ampla nos países da região Mediterrânea, Portugal à Austrália (Basiri et al, 2011; Lorenzi et al, 2006). O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta pertencente à família Lamiaceae. É um arbusto vivaz do litoral mediterrânico que pode atingir 1,5 m de altura. Ocorre em terrenos secos e pobres, principalmente calcários e bem drenados. É espontâneo em charnecas, matagais e pinhais do centro e sul do continente, sendo subespontâneo e cultivado no norte. O alecrim é uma planta aromática usada como tempero em vários alimentos, e com várias aplicações medicinais (Carvalho-Junior et al., 2004).

Para além das variedades químicas que se distinguem pela composição do óleo essencial, existem dois tipos morfológicos: *Rosmarinus officinalis*, var *prostratus* (caules prostrados, flor lilás clara e folhas muito finas de cor verde clara) e *Rosmarinus officinalis*, var *albus* de crescimento vertical e de flor branca, por vezes com nervuras semelhantes às da alfazema (Lorenzi et al, 2006; Proença da Cunha, & Roque, 2011). Os constituintes químicos principais do óleo essencial desta planta são a cânfora, 1-8 cineol,  $\alpha$ - e  $\beta$ - pineno, borneol e canfeno em proporções variáveis,

dependendo da origem e do estado vegetativo (Bruneton, 2001; Jamshid et al., 2009). Além disso, a composição química do óleo essencial do alecrim e/ou extrato é dependente de condições climáticas e de cultivo, da parte da planta usada, do tipo de preparação do material e do método de extração empregue (Carvalho-Junior et al., 2004; Svoboda et al., 1992).



**Figura 2.4** – Flor de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

(fonte: <http://www.lideragronomia.com.br/2012/02/alecrim.html> )

Os compostos fenólicos do alecrim são representados por flavonoides, flavonas e por ácidos fenólicos, sobretudo derivados cafeicos: ácido cafeico, ácido clorogénico e ácido rosmarínico (Razborsek et al, 2006; Tavassoli et al, 2011). Quando a extração é feita por solventes orgânicos (etanol, metanol), são detetados mais compostos, tais como ácido carnósico, e carnosol (Kuhlmann et al, 2006, Afonso, 2010). No alecrim foi detetada a presença de vários compostos fenólicos com atividade antioxidante, como o ácido carnósico, rosmadiol, rosmanol e epirosmanol, entre outros (Inatani et al., 1983). A quercetina é um flavonoide que pode ser encontrada em varias tipos de chás, nomeadamente chá de alecrim (Melo, 2010).

## 2.4. Objetivos

As medidas implementadas para o controlo de *blooms* fitoplanctónicos abrangem a aplicação de algicidas, como o sulfato de cobre, que apresenta muitas limitações, nomeadamente toxicidade para organismos não-alvo, ausência de efeito duradouro e persistência no meio. Interessa pois desenvolver novas tecnologias de controlo direto das populações de algas fitoplanctónicas, que sejam eficientes, de baixo custo e amigas do ambiente.

No Laboratório de Aquacultura da Escola Superior Agrária - IPB, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar a utilização de extratos vegetais no controlo do crescimento de microalgas, como alternativa relativamente aos algicidas convencionais. Os resultados da avaliação do crescimento de dois tipos de microalgas (clorófitas e cianobactéria) na presença de extratos de sete plantas da flora de Trás-os-Montes, mostrou que alguns dos extratos testados apresentam potencial algicida/algistático, nomeadamente as decocções (extrato aquoso resultante da hidrodestilação) de alecrim colhido em Setembro, mostraram efeito algistático nas culturas de *Chlorella vulgaris*.

Nesse contexto, a presente dissertação pretendeu dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos, averiguando o impacto da sazonalidade do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), designadamente quando este é colhido em Abril, na composição do seu extrato aquoso e no seu potencial efeito algicida/algistático em culturas de *Chlorella vulgaris*.

Assim, salientam-se os seguintes objetivos específicos:

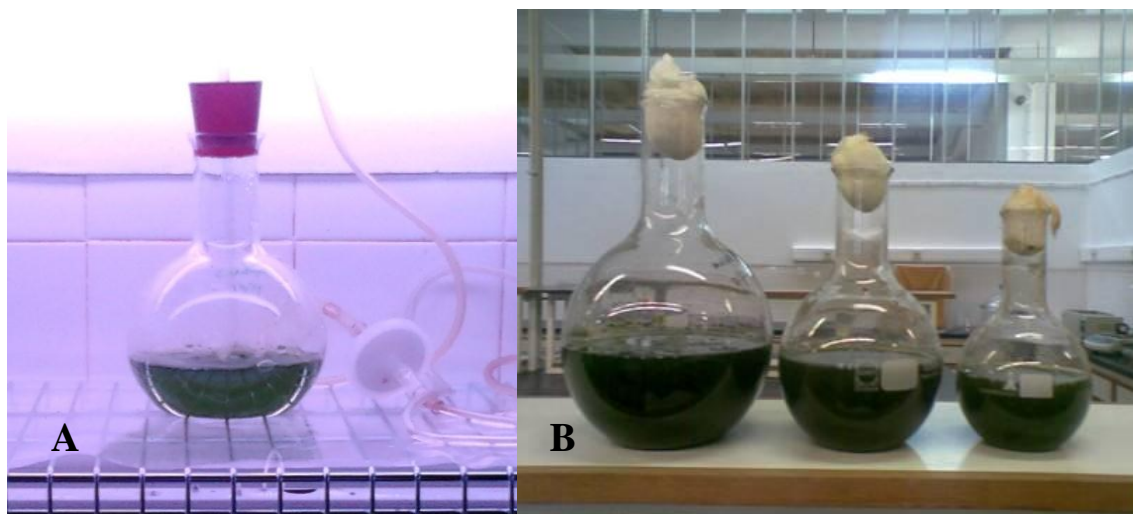
1. Avaliar o potencial algicida e/ou algistático, em culturas de *Chlorella vulgaris*, de extratos aquosos de alecrim colhido em Abril;
2. Avaliar esse potencial em função de diferentes concentrações (10%, 25%, 30%) dos extratos aquosos;
3. Avaliar esse potencial em função de 2 tipos de extratos de alecrim, extratos a quente e extratos a frio;
4. Avaliar a influência de diferentes tempos de extração (5 e 21 dias), no caso dos extratos a frio;
5. Relacionar a composição em compostos fenólicos com o tipo de extrato aquoso e com a sazonalidade do alecrim.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Microalga utilizada**

Para testar o efeito dos extratos do alecrim foram utilizadas culturas monoalgais de *Chlorella vulgaris* (CBS15-2075). A manutenção de stocks e o desenvolvimento de culturas em pequenos e médios volumes é feita usando o meio de Walne Modificado. As culturas stock são mantidas em meio líquido e/ou em meio sólido, com cerca de 20-100 mL de meio de cultura, em estufa a 19 °C, intensidade luminosa de 2390 lx, proveniente de lâmpadas fluorescentes de 30W (Gro-Lux), com fotoperíodo 16h/8h luz/escuro e repicadas mensalmente. As culturas em maior volume de *C. vulgaris* (Figura 3.1) são rotineiramente desenvolvidas no mesmo meio, a pH 6,0, e agitadas continuamente por fluxo de ar, utilizando filtros autoclaváveis de 0.2 µm e diâmetro de 50 mm (Millex™). As culturas são mantidas a uma temperatura controlada de 25°C, com iluminação de 4500 lx e com fotoperíodo de 16h/8h luz/escuro. Os meios de cultura e o material de vidro utilizado foram previamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Os ensaios foram realizados assim que as culturas iniciavam a fase exponencial, avaliada por contagem do número de células em câmara de Neubauer.



**Figura 3.1:** Manutenção de culturas em laboratório; A- Cultura em meio de Walne modificado com fluxo de ar; B- Cultura em meio de Walne modificado.

### 3.2.Extratos aquosos

#### 3.2.1. Amostragem do alecrim

Para estes ensaios foi selecionado o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tendo em conta os resultados prévios obtidos com a decocção (água de lixiviação) do processo de hidrodestilação.

O alecrim foi colhido em Abril de 2012, entre as 9h30 e as 10h00 da manhã, no jardim da Escola Superior Agrária do Campus da Santa Apolónia, Instituto Politécnico de Bragança (41°47'48.72"N, 6°46'1.97"W), Trás-os-Montes, Portugal.

As condições meteorológicas observadas durante a amostragem incluíram um dia ventoso, com céu pouco nublado e temperaturas de 12°C máximo e 4°C mínimo. Foram apontados estes parâmetros uma vez que as plantas são fortemente influenciadas por fatores climáticos e ambientais. Sempre que possível, foram recolhidas três partes de planta: flores, folhas e caules, conforme figura 3.2.. O material vegetal colhido foi levado para o laboratório onde foi feita a sua secagem, à temperatura ambiente, em envelopes de papel, no escuro, até ser utilizado.



**Figura 3.2** - Alecrim recolhido: flores, folhas e caule.

### 3.2.2. Obtenção dos extratos aquosos

Para a obtenção dos extratos aquosos de alecrim, as flores, folhas e caules foram cortadas em pequenos bocados com uma tesoura de poda, conforme figura 3.3. A composição dos extratos (m/v) foi inferior, comparativamente à decocção testada anteriormente pela equipa, que foi de 17,8 % (m/v).



**Figura 3.3** - Preparação do alecrim para a obtenção dos extratos aquosos.

#### **Extratos aquosos a frio**

Para a obtenção dos extratos aquosos a frio preparou-se uma infusão a 12% (m/v) em água destilada. A infusão foi feita num garrafão plástico de 5 L e conservada num armário, no escuro à temperatura ambiente, até ser utilizado. O garrafão era agitado diariamente. Foram testados extratos ao 5º e 21º dias. Para os ensaios, o extrato foi filtrado previamente por crivo de 45 µm e levado aos UV durante 20 minutos.

### **Extratos aquosos a quente**

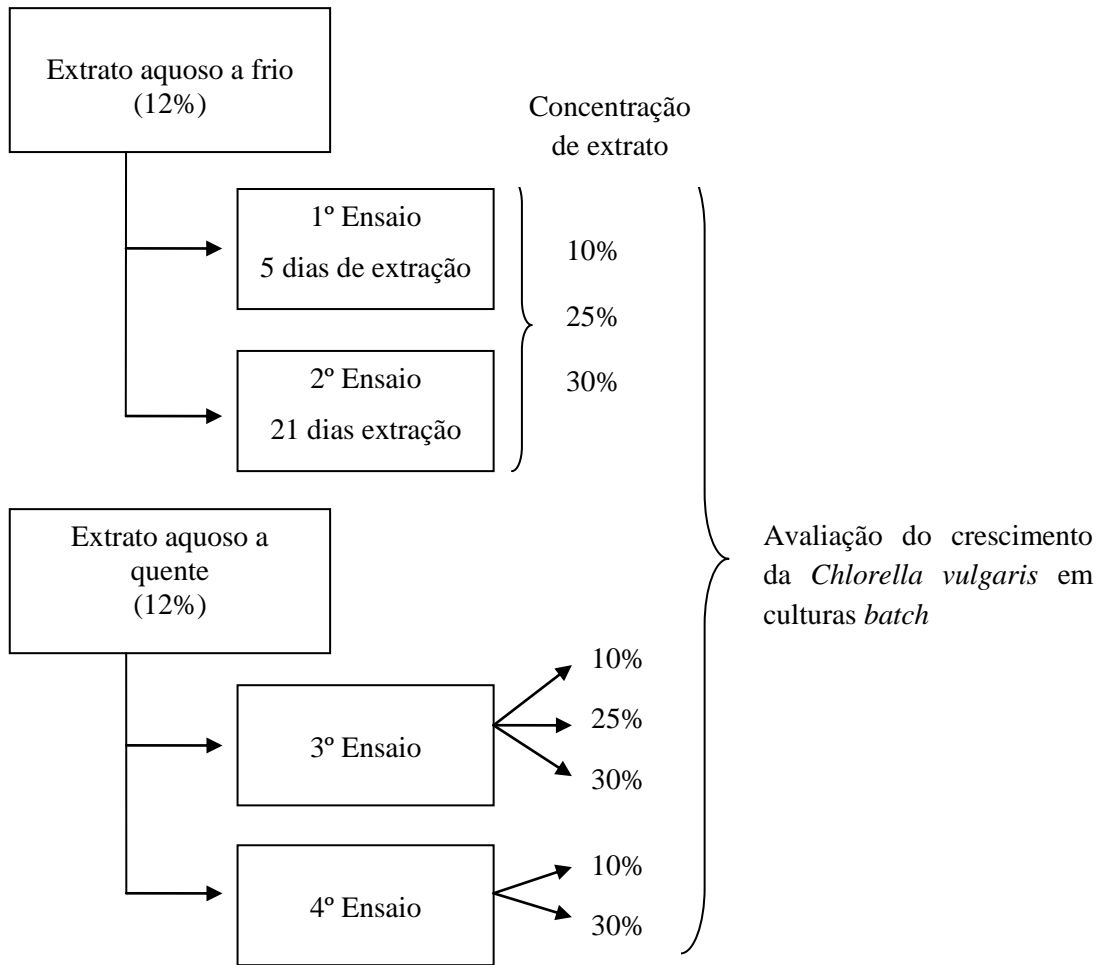
Para a obtenção dos extratos aquosos a quente, utilizou-se alecrim conservado nas condições mencionadas no ponto 3.2.1. Preparou-se uma solução de alecrim a 12% (m/v), com água ultrapura, conforme figura 3.4, iniciando-se de seguida o seu aquecimento (70°C / 3 h). A amostra foi tapada com vidro de relógio para evitar a sua evaporação. Após esta etapa terminar, passou-se amostra para um Erlenmeyer, filtrando-a por crivo de 45 µm, tapando-a de seguida com parafilm e colocando-a no frigorífico para evitar qualquer alteração na composição e aspeto.



**Figura 3.4** - Aspeto inicial da solução de alecrim para obtenção de extrato aquoso a quente.

### **3.3. Ensaios em Culturas *batch***

A avaliação do crescimento da *C. vulgaris*, na presença de extratos aquosos, foi feita em culturas *batch*. As culturas de *C. vulgaris* em fase exponencial foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados, e expostas quer a diferentes concentrações de extratos aquosos (a frio e a quente), quer a diferentes tempos de extração, no caso dos extratos a frio, num total de 4 ensaios distintos, conforme figura 3.5. Para cada ensaio foram incubados brancos, nos quais o volume de extrato foi substituído por água autoclavada. Os ensaios foram desenvolvidos em volumes de 200 mL e foram realizados em triplicado.



**Figura 3.5** – Esquema representativo da metodologia usada com os ensaios.

Os ensaios foram incubados em câmara de cultura à temperatura de 20°C, intensidade luminosa de 4500 lx com fotoperíodo de 16h/8h luz/escuro, sendo agitados manualmente uma vez por dia. A avaliação da densidade celular das culturas foi feita por contagem diária do número de células em câmara de Neubauer. O potencial algicida e/ou algistático foi avaliado, comparativamente ao controlo, pelo incremento celular, taxa específica de crescimento, teor em clorofila *a*, teor em feopigmentos, percentagem de degradação da clorofila e teor em proteínas.

### 3.3.1. Avaliação da Densidade Celular

A avaliação do crescimento das microalgas foi feita por contagens ao microscópio ótico, com o auxílio de uma câmara de Neubauer. O número total de células foi expresso por unidade de volume (células/mL), tendo em conta:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Para cada cultura, a variação do número de células/mL ao longo do tempo foi usada para identificar a fase exponencial do crescimento e calcular o incremento da densidade celular ocorrido durante esta fase (Incremento).

Além disso, os dados que relacionam o logaritmo do número de células por mL, em função do tempo de incubação, na fase exponencial do crescimento, foram ajustados por análise de regressão linear e a taxa de crescimento foi calculada, pela seguinte expressão:

$$\text{Taxa específica de crescimento } (\mu) = \frac{\text{Log}N - \text{Log}N_0}{t - t_0}$$

Onde:

**N** = concentração de células no tempo *t* de incubação

**N<sub>0</sub>** = concentração de células no tempo *t<sub>0</sub>*

### 3.3.2. *Quantificação dos pigmentos fotossintéticos*

Para a determinação da concentração em clorofila *a* e feofitina *a* utilizou-se o método espectrofotométrico. Resumidamente, retiram-se 5 mL de amostra, leva-se à centrífuga (3500 rpm, 15 min) e adiciona-se 5 mL de acetona (90% (v/v)) ao precipitado. Os tubos são homogeneizados, mantidos no escuro e tapados. As amostras ficam no frigorífico de um dia para o outro (+/- 16 horas), após o que se recolhe o sobrenadante, obtido por centrifugação, e se procede a leitura nos diferentes comprimentos de onda. Absorvância do extrato foi lida num espectrofotómetro Nanocolor UV/VIS 60 Hz. Após as leituras as amostras são acidificadas com HCl (5%), seguindo-se novamente leituras aos comprimentos de onda 750 nm e 665 nm. As quantificações foram feitas em duplicado.

Para o cálculo das concentrações, utilizaram-se as seguintes equações:

- Clorofila *a* (Jeffrey & Humphrey, 1975)

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) = [ [(11,93 \times (A_{663} - A_{750})) - [1,93 \times (A_{645} - A_{750})]) \times V_1 ] / (V_2 \times P)$$

- Feofitina *a* (Lorenzen, 1967)

$$\text{Feof } (\mu\text{g mL}^{-1}) = [ [ 11,4 \times K (R \times (A_{665A} - A_{750A}) - (A_{665} - A_{750})) ] \times V_1 ] / V_2 \times P$$

Em que:

$V_1$  = volume de acetona utilizado na extração (mL)

$V_2$  = volume utilizado de amostra (mL)

$P = 1$  (percurso ótico da célula do espectrofotômetro)

$R = 1.8$  (razão máxima da absorvância  $[(A_{665}-A_{750})/(A_{665A}-A_{750A})]$ , na ausência de feopigmentos)

$K = 2,25$  (fator que equaciona a redução na absorvância para a concentração inicial da clorofila, após acidificar)

Os resultados da concentração dos pigmentos foram expressos também por célula, picogramas (pg)  $cel^{-1}$ , tendo em conta:

$$(pg\ cel^{-1}) = \left[ \frac{\text{Chl } a\ \mu g/ml}{\text{contagem}} \right] \times 10^6$$

Determinou-se igualmente a percentagem de degradação da clorofila (% Deg), considerando a seguinte equação:

$$\% \text{ Deg} = [feof\ a / (feof\ a + Chl\ a)] \times 100$$

### 3.3.3. *Quantificação das proteínas*

O teor de proteínas nas microalgas foi determinado pelo método de Bradford. (Bardford, 1976). Resumidamente, após extração dos pigmentos são adicionados 5 mL de NaOH/0,5 M às amostras. Estas vão incubar a banho-maria durante 20 min, após arrefecidas são novamente centrifugadas (3500rpm/15 min), seguindo-se a leitura a 595 nm (Nanocolor UV/VIS 60 Hz), do sobrenadante. A concentração de proteínas totais foi feita considerando uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.4. **Identificação dos Compostos Fenólicos nos Extratos Aquosos**

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos foi feita por HPLC. Assim, foram analisados 3 extratos: os extratos aquosos de alecrim colhido em Abril e testados neste estudo, a quente e a frio, este com 21 dias de extração, e o extrato aquoso resultante

da hidrodestilação de alecrim colhido em Setembro e testado anteriormente pela equipa de investigação (decoção):

- a) Extratos aquosos a frio, infusão à temperatura ambiente, a 12% (m/v), análise após 21 dias.
- b) Extratos aquosos a quente, infusão com aquecimento, a 12% (m/v)
- c) Decocção, resultante da hidrodestilação, a 17,8 % (m/v)

Para a identificação e quantificação dos fenólicos procedeu-se primeiro à eliminação dos açúcares das amostras, através de hidrólise ácida com HCl e hidrólise com MeOH, água e TBHQ (tert-butilhidroquinona, antioxidante) Assim, para microtubos com tampa retiraram-se 200 µL de cada extrato vegetal e procedeu-se à sua evaporação com azoto gasoso. Após a completa evaporação, adicionou-se 200 µL de HLC a 2M em metanol a 50% (água: metanol, v/v) e 200 µL de uma solução de 50% de metanol (água: metanol, v/v) e TBHQ. Os microtubos foram colocados em bloco de aquecimento a 80 °C, durante 2h e de seguida centrifugados (model 2-16 K, Sigma, Osterode, Alemanha). Após a centrifugação transferiu-se o sobrenadante para vilas de HPLC, os quais foram mantidos a -20 °C até sua análise.

#### **3.4.1. Condições cromatográficas**

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, do tipo C18, com enchimento Spherisorb ODS2 de 5 µL (Phase Separations, WATERS). A fase móvel consistiu em água ultrapura com 1% (v/v) de ácido tricloroacético (TFA) (solvente A) e acetonitrilo com 1% TFA (solvente B) Ambos os reagentes eram HPLC gradient, Merck.

A eluição foi realizada a um fluxo de solvente de 1 mL/minuto, com gradiente a começar com 100 % de A, sendo o volume de injeção de 10 µL.

O sistema HPLC-MS (LCQ Advantage Max, ThermoFinnigan) era constituído por:

- Câmara de mistura (Gilson-mod. 811A)
- Bomba de alta pressão (Gilson-mod. 305)
- Bomba de alta pressão (Gilson-mod. 306);
- Injetor automático (Gilson-mod. 231XL)
- Detetor UV fixado a 229 nm (Gilson-mod. 117)
- Seringa de injeção (Gilson-mod. 402);
- Forno regulado a 30°C (Jones Chromatography)

Os cromatogramas foram registados a 280, 320, 370 e 520 nm. A identificação dos compostos fenólicos individuais foi feita por comparação com padrões comerciais externos (Extrasynthese, França), através dos respetivos tempos de retenção e espectros UV. A quantificação foi feita utilizando parâmetros como o volume de extração, volume de injeção, área do padrão interno, área do composto em questão. O LC-MS/MS foi utilizado para confirmar os resultados.

### **3.5. Análise Estatística**

A análise estatística foi efetuada usando o software estatístico SPSS 19.0 e um nível de significância de 5%. O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para demonstrar a existência de normalidade dos parâmetros e para testar a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Foram comparados os valores da clorofila, feopigmentos e proteína, usando Anova e o teste de Tukey para comparações múltiplas (Post-Hoc).

O teste de Mann-Whitney foi usado para identificar diferenças nos valores médios da taxa específica de crescimento, do incremento celular e da concentração celular final, entre culturas incubadas com diferentes percentagens de extrato aquoso de alecrim, para cada ensaio. Utilizaram-se correlações de Spearman's para identificar relações entre a taxa específica de crescimento e as concentrações de extrato testadas e as relações entre clorofila *a* e feofitina *a*. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  DP (Desvio Padrão da média).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

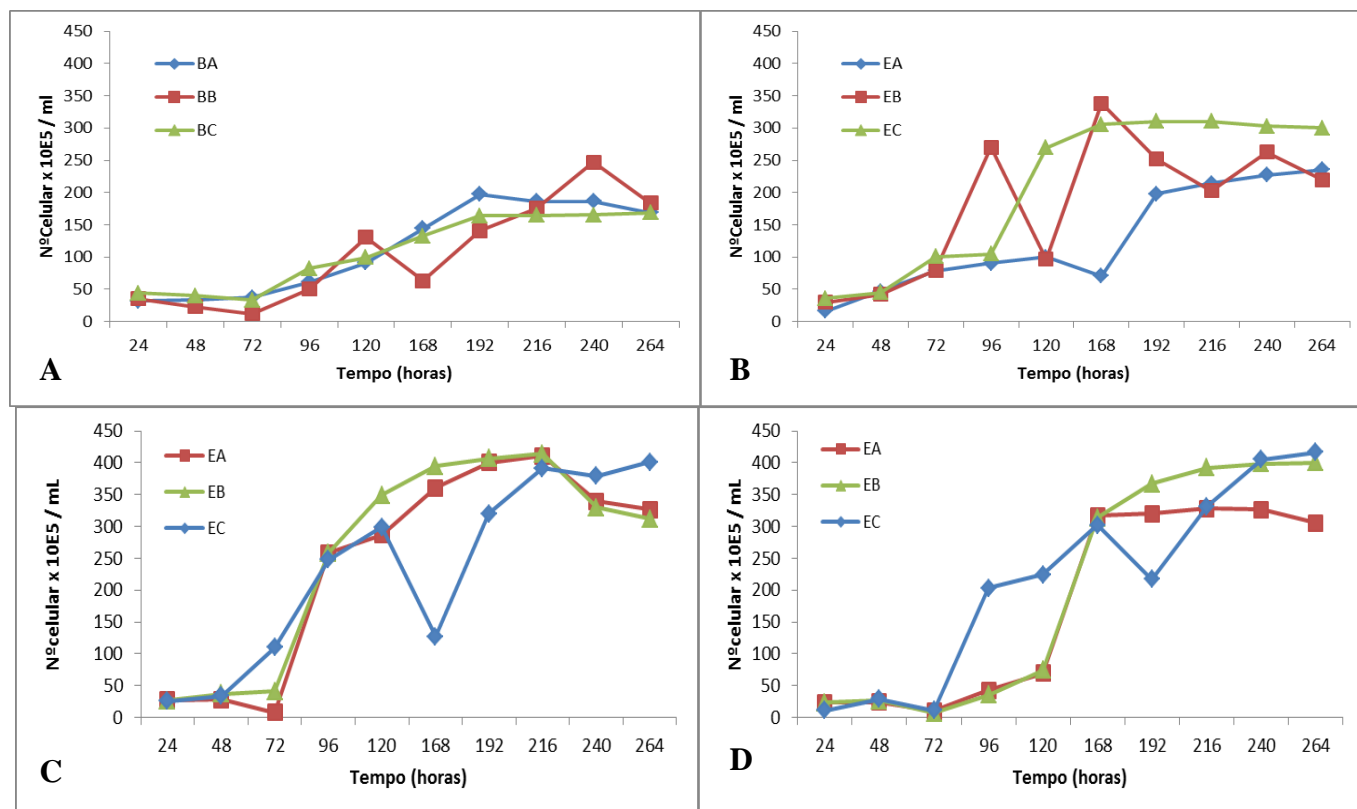
### 4.1. Ensaio com extratos aquosos

Estes ensaios avaliaram o crescimento das culturas de *C. vulgaris*, em meio líquido, na presença de diferentes tipos de extrato aquoso de alecrim e de diferentes concentrações para cada tipo de extrato, conforme descrito no Material e Métodos. Os resultados obtidos correspondem a triplicados (EA, EB, EC) e foram avaliados comparativamente aos brancos (BA, BB, BC).

#### 4.1.1. Extrato aquoso a frio

##### *i) Contagem celular*

Os ensaios com os extratos a frio foram realizados com extratos aquosos de alecrim, com 2 tempos distintos de extração, 5 dias e 21 dias, nas concentrações de 10%, 25% e 30%. Nos gráficos da figura 4.1, apresentam-se as curvas de crescimento da *C. vulgaris*, das culturas controle (brancos) e das culturas incubadas com extratos aquosos de 5 dias, nas 3 concentrações testadas.



**Figura 4.1** - Curvas de crescimento para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

A densidade celular foi avaliada nas culturas durante um período total de 264 horas (11 dias) por contagens diárias. Os resultados mostram que a fase exponencial de crescimento, a grosso modo, foi atingida em dias diferentes e teve também distinta duração. Assim, nas culturas controlo (brancos) verificou-se que o crescimento em média foi exponencial a partir das 72 horas (3º dia) estendendo-se até às 192 horas (8º dia). Neste caso o triplicado BB não foi tido em conta, por não apresentar fase exponencial marcada. Comparativamente, as culturas incubadas na presença de 10% de extrato apresentaram uma fase exponencial entre as 48 horas (2º dia) e as 192 horas (8º dia). Também aqui o triplicado EB não foi tido em conta. A *C. vulgaris* suplementada com 25% de extrato de alecrim iniciou a sua fase exponencial sensivelmente às 96 horas (4º dia) e quando suplementada com 30% de extrato às 72 horas (3º dia), estendendo-se em ambas até às 216 horas (9º dia), conforme figura 4.1 (gráfico C e D) e tabela 4.1

Os valores médios da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e do incremento celular ocorrido na fase exponencial, encontrados para estas culturas (1º Ensaio) são apresentados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). N=3

	<b>Branco*</b>	<b>E10*</b>	<b>E25</b>	<b>E30</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,012±0,001	0,013±0,005	0,007±0,004	0,018±0,012
<b>Duração</b> (dias)	3°-8°	2°-8°	4°-9°	3°-9°
<b>Incremento</b> (n°células x 10E5/ mL)	145±21	240±30	219±120	302±93

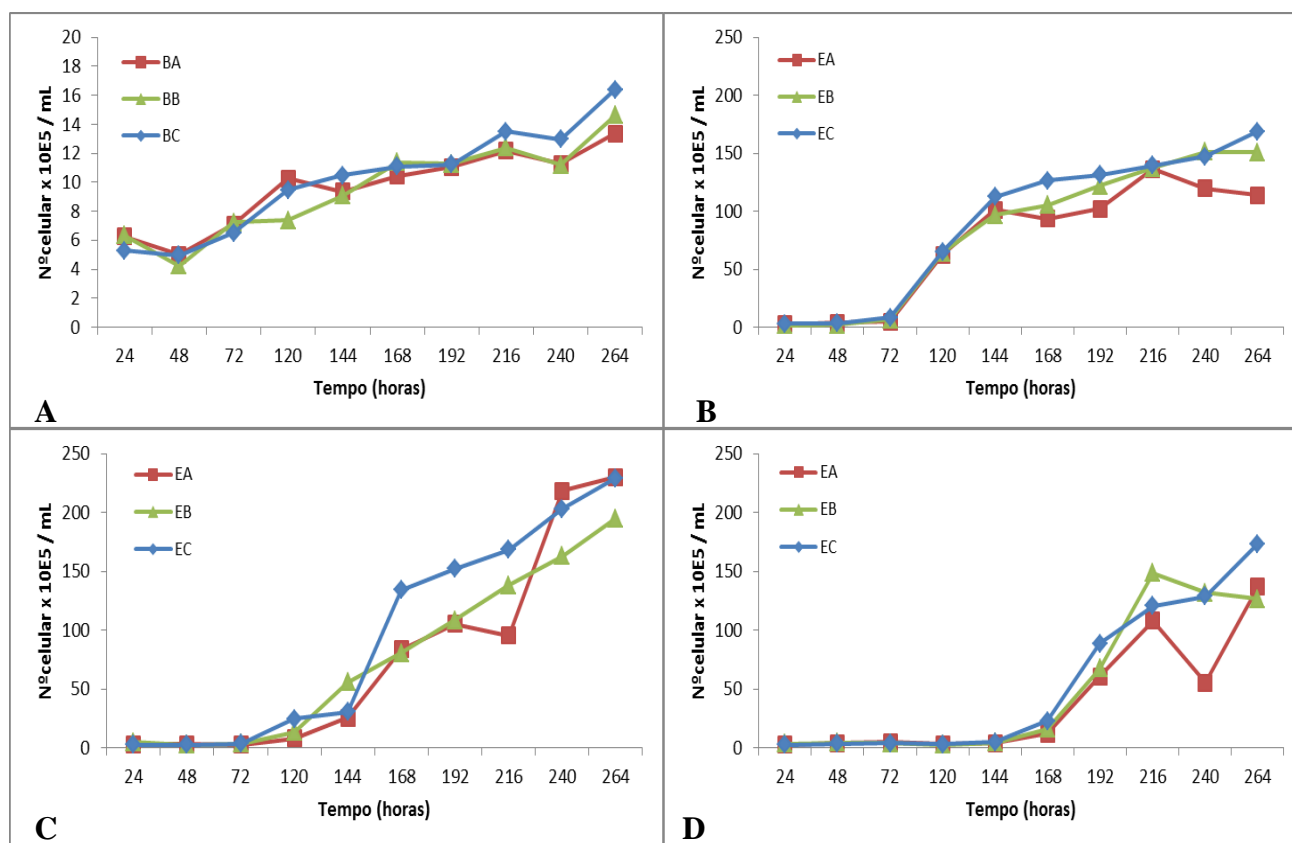
\* N=2

Os efeitos dos extratos aquosos de alecrim a frio, com 5 dias de extração, não influenciaram a taxa de crescimento, já que não se observaram diferenças significativas nos valores médios da  $\mu$ . Também o incremento celular médio ocorrido na fase exponencial não apresentou diferenças para a *C. vulgaris* quando incubada nas diferentes concentrações de extrato, comparativamente às culturas controlo (branco). Do mesmo modo não se verificam diferenças significativas na densidade celular final da *C. vulgaris*, quando incubada com extratos, comparativamente ao controlo. Na figura 4.2. exemplifica-se o especto dessas culturas.



**Figura 4.2** – Culturas *batch* de *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio de alecrim, com 5 dias de extração.

Com o objetivo de apurar o efeito do tempo de extração a frio do alecrim, foi realizado um segundo ensaio com as mesmas condições e concentrações de extrato anteriores, mas utilizando extrato aquoso com 21 de extração. Tal como anteriormente, estes ensaios tiveram a duração de 264 horas (11 dias), tendo sido realizadas contagens celulares diariamente. Nos gráficos da figura 4.3, apresentam-se as curvas de crescimento da *C. vulgaris*, das culturas controlo (brancos) e das culturas incubadas com extratos aquosos de 21 dias, nas 3 concentrações testadas.



**Figura 4.3** - Curvas de crescimento para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

Tal como no ensaio anterior (1º Ensaio) a fase exponencial de crescimento ocorreu em dias diferentes. Nas culturas controlo (brancos) o crescimento em média foi exponencial a partir das 48 horas (2º dia) estendendo-se até ao final do ensaio. Comparativamente, as culturas suplementadas com 10% e 25% de extrato de alecrim apresentaram crescimento exponencial a partir das 48 horas e 72 horas (3º dia), respetivamente, prolongando-se também até ao último dia.

As culturas suplementadas com 30% de extrato apresentaram crescimento exponencial durante um período mais curto, iniciando-se bastante mais tarde, por volta das 120 horas (5º dia) e prolongando-se até às 216 horas (9º dia), exceto para o replicado EA. Aparentemente estes resultados poderão ser devidos à necessidade de adaptação metabólica das células. Segundo, Megharaj et. al. (1992) na *C. vulgaris*, em condições fotoheterotróficas ocorre diminuição da toxicidade por fenólicos, e esta tem capacidade de utilizar compostos endógenos resultantes da fotossíntese e também compostos exógenos como fonte de carbono.

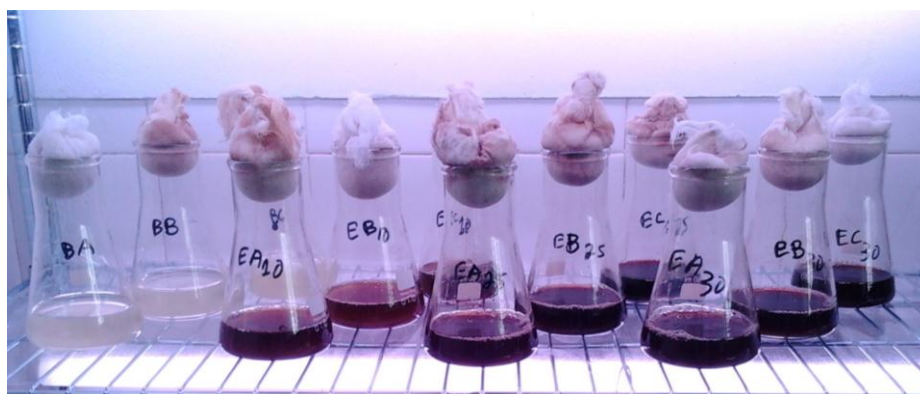
Os valores médios da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e do incremento celular ocorrido na fase exponencial, encontrados para estas culturas (2º Ensaio) são apresentados na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** - Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). N=3

	Branco	E10 *	E25	E30
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,004±0,0006 <sup>a</sup>	0,019±0,004 <sup>b</sup>	0,022±0,002 <sup>b</sup>	0,040±0,008 <sup>c</sup>
Duração (dias)	2º-11º	2º-11º	3º-11º	5º-9º
Incremento (nº células x 10E5/mL)	10±2 <sup>a</sup>	158±12 <sup>b</sup>	215±20 <sup>b</sup>	132±14 <sup>b</sup>

\* N=2; Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente diferentes.

Os efeitos dos extratos aquosos de alecrim a frio, com 21 dias de extração, influenciaram a taxa de crescimento, já que se observaram aumentos significativas nos valores médios da  $\mu$ , no incremento celular médio ocorrido na fase exponencial e na densidade celular final da *C. vulgaris*, quando incubada com extratos, comparativamente ao controlo (branco). Na figura 4.4. exemplifica-se o especto dessas culturas.

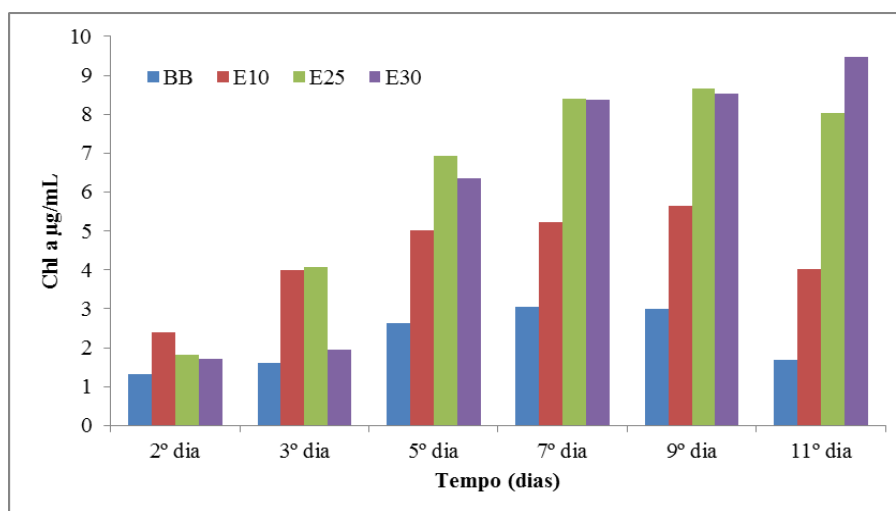


**Figura 4.4** – Culturas *batch* de *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração.

#### ii) Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

O crescimento da *C. vulgaris* foi também avaliado pela quantificação dos pigmentos, nomeadamente pela Clorofila *a* (Chl *a*), de acordo com Material e Métodos. Foram tiradas amostras sensivelmente em dias alternados, sempre à mesma hora, de 2 das culturas escolhidas aleatoriamente, quer dos brancos, quer das 3 concentrações testadas e para os 2 tipos de ensaios realizados com extratos a frio, com 5 e 21 dias de extração (Ensaio 1 e Ensaio 2, respetivamente).

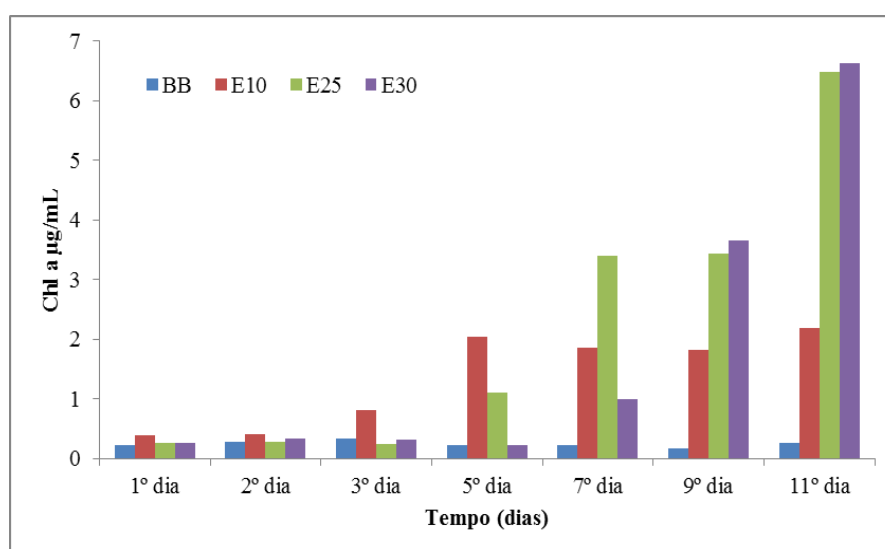
Os valores obtidos da concentração da Chl *a* para o 1º ensaio, realizados com 5 dias de extração de infusão de alecrim a frio, encontram-se no gráfico da figura 4.5.



**Figura 4.5:** Variação da concentração da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio com 5 dias de extração (1º Ensaio).

A biomassa do fitoplâncton em termos de concentração de Chl *a* é um dos métodos mais amplamente aceitos no estudo da produção biológica, como indicativo do material vegetal total disponível (Luo et al., 2009). Assim, verifica-se que o aumento em Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ), para todas as culturas, incluindo os brancos, acompanhou a fase exponencial de crescimento, como seria de esperar. Mesmo as culturas com 30% de extrato obedeceram a este padrão, já que foram as culturas que apresentaram a fase exponencial até mais tarde.

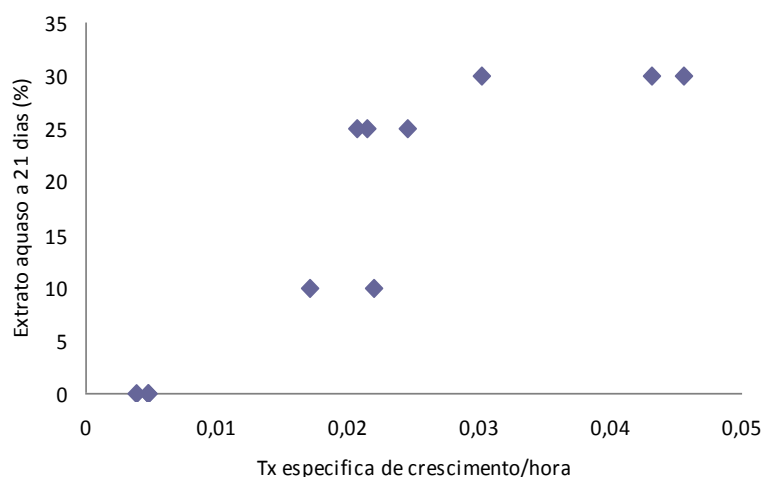
Os valores obtidos da concentração da Chl *a* para o 2º ensaio, realizados com 21 dias de extração de infusão de alecrim a frio, encontram-se no gráfico da figura 4.6



**Figura 4.6:** Variação da concentração da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações aquosas de alecrim a frio com 21 dias de extração.

Tal como esperado, os valores da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ) aumentaram significativamente ao longo do tempo de cultura, comparativamente às culturas controlo (branco).

Assim, os resultados mostram que o extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração, não afeta o crescimento da *C. vulgaris*, por outro lado quando o tempo de extração se prolonga para 21 dias, ocorre estímulo do crescimento, nas condições de incubação testadas. Neste caso, os efeitos dos extratos aquosos a frio de alecrim, com 21 dias de extração, aumentaram quer a taxa de crescimento, quer o incremento celular médio ocorrido na fase exponencial e por isso também a densidade celular final e o teor em Chl *a*. Comparativamente às culturas controlo (branco), a incubação da *C. vulgaris* na presença de extrato com 21 dias, mostrou aumento significativo destes parâmetros, em função da concentração testada. De facto foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração dos extratos aquosos a frio de alecrim, com 21 dias de extração, e a taxa específica média de crescimento da *C. vulgaris* ( $n = 11$ ,  $r = 0,923$ ,  $p < 0,01$ ).



**Figura 4.7:** Relação entre a taxa específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) da *C. vulgaris* e a concentração de extrato aquoso de alecrim a frio com 21 dias.

Estes resultados apontam para um estímulo do crescimento na presença do extrato a frio de alecrim, com 21 dias de extração e mostram uma relação de aumento da densidade celular com o aumento da concentração de extrato, nas gamas testadas (Figura 4.7). Os resultados obtidos sugerem a presença de maior concentração e/ou para a existência de outros compostos, nos extratos de alecrim com 21 dias, comparativamente aos extratos com 5 dias, que de alguma forma podem funcionar como suplemento nutricional. De facto, Megharaj et. al. (1992) observaram diminuição da toxicidade associada a compostos fenólicos e até estímulo do crescimento de *C. vulgaris*, em culturas sob condições fotoheterotróficas. Também EI-Sheekh et.al. (2012) observaram degradação de alguns compostos fenólicos pela *C. vulgaris*, confirmando a capacidade que algumas algas apresentam de oxidar compostos fenólicos.

Foram avaliados os feopigmentos, nas culturas dos 2 tipos de ensaios realizados com extratos a frio, com 5 e 21 dias de extração (Ensaio 1 e Ensaio 2, respetivamente), conforme tabela 4.3. De um modo geral, a quantidade de produtos de degradação de clorofila aumentou ao longo da curva de crescimento, como seria de esperar, já que se tratam de culturas em sistema fechado.

**Tabela 4.3:** Variação da concentração de feopigmentos ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a frio com 5 e 21 dias de extração, respetivamente 1º ensaio e 2º ensaio. (N=2)

	<b>Horas</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>120</b>	<b>168</b>	<b>216</b>	<b>264</b>
<b>1º Ensaio</b>	<b>Branco</b>	0,538±0,09	0,624±0,04	2,103±1,22	1,527±0,23	1,490±0,48	0,794±0,01
	<b>E 10</b>	1,042±0,01	1,402±0,11	2,083±0,02	1,947±0,44	2,438±0,20	1,514±0,13
	<b>E 25</b>	1,500±0,04	1,406±0,74	2,686±0,43	3,070±0,19	5,038±0,54	3,560±0,37
	<b>E 30</b>	1,385±0,08	0,792±0,17	2,405±0,15	2,902±0,24	3,105±0,40	3,546±0,38
<b>2º Ensaio</b>	<b>Branco</b>	0,107±0,02	0,146±0,03	0,129±0,13	0,096±0,08	0,049±0,01	0,055±0,01
	<b>E 10</b>	0,250±0,06	0,197±0,14	0,408±0,25	0,634±0,21	0,681±0,23	0,935±0,32
	<b>E 25</b>	0,240±0,21	0,131±0,05	0,423±0,09	0,850±0,13	1,026 *	1,565±0,21
	<b>E 30</b>	0,154±0,13	0,168 *	2,335±3,22	0,281±0,08	1,094±0,06	1,895±0,01

\*N=1

Escolheu-se a Chl *a*, uma vez que este é o pigmento mais abundante e importante nas clorófitas, por outro lado os feopigmentos correspondem a formas degradadas da Chl *a* inativa (Vollenweider, 1974, Golterman et al., 1978). Nesse sentido, foram encontradas correlações positivas entre a variação da concentração (pg/cel) da Chl *a* e da feofitina *a* (n=12):  $r=0,825$ ,  $p < 0,01$  para as culturas controlo (branco);  $r=0,952$ ,  $p < 0,01$ ;  $r=0,956$ ,  $p < 0,01$  e  $r=0,622$ ,  $p < 0,05$  para as culturas com 10%, 25% e 30% de extrato aquoso com 5 dias, respetivamente. Também foram encontradas correlações positivas entre a variação da concentração (pg/cel) da Chl *a* e da feofitina *a* (n=14):  $r=0,532$ ,  $p < 0,05$  para as culturas controlo (branco);  $r=0,849$ ,  $p < 0,01$ ;  $r=0,591$ ,  $p < 0,05$  e  $r=0,684$ ,  $p < 0,01$  para as culturas com 10%, 25% e 30% de extrato aquoso com 21 dias, respetivamente.

A razão da Chl *a* e da feofitina *a* serve como um bom indicador da condição fisiológica da cultura. Valores de % de degradação elevados são indicadores de elevadas concentrações de feopigmentos e por isso de degradação do fitoplâncton. Analisando os resultados obtidos da % de degradação, para os 2 ensaios com extrato de alecrim a frio, com 5 dias e 21 dias de extração, verifica-se que os valores de um modo geral são  $< 20\%$ , portanto considerados satisfatórios (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Percentagem de degradação para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a frio com 5 e 21 dias de extração, respetivamente 1º ensaio e 2º ensaio. (N=2)

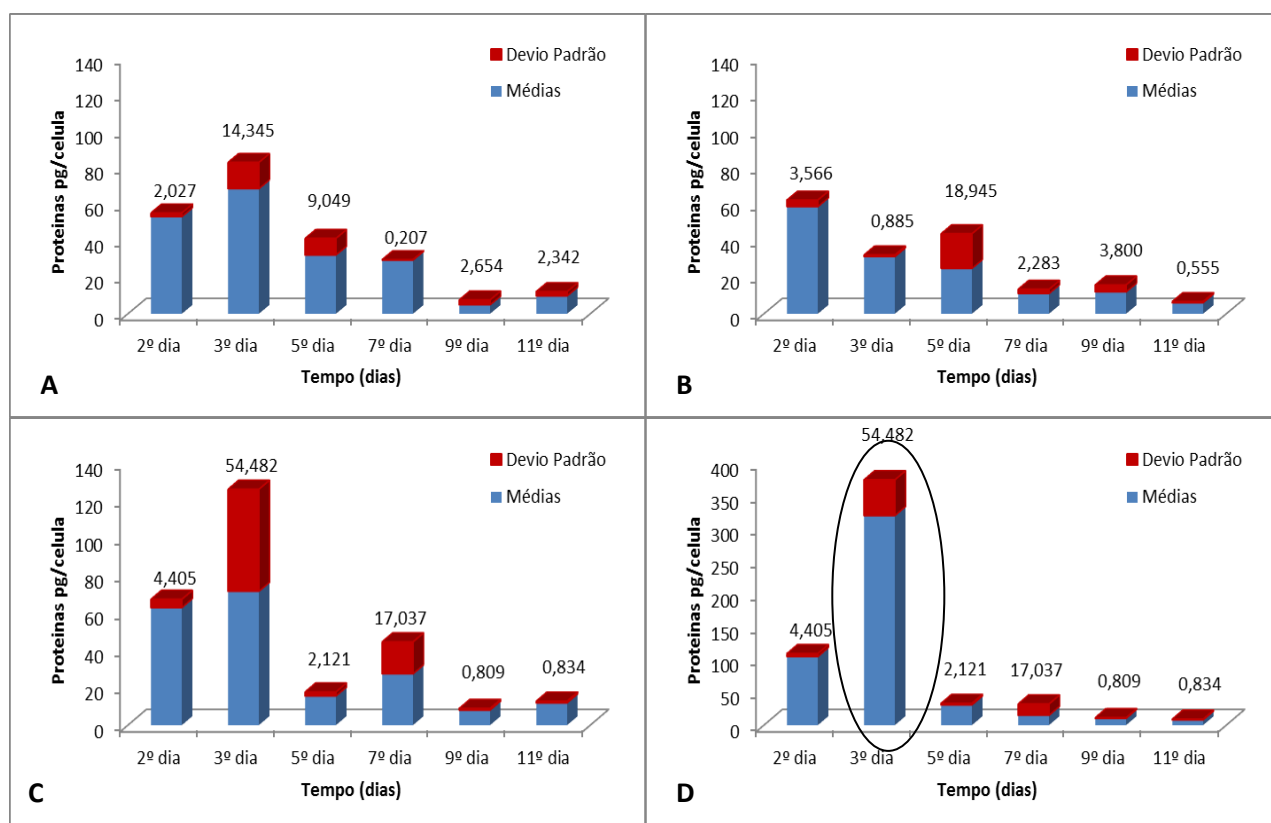
	<b>Horas</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>120</b>	<b>168</b>	<b>216</b>	<b>264</b>
<b>1º Ensaio</b>	<b>Branco</b>	17±0,93	15±0,68	18±1,52	18±9,23	19±1,91	18±0,85
	<b>E 10</b>	17±0,12	15±0,17	17±0,55	16±0,61	18±2,60	15±1,25
	<b>E 25</b>	26±3,75	12±0,81	15±1,06	15±0,92	18±1,26	17±0,47
	<b>E 30</b>	26±0,58	13±1,96	15±0,78	15±0,75	14±0,07	16±0,90
<b>2º Ensaio</b>	<b>Branco</b>	16±2,23	18±1,67	7,57 *	17±8,48	13±1,12	15±4,19
	<b>E 10</b>	20±1,83	9±4,31	11,2±1,31	12±1,59	12±0,61	12±5,10
	<b>E 25</b>	28±11,84	17±2,85	13,5±0,53	12±0,43	13±0,61	15±9,28
	<b>E 30</b>	14±8,70	16±0,18	11,36 *	10±2,45	17±7,08	16±12,59

\*N=1

*iii) Proteínas*

O doseamento das proteínas foi também feito em dias alternados, utilizando 2 culturas escolhidas aleatoriamente, quer dos brancos, quer das 3 concentrações testadas e para os 2 tipos de ensaios realizados com extratos a frio, com 5 e 21 dias de extração (Ensaio 1 e Ensaio 2, respetivamente).

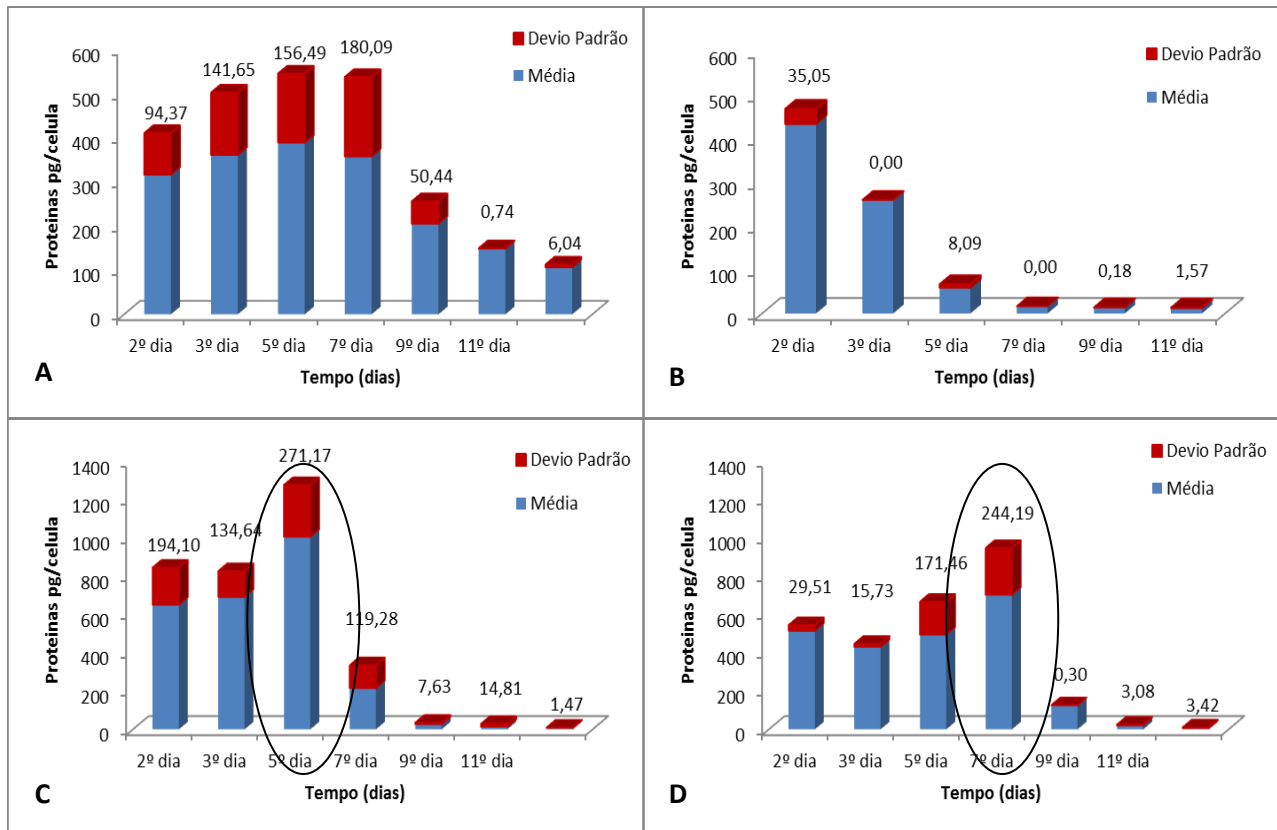
Nos gráficos da figura 4.8 e 4.9 apresenta-se a variação do teor de proteínas ao longo do tempo, para as culturas incubadas com extrato de 5 dias e 21 dias, respetivamente (1º e 2º Ensaio).



**Figura 4.8:** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 5 dias de extração (1º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

O doseamento das proteínas totais é geralmente usado como um parâmetro de avaliação da biomassa. Neste estudo, os resultados expressos por célula servem como um indicador da condição fisiológica da cultura, nomeadamente de atividade metabólica. Verificou-se um pico acentuado ao 3º dia para as culturas expostas a 30% de extrato com 5 dias (Figura 4.8 D). Este pico coincide com o início da fase exponencial destas culturas (tabela 4.1), podendo ser o resultado do aumento da síntese de proteínas necessárias para a degradação de substratos provenientes do extrato de alecrim, já que corresponde à maior percentagem testada.

Mais uma vez os picos observados nas culturas expostas a 25% e 30% de extrato com 21 dias (Figura 4.9 C e D) poderão ser o resultado de uma resposta metabólica necessária para a degradação dos compostos presentes nestes extratos, já que se verificam durante a fase exponencial do crescimento (Tabela 4.2).



**Figura 4.9:** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a frio, com 21 dias de extração (2º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

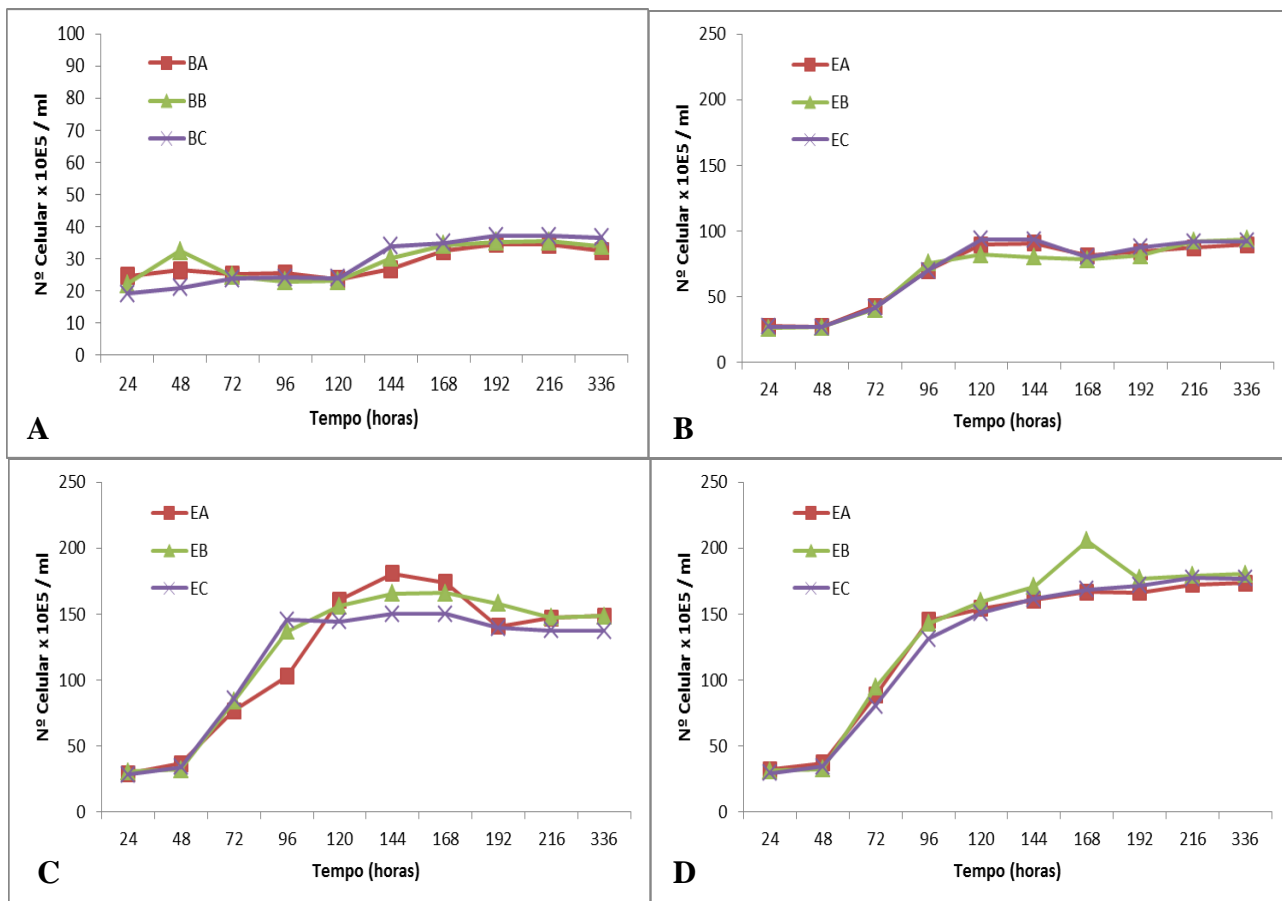
#### 4.1.2. Extrato aquoso a quente

##### i) Contagem celular

De forma a averiguar a resposta da microalga ao tipo de extração, realizou-se um 3º ensaio com *C. vulgaris* em meio Walne suplementado com 10%, 25% e 30% de extrato a quente de alecrim.

Tal como anteriormente os critérios de avaliação foram os mesmos, nomeadamente densidade celular, taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial e incremento celular ocorrido na fase exponencial.

Nos gráficos da figura 4.10, apresentam-se as curvas de crescimento da *C. vulgaris*, das culturas controlo (brancos) e das culturas incubadas com extratos aquosos de alecrim a quente, nas 3 concentrações testadas.



**Figura 4.10:** Curvas de crescimento para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C- Ensaio com 25% de extrato aquoso; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

O número células das culturas foi avaliado a durante um período total de 336 horas (14 dias) de incubação, por contagens diárias. Foi atingida a fase exponencial de crescimento em dias iguais para as concentrações 10%, 25% e 30%, às 48 horas, verificando-se duração diferente, até ao 5º dia, 6º dia e 8º dia, respetivamente, como se pode verificar na figura 4.10 (gráficos B, C e D) e na tabela 4.5. Nos brancos verificou-se que o crescimento em média foi exponencial a partir das 120 horas (5º dia) estendendo-se até às 192 horas (8º dia).

Os valores médios da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial e incremento celular ocorrido na fase exponencial, encontrados para estes ensaios (3º ensaio) são apresentados na tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3º Ensaio). N=3

	<b>Branco</b>	<b>E10</b>	<b>E25*</b>	<b>E30</b>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,005±0,0009 <sup>a</sup>	0,017±0,0007 <sup>b</sup>	0,016±0,0002 <sup>b</sup>	0,011±0,0019 <sup>b</sup>
<b>Duração</b> (dias)	5°-8°	2°-5°	2°-6°	2°-8°
<b>Incremento</b> (nº células x 10E5/ mL)	14±4 <sup>a</sup>	62±6 <sup>b</sup>	142±13 <sup>c</sup>	150±22 <sup>c</sup>

N= 2; Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente diferentes.

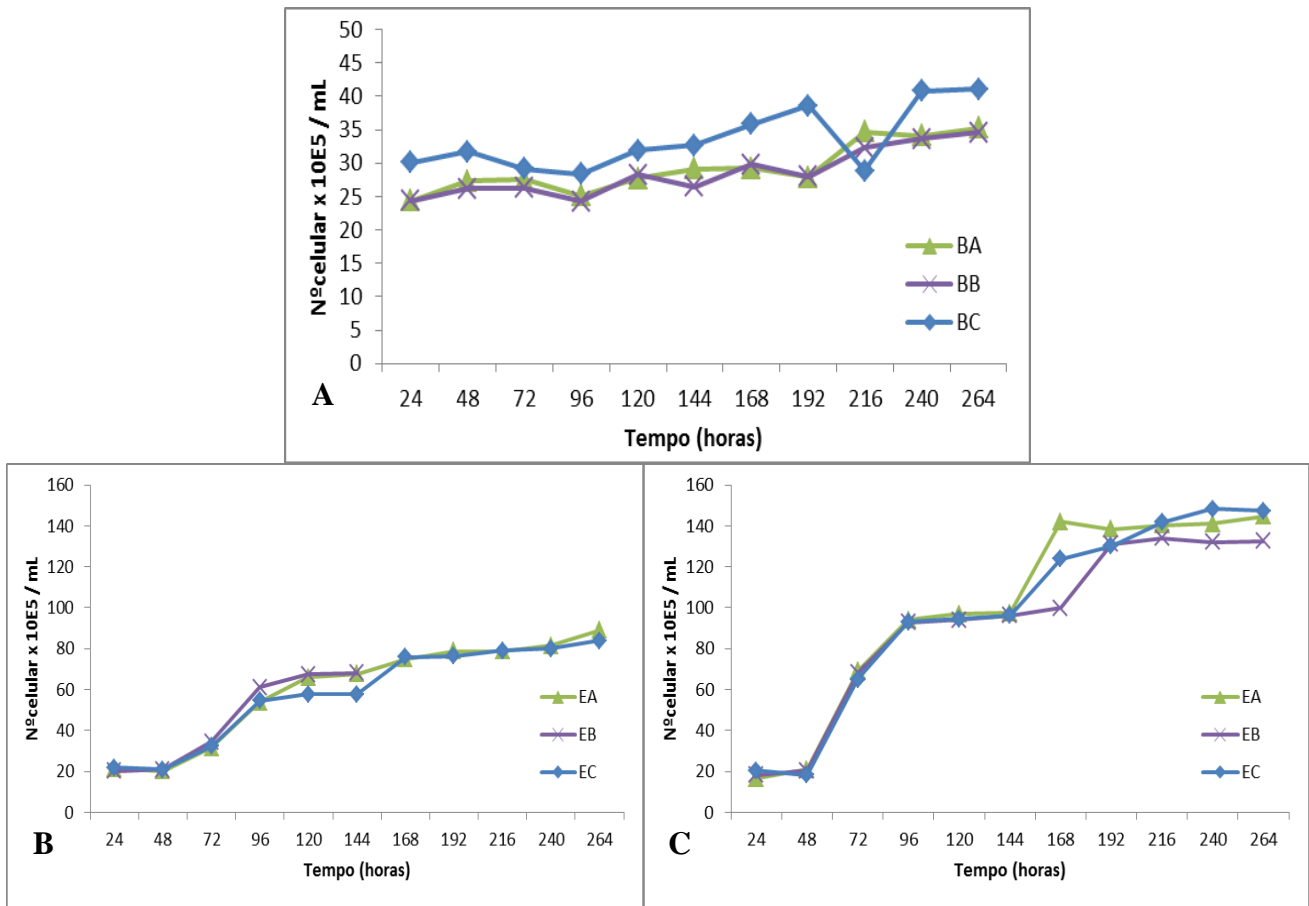
Os efeitos dos extratos aquosos de alecrim a quente influenciaram a taxa de crescimento da *C. vulgaris*, já que na sua presença os valores médios da  $\mu$  foram superiores, comparativamente ao branco. Também o incremento celular médio ocorrido na fase exponencial para as culturas incubadas com extrato de alecrim a quente foi superior comparativamente às culturas controlo (branco). Assim, não é de estranhar que a densidade celular final da *C. vulgaris*, quando incubada com extratos, fosse superior comparativamente às culturas controlo (gráficos da figura 4.10). Apesar disso não foi encontrada nenhuma relação entre a concentração dos extratos aquosos a quente de alecrim e a taxa específica média de crescimento da *C. vulgaris*. Na figura 4.11. exemplifica-se o especto dessas culturas.



**Figura 4.11:** Culturas *batch* de *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (3ºensaio).

Para confirmar estes resultados, efetuou-se um quarto ensaio com o mesmo extrato a quente, nas mesmas condições, tendo sido testadas 2 concentrações do extrato: 10% e 30%. Estes ensaios tiveram a duração de 264 horas (11 dias), tendo sido realizadas contagens diárias

Nos gráficos da figura 4.12, apresentam-se as curvas de crescimento da *C. vulgaris*, das culturas controlo (brancos) e das culturas incubadas com 2 concentrações de extratos aquosos de alecrim a quente (4º Ensaio).



**Figura 4.12:** Curvas de crescimento para *C. vulgaris* incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de extrato aquoso; C-Ensaio com 30% de extrato aquoso.

Tal como no ensaio anterior (3º ensaio) foi atingida a fase exponencial de crescimento em dias iguais para as concentrações 10% e 30%, iniciando a fase exponencial, às 48 horas, com duração até 11º dia e 8º dia, respetivamente (Figura 4.12 e Tabela 4.6). Nas culturas controlo (Brancos) verificou-se um crescimento exponencial a partir das 72 horas (3º dia) estendendo-se até ao final do ensaio.

Os valores médios da taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) e do incremento celular ocorrido na fase exponencial, encontrados para estas culturas (4º Ensaio) são apresentados na tabela 4.6.

**Tabela 4.6:** Valores médios de taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), duração da fase exponencial (Duração) e incremento celular ocorrido na fase exponencial (Incremento) para *C. vulgaris* incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). N=3

	<b>Branco</b>	<b>E10</b>	<b>E30</b>
<b><math>\mu</math> (h-1)</b>	0,002±0,0006 <sup>a</sup>	0,007±0,0001 <sup>b</sup>	0,010±0,0002 <sup>c</sup>
<b>Duração (dias)</b>	3º-11º	2º-11º	2º-8º
<b>Incremento (nºcélulas x 10E5/ mL)</b>	10±3 <sup>a</sup>	66±4 <sup>b</sup>	121±10 <sup>c</sup>

Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente diferentes.

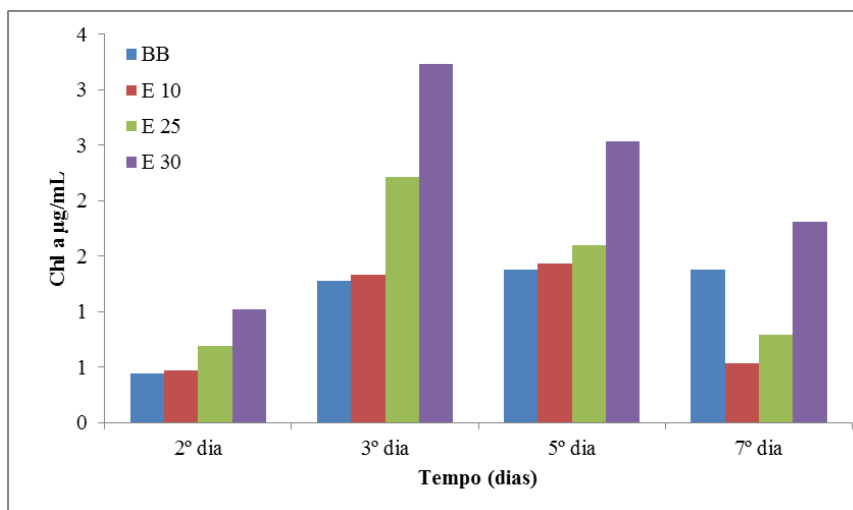
Os resultados obtidos neste 4º ensaio, confirmaram os resultados anteriores. Tanto os valores médios da  $\mu$  e do incremento celular ocorrido na fase exponencial (Tabela 4.6), como a densidade celular final da *C. vulgaris*, para as culturas incubadas com extrato de alecrim a quente, foram superiores comparativamente às culturas controlo (gráficos da figura 4.12). Na figura 4.13, exemplifica-se o especto dessas culturas.



**Figura 4.13:** Culturas *batch* de *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4ºensaio).

#### ii) Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

Foram tiradas amostras sensivelmente em dias alternados e sempre à mesma hora, somente para o 3º ensaio. Os valores obtidos da concentração da Chl *a* para o 3º ensaio, realizados com extrato a quente de alecrim, encontram-se nos gráficos da figura 4.14.



**Figura 4.14:** Variação da concentração da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações aquosas de alecrim a quente (3º ensaio). N=2

Para os brancos, o aumento da Chl *a* ( $\mu\text{g/mL}$ ) acompanhou a fase exponencial de crescimento, no entanto as culturas com 25% e 30% de extrato a quente têm um decréscimo da Chl *a*, a partir do 3º dia e para as culturas com 10% de extrato, a partir do 5º dia. Estes resultados parecem inesperados já que se esperava que a evolução pigmentar acompanhasse o crescimento da biomassa. De facto, verifica-se uma diminuição acentuada da Chl *a* por célula, comparativamente às culturas controlo (Tabela 4.7). Esta situação pode advir de alterações metabólicas resultantes, quer da presença de novos compostos, quer do aumento da concentração de compostos, comparativamente ao extrato a frio de alecrim que deprimem a concentração da clorofila, mas que apesar disso estimulam o crescimento da biomassa. O facto de os compostos fenólicos serem inibidores da atividade fotossintética, levando à diminuição da clorofila *a* (Megharaj et. al., 1992; Herrera-Silveira and Ramfrez-Ramfrez, 1996), suporta esta observação.

**Tabela 4.7:** Variação da concentração da Chl *a* (pg/cel), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. (N=2)

	Branco	E10	E25	E30
<b>2º Dia</b>	0,172±0,009	0,252±0,143	0,244±0,058	0,272±0,035
<b>3º Dia</b>	0,665±0,207	0,343±0,045	0,273±0,023	0,380±0,030
<b>5º Dia</b>	0,653±0,113	0,174±0,002	0,103±0,011	0,160±0,000
<b>7º Dia</b>	0,438±0,051	0,123±0,076	0,102±0,080	0,094±0,001

Foram avaliados os feopigmentos, nas culturas do 3º ensaio, conforme tabela 4.8. De um modo geral, a quantidade de produtos de degradação de clorofila aumentou ao longo do crescimento.

**Tabela 4.8:** Variação da concentração de feopigmentos ( $\mu\text{g/mL}$ ), para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. (N=2)

<b>Horas</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>120</b>	<b>168</b>
<b>BB</b>	0,045	0,174	0,209	0,244
<b>E 10</b>	0,090	0,363	0,328	0,070
<b>E 25</b>	0,100	0,527	0,425	0,117
<b>E 30</b>	0,145	0,817	0,784	0,425

Foram encontradas correlações positivas entre a variação da concentração (pg/cel) da Chl *a* e da feofitina *a* (n=8) somente para as culturas incubadas com 25% e 30% de extrato aquoso a quente de alecrim:  $r=0,790$ ,  $p<0,05$  e  $r=0,857$ ,  $p<0,01$ , respetivamente.

Os resultados obtidos da % de degradação, para o 3º ensaio, realizado com extrato de alecrim a quente, mostram que os valores de um modo geral são  $<10\%$ , portanto considerados satisfatórios (Tabela 4.9). Estes resultados confirmam que o extrato a quente afeta o teor de clorofila, não por aumento da sua degradação, mas sim inibindo provavelmente a sua síntese.

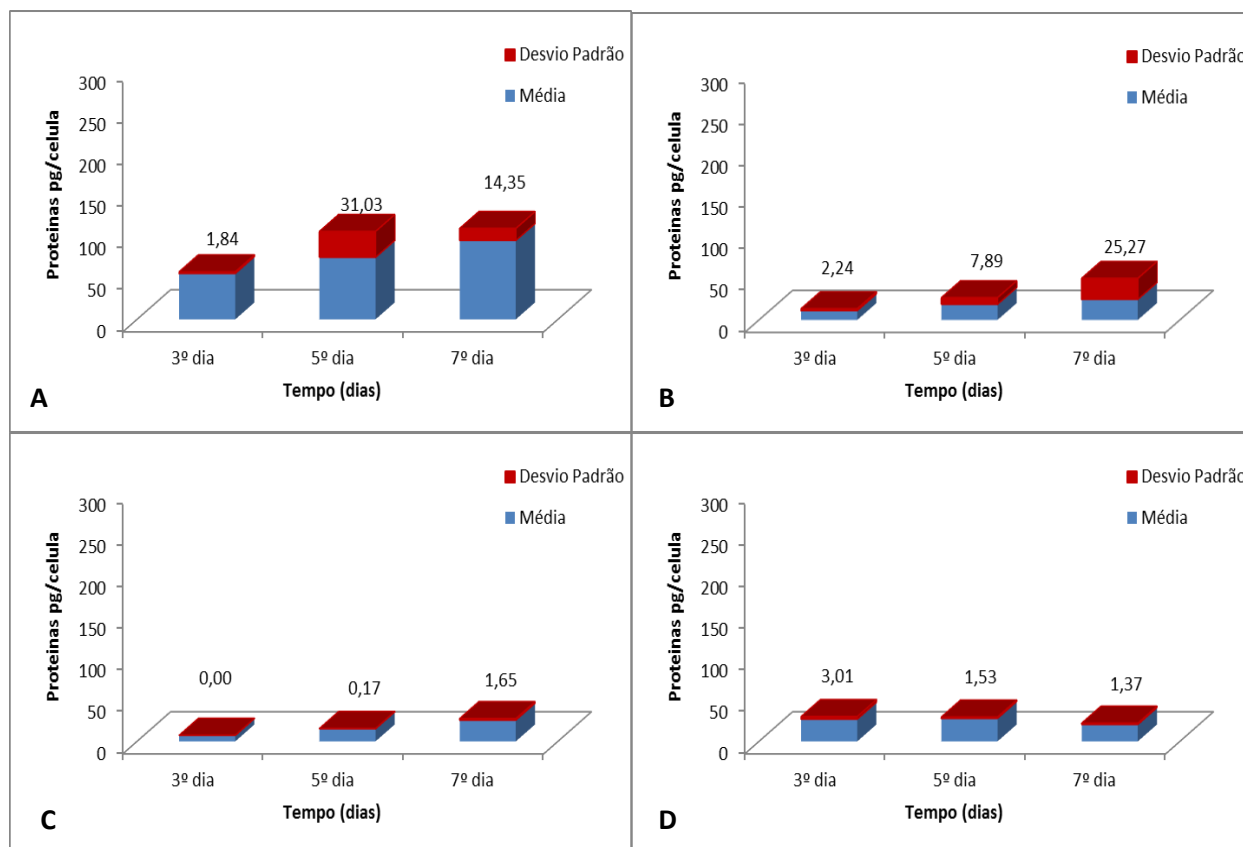
**Tabela 4.9:** Percentagem de degradação para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente, 3º ensaio. (N=2)

	<b>Horas</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>120</b>	<b>168</b>
<b>3º Ensaio</b>	<b>Branco</b>	10 $\pm$ 2,74	6 $\pm$ 0,66	6 $\pm$ 0,13	7,37 *
	<b>E 10</b>	7,57 *	7 $\pm$ 1,23	11 $\pm$ 0,16	10 $\pm$ 3,92
	<b>E 25</b>	4 $\pm$ 2,39	10 $\pm$ 2,09	11 $\pm$ 0,33	7 $\pm$ 0,22
	<b>E 30</b>	7 $\pm$ 0,33	10 $\pm$ 0,63	13 $\pm$ 0,47	10 $\pm$ 0,22

\*N =1

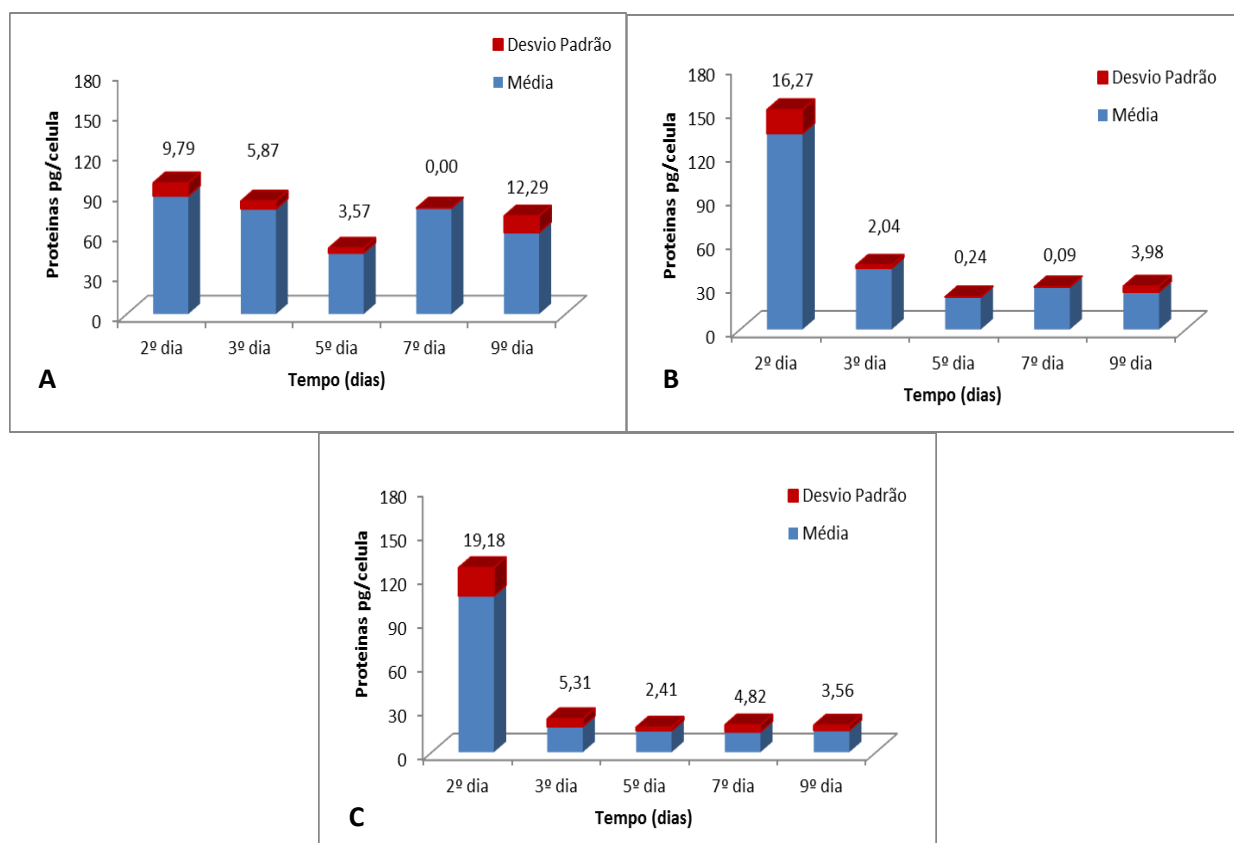
### iii) Proteínas

No gráfico da figura 4.15, apresenta-se a variação do teor de proteínas ao longo do tempo, para as culturas incubadas com extrato a quente (3º ensaio).



**Figura 4.15:** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com diferentes concentrações de extrato de alecrim a quente (3º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 25% de infusão; D- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

Verifica-se de um modo geral, que os valores de proteína por célula, nas culturas com extrato a quente, são inferiores aos valores do controlo (branco). Para confirmar estes resultados fez-se o doseamento das proteínas nas culturas incubadas com 2 concentrações de extrato a quente (4º Ensaio), conforme gráficos da figura 4.16. De facto, o teor de proteína na *C. vulgaris* incubada com 10 e 30% de extrato de alecrim a quente, continua a ser inferior comparativamente ao controlo, sendo esse efeito aparentemente dependente da concentração do extrato. A eventual inibição da síntese de clorofila observada poderá estar relacionada com esta diminuição do teor de proteína. Segundo Megharaj et. al.,(1992), os compostos fenólicos exercem efeitos tóxicos que se manifestam, para além da diminuição do teor de clorofila, também na diminuição do teor de proteínas.



**Figura 4.16:** Valores da proteína em pg/célula para *C. vulgaris* incubada com 2 concentrações de extrato aquoso de alecrim a quente (4º Ensaio). A- Brancos; B- Ensaio com 10% de infusão; C- Ensaio com 30% de extrato aquoso.

## 4.2. Compostos Fenólicos nos Extratos Aquosos

A figura 4.17, apresenta o perfil cromatográfico do extrato de alecrim obtido a frio, onde se podem visualizar os espectros dos picos com maior intensidade e seus respectivos tempos de retenção. Neste extrato foi detetado e quantificado o ácido rosmarínico e a quercetina (Tabela 4.10). Comparativamente aos outros dois extratos analisados (extrato a frio e decocção obtida da hidrodestilação) o ácido rosmarínico aparece neste extrato em muito maior concentração, o que sugere que a temperatura terá efeito negativo na estabilidade deste composto. Embora a temperatura tenha um efeito positivo na produção da extração, esta não deve ultrapassar os 50°C, para evitar a destruição do ácido rosmarínico (Angelov, 2007).

**Tabela 4.10:** Quantificação dos compostos fenólicos identificados nos três tipos de extrato de alecrim analisados.

Amostra	Composto fenólico	Total (µg/g peso seco) *	Relação decocção/quente
Extrato a frio	Ácido gálico	0,00	14,67
Extrato a quente		14,00	
Decocção obtida da hidrodestilação		205,37	
Extrato a frio	Ácido clorogénico	0,00	14,63
Extrato a quente		1,43	
Decocção obtida da hidrodestilação		20,85	
Extrato a frio	Ácido cafeico	0,00	6,96
Extrato a quente		4,09	
Decocção obtida da hidrodestilação		28,47	
Extrato a frio	Luteolina-7-O-glucoside	0,00	11,17
Extrato a quente		5,40	
Decocção obtida da hidrodestilação		60,36	
Extrato a frio	Luteolina-4-O-glucoside	0,00	58,17
Extrato a quente		4,09	
Decocção obtida da hidrodestilação		237,69	
Extrato a frio	Quercetina-3-O-rhamnoside	76,70	22,86
Extrato a quente		3,54	
Decocção obtida da hidrodestilação		80,87	
Extrato a frio	Ácido rosmarínico	1116,85	10,70
Extrato a quente		44,18	
Decocção obtida da hidrodestilação		472,71	

\* Média de três repetições

Erro padrão da média = ± 0,1

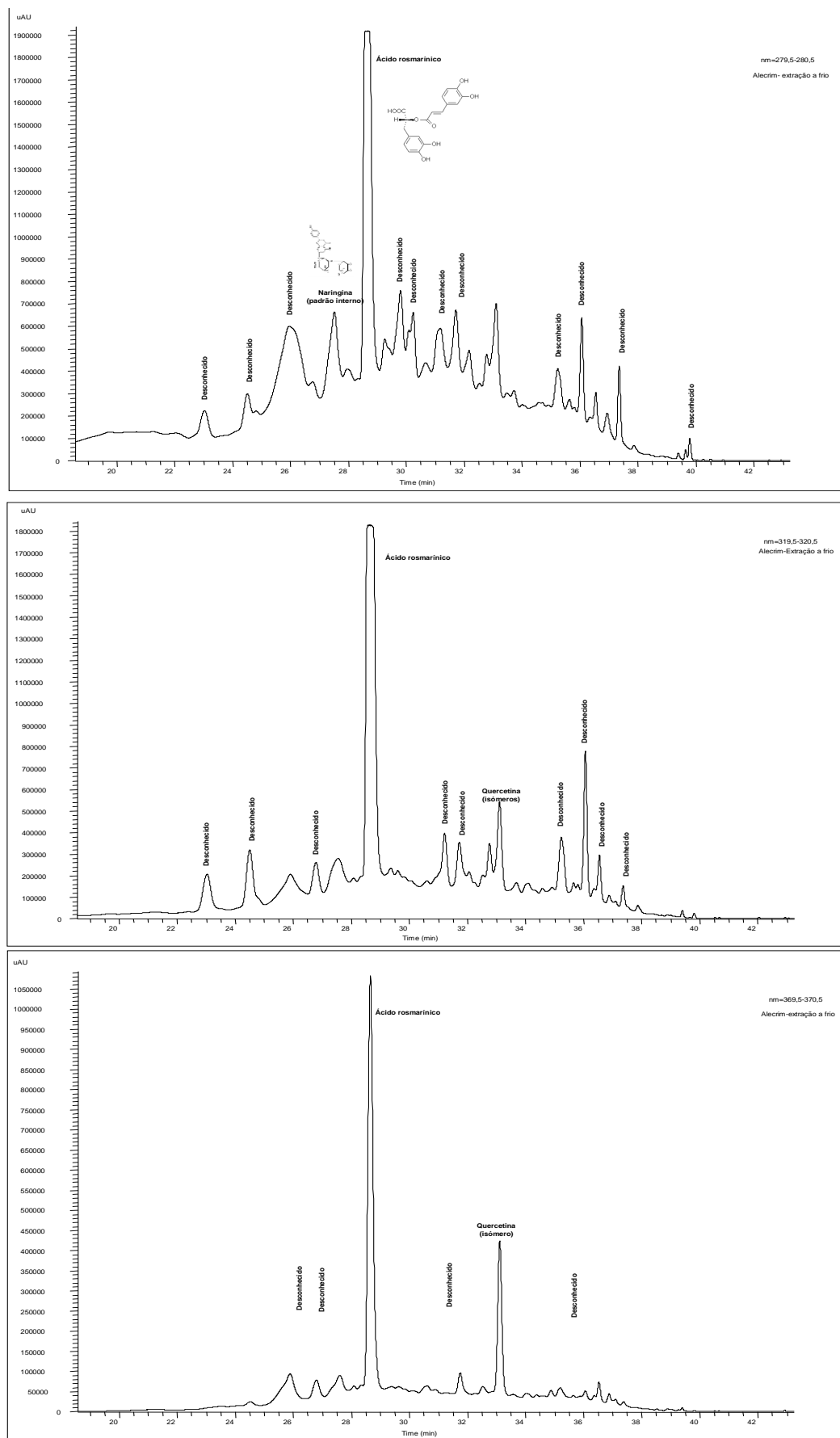


Figura 4.17: Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em extratos de alecrim a frio, com 21 dias.

Os resultados obtidos com *C. vulgaris* apontam para um estímulo do crescimento na presença do extrato a frio de alecrim, com 21 dias de extração e mostram uma relação direta com o aumento da concentração de extrato, nas gamas testadas. O ácido rosmarínico tem atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatório e antioxidante (Peterse & Simmonds, 2003; Pietsch et al, 2011). À quercetina são também atribuídas propriedades antiviral, anti-inflamatória e antioxidante, e além destas também analgésica, antialérgica e bactericida (Lakhanpal et al, 2007; Pietsch et al, 2011)

No entanto, apesar do ácido rosmarínico e da quercetina apresentarem ação antibacteriana podem estar, nas concentrações testadas, abaixo da concentração inibitória. Por outro lado, as vias metabólicas na manifestação dos efeitos tóxicos são seguramente diferentes, já que a *C. vulgaris* é eucariota. Os efeitos tóxicos de compostos fenólicos nas microalgas serão dependentes da concentração e do tipo de compostos, e também das condições de iluminação das culturas. É de notar que os efeitos tóxicos de compostos fenólicos são revertidos e/ou atenuados na *C. vulgaris*, em situação fotoheterotrófica (Megharaj et. al., 1992). Por outro lado, Luna et al.(1996) demonstraram que a quercetina induz um aumento do crescimento celular, diminuindo a peroxidação de lípidos ao nível da membrana.

Na figura 4.18 é apresentado o perfil cromatográfico do extrato de alecrim obtido a quente, onde se podem visualizar os espectros dos picos com maior intensidade e seus respectivos tempos de retenção. Comparando estes cromatogramas com os obtidos para o extrato aquoso a frio, verificou-se que existem diferenças nas composições químicas entre ambos os extratos.

No extrato a quente foi detetado maioritariamente o ácido rosmarínico e o ácido gálico (Tabela 4.10). Comparativamente ao extrato a frio, o extrato a quente apresenta mais variedade de compostos fenólicos já que foram identificados e quantificados 7 compostos distintos. A diferença entre os extratos a quente e extratos a frio deve estar ligada à maior capacidade do solvente (água) a temperatura elevada. O ácido gálico apresenta atividade antibacteriana, antiviral, bem como atividade analgésica e anti-apoptótica (Belur, 2011). Apesar disso, o facto dos extratos aquosos de alecrim a quente aumentarem a taxa de crescimento da *C. vulgaris*, aparentemente dependente da concentração testada, poderá ser devido às baixas concentrações dos compostos fenólicos nos extratos, que não são suficientes para manifestar o potencial efeito algistático e/ou algicida. Por outro lado, a presença de mais variedade de compostos parece ter funcionado como substratos suplementares.

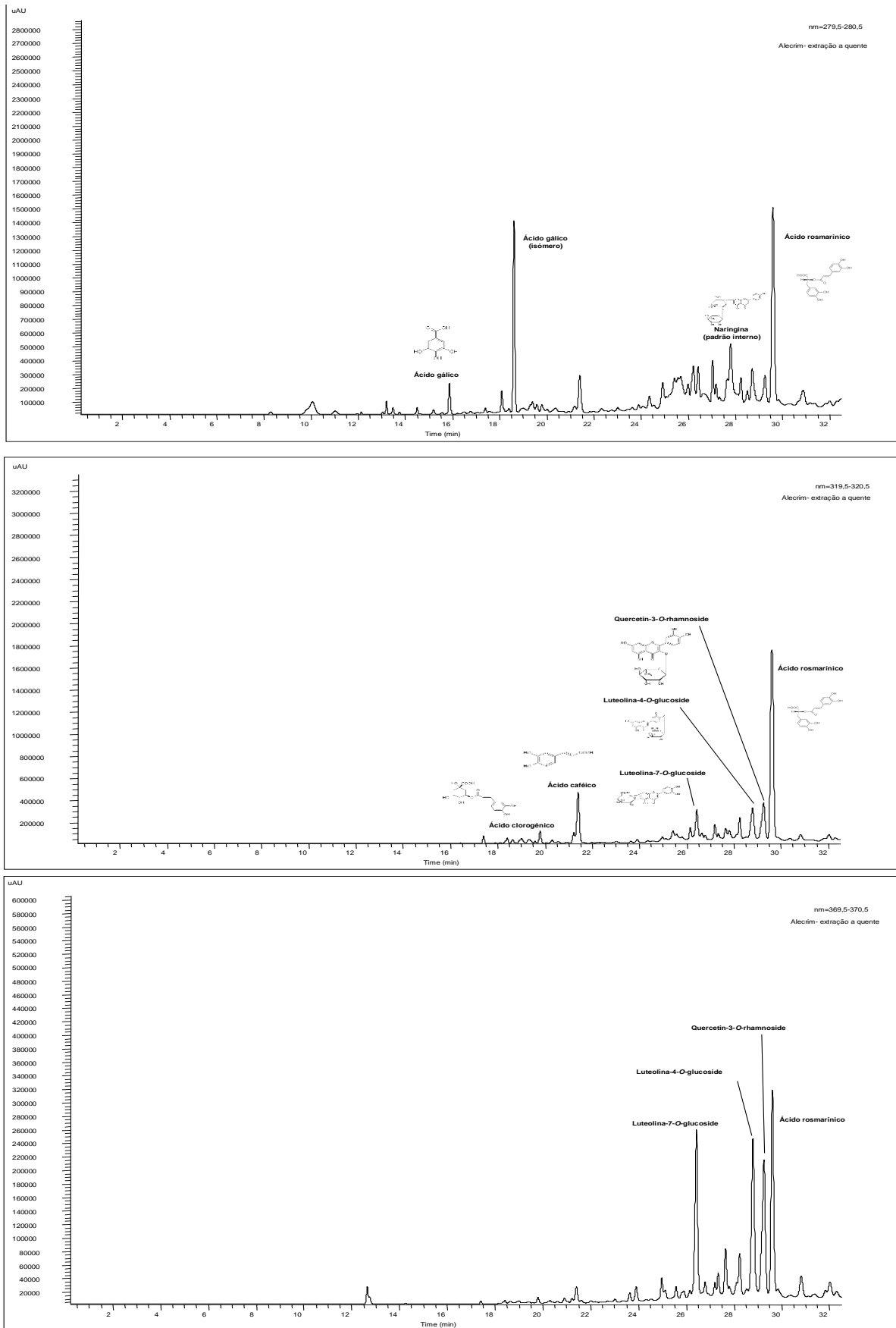
A figura 4.19 apresenta o perfil cromatográfico da decocção resultante do processo de hidrodestilação do alecrim, testada anteriormente pela equipa de investigação e onde se podem visualizar os espectros dos picos com maior intensidade e seus respetivos tempos de retenção. Neste extrato foram detetados e quantificados 7 compostos fenólicos, sendo maioritariamente o ácido rosmarínico, luteolina e ácido gálico (Tabela 4.10). Comparativamente ao extrato a quente, a decocção apresenta maior concentração de compostos fenólicos (Tabela 4.10)

Os resultados obtidos neste trabalho, nomeadamente o estímulo do crescimento de *C. vulgaris* na presença do extrato aquoso a quente e tendo em consideração o perfil de compostos fenólicos encontrado, levam a colocar a hipótese de que os efeitos algistáticos, anteriormente obtidos com a decocção, dependem da concentração dos diferentes compostos fenólicos. De facto, comparativamente ao extrato de alecrim a quente, a decocção do alecrim apresenta sempre maior concentração dos 7 compostos fenólicos, com um fator que varia de 7 a 58 (Tabela 4.10).

No extrato a frio só foram identificados 2 dos 7 compostos fenólicos. Estes resultados são confirmados pelo facto do grau de inibição/estímulo do crescimento de microalgas mostrar relação com a concentração de compostos fenólicos, já que na presença de baixas concentrações se verifica um efeito positivo no crescimento (Megharaj et. al., 1992; Herrera-Silveira and Ramfrez-Ramfrez, 1996; EI-Sheekh, et al., 2012)

Embora a concentração do ácido rosmarínico seja a mais elevada no extrato a frio, os resultados globais obtidos com os 3 tipos de extratos, indiciam que o efeito algistático e/ou algicida poderá depender, para além da concentração, de efeitos sinérgicos da presença de todos os compostos.

A diferença entre o extrato a quente e a decocção, encontrada na quantificação dos compostos fenólicos, poderá maioritariamente dever-se ao efeito da sazonalidade da apanha do alecrim, em detrimento da diferente composição dos extratos (m/v). De facto, para o extrato a quente usado neste trabalho usou-se alecrim colhido em Abril e para a decocção alecrim colhido em Setembro. Serão necessários mais trabalhos para saber de que modo a sazonalidade do alecrim influencia o perfil quantitativo e qualitativo dos compostos fenólicos.



**Figura 4.18:** Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em extratos de alecrim a quente.

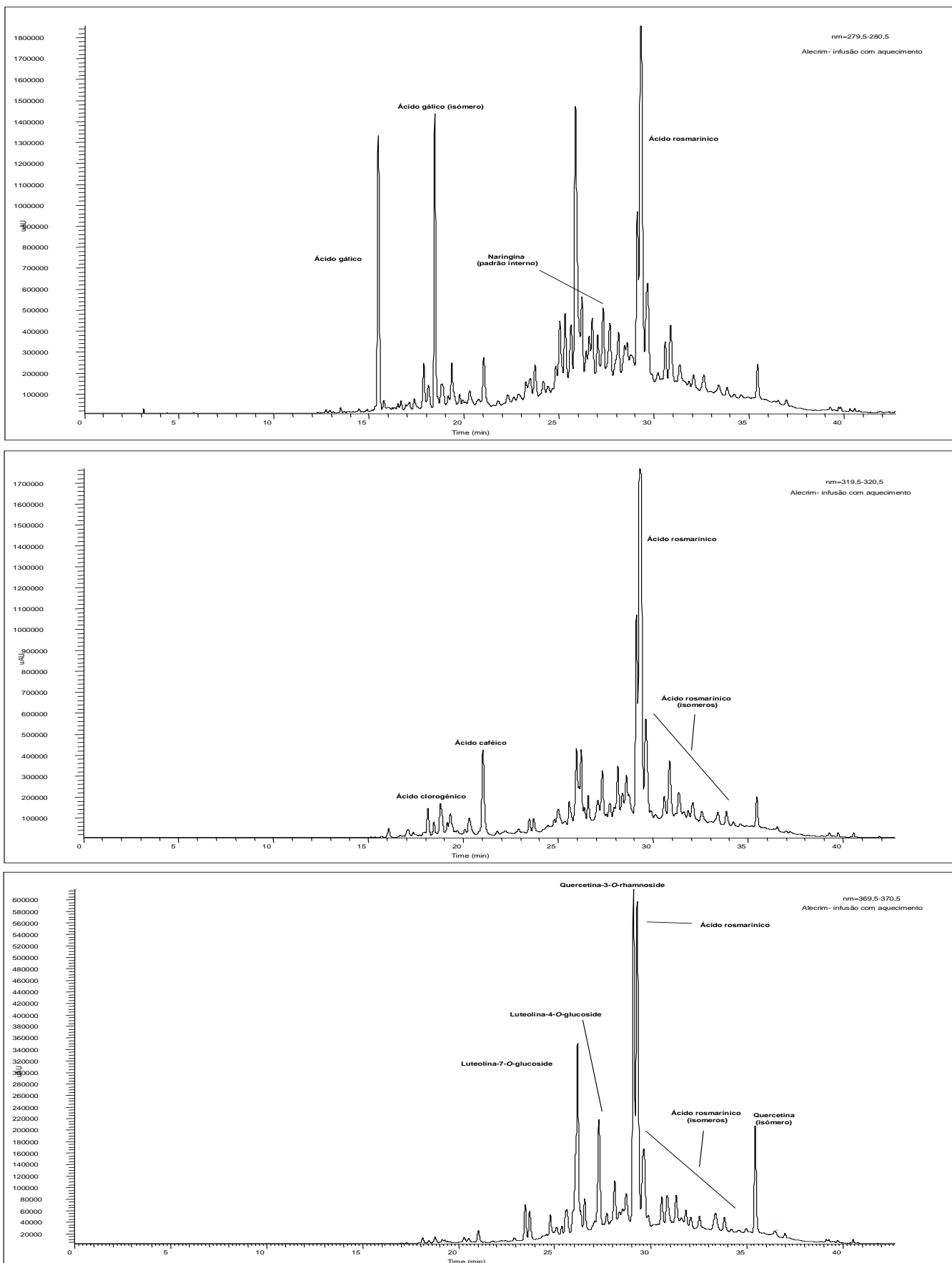


Figura 4.19: Perfil dos fenólicos individuais detetados por HPLC em decoção de alecrim.

## 5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Os estudos para avaliar a utilização de extratos aquosos de alecrim no controlo do crescimento de microalgas, como alternativa relativamente aos algicidas convencionais, mostraram que os extratos a frio com 5 dias de extração, não afetam o crescimento da *Chlorella vulgaris*, por outro lado quando o tempo de extração se prolonga para 21 dias, ocorre estímulo do crescimento, nas condições de incubação testadas. Neste caso, levaram a um aumento quer da taxa de crescimento, quer do incremento celular médio ocorrido na fase exponencial e por isso também da densidade celular final e do teor em Chl *a*. Comparativamente às culturas controlo a incubação da *C. vulgaris* na presença de extrato com 21 dias, mostrou aumento significativo destes parâmetros, em função da concentração testada. Os picos no teor de proteína, observados nestas culturas quando expostas á maior concentração de extrato (21 dias), poderão ser o resultado do aumento da síntese de proteínas necessárias para a degradação de substratos suplementares.

Para o extrato aquoso de alecrim a quente, os resultados obtidos permitem concluir que a sua presença levou ao aumento da taxa de crescimento da *C. vulgaris*, ao aumento do incremento celular médio ocorrido na fase exponencial e da densidade celular final da *C. vulgaris*, uma vez que os valores destes parâmetros foram superiores comparativamente às culturas controlo. Apesar disso, nestas culturas observou-se uma diminuição acentuada da Chl *a* por célula e do teor de proteína na *C. vulgaris*, sugerindo alguns efeitos tóxicos de compostos fenólicos presentes nos extratos de alecrim a quente.

Tendo em consideração o perfil quantitativo de compostos fenólicos encontrado nos extratos a quente e nas decocções anteriormente testadas, coloca-se a hipótese de que os efeitos algistáticos anteriormente observados com a decocção, se deveram à elevada concentração dos compostos fenólicos, confirmando a ideia de que o grau de inibição/estímulo do crescimento de microalgas mostra relação com a concentração de compostos fenólicos. Efetivamente, comparando o extrato de alecrim a quente com a decocção do alecrim, este último apresentou sempre maior concentração de compostos fenólicos, com um fator que variou de 7 a 58.

Os resultados dos compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos aquosos mostram diferenças nas composições qualitativas e quantitativas. No extrato de alecrim obtido a frio, foi quantificado o ácido rosmarínico e a quercetina, enquanto que no extrato a quente foi quantificado maioritariamente o ácido rosmarínico e o ácido gálico. A diferença entre estes extratos deve estar ligada à maior capacidade do solvente (água) a temperatura elevada.

Comparativamente ao extrato de alecrim a quente, a decocção do alecrim apresenta sempre maior concentração de compostos fenólicos. Esta diferença poderá maioritariamente dever-se ao efeito da sazonalidade do alecrim. De facto, para o extrato a quente usado neste trabalho usou-se alecrim colhido em Abril e para a decocção alecrim colhido em Setembro.

Serão necessários mais trabalhos para saber de que modo a sazonalidade do alecrim influencia o perfil quantitativo e qualitativo dos compostos fenólicos e consequentemente o potencial efeito algicida/algistático.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addisie Y., Medellin A.C. (2012) Allelopathy in aquatic macrophytes: Effects on growth and physiology of phytoplanktons. *African Journal of Plant Science*, Vol. 6, 270-276.
- Afonso, M.S. (2010). Avaliação do efeito do extrato aquoso e da fração fenólica livre do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Universidade de São Paulo.
- Angelov G., Penchev P., Condoret J.S. (2007). Optimization of operational conditions of ethanol extraction of rosmarinic acid from lemon balm, *Scientific Papers*. Vol. 35.
- Bakker S.E., Van Donk E., Declerck S.A.J., Helmsing N.R., Hidding B., Nolet B.A. (2010). Effect of macrophyte community composition and nutrient enrichment on plant biomass and algal blooms. *Elsevier, Basic and Applied Ecology*, 11, 432–439.
- Basiri Y., Zarei H., Mashayekhy K. and Pahlavany M.H. (2011). Effect of rosemary extract on vase life and some qualitative characteristics of cut carnation flowers. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*. Vol. 2(14), 261 – 265.
- Barros S., Geraldés A.M., Fernandes C. (2011). Avaliação do potencial algicida e algistático de extractos vegetais em *Chlorella vulgaris* e *Anabaena cylindrica*. *CAPTAR (ciências e ambiente para todos)*, Vol.3, nº1, 30-39.
- Belur P.D. and Pallabhanvi B. (2011). Investigation on production of gallic acid from *Terminalia chebula* extract using cell-associated tannase of *Bacillus massiliensi*. In *International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS'2011)*, 222-225.
- Bertoldi F. C., Sant'Anna E., Oliveira J.L.B. (2008). Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Ciencia. Rural*, vol.38, nº1, 54-58
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.

- Bricker, S.B., C.G. Clement, D.E. Pirhalla, S.P. Orlando, and D.R.G. Farrow (1999). National Estuarine Eutrophication Assessment: Effects of Nutrient Enrichment in the Nation's Estuaries. NOAA, National Ocean Service, Special Projects Office and the National Centers for Coastal Ocean Science. Silver Spring. MD: pp 71.
- Bruneton, J (2001). Farmagognosia, Fitoquímica. Plantas Medicinales. Ed.1 ACRIBIA S.A. Zaragoza, Espanha, ed. 2, pp. 1099.
- Carvalho-Junior R. N., Rehder V.L.G., Sartoratto A., Santos A.S., Meireles M.A.A. (2004). Comparison of the global yield and chemical composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts obtained by hidrodistillation and SFE. In: Encontro Brasileiro de fluidos supercríticos V, Florianópolis: EQA/CTC/UFSC. p 81.
- Cobo F., Lago L., Barca S., Vieira R., Servia M.J. (2012). Cianobacterias y medioambiente: aspectos ecotoxicológicos de sus floraciones en aguas continentales. AGAIA, 55-58.
- Coelho J.P., Pereira M.E., Duarte A.C., Pardal M.A. (2009). Contribution of primary producers to mercury trophic transfer in estuarine ecosystems: Possible effects of eutrophication. Marine Pollution Bulletin. 58, 358–365.
- Cortes, R. M., Carvalho, L. H., Carvalho, M. J. (1992). Caracterização Físico-Química das Água Dulciaquícolas. Implicações Biológicas, UTAD, Vila Real, pp. 126.
- Costa J.A.V., Radmann E.M., Cerqueira V.S., Santos G.C., Calheiros M.N. (2006). Perfil de ácidos graxos das microalgas. Alim. Nutr., Araraquara. Vol17, nº4, 429-436.
- Cunha A. P., Teixeira F., Silva A.P., Roque O.R. (2007). Plantas na Terapêutica – Farmacologia e Ensaio Clínicos. Fundação Calouste Gulbenkian. ISBN: 978-972-31-1224-5.
- EI-Sheekh MM, Ghareib MM and EL-Souod GW A (2012) Biodegradation of Phenolic and Polycyclic Aromatic Compounds by Some Algae and Cyanobacteria. J Bioremed Biodegrad. 3:133. doi: 10.4172/2155-6199.1000133
- European Communities (EU) (2002). Eutrophication and health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Ferreira M.T, Franco A., Amaral S., Albuquerque A. (2010). Pesca desportiva em albufeiras do centro e sul de Portugal: contribuição para a redução da eutrofização por biomanipulação. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. pp. 45.

- Forestry, Department of Water Affairs (2002). National Eutrophication Monitoring Programme Implementation. Implementation Manual (Final Draft). First Edition.
- Geiger, S., Henry, E., Hayes, P. & Haggard, K. 2005. Barley Straw-Algae Control Literature Analysis (in: <http://barleyworld.org/barleystraw.php>) 20/10/12
- Gross, E.M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Science* 22: 313-339.
- Gross, E.M.; Hilt, S.; Lombardo, P. & Mulderij, G. (2007) Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton- State of art and open questions. *Hydrobiologia* 584:77-88.
- Golderman H.L., Clymo R.S. & Ohnstad M.A.M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of freshwaters: Oxford. Blackwell Scientific Publications, v.I.B.P.Handbook.8. p.213.
- Herrera-Silveira J.A. and Ramfrez-Ramfrez J. (1996). Effects of natural phenolic material (tannin) on phytoplankton growth. *Limnol. Oceanogr.* 41(5): 1018-1023.
- Inatani R., Nakatani N., Fuwa H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, Vol 47, n° 3, 521-528.
- Jančula D, Suchomelová J, Gregor J, SmutnáM, Maršálek B, Táborská E. (2007). Effects of Aqueous Extracts from Five Species of the Family Papaveraceae on Selected Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox, 480 – 486.
- Jeffrey, S.W., and G.F.Humphrey (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzn. (BPP)* 167, 191-194.
- Jamshidi R., Afzali Z. and Afzali D. (2009). Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (1), 78-81.
- Kuhlmann A. and Rohl C. (2006). Phenolic Antioxidant Compounds Produced by in Vitro cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Their Anti-inflammatory Effect on Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 44, n°. 6, 401 – 410.

- Lakhanpal P. and Rai D.K. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, Vol. 2, nº 2, 22-37.
- Lorenzi H. & Matos F. J. (2006) *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas*. Francisco José de Abreu Matos. Primeira Edição. Instituto Plantarum. Nova Odessa. 512 pp.
- Lorenzen C.L. (1967). Determination of chlorophyll and pheo-pigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, Vol.12, 345-346.
- Megharaj M., Pearson H.W. and Venkateswarlu K. (1992). Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Plant and soil*. 140, 25-34.
- Melo P.S. (2010). *Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais*. Master Thesis. Universidade de São Paulo. Piracicaba. pp.100.
- Ohse S., Derner B.D., Ozório R.A., Braga V.C.B., Cunha P., Lamarca C.P., Santos M.E. (2008). Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas*, 21, 7-18
- Pawlak J.F., Laamanen M. and Andersen J.H. (2009). Eutrophication in the Baltic Sea: An integrated thematic assessment of the effects of nutrient enrichment in the Baltic Sea region. *Baltic Sea Environment Proceedings*. nº 115.
- Petersen M. and Simmonds M.S.J. (2003). Molecules of interest: Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.
- Pietsch K., Saul N., Chakrabarti S., Stürzenbaum S.R., Menzel R. and Steinberg C.E.W. (2011). Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*, Vol.12, nº4, 329-347.
- Pinto, R.C.A. (2012). *Percepção de Impactos Ambientais: o caso da lagoa do Fundão no município de Formiga – Minas Gerais*. Master Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. pp.44.
- Proença da Cunha, A & Roque, OR (2011) *Plantas medicinais da farmacopeia portuguesa. Constituintes, controlo, farmacologia e utilização*. Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 710
- Queiroz M.L.S., Torello C.O., Perhs S.M.C., Rocha M.C., Bechara E.J.H., Morgano M.A., Valadares M.C., Rodrigues A.P.O., Ramos A.L., Soares C.O. (2008). *Chlorella vulgaris* up-

modulation of myelossuppression induced by lead: The role of stromal cells. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3147–3154.

Rahman AKM M., Bakri D.A. (1999). Undated, Eutrophication and Algal Blooms in Inland Reservoirs: A case Study from Australia. *Land and Water Management*. Orange (<http://www.eng-consult.com/BEN/papers/Paper-mrahman.PDF>, 23/9/2012).

Razborsek M.I., Voncina D.B., Dolecek V., Voncina E. (2007). Determination of Major phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Acta Chim. Slov.* N° 54, 60–67

R.S.S.WU (1999). Eutrophication, Water Borne Pathogens and Xenobiotic Compounds: Environmental Risks and Challenges. *Marine Pollution Bulletin* Vol.39, 11-22.

Shaw G.R., Moore D. and Garnett C.M. (2003) Eutrophication and algal blooms. In Aleksandar Sabljic (Ed.), *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)* (p. 1-21) Oxford, UK: Eolss Publishers.

Svoboda K.P., Deans S.G.A. (1992). Study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 7, n° 2, 81-87.

Tavassoli S. and Djomeh Z.E. (2011). Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Veterinaria* 7 (4), 337-341.

Vasconcelos V. (2006). Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica*, 25, 425-432.

Vollenweider, R.A. (1974). Photosynthetic pigments. *In*: Vollenweider, R. (Ed.). *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. IBP Handbook, n° 12, Blackwell Scientific Publications, London. pp 225

AlgaeBase (1996) Algae information <http://www.algaebase.org/> (18/10/2012)