

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
GRUPO DE DISCIPLINAS DE ECOLOGIA DA HIDROSFERA

Título da Dissertação  
“Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis*  
como matéria-prima para biocombustíveis”

Por:

OCTÁVIO SIMEÃO BERNARDES COELHO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Bioenergia

Orientador: Nídia de Sá Caetano

Dezembro de 2009

"A sabedoria da natureza é tal que não produz nada de supérfluo ou inútil."

(Nicolau Copérnico)

"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

(Fernando Pessoa)

## **Agradecimentos**

Expresso aqui uma palavra de agradecimento a todos os que directa ou indirectamente tornaram possível a concretização deste trabalho, em particular:

À Doutora Nídia de Sá Caetano toda a atenção e orientação prestada em todo o trabalho.

Agradeço também à minha família, especialmente aos meus pais e à minha madrinha, e amigos pelo apoio constante e força que me deram.

Agradeço à Sandra Oliveira o companheirismo e amizade sempre presentes.

Quero agradecer a todos os professores e auxiliares do Departamento de Engenharia Química do ISEP pela disponibilidade imediata em ajudar sempre que precisei.

## Resumo

Este trabalho teve como objectivo a optimização da produtividade lipídica de uma microalga de rápido crescimento tendo em vista a sua utilização como fonte de lípidos para biocombustíveis. O objectivo foi subdividido nos seguintes pontos:

- Inoculação das microalgas de água doce *Arthrospira platensis*, *Porphyridium aeruginosum*, *Schizomeris leibleinii*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus brauni* seleccionando-se a de crescimento mais rápido;
- Avaliação do crescimento algal e controlo de possíveis contaminações nas culturas objecto de estudo;
- Optimização das condições de cultivo, em laboratório, da estirpe de mais rápido crescimento, de forma a maximizar a produtividade lipídica.

Para a *Arthrospira platensis* (estirpe seleccionada do grupo em estudo, por se ter revelado a de mais rápido crescimento) foram efectuados três conjuntos de ensaios, em erlenmeyers de 1 L (fotobioreactores fechados), em que se pretendeu avaliar a influência das condições de cultivo, relativamente ao cultivo em regime autotrófico, para o que se fizeram variar as fontes nutricionais:

- 1) Adição de Carbono (regime mixotrófico, adição de 0,25, 0,75 e 1,0 mg<sub>glucose</sub>/L);
- 2) Redução da concentração de Azoto (menos 20 e 40 %) em regime mixotrófico;
- 3) Indução de *stress* (aumento da salinidade, por adição de NaCl 5x, 15x e 25x valor base) em regime mixotrófico.

Os melhores resultados de produtividade máxima lipídica foram obtidos nos ensaios de cultivo em condições mixotróficas com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> sem redução e com redução em 40 % de fonte de azoto (relativamente ao usado no meio de cultura de base – meio Zarrouk modificado), correspondendo a uma taxa de produção de lípidos de 11,35 mg<sub>lipidos</sub>/L.dia e 13,23 mg<sub>lipidos</sub>/L.dia, respectivamente. Este segundo valor é cerca de três vezes superior, quando comparado com o valor obtido para regime autotrófico, de 4,31 mg<sub>lipidos</sub>/L.dia. Os correspondentes teores de lípidos foram de 9,72% e 11,95%, respectivamente.

A indução de *stress* salino em condições de cultivo mixotrófico com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> permitiu obter uma produtividade em lípidos de 10,87 mg<sub>lipidos</sub>/L.dia, quando foi adicionado ao meio de cultura NaCl numa concentração igual a 5x o valor de base, permitindo um aumento da produtividade lipídica para mais do dobro relativamente ao cultivo no regime autotrófico (o teor em lípidos foi de cerca de 10,92%). Nestas condições de cultivo mixotrófico, à medida que a salinidade do meio aumenta (até um máximo de 25x o

valor de base), a produtividade lipídica vai diminuindo obtendo-se, mesmo nestas condições, produtividades lipídicas de cerca do dobro relativamente ao cultivo em condições autotróficas (correspondendo ao dobro do teor lipídico nas microalgas).

Conclui-se que as condições de cultivo usadas no ensaio em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e redução de teor de azoto em 40% são as mais adequadas para produção de biomassa da estirpe de *Arthrospira platensis* em estudo, com vista à maximização da produtividade lipídica. Estas condições permitem também obter uma produtividade de biomassa significativa ( $116,79 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ), pelo que se admite que seja também possível obter uma valorização adicional significativa do óleo extraído.

Considerando um fotobioreactor com um volume total de cultivo equivalente ao volume de uma piscina de 1 ha com 15 cm de profundidade ( $V = 1.500 \text{ m}^3$ ), sendo o valor de produtividade lipídica máxima de  $13,23 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ , estima-se que seja possível atingir uma produtividade máxima de cerca de  $8.050 \text{ L}_{\text{oleo}}/\text{ha.ano}$ . Este valor é de cerca de 7 e 10 vezes superior quando comparado com a produtividade de óleo em monoculturas de colza e girassol.

**Palavras-chave:** *Arthrospira platensis*, cultivo autotrófico, cultivo mixotrófico, stress nutricional, stress salino

## Abstract

The main objective of this work was the optimization of lipid productivity of a fast growing microalgae as a source of oil for biofuels. The study was subdivided in the following steps:

- Inoculation of freshwater microalgae *Arthrospira platensis*, *Porphyridium aerugineum*, *Schizomeris leibleinii*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus brauni*; and selection of the fastest growing microalgae;
- Evaluation of algal growth and control of possible contamination of the cultures under study;
- Optimization of cultivation conditions in the laboratory, for the fastest growing strain, in order to achieve maximum lipid productivity.

For *Arthrospira platensis* (strain selected from the algae working group for being the fastest growing one) three sets of tests were carried out in 1 L Erlenmeyer flasks (closed photobioreactors), aiming to evaluate the influence of cultivation conditions in comparison to the autotrophic scheme. Different nutritional sources were used:

- 1) Addition of carbon (mixotrophic scheme, addition of 0.25, 0.75 and 1.0 g<sub>glucose</sub>/L);
- 2) Reduction of nitrogen concentration (20 and 40% less) in the mixotrophic scheme;
- 3) Induction of stress (increased salinity by addition of NaCl 5x, 15x and 25x the base value) under mixotrophic conditions.

The best results of maximum lipid productivity were obtained for the cultures tested under mixotrophic conditions with 1.0 g<sub>glucose</sub>/L, without reduction and with 40% reduction in nitrogen source (relatively to the one used in the base culture media – modified Zarrouk media), corresponding to a rate of lipid production of 11.35 mg<sub>lipids</sub>/L.day and 13.23 mg<sub>lipids</sub>/L.day, respectively. The second result is about three times the value obtained for autotrophic conditions of 4.31 mg<sub>lipids</sub>/L.day. Corresponding lipid content of the microalgae was 9.72% and 11.95%, respectively.

Induction of salt stress under mixotrophic cultivation conditions (with 1.0 g<sub>glucose</sub>/L addition) allowed for a lipid productivity of 10.87 mg<sub>lipids</sub>/L.day, when NaCl was added to the culture media in a concentration of 5x the base value, corresponding to an increase of the lipids productivity of more than twice when compared to cultivation under autotrophic conditions (lipids content was 10.92%). Under these mixotrophic cultivation conditions, a salinity increase (up to a maximum of 25x the base value), leads to a reduction in lipids productivity. Even so, a lipids productivity of about twice the one obtained for cultivation under autotrophic conditions can be obtained (corresponding to a double of lipids content in the microalgae).

Thus it is considered that the cultivation conditions of the test under mixotrophy with addition of 1.0 g<sub>glucose</sub>/L in conjunction with reduction of nitrogen content by 40% are more suitable for production of biomass of the strain of *Arthrospira platensis* under study, when lipid productivity maximization is intended. These conditions allow for a significant biomass productivity (116.79 mg<sub>dry</sub>/L.dia), so we can also suppose that a valorization of the extracted oil may be obtained.

It is considered that if of a photobioreactor system has the same volume as an open pond of 1 ha with a depth of 15 cm ( $V = 1500 \text{ m}^3$ ), with a productivity of 13.23 mg<sub>lipids</sub>/L.day an oil productivity of 8050 L<sub>oil</sub>/ha.year can be reached. This value is about 7 and 10 times higher when compared to the oil productivity of colza and sunflower monocultures, respectively.

**Keywords:** *Arthrospira platensis*, autotrophic cultivation, mixotrophic cultivation, nutritional stress, salt stress

---

**Índice de Matérias**

<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
I.1. Biocombustíveis	1
I.2. Biodiesel	4
I.2.1. Considerações genéricas sobre os óleos para produção de biodiesel	6
I.2.2. Transesterificação	8
I.2.3. Legislação vigente	9
I.3. Algas	11
I.3.1. Microalgas	11
I.3.2. Microalgas – produtos e aplicações	13
I.4. Avaliação do Crescimento Microalgal	16
I.4.1. Curva de crescimento	16
I.4.2. Parâmetros de crescimento	17
I.5. Classificação e morfologia das microalgas repicadas	19
I.5.1. Espécie: <i>Arthrospira platensis</i> ; Estirpe: UTEX, LB 2340	19
I.5.2. Espécie: <i>Porphyridium aerugineum</i> ; Estirpe: SAG, 43.94	20
I.5.3. Espécie: <i>Schizomeris leibleinii</i> ; Estirpe: SAG, 42.96	21
I.5.4. Espécie: <i>Haematococcus pluvialis</i> ; Estirpe: SAG, 49.96	21
I.5.5. Espécie: <i>Botryococcus brauni</i> ; Estirpe: ACOI, 58	22
I.6. Meios de cultura, fontes nutricionais e de <i>stress</i>	24
I.6.1. Fontes nutricionais (carbono, azoto e fósforo)	24
I.7. Processos de cultivo	26
I.7.1. Parâmetros químicos e físicos de cultivo	26

---

1.7.2. Processos de cultivo de microalgas	26
1.7.3. Fotobioreactores fechados vs Fotobioreactores abertos	27
1.8. Métodos de colheita de microalgas e de extracção de óleo	30
<b>II. Parte Experimental: Materiais, Reagentes e Métodos</b>	<b>32</b>
II.1. Parâmetros físicos fixados	32
II.2. Inoculação das microalgas de água doce <i>Arthrospira platensis</i> , <i>Porphyridium aeruginosum</i> , <i>Schizomeris leibleinii</i> , <i>Haematococcus</i> <i>pluvialis</i> e <i>Botryococcus brauni</i>	33
II.2.1. Identificação das microalgas repicadas/inoculadas	33
II.2.2. Preparação do material utilizado na inoculação / cultivo	33
II.2.3. Condições de Inoculação / Cultivo	34
II.2.4. Meios de Cultura	36
II.3. Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i>	41
II.3.1. Repicagens	41
II.3.2. Monitorização de possíveis contaminações das culturas	41
II.4. Curvas de crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	42
II.4.1. Metodologia para traçar a curva de calibração	42
II.4.2. Avaliação do crescimento microalgal	42
II.4.3. Cálculo da concentração de biomassa algal produzida	44
II.5. Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria	45
<b>III. Resultados experimentais e discussão de resultados</b>	<b>47</b>
III.1. Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo	47
III.2. Avaliação do crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	48
III.2.1. Cultura em regime autotrófico e quatro culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico, sob a forma de glucose	48

---

III.2.2. Três culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de 1,0 g <sub>glucose</sub> /L com subtração de azoto ao meio de cultura	51
III.2.3. Quatro culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g <sub>glucose</sub> /L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura	54
III.2.4. Determinação das produtividades máximas para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.	56
III.3. Quantificação de óleos por gravimetria	59
<b>IV. Conclusões</b>	62
<b>V. Sugestões para trabalhos futuros</b>	64
<b>VI. Referências bibliográficas</b>	66
<b>VII. Anexos</b>	A.1
Anexo 1. Calibração – bomba de ar	A.1
Anexo 2. Calibração – Curvas de crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	A.3
Anexo 3. Avaliação do crescimento microalgal	A.4
Anexo 3.1. Cultura em regime autotrófico e quatro culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico (glucose)	A.4
Anexo 3.2. Três culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g <sub>glucose</sub> /L com subtração de azoto ao meio de cultura	A.10
Anexo 3.3. Quatro culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g <sub>glucose</sub> /L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura	A.13
Anexo 4. Determinação da massa de água contida na biomassa algal húmida	A.17
Anexo 5. Determinação das produtividades máximas de biomassa seca	A.18

Anexo 6. Quantificação de óleos por gravimetria – determinação da produtividade máxima lipídica	A.22
Anexo 7. Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm), medida no espectrofotômetro UV-visível UV-160A, aquando das leituras de Abs para culturas constantes nas Tabelas A3.1, A3.5, A3.8, A3.12 e A5.1 a A5.9	A.23

## Índice de Figuras

<b>Figura I.1</b> – Oleaginosas vs Microalgas. Área de terreno cultivado com Colza e com Microalgas para obtenção da mesma quantidade de óleo	5
<b>Figura I.2</b> – Reacção de transesterificação	8
<b>Figura I.3</b> – Compostos extraídos a partir de microalgas	15
<b>Figura I.4</b> – Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reaktor fechado	17
<b>Figura I.5</b> – Imagens de microscópio óptico (ampliação 100x e 400x, respectivamente) da estirpe de <i>Arthrospira platensis</i>	19
<b>Figura I.6</b> – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de <i>Porphyridium aeruginosum</i>	20
<b>Figura I.7</b> – Imagens de microscópio óptico (ampliação 100x e 400x, respectivamente) da estirpe de <i>Schizomeris leibleinii</i>	21
<b>Figura I.8</b> – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Haematococcus pluvialis</i>	22
<b>Figura I.9</b> – Imagens de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de <i>Botryococcus brauni</i>	23
<b>Figura I.10</b> – Sistemas de produção de microalgas a céu aberto do tipo <i>raceway pond</i> ( <a href="http://www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854">www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854</a> )	28
<b>Figura I.11</b> – Sistemas de produção de microalgas em fotobioreactores tubulares ( <a href="http://brae.calpoly.edu/CEAE/biofuels.html">http://brae.calpoly.edu/CEAE/biofuels.html</a> )	29
<b>Figura I.12</b> – Colheita de microalgas (a) <a href="http://microalgas-producao.blogspot.com">http://microalgas-producao.blogspot.com</a> ; (b) <a href="http://www.cyanotech.com">www.cyanotech.com</a> )	30
<b>Figura II.1</b> – Inoculação em tubos de ensaio, na câmara de fluxo laminar	35
<b>Figura II.2</b> – Tubos de ensaio e erlenmeyers inoculados	35
<b>Figura II.3</b> – Curva de intensidade luminosa à altura média das lâmpadas luz de dia	36
<b>Figura II.4</b> – Homogeneização dos meios de cultura (à esquerda) e armazenamento dos meios de cultura concentrados em frio (à direita)	38
<b>Figura II.5</b> – Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> em erlenmeyers de 250 mL, antes de se introduzir o arejamento	41
<b>Figura II.6</b> – Cultivos em triplicado para avaliação do crescimento microalgal	43
<b>Figura II.7</b> – Leitura de pH e temperatura	44

<b>Figura II.8</b> – Quantificação gravimétrica dos lípidos presentes na biomassa microalgal	46
<b>Figura III.1</b> – Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> em regime autotrófico (ao canto esquerdo) e em regime mixotrófico com a adição de 4,0 g <sub>glucose</sub> /L <sub>meio</sub> (três erlenmeyers à direita) ao fim de 2 dias de cultivo	48
<b>Figura III.2</b> – Cultura de <i>Arthrospira platensis</i> em regime mixotrófico com a adição de 4,0 g <sub>glucose</sub> /L <sub>meio</sub> ao fim de 4 dias de cultivo	49
<b>Figura III.3</b> – Imagem de microscópio óptico (ampliação 100x) da estirpe de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada em condições mixotróficas com adição de 4,0 g <sub>glucose</sub> /L <sub>meio</sub> , ao fim de 2 dias	49
<b>Figura III.4</b> – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia	50
<b>Figura III.5</b> – Curvas de pH vs Dia	51
<b>Figura III.6</b> – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e diferentes reduções de azoto	52
<b>Figura III.7</b> – Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> em regime mixotrófico 1,0 g <sub>glucose</sub> /L <sub>meio</sub> com subtracção de azoto (0,6N à esquerda; 0,2N à direita)	53
<b>Figura III.8</b> – Curvas de pH vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e diferentes reduções de azoto	53
<b>Figura III.9</b> – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e diferentes adições de NaCl	54
<b>Figura III.10</b> – Curvas de pH vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e diferentes reduções de azoto	55
<b>Figura III.11</b> – Produtividade máxima para os ensaios constantes na Tabela III.1	57
<b>Figura III.12</b> – Produtividade lipídica para os ensaios constantes na Tabela III.2	60
<b>Figura III.13</b> – Fracções lipídicas e não lipídicas da biomassa algal, para a biomassa algal obtida nos ensaios constantes na Tabela III.2	60
<b>Figura A1.1</b> – Curva de calibração da bomba de ar	A.2
<b>Figura A2.1</b> – Curva de calibração do crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	A.3
<b>Figura A7.1</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime autotrófico – dia 0	A.23
<b>Figura A7.2</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime autotrófico – dia 15	A.23
<b>Figura A7.3</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> – dia 0	A.24

---

<b>Figura A7.4</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> – dia 11	A.24
<b>Figura A7.5</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 0	A.24
<b>Figura A7.6</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 11	A.25
<b>Figura A7.7</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 0	A.25
<b>Figura A7.8</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 11	A.25
<b>Figura A7.9</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x) – dia 0	A.26
<b>Figura A7.10</b> – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x) – dia 11	A.26

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I.1</b> – Óleo extraído de diferentes matérias oleaginosas convencionais e microalgas (Pulz, 2001)	5
<b>Tabela I.2</b> – Composição (% mássica) de ácidos gordos, com cadeias de 16 a 20 átomos de carbono, de três espécies de microalgas, relativamente aos lípidos totais (Adaptado de: Tokusoglu e Ünal, 2003)	7
<b>Tabela I.3</b> – Pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento nos Filos <i>Cyanophyta</i> , <i>Chlorophyta</i> , <i>Euglenophyta</i> , <i>Rhodophyta</i> e <i>Chromophyta</i>	13
<b>Tabela I.4</b> – Comparação entre a composição de alimentos convencionais e a de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca) (Adaptado de: Becker, 2004)	15
<b>Tabela I.5</b> – Vantagens/desvantagens dos sistemas de cultivo (adaptado de: Pulz, 2001)	29
<b>Tabela II.1</b> – Parâmetros físicos fixados	32
<b>Tabela II.2</b> – Identificação das microalgas estudadas	33
<b>Tabela II.3</b> – Composição do meio Zarrouk modificado, meio de cultura padrão para cultivo de <i>Arthrospira platensis</i>	37
<b>Tabela II.4</b> – Composição do meio de cultura BBM 3N	39
<b>Tabela III.1</b> – Produtividade máxima de biomassa seca para 24, 48 e 72 horas de cultivo	57
<b>Tabela III.2</b> – Produtividade lipídica para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.	59
<b>Tabela A1.1</b> – Valores de $Q_{ar}$ (v.v.m) obtidos na calibração da bomba de ar	A.2
<b>Tabela A2.1</b> – Valores de Absorvância obtidos para as oito concentrações padrão	A.3
<b>Tabela A3.1</b> – Avaliação do crescimento em regime autotrófico	A.4
<b>Tabela A3.2</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,25 $g_{gluc}/L_{meio}$	A.6

<b>Tabela A3.3</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,5 $g_{gluc}/L_{meio}$	A.7
<b>Tabela A3.4</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,75 $g_{gluc}/L_{meio}$	A.8
<b>Tabela A3.5</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$	A.9
<b>Tabela A3.6</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ (igual à tabela A3.5)	A.10
<b>Tabela A3.7</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e subtração da fonte de azoto ( $NaNO_3$ ) em 40% (0,6N)	A.11
<b>Tabela A3.8</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e subtração da fonte de azoto ( $NaNO_3$ ) em 80% (0,2N)	A.12
<b>Tabela A3.9</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ (igual à tabela A3.5)	A.13
<b>Tabela A3.10</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x)	A.14
<b>Tabela A3.11</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e adição de cloreto de sódio em 1.500% (15x)	A.15
<b>Tabela A3.12</b> – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x)	A.16
<b>Tabela A4.1</b> – Determinação do teor de Biomassa algal seca	A.17
<b>Tabela A5.1</b> – Produtividade em biomassa seca ( $mg_{secas}/L.dia$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime autotrófico e em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose	A.18
<b>Tabela A5.2</b> – Produtividade em biomassa seca ( $mg_{secas}/L.dia$ ) para períodos de 48 h para a cultura em regime autotrófico e culturas em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose	A.19
<b>Tabela A5.3</b> – Produtividade em biomassa seca ( $mg_{secas}/L.dia$ ) para períodos de 72 h para a cultura em regime autotrófico e culturas em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose	A.19
<b>Tabela A5.4</b> – Produtividade em biomassa seca ( $mg_{secas}/L.dia$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de 1,0 $g_{gluc}/L_{meio}$ e subtração de concentrações distintas da fonte de azoto	A.19

ao meio de cultura

- Tabela A5.5** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 48 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura A.20
- Tabela A5.6** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 72 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura A.20
- Tabela A5.7** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura A.21
- Tabela A5.8** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 48 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura A.21
- Tabela A5.9** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 72 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura A.21
- Tabela A6.1** – Teor percentual lipídico e Produtividade lipídica ( $\text{mg}/\text{L.dia}$ ) para todos os ensaios realizados A.22

## Nomenclatura

Abs.	Absorvância
[Bio. <sub>seca</sub> ]	Concentração de biomassa seca (mg/L)
cm	centímetros
C	concentração (ppm, mg/L)
E	Energia (BTU – British Thermal Unit; 1BTU =1055,05585 J)
ha	hectares
I	Intensidade luminosa (lux)
m	massa (mg, g, kg)
m/m	relação massa de composto por massa total
Q <sub>ar</sub> ,	Caudal de ar (m <sup>3</sup> /s, mL/s)
t	tempo (s)
T	Temperatura (°C, K)
v <sub>rot</sub>	velocidade de rotação (rpm – rotações por minuto)
v/v	relação volume de composto por volume total
v.v.m.	Volume de ar por volume de cultura e por minuto
V	Volume (mL, L)
λ	Comprimento de onda (nm)
ρ	massa volúmica (g/mL, kg/L)

## Siglas

ACOI	Algoteca de Coimbra
Auto	Regime de crescimento autotrófico
BBM	Bold Basal Medium
Epp	Eppendorf
GC	Cromatografia gasosa
GEE	Gases de efeito de estufa
Gluc.	Glucose
Mix.	Regime de crescimento mixotrófico
N	Azoto
NaCl	Cloreto de sódio
Reagentes p.a.	reagentes pro-análise
SAG	Goettingen University Culture Collection, Alemanha
UE	União Europeia

UTEX Universidade do Texas

UV radiação ultravioleta

## I. Introdução

### I.1. Biocombustíveis

Na União Europeia (UE), os sectores do transporte e da energia são responsáveis pela emissão de aproximadamente 20% e 60% dos gases com efeito de estufa (GEE), respectivamente (EEA, 2004). O sector agrícola é a terceira maior fonte antropogénica e representa cerca de 9% das emissões de GEE, onde os gases emitidos mais relevantes correspondem ao óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e ao metano (CH<sub>4</sub>) (EEA, 2007). Com o desenvolvimento e crescimento económico de países emergentes, como a Índia e a China, é esperado que o consumo energético global aumente, originando um incremento adicional de GEE e, consecutivamente, maiores danos ambientais (IEA, 2007).

Os GEE contribuem não só para o aquecimento global, mas também para a ocorrência de outros impactes no ambiente e na vida humana: os oceanos absorvem aproximadamente um terço do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) emitido pelas actividades humanas, o que leva a uma acidificação gradual dos oceanos; a redução do pH dos oceanos poderá levar à perda de recifes de corais e de biodiversidade de ecossistemas marinhos (Ormerod *et al.*, 2002).

O aumento da poluição pelas emissões provenientes de sistemas de produção de energia, as limitações nas reservas de combustíveis fósseis e a dependência energética de zonas politicamente instáveis, são factores que exercem uma força no sentido da investigação e do desenvolvimento de novas fontes alternativas renováveis de energia, como a bioenergia, e de tecnologias de conversão eficientes, a fim de se criar um modelo de desenvolvimento sustentável (Laherrere, 2005). Esta situação é particularmente preocupante no sector do transporte pela dependência quase total na utilização de combustíveis fósseis.

Presentemente, diversas fontes de energias renováveis estão a ser estudadas e implementadas, com diferentes graus de sucesso e em distintas fases de estudo e de desenvolvimento: como exemplo inclui-se a energia solar térmica e fotovoltaica, mini-hídricas, energia geotérmica, energia eólica e a bioenergia (Dewulf e Van Langenhove, 2006; Gilbert e Perl, 2008). Um objectivo importante é a redução das emissões de GEE do sector de transporte, para o que se deve proceder à substituição gradual dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis, onde a bioenergia e os biocombustíveis poderão desempenhar, pelo menos a curto prazo, um papel importante na sua concretização.

A bioenergia é a energia gerada a partir da biomassa, sob a forma de electricidade, calor, combustíveis de origem não fóssil ou outros produtos de valor acrescentado.

Entende-se como biomassa, toda a matéria orgânica produzida tal como resíduos de origem doméstica, industrial, florestal ou agrícola, e também aquela produzida a partir de culturas bioenergéticas, isto é, culturas vegetais de rápido crescimento. As técnicas de valorização da biomassa são a combustão, a gaseificação, a pirólise, a fermentação e a extracção de substâncias líquidas, como óleos.

A bioenergia é considerada renovável no sentido em que os produtos resultantes das técnicas de conversão da biomassa serão novamente aproveitados pelas plantas no seu crescimento, isto é, as emissões da combustão de biocombustíveis são incluídas no ciclo natural de carbono, dado que os organismos vegetais são biofixadores de CO<sub>2</sub>, e por conseguinte a biomassa produzida no próximo ciclo capta o mesmo valor de quantidade de CO<sub>2</sub> emitido.

Aspectos importantes a ter em consideração em projectos de bioenergia são a gestão da produção e da utilização dos recursos vegetais, de modo a garantir a utilização sustentável da biomassa. Não sendo efectuada uma avaliação integrada, a exploração deste tipo de energias poderá não ser sustentável e economicamente viável.

Outro factor, não menos importante, é a poluição inerente a qualquer sistema de produção de energia. Embora, no caso de produção de bioenergia possa haver menor impacte, relativamente à produzida na exploração dos combustíveis fósseis ou à energia atómica, os processos de conversão de biomassa em energia não podem nunca ser considerados “limpos”. Existem, sempre, como em qualquer sistema, perdas energéticas resultantes de fugas ao longo do processo e a produção de resíduos que constituem uma fonte de poluição.

A produção de biocombustíveis poderá oferecer novas oportunidades de negócios, promover novos postos de trabalho nas zonas rurais, reduzir as emissões de GEE e aumentar a segurança local de abastecimento de energia.

Os biocombustíveis mais comuns no sector dos transportes são o biodiesel e o bioetanol, que podem substituir o gasóleo e a gasolina, respectivamente. Estes combustíveis podem ser utilizados e distribuídos utilizando o sistema actual e disponível de distribuição dos combustíveis fósseis.

Os incentivos fiscais e as medidas políticas têm levado ao desenvolvimento do sector de produção de biocombustíveis, e a produção global actual é estimada em aproximadamente 35 biliões de litros/ano (COM, 2006).

Na UE o biodiesel representa cerca de 82% da produção total de biocombustíveis (COM, 2006).

## I.2. Biodiesel

Na última década o biodiesel, que pode ser utilizado como substituto do diesel fóssil, tem recebido uma atenção considerável, por diversos factores, de entre os quais se destacam a sua biodegradabilidade e o facto de ser um combustível renovável e não tóxico. A sua combustão não emite compostos de enxofre para a atmosfera, não contribuindo deste modo para a ocorrência de chuvas ácidas e, para os países que não detêm reservas de petróleo, permite a diminuição da dependência energética do exterior. A combustão de biodiesel relativamente ao diesel fóssil tem como desvantagem a emissão inerente de um maior teor de óxidos de azoto (NO<sub>x</sub>) nos gases de combustão. A produção e utilização de biodiesel apoiam um sistema energético sustentável e contribuem para alcançar metas, como a assumida por diversos países Europeus com a assinatura do Protocolo de Quioto, de reduzir as emissões de Gases com Efeito de Estufa (GEE) em 8% relativamente a 1990, durante o período de 2008 a 2012.

Recentemente, a produção de biodiesel a partir de matérias oleaginosas convencionais tem sido alvo de críticas já que, eticamente não é razoável desviar culturas do seu destino alimentar habitual ou usar solo fértil para a produção de matérias-primas, com substituição de culturas alimentares por outras bioenergéticas para a indústria dos biocombustíveis, quando há escassez de alimentos, o que para além do mais tem o efeito perverso de induzir uma subida no preço dos bens alimentares.

A produção de microalgas pode ser realizada em solos considerados impróprios (não férteis) para o cultivo de oleaginosas ou cereais alimentares (Demirbas, 2009). Para além disso, o teor de óleo em algumas espécies de algas é muito elevado, a quantidade de biomassa e do correspondente óleo produzido por unidade de superfície é muito superior àquela que se conseguiria obter a partir de materiais oleaginosos convencionais como a soja, a colza ou o girassol.

A produtividade em óleo de algumas espécies de algas pode ser incrementada significativamente mediante o seu cultivo em condições optimizadas. Por outro lado, é possível encontrar localmente espécies/estirpes de microalgas mais adaptadas e que potenciem a produção de óleos com características adequadas à produção de combustível como o biodiesel.

Na tabela I.1 apresenta-se uma comparação entre a produtividade de diferentes materiais oleaginosos. O volume de óleo extraído por hectare e ano relativo à cultura de Microalgas foi estimado, com base na produtividade de uma espécie do género *Chlorella*, num sistema de

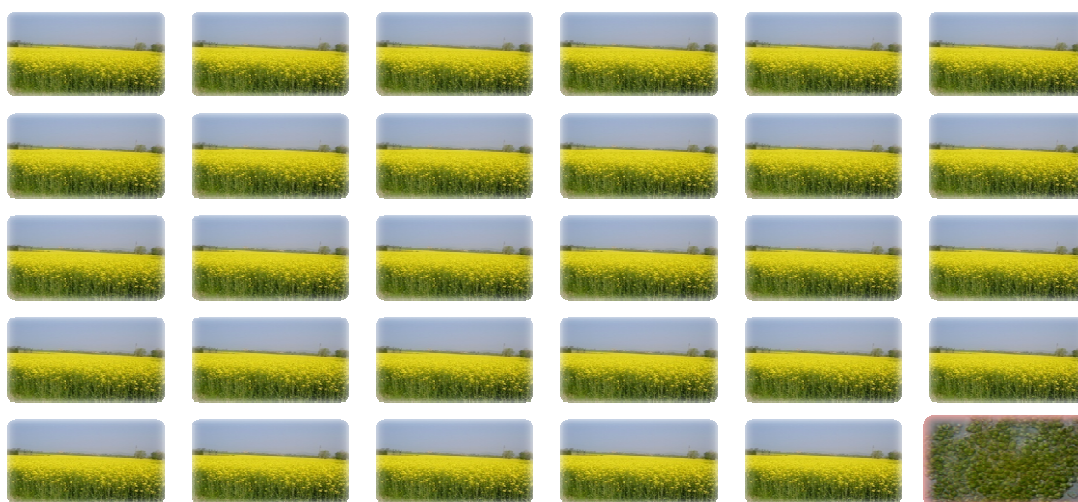
cultivo fechado na Alemanha, perto de Wolfsburg, em cerca de 130 a 150 toneladas de biomassa seca por hectare e ano (Pulz, 2001). Foi também considerado um teor em óleo na biomassa algal seca de 30%.

**Tabela I.1** – Óleo extraído de diferentes matérias oleaginosas convencionais e microalgas (Pulz, 2001)

Cultura	Óleo extraído (L/hectare.ano)	Hectares para produção de 1.000.000 litros de óleo
Soja	446	2.242
Colza	1.190	840
Girassol	810	1.235
Microalgas	35.100	28

O valor de óleo extraído de microalgas apresentado na tabela I.1 corresponde à produção de biomassa seca referida de 130 toneladas/ha.ano e a densidade do óleo considerada foi de 0,9 kg/L.

Na figura I.1 está representada esquematicamente a relação entre as áreas de cultivo necessário para a produção da mesma quantidade de lípidos em culturas de oleaginosas convencionais e em culturas de microalgas, mediante os valores descritos na tabela I.1.



**Figura I.1** – Oleaginosas vs Microalgas. Área de terreno cultivado com Colza e com Microalgas para obtenção da mesma quantidade de óleo.

Actualmente ainda não existe um género de microalgas, espécie ou estirpe definida como a indicada para a produção de óleo para biodiesel.

Um ponto comum referido nos estudos de diversos autores é a necessidade de baixar os custos de produção de uma determinada estirpe e tornar viável a sua produção em massa, tendo em conta as características ecofisiológicas da espécie requeridas.

Uma forma de baixar os custos de produção será utilizar meios residuais no cultivo microalgal, o que permitirá também reduzir os custos com o tratamento de águas residuais.

### **I.2.1. Considerações genéricas sobre os óleos para produção de biodiesel**

A avaliação qualitativa de óleos extraídos de microalgas e de outros produtos vegetais é importante, no sentido em que as percentagens de ácidos gordos relativas aos lípidos totais, da matéria-prima (óleo) antes de ser sujeita ao processo de transesterificação (sub-capítulo I.2.2), poderão tornar o combustível biodiesel aceitável ou não, de acordo com os requisitos da Norma Europeia EN 14214, ou pelo menos exigir a utilização de um *blending* que permita satisfazer esses requisitos.

Ácidos gordos e ésteres metílicos de ácidos gordos com quatro ou mais duplas ligações entre átomos de carbono da cadeia principal são susceptíveis de oxidação e este facto reduz a sua aceitabilidade na produção ou quando presentes no biodiesel. Os ácidos gordos polinsaturados com duas ou três ligações duplas entre carbonos são mais estáveis à oxidação que os anteriores (quatro ou mais ligações duplas). O teor de ésteres metílicos dos ácidos gordos polinsaturados é limitado na Norma Europeia EN 14214, e podemos referir como exemplo que, o limite superior de éster metílico do ácido linolénico (ácido linolénico – C18:3 n-3) é de 12% (mol) e o limite superior de ésteres metílicos com quatro ou mais ligações duplas é de 1% (mol).

No entanto, os ésteres metílicos de ácidos gordos polinsaturados apresentam um ponto de congelamento (*Cold Filter Plugging Point*, CFPP) inferior ao dos monoinsaturados ou saturados. Este factor é indicativo da necessidade de equilíbrio no teor de ésteres metílicos presentes no biodiesel. Em geral, os óleos algais são constituídos por mais ácidos gordos polinsaturados que o óleo proveniente de oleaginosas convencionais; deste modo, o biodiesel produzido a partir dos óleos algais terá melhores propriedades em climas frios (Demirbas, 2009).

Na tabela I.2 apresentam-se as composições percentuais de alguns tipos de ácidos gordos presentes em três espécies de microalgas: a *Arthrospira platensis*, a *Chlorella vulgaris* e a *Isochrysis galbana*.

No estudo efectuado por Tokusoglu e Ünal (2003), o teor lipídico (% peso seco) nas espécies *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* foi de 8,03%, 13,32% e 17,16%, respectivamente.

Como se pode verificar na tabela I.2, as três espécies de microalgas são particularmente ricas nos ácidos gordos C16:0 e C18:1 n-9, e a *Arthrospira platensis* e a *Chlorella vulgaris* diferenciam-se essencialmente da *Isochrysis galbana* pelo teor em C18:2 n-6 e C16:1 n-7.

A produção das grandes quantidades de óleo virgem necessário à produção de biodiesel está, presentemente, dependente da produção em solo agrícola, introduzindo problemas do ponto de vista da gestão do solo arável e da economia mundial. A origem residual é muito distribuída (o que encarece a recolha dos óleos/gorduras) e de difícil acesso às grandes unidades de produção de biodiesel.

**Tabela I.2** – Composição (% mássica) de ácidos gordos, com cadeias de 16 a 20 átomos de carbono, de três espécies de microalgas, relativamente aos lípidos totais (Adaptado de: Tokusoglu e Ünal, 2003)

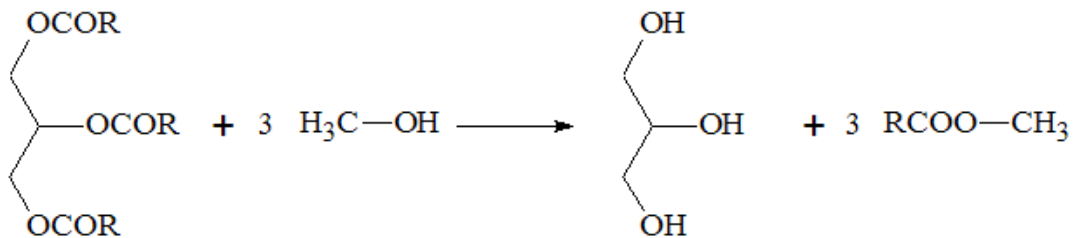
Ácido gordo	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Isochrysis galbana</i>
C16:0	27,19	15,41	28,37
C16:1 n-7	1,92	1,17	6,57
C18:0	6,66	6,24	5,82
C18:1 n-9	35,74	33,14	19,73
C18:1 n-7	1,33	1,13	2,40
C18:2 n-6	11,25	9,73	1,14
C18:3 n-6	5,52	<0,10	0,54
C18:3 n-3	0,71	1,93	0,46
C18:4 n-3	0,81	<0,10	0,48
C20:0	-	0,19	0,74
C20:4 n-6	0,41	<0,10	1,07
C20:5 n-3	2,91	3,23	1,93

### I.2.2. Transesterificação

O biodiesel é produzido industrialmente por transesterificação de óleos com um álcool de cadeia curta (geralmente o metanol), na presença de um catalisador (geralmente alcalino e dissolvido). Os óleos e gorduras usados na produção do biodiesel têm diversas origens: óleos vegetais virgens (alimentares ou não), óleos residuais da indústria alimentar ou do pequeno proprietário de uma cadeia de restauração, gorduras produzidas nos lagares de azeite.

No processo de transesterificação juntam-se os óleos a um álcool (metanol, etanol, propanol, butanol) e catalisadores (que podem ser ácidos, bases ou enzimáticos) para acelerar a reacção e obtém-se uma mistura de ésteres de ácido gordo (biodiesel) e glicerina como subproduto, sendo esta removida por decantação. A glicerina formada, após purificação possui alto valor agregado, e pode ser usada como matéria-prima nas indústrias farmacêutica, cosmética e de explosivos.

Na figura I.2 é apresentado um exemplo de uma reacção de transesterificação em que os triglicerídeos (provenientes do óleo) reagem com metanol, na presença de um catalisador, produzindo glicerol (subproduto) e o éster metílico de ácido gordo (biodiesel).



**Figura I.2** – Reacção de transesterificação (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Biodiesel>).

O biodiesel substitui total ou parcialmente o diesel de petróleo (gasóleo) em motores ciclo diesel de veículos automóveis ou equipamentos electromecânicos (ex. geradores de electricidade e calor). Pode ser usado puro ou misturado com diesel em diversas proporções.

O nome biodiesel muitas vezes é confundido com a mistura “diesel+biodiesel”, disponível em alguns postos de combustível. A designação correcta para a mistura vendida nestes postos deve ser precedida pela letra B (do inglês *Blend*). Neste caso, a mistura de 5% de

biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B5 e assim sucessivamente, até ao biodiesel puro, denominado B100.

### **I.2.3. Legislação vigente**

A Estratégia Nacional de Desenvolvimento Sustentável (ENDS) até 2015, de acordo com a Resolução do Conselho de Ministros nº109/2007, Diário da República nº159, 1ª Série de 20 de Agosto de 2007, tem como metas globais transversais colocar Portugal em 2015 num patamar de desenvolvimento económico mais próximo da União Europeia (UE), entre os primeiros 20 países do índice de desenvolvimento humano do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) e com um défice ecológico global inferior ao actual de 25. No plano de implementação da ENDS 2015, inclui-se como um dos instrumentos-chave o Programa Nacional para Alterações Climáticas (PNAC), segundo a Resolução do Conselho de Ministros nº104/2006, que tem como objectivo específico controlar e reduzir as emissões de GEE, de modo a respeitar os compromissos de Portugal no âmbito do protocolo de Quioto e do Acordo de Partilha da UE, bem como antecipar os impactes das alterações climáticas e propor as medidas e adaptações que visam reduzir os seus impactes negativos.

Com a publicação do Decreto-Lei (DL) nº 62/2006, foi transposta para a legislação nacional a Directiva 2003/30/CE. O referido DL “visa a colocação no mercado de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis”. De acordo com o DL nº 66/2006, as metas estabelecidas para a incorporação mínima de biocombustível no mercado são de 2% para o ano de 2006, 3% para o ano de 2007 e 5,75% (em média anual) para o período de 2008 a 2010. A Resolução do Conselho de Ministros n.º 21/2008, de 7 de Janeiro, ajustou estas metas para 1,75% em 2009, 4,25% em 2010, 6,5% em 2011 e 10% em 2012. A necessidade de produzir biodiesel é pois evidente das metas estabelecidas nestes diplomas legais.

Em Portugal, esta legislação já era há muito aguardada por alguns potenciais produtores, particularmente devido à expectativa pela possibilidade de isenção de Imposto sobre Produtos Petrolíferos (ISP). No entanto essa isenção só é aplicável para pequenas quantidades o que torna a produção de biodiesel para auto-consumo e com aproveitamento de gorduras vegetais aparentemente menos nobres mais apetecível.

Algumas microalgas, pela sua elevada produtividade de biomassa relativamente a plantas superiores de rápido crescimento, fazem parte do grupo de culturas bioenergéticas e por

este motivo poderão num futuro próximo representar um papel importante na mitigação de CO<sub>2</sub>, como também na biofixação de azoto e fósforo de fontes residuais orgânicas.

Face a todas estas considerações, o estudo da produção de biomassa algal como fonte de óleo para biocombustíveis reveste-se de particular importância, uma vez que a produção de microalgas permite satisfazer as necessidades de matéria-prima para a produção de biocombustíveis (os lípidos são usados para a produção de biodiesel, a biomassa residual rica em hidratos de carbono pode ser usada para a produção de bioetanol ou biometanol), contribuindo para a mitigação das emissões de CO<sub>2</sub>, para o tratamento de águas residuais e não necessitando da utilização de solo agrícola fértil destinado a culturas alimentares.

### **I.3. Algas**

As algas compreendem as macroalgas e as microalgas. As macroalgas são organismos fotossintéticos que vivem na água ou em locais húmidos, pertencendo ao reino vegetal e sendo classificadas como talófitas, por apresentarem uma estrutura simples não vascularizada desprovida de raiz, caule, folhas, sementes e flores (Lee, 2008).

Consideram-se macroalgas as algas de maior tamanho, em geral marinhas e por vezes com dimensões consideráveis (podem atingir 50 m de comprimento), cujo corpo chega a apresentar um elevado grau de complexidade (Guimarães *et al.*, 2009).

Consideram-se microalgas as algas que só podem ser observadas com a ajuda de uma lupa ou microscópio, por apresentarem dimensões muito reduzidas (existem algas com apenas 0,001 mm de diâmetro); são em regra organismos simples, constituídos por uma célula ou um número relativamente pequeno de células. No entanto, algumas espécies de água doce de maior tamanho, mais complexas e visíveis a olho nu, são muitas vezes abrangidas por esta designação (Guimarães *et al.*, 2009).

As algas podem ter uma estrutura celular procariótica (sem núcleo organizado nem plastos) ou eucariótica (com núcleo organizado e um ou vários plastos). O pigmento fotossintético primário das algas é a clorofila-a mas outros pigmentos, tais como carotenóides (caroteno, fucoxantina e astaxantina) e ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina), podem estar presentes ou não, conforme o Filo ou Divisão ao qual pertençam (Lee, 2008).

#### **I.3.1. Microalgas**

O número de espécies de microalgas está estimado entre 22000 e 26000 (Vonshak, 2002).

Estes microrganismos encontram-se em praticamente todos os biótopos, pela sua diversidade ecológica e adaptabilidade fisiológica, sobretudo em meios aquáticos (águas doces, salobras e salgadas), mas também podem habitar outros meios tais como a superfície húmida de rochas, nascentes quentes, o ar, neve e desertos (Lee, 2008).

As microalgas podem ser classificadas em cinco Filos, que se distinguem fundamentalmente pela coloração e pela natureza das substâncias de reserva que apresentam (Guimarães *et al.*, 2009):

### Filo *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria* (algas azuis)

Apresentam tonalidades azuis-esverdeadas, avermelhadas ou arroxeadas. Trata-se de um grupo muito particular porque as células possuem uma organização procariótica, ou seja, não existe um núcleo organizado nem plastos e os pigmentos ocorrem em lamelas fotossintéticas na periferia do citoplasma. Por este motivo as células têm uma tonalidade mais ou menos homogênea.

### Filo *Chlorophyta* (algas verdes)

Apresentam plastos verdes e a principal substância de reserva é o amido intraplastidial (acumulado no interior dos plastos sob a forma de grânulos dispersos ou reunidos à volta de uma zona diferenciada do plasto – o pirenóide). O amido é facilmente identificado por corar de azul-escuro com o soluto de Lugol (solução iodada).

### Filo *Euglenophyta*

Os plastos são verdes e a principal substância de reserva é o paramilo extraplastidial, que se acumula no citoplasma sob a forma de anéis, discos ou bastonetes. O paramilo é uma substância quimicamente semelhante ao amido, que cora de amarelo-claro com o soluto de Lugol.

### Filo *Rhodophyta* (algas vermelhas)

Os plastos são, em regra, avermelhados ou arroxeados, mas podem apresentar uma coloração azulada ou verde-azeitona; a principal substância de reserva é o amido florídeo que se distribui pelo citoplasma e cora de acastanhado com o soluto de Lugol. As algas incluídas neste filo são predominantemente marinhas.

### Filo *Chromophyta* (algas castanhas, douradas e amarelo-esverdeadas)

Apresentam plastos castanhos, dourados ou amarelados, sendo os lípidos as principais substâncias de reserva.

De seguida apresenta-se uma tabela resumo (tabela I.3) onde se faz referência aos pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento dos Filos acima descritos.

**Tabela I.3** – Pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento nos Filos *Cyanophyta*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta* e *Chromophyta*

Filo	Pigmentos fotossintéticos	Produtos de armazenamento
<i>Cyanophyta</i>	Clorofila -a; Ficobilinas	Amido; cianoficina (proteína)
<i>Chlorophyta</i>	Clorofila -a e -b; Carotenóides	Amido, celulose
<i>Euglenophyta</i>	Clorofila -a e -b; Carotenóides	Amido, celulose
<i>Rhodophyta</i>	Clorofila -a e -d; Ficobilinas; Carotenóides	Amido
<i>Chromophyta</i>	Clorofila -a e -c; Carotenóides	Laminarina; óleo

A produção comercial de microalgas teve início na década de 60 com espécies do género *Chlorella* e *Arthrospira*, para utilização como suplementos dietéticos (Lavens e Sorgeloos, 1996). Na mesma década, as pesquisas em biotecnologia de microalgas concentravam-se na reciclagem de águas residuais e na obtenção de fontes alimentares (Beneman, 1990; Lavens e Sorgeloos, 1996; Olaizola, 2003).

Actualmente, os principais géneros cultivados a nível comercial são a *Chlorella sp.* e a *Arthrospira sp.*, para adição em alimentos naturais e obtenção de clorofilas e ficobilinas, respectivamente, a *Dunaliella salina* para obtenção de betacaroteno, a *Haematococcus pluvialis* para obtenção de astaxantina e a *Cryptocodinium cohnii* para a produção de DHA (ácido docosahexaenóico – ácido gordo do tipo ómega-3) (Becker, 2004). Além destas, cultivam-se outras espécies de microalgas dos géneros *Dunaliella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* e *Chlorella* para a aquacultura, como fonte alimentar de dáfnias, larvas de crustáceos, moluscos e peixes (Abalde *et al.*, 1987; Balboa *et al.*, 1987; Herrero *et al.*, 1987(1); Herrero *et al.*, 1987(2); Lavens e Sorgeloos, 1996).

### I.3.2. Microalgas – produtos e aplicações

O rápido crescimento populacional, a limitação na utilização de terras aráveis para cultivo de vegetais alimentares e a necessidade de tornar os processos de produção de biomassa

sustentáveis são factores que exercem uma força no sentido de produzir compostos com alto teor protéico, a partir de culturas biológicas de rápido crescimento, nas quais se incluem diversas espécies de microalgas, fungos e bactérias (Rehm e Reed, 1995).

No âmbito das microalgas, o género *Arthrospira* constitui uma fonte proteica de boa qualidade, pois contém todos os aminoácidos essenciais, embora tenha um teor percentual de metionina, cistina e lisina inferior, quando comparada com outras fontes, tais como carne, ovos ou leite. Mediante o tipo de cultura e a estirpe deste género, o teor proteico varia usualmente entre 55-70% (m/m) da biomassa seca (Phang *et al.*, 2000). No cultivo de *Arthrospira* sp. em sistemas do tipo *raceway* (sub-capítulo I.7.3.) e na utilização da mesma área de produção, pode-se obter cerca de 20 vezes e 400 vezes mais conteúdo proteico, do que no cultivo de soja e na produção de carne bovina, respectivamente (Henrikson, 1989).

A produção microalgal apresenta diversas vantagens, tais como a possibilidade de utilização de fontes de carbono inorgânico e/ou orgânico no processo de cultivo, de obtenção de taxas de crescimento de biomassa de algumas espécies, como por exemplo, do género *Chlorella*, superiores a monoculturas vegetais terrestres e a homogeneidade da composição da biomassa algal após colheita, devido ao facto de os compostos se encontrarem todos inclusos em cada célula e à inexistência de diferentes partes estruturais como raiz, caule, folhas, sementes e flores como nas plantas superiores (Richmond, 1990; Richmond, 2004).

A produtividade primária de biomassa algal corresponde a aproximadamente 50% da total produzida na Terra, isto é, de  $111-117 \times 10^9$  ton/ano (Behrenfeld *et al.*, 2001).

Na tabela I.4 podem-se observar diferentes teores proteicos e lipídicos em algumas espécies de microalgas e em outros produtos alimentares. Becker (1994) refere que se pode atingir os 71% em teor protéico e 22% em lípidos (% m/m), em massa seca, nas microalgas *Spirulina maxima* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

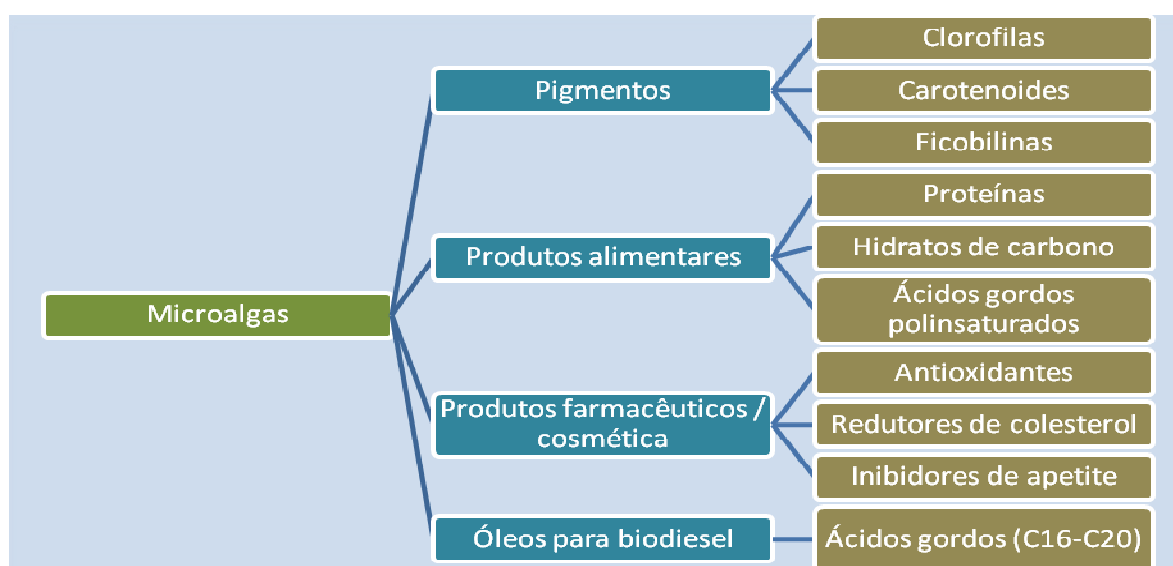
Em geral, as microalgas apresentam concentrações lipídicas aceitáveis relativamente a outros produtos alimentares (tabela I.4). Os lípidos algais podem servir de matéria-prima para a produção de detergentes, borracha, gorduras/óleos, tecidos, aditivos alimentares, cosméticos e medicamentos. A utilização de lípidos algais poderá reduzir o uso de derivados do petróleo como fonte de energia e de gorduras animal e vegetal para o consumo humano (Tokusoglu e Ünal, 2003; Demirbas, 2009), o que contribui para a redução das emissões de CO<sub>2</sub> de origem fóssil.

**Tabela I.4** – Comparação entre a composição de alimentos convencionais e a de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca) (Adaptado de: Becker, 2004)

Origem	Teor proteico	Teor lipídico
Carne	43	34
Leite	26	28
Arroz	8	2
Soja	37	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21
<i>Dunaliella salina</i>	57	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	11

A produção de suplementos alimentares, os quais são comercializados principalmente sob a forma de pó, tabletes e cápsulas, tem usado como matéria-prima aproximadamente 75% da produção anual de biomassa microalgal (Belay, 1993; Becker, 2004).

De seguida apresenta-se na figura I.3 a referência a alguns dos compostos de valor acrescentado que podem ser extraídos de microalgas.



**Figura I.3** – Compostos extraídos a partir de microalgas.

## I.4. Avaliação do Crescimento Microalgal

O crescimento é definido como o aumento da matéria viva, usualmente o número de células para microrganismos unicelulares ou a biomassa total para organismos multicelulares (Tomaselli, 2004). No cultivo de microalgas, e de outros microrganismos, podem-se aplicar determinados parâmetros de crescimento (uso de fórmulas) e representações gráficas para ilustrar o desenvolvimento das culturas (Vonshak, 1990).

### I.4.1. Curva de crescimento

Um dos métodos utilizados para a avaliação do crescimento de culturas de microalgas é a curva de crescimento. Esta pode ser representada graficamente como sendo a relação entre o incremento da biomassa ou aumento do número de indivíduos em função do tempo.

Numa cultura em reactor fechado e em cultivo descontínuo, a curva de crescimento (Figura I.4) apresenta cinco fases distintas, que se descrevem de seguida:

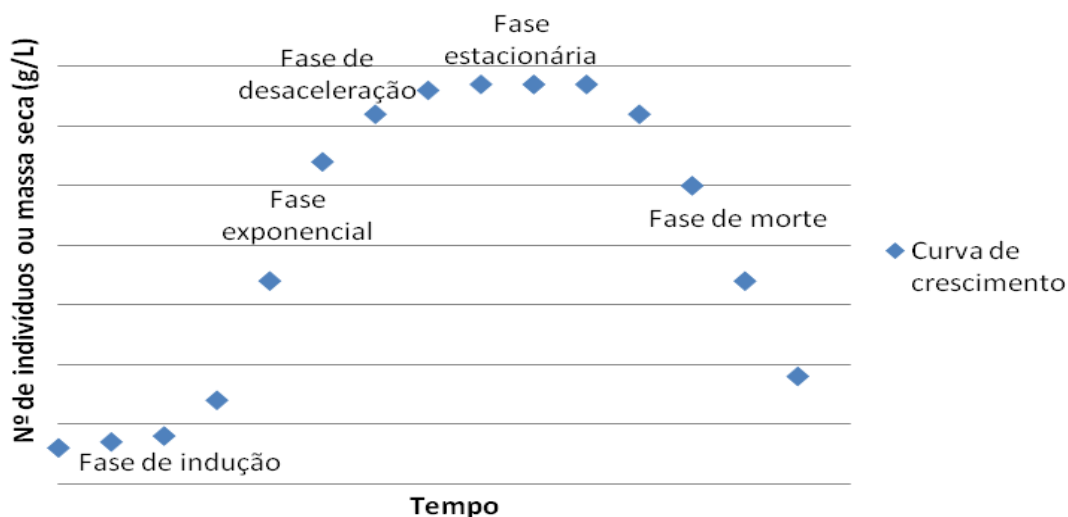
**1 - Fase de Indução ou Fase Lag:** Esta fase ocorre logo após a repicagem da cultura. Não existe um incremento na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo. Nesta fase pode mesmo ocorrer uma redução na densidade celular;

**2 - Fase Exponencial ou Fase Log:** Nesta fase de crescimento, a biomassa duplica-se sucessivamente em intervalos regulares de tempo, ou seja, a cultura apresenta uma elevada e constante (exponencial) velocidade (taxa) de crescimento;

**3 - Fase de Diminuição do Crescimento Relativo ou Desaceleração:** Nesta fase, o tempo necessário para a duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto deve-se à diminuição da quantidade de nutrientes disponíveis no meio (os quais foram assimilados pelas microalgas na fase anterior) e, principalmente, à redução da actividade fotossintética devido ao incremento da densidade microalgal e conseqüente sombreamento entre os organismos, pelo que a quantidade de energia luminosa por célula microalgal torna-se inferior à disponível na fase exponencial;

**4 - Fase Estacionária:** Nesta fase não há incremento líquido da população (a densidade celular permanece constante), a taxa de crescimento é compensada pela taxa de mortalidade;

**5 - Fase de Morte da Cultura:** O declínio no número de indivíduos por unidade de volume resulta da falta de nutrientes, da reduzida quantidade de energia luminosa por célula microalgal e da ocorrência de um nível tóxico de metabolitos no meio, factores que, em conjunto, impossibilitam o crescimento de biomassa algal.



**Figura I.4** - Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor fechado.

Na ausência de um modelo específico para representar o crescimento das microalgas em culturas descontínuas, o modelo logarítmico de análise de regressão (referido de seguida em “Parâmetros de Crescimento”) pode ser aplicado (Guillard, 1972). No entanto, este modelo de regressão somente pode ser utilizado como ajuste para representar a curva de crescimento microalgal até se verificar a entrada na fase de desaceleração.

#### I.4.2. Parâmetros de Crescimento

O crescimento de uma população microalgal pode ser estimado por recurso a determinados parâmetros, dentre os quais se pode destacar a densidade celular máxima obtida, o tempo de cultivo e a velocidade (ou taxa) de crescimento.

A densidade celular máxima obtida refere-se ao maior valor obtido, expresso em número de células por unidade de volume, e o tempo de cultivo é o período decorrido entre o início da cultura (inóculo) e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima.

A velocidade de crescimento ( $\mu$ ) pode ser calculada com base na equação (Guillard, 1972):

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t_f - t_i} \quad (1.4.1)$$

onde

$N_i, N_f$  – densidade celular inicial e final, respectivamente

$t_i, t_f$  – tempo de cultivo inicial e final, respectivamente

O número de duplicações celulares da população por dia obtém-se através da equação (Stein, 1973):

$$\text{Duplicações/dia} = \mu / 0,6931 \quad (1.4.2)$$

em que 0,6931 é o valor correspondente a  $\ln 2$ .

## I.5. Classificação e morfologia das microalgas repicadas

### I.5.1. Espécie: *Arthrospira platensis*; Estirpe: UTEX, LB 2340

A espécie *Arthrospira platensis* é uma microalga do Reino Monera, Filo *Cyanophyta* e Classe *Cyanophyceae*. Esta Classe também pode ser referida como cianobactérias (espécies de microalgas azuis esverdeadas), pela sua similaridade de organização celular procariótica com as bactérias procarióticas (Lee, 2008).

O género *Arthrospira* habita normalmente meios líquidos alcalinos, com pH compreendido entre 8 e 11, ricos em sais, como o bicarbonato e o carbonato de sódio (Vonshak, 2002). Este género reúne as microalgas com aspecto filamentososo não ramificado, com tricoma (filamentos sem bainha) regularmente torcido e em espiral, e cujas células (do filamento), sem plastos e de cor azul esverdeada, apresentam morfologia idêntica (Guimarães *et al.*, 2009). Na figura I.5 apresentam-se duas imagens obtidas por microscópio óptico que mostram a estirpe de *Arthrospira platensis* estudada, em ampliações de 100x (imagem da esquerda) e 400x (imagem da direita), respectivamente.



**Figura I.5** – Imagens de microscópio óptico (ampliação 100x e 400x, respectivamente) da estirpe de *Arthrospira platensis*.

As regiões propícias ao crescimento deste Género são as tropicais e sub-tropicais, como o México, Chade e Quénia (Abdin el Sherif e Clément, 1982).

A *Arthrospira platensis* foi reportada pelo botânico Jean Leonárd, membro de uma expedição francesa e belga à República do Chade, em meados da década de 60, através da

constatação da venda da biomassa seca desta cianobactéria, como alimento, nos mercados no Fort Lamy, Chade (Vonshak, 2002).

Actualmente esta espécie é produzida em grande escala em lagoas artificiais, tipo “pista de corrida” (*raceway ponds*). O cultivo é efectuado a céu aberto e é possível o controlo de contaminação (competição por parte de outros organismos), pelo aumento do valor de pH, o que leva a que o meio de cultura seja adverso para o desenvolvimento de outras espécies de microalgas. Um caso ocorrente de contaminação em culturas de microalgas é pelo género *Chlorella*, o qual pode ser evitado, no caso do cultivo do género *Arthrospira*, mantendo a concentração de carbonato de sódio, no meio de cultivo, superior a 0,2 M (Vonshak, 2002).

#### **I.5.2. Espécie: *Porphyridium aerugineum*; Estirpe: SAG, 43.94**

A espécie *Porphyridium aerugineum* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Rhodophyta*. As algas incluídas na Divisão *Rhodophyta* são predominantemente marinhas, existindo apenas um pequeno número de géneros de água doce. O género *Porphyridium* reúne microalgas unicelulares ou células reunidas em agregados mucilaginosos sem forma definida (estes agregados são visíveis utilizando tinta-da-china), células com um plasto estrelado e pirenóide central e as diferentes espécies podem ter tonalidades variadas como azul-esverdeada, avermelhada ou verde-acinzentado (Guimarães *et al.*, 2009).



**Figura I.6** – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de *Porphyridium aerugineum*.

Na figura I.6 apresenta-se uma imagem obtida por microscópio óptico que mostra a estirpe de *Porphyridium aerugineum* repicada, em ampliação de 1000x.

### I.5.3. Espécie: *Schizomeris leibleinii*; Estirpe: SAG, 42.96

A espécie *Schizomeris leibleinii* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Chlorophyta*. O género *Schizomeris* reúne microalgas imóveis com aspecto filamentososo não ramificado, com sistema basal de fixação diferenciado e as células contêm vários pirenóides (Guimarães *et al.*, 2009).

Na figura I.7 apresentam-se duas imagens obtidas por microscópio óptico que mostram a estirpe de *Schizomeris leibleinii* repicada, em ampliações de 100x (imagem da esquerda) e 400x (imagem da direita), respectivamente.

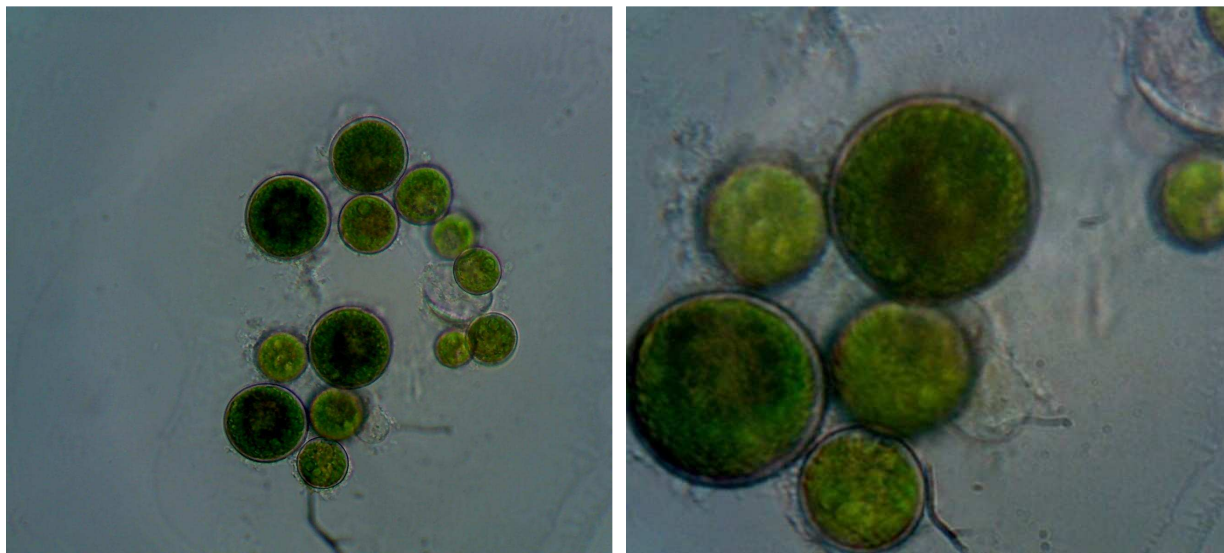


**Figura I.7** – Imagens de microscópio óptico (ampliação 100x e 400x, respectivamente) da estirpe de *Schizomeris leibleinii*.

### I.5.4. Espécie: *Haematococcus pluvialis*; Estirpe: SAG, 49.96

A espécie *Haematococcus pluvialis* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Chlorophyta*. O género *Haematococcus* reúne microalgas unicelulares, as células das diferentes espécies podem ser esféricas, elipsóides ou ovóides e são compostas por prolongamentos citoplásmicos entre o citoplasma e a membrana celular (Guimarães *et al.*, 2009).

Na figura I.8 apresentam-se duas imagens obtidas por microscópio óptico que mostram a estirpe de *Haematococcus pluvialis* repicada, em ampliações de 400x (imagem da esquerda) e 1000x (imagem da direita), respectivamente.



**Figura I.8** – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Haematococcus pluvialis*.

#### I.5.5. Espécie: *Botryococcus brauni*; Estirpe: ACOI, 58

A espécie *Botryococcus brauni* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Chlorophyta*. O género *Botryococcus* reúne microalgas imóveis e coloniais, as células são de forma esférica ou elipsóide, unidas internamente por cordões mucilaginosos, e reunidas em agregados gelatinosos geralmente muito densos (Guimarães *et al.*, 2009).

Na figura I.9 apresenta-se uma imagem obtida por microscópio óptico que mostra a estirpe de *Botryococcus brauni* repicada, em ampliação de 1000x.



**Figura I.9** – Imagens de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de *Botryococcus brauni*.

## I.6. Meios de cultura, fontes nutricionais e de stress

### I.6.1. Fontes nutricionais (carbono, azoto e fósforo)

Existem diversos meios de cultura apropriados à preservação e produção de culturas de microalgas. Regra geral, nas algotecas ou em locais de exploração de cultivos massivos de microalgas de água doce os macronutrientes essenciais são o carbono, azoto, fósforo e potássio. Para manutenção e estudo de culturas de microalgas à escala laboratorial utilizam-se normalmente sais de pureza pro-análise; já em cultivos de grande escala os meios podem ser preparados a partir de fontes residuais e/ou comerciais, cuja composição nutricional seja conhecida, para que o meio final seja adequado à espécie a produzir. No caso de meios salinos, que simulem uma água salgada ou salobra, as principais diferenças relativamente aos meios de água doce são o aumento das concentrações de cloreto de sódio e de magnésio no meio.

Nos sistemas de cultivo de microalgas, o carbono é considerado o macronutriente mais importante, uma vez que constitui cerca de 50 % da biomassa microalgal (Abalde *et al.*, 1995; Mirón *et al.*, 2003; Grobbelaar, 2004).

Parte do carbono existente nos meios aquáticos encontra-se numa forma oxidada (inorgânica) e combinada com oxigénio molecular, sob as formas de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) ou carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Falkowski e Raven, 1990).

O carbono inorgânico é fundamental no processo de autotrofia / fotossíntese, estando a sua concentração no meio directamente relacionada com o pH. Assim, para valores de pH inferiores a 5,0, apenas o  $\text{CO}_2$  é consumido; entre 7 e 9 o hidrogenocarbonato passa a ser também utilizado como fonte de carbono no processo fotossintético; quando o pH é superior a 9,5 o consumo de carbonato passa a ser predominante (Esteves, 1988).

As microalgas crescem em regime autotrófico, utilizando luz e dióxido de carbono mas, também podem ser cultivadas em regime heterotrófico, usando compostos orgânicos como fonte de energia e fonte de carbono, ou ainda em regime de cultivo mixotrófico (Barclay *et al.*, 1994). Neste último tipo de crescimento utiliza-se simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de  $\text{CO}_2$  e substrato orgânico como fontes de carbono (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004).

O azoto é um nutriente essencial para o metabolismo das microalgas na medida em que contribui para a formação das proteínas. A redução na quantidade de azoto no meio de

cultura leva a que sejam sintetizados preferencialmente lípidos e hidratos de carbono (Rigano *et al.*, 1998).

Quando o azoto a fornecer às culturas algais se encontra sob a forma de nitrato, é reduzido a nitrito pelas microalgas através da enzima nitrato-redutase e posteriormente este último é reduzido pela nitrito-redutase a amónia (forma molecular de azoto utilizada pelas algas no metabolismo) (Cornet *et al.*, 1998).

O fósforo é também considerado um macronutriente e a quantidade existente no meio de cultura pode limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. Por exemplo, foi referido (Mahasneh, 1997) que, em culturas de *Chlorella sp.*, com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de fosfato, o valor de teor proteico atingido foi de 15,7% mas, com o aumento da concentração de fosfato para  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , o teor proteico aumentou para 37%. Conclui-se assim que, a massa de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ou  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  usada na preparação do meio de cultura, influencia a concentração de proteína final na biomassa algal.

A salinidade poderá ser utilizada como fonte de *stress* e de prevenção de contaminação numa cultura microalgal e como exemplo da indução de *stress* apresenta-se o caso de um estudo realizado para uma microalga de água salgada, *Dunaliella sp.*, em que ensaios com uma concentração de 0,5 M ou de 1,0 M de NaCl nos meios resultaram em teores lipídicos de 60% e 67% (% m/m) relativamente ao valor de biomassa seca, respectivamente. Além destes resultados, a adição de 1,0 M de NaCl, ao meio com 1,0 M inicial, na fase exponencial de crescimento fez aumentar o teor lipídico para 70% do valor de biomassa seca (Takagi *et al.*, 2006).

## **I.7. Processos de cultivo**

### **I.7.1. Parâmetros químicos e físicos de cultivo**

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, e depende de factores como a intensidade de luz e regime de iluminação, temperatura, pH, nutrientes e agitação do meio (Miao e Wu, 2004).

O pH do meio é importante no processo de cultivo e varia de aproximadamente 7 a 9 para a maioria das espécies de microalgas (Raven, 1990).

A luz é fundamental para o crescimento microalgal em regime autotrófico, pois actua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa. O excesso de luz pode provocar foto-oxidação ou morte foto-oxidativa devido à formação de peróxido de hidrogénio (substância tóxica para as microalgas) na presença de oxigénio.

A temperatura pode influenciar o crescimento celular e a composição química das microalgas. Por exemplo, no género *Chlorella*, quando a temperatura de cultivo aumenta de 25 °C para 35 °C, o teor em proteínas e em hidratos de carbono diminui e aumenta, respectivamente (Ogbonna e Tanaka, 1996).

A agitação de culturas, em meio líquido, mantém as células em suspensão e evita parcialmente a sua deposição no fundo do fotobioreactor, favorecendo a homogeneização de disponibilidade de luz a todas as células em suspensão e promovendo a eliminação de excesso de oxigénio dissolvido no meio, o que diminui o risco de ocorrer morte celular por foto-oxidação (Becker e Venkatarman, 1984; Richmond *et al.*, 1993).

### **I.7.2. Processos de cultivo de microalgas**

Os reactores biológicos para cultivo de microalgas podem operar em modo descontínuo, semi-contínuo ou contínuo.

Num processo descontínuo (em reactor fechado) de cultivo de microalgas verificam-se as seguintes fases:

- 1º) Preparação do meio de cultura, adequado à nutrição e desenvolvimento da estirpe, bem como à obtenção do produto desejado;
- 2º) Inoculação de um fotobioreactor com o meio preparado e com o inóculo, o qual deverá advir de uma cultura microalgal densa; crescimento da cultura até à fase estacionária

- ou até à fase requerida para extracção do composto pretendido,
- 3º) Quando a cultura atingir a fase requerida procede-se à colheita total e à obtenção do(s) produto(s).

Este tipo de processo é o mais indicado quando existem dificuldades de manutenção de condições de assepsia, permite grande flexibilidade de operação e um controlo mais restrito da estabilidade genética da estirpe de microalga (Borowitzka, 1997).

Neste processo poderá ser efectuada a adição periódica de meio nutricional, isto é, um ou mais nutrientes são adicionados ao fotobioreactor durante o período de cultura até à colheita. Neste tipo de operação pode ou não ocorrer alteração do volume de cultura, a qual depende da concentração do substrato e da taxa de evaporação do sistema (Lee e Shen, 2004).

No processo semi-contínuo as fases de operação seguem a mesma ordem que no processo descontínuo, com a diferença de que, o acto de colheita não corresponde à colheita total da cultura algal, e o volume de cultura que fica no fotobioreactor serve de inóculo ao cultivo seguinte. No final da colheita é introduzido no reactor um volume de meio de cultura aproximadamente igual ao volume retirado. Deste modo, reinicia-se a sequência de operações até eventualmente existir uma quebra na produtividade do sistema.

O processo contínuo é realizado pela introdução contínua de meio de cultura no fotobioreactor. Este caudal de entrada deverá ser equivalente ao caudal de saída, o qual corresponde ao caudal para colheita de biomassa algal, de modo a manter-se o volume de cultivo constante. Neste tipo de processo, o objectivo é que o sistema atinja uma condição de estado estacionário, isto é, que a densidade da cultura se mantenha aproximadamente constante (Fogg, 1975; Lee e Shen, 2004).

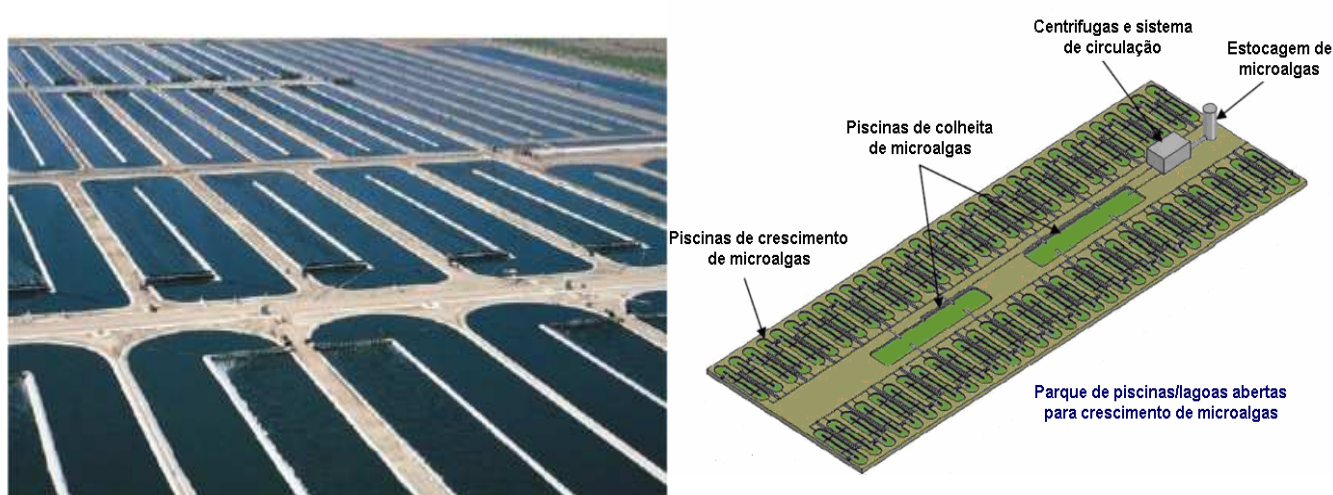
### **1.7.3. Fotobioreactores fechados vs Fotobioreactores abertos**

Os sistemas de produção de microalgas podem-se dividir em dois grandes grupos: fotobioreactores abertos (sistemas a céu aberto) e fotobioreactores fechados.

Os sistemas a céu aberto são usualmente do tipo *raceway pond* (lagoas abertas tipo pista de corrida), com pequena profundidade (cerca de 15 cm) para assegurar a adequada incidência da luz solar (figura 1.10). Estes sistemas podem ser construídos em plástico, lonas, betão, fibra de vidro ou alvenaria. Durante o Inverno, os tanques devem ser cobertos para evitar variações de temperatura e impedir que a camada superficial do meio de cultura

congele durante a noite. Em regiões temperadas e subtropicais, a cobertura também reduz as perdas do meio por evaporação e diminui a contaminação da biomassa colhida por insectos. A desvantagem dos cultivos cobertos reside na redução da penetração da luz no sistema de cultivo, tanto pela existência da cobertura, como pela condensação de água na superfície interna (Becker, 1981).

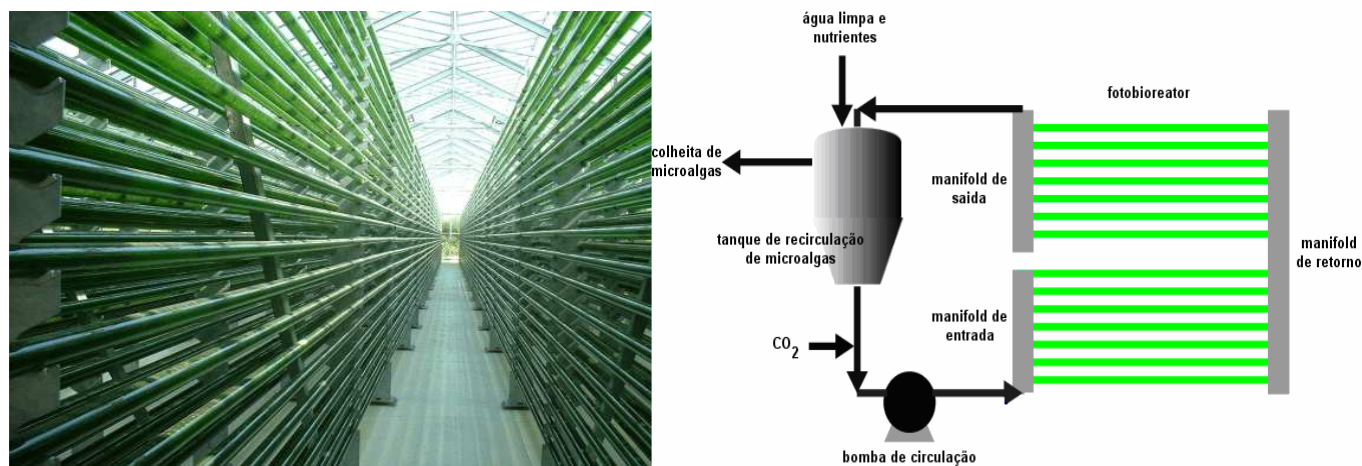
No cultivo de microalgas a céu aberto existe o risco de contaminação por parte de outros organismos; no entanto a contaminação pode ser controlada pela variação da concentração salina, aumento do pH e variação da temperatura (Vonshak, 2002), que afectam de modo diferente distintas estirpes de microalgas.



**Figura I.10** – Sistemas de produção de microalgas a céu aberto do tipo *raceway pond* ([www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854](http://www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854)).

Os fotobioreactores fechados podem ter diversas concepções estruturais. São usualmente construídos com tubos/superfícies de plástico transparente, vidro ou policarbonato. A estrutura pode ser do tipo tubular (figura I.11), em coluna (forma cilíndrica) ou em painéis.

Nos fotobioreactores fechados é possível controlar mais facilmente parâmetros de cultivo como a temperatura, iluminação e pH. Estes tipos de sistemas viabilizam o controlo e aplicação de intervalos óptimos dos parâmetros descritos anteriormente, o que pode levar a um acréscimo de produtividade de biomassa algal, relativamente aos sistemas a céu aberto.



**Figura I.11** – Sistemas de produção de microalgas em fotobioreactores tubulares (<http://brae.calpoly.edu/CEAE/biofuels.html>).

Na tabela I.5 resumem-se as vantagens e desvantagens entre os dois tipos de sistemas de cultivo de microalgas.

**Tabela I.5** – Vantagens/desvantagens dos sistemas de cultivo (adaptado de: Pulz, 2001)

Parâmetros	Sistemas a céu aberto	Fotobioreactores
Risco de contaminação	Bastante Elevado	Baixo
Área de implementação	Elevada	Baixa
Custo de implementação	Menor	Maior
Perdas por evaporação	Bastante elevada	Baixa
Possibilidade de injeção de CO <sub>2</sub>	Não é possível	Possível
Qualidade da biomassa	Não é controlável	Controlável
Variabilidade de espécies a cultivar	Muito baixa	Praticamente todas
Flexibilidade na produção	Praticamente impossível de alterar a espécie a produzir	Possibilidade de alterar a espécie a cultivar
Parâmetros de cultivo	Dependente das condições exteriores	Possível controlar
Dependência de factores climáticos	Total	Com pouco significado
Período para iniciar a produção após o início ou interrupções (ex. limpeza)	Pelo menos de seis a oito semanas	Até 2 semanas
Concentração de biomassa	De 0,1 a 0,2g/l	De 2 a 8g/l
Eficiência da colheita	Mais demorada e maior custo	Menos demorada e menor custo

## I.8. Métodos de colheita de microalgas e de extracção de óleo

Para a produção de alimentos, ou para a extracção de produtos de valor acrescentado, é necessário separar a biomassa algal do meio de cultivo. O processo de colheita (figura I.8) envolve uma ou mais etapas de separação sólido-líquido, como por exemplo, floculação, centrifugação e filtração. Após a colheita e no caso do processo produtivo quente estar padronizado para utilizar a biomassa seca, então será necessário secar (ex. secagem ao sol) ou desidratar a biomassa (ex. liofilização) (Grima *et al.*, 2003).



Figura I.12 – Colheita de microalgas (a) <http://microalgas-producao.blogspot.com>; b) [www.cyanotech.com](http://www.cyanotech.com)).

Para a extracção dos compostos, as paredes das células das microalgas são “destruídas” por aplicação de métodos físicos (ex. prensagem), ultra-sons, choque osmótico, solventes e enzimas.

Os métodos utilizados para extrair óleo das sementes oleaginosas, podem também ser aplicados para a extracção de óleo das microalgas (Folch *et al.*, 1957; Bligh e Dyer, 1959; Grima *et al.*, 2003; Demirbas, 2009). Descrevem-se de seguida, sucintamente, cada um dos métodos que pode ser utilizado na extracção do óleo das microalgas:

**Ruptura por prensagem:** Processo físico no qual a ruptura é realizada por compressão das microalgas confinadas num determinado volume, por meio da aplicação de uma pressão mecânica adequada. Poderá ser extraído cerca de 70 a 75% da quantidade total de óleo presente na biomassa. Poderá ser utilizada uma combinação de pressão mecânica e de solventes químicos para extracção do óleo.

**Extracção por solventes:** O óleo das microalgas pode ser extraído usando produtos químicos simples ou conjugados entre si, tais como:

- etanol, metanol, hexano, n-hexano, clorofórmio
- 2:1 clorofórmio:metanol; 2:2:1,8 clorofórmio:metanol:água; 7:3 metanol:água (misturas v:v)

A extracção com hexano pode ser usada isoladamente ou em conjunto com o método da prensagem de óleo. Após a extracção, o óleo e a polpa remanescente são separados e o solvente é recuperado por destilação. Os processos de prensagem combinada com extracção por solvente permitem extrair mais de 95% do óleo total contido nas microalgas.

**Extracção com CO<sub>2</sub> supercrítico:** Neste processo extractivo, o CO<sub>2</sub> é liquefeito sob pressão e aquecido até ao seu ponto supercrítico, em que tem as propriedades tanto de líquido como de gás. Este fluido líquido actua então como um poderoso solvente para extracção do óleo. Este método permite extrair quase 100% de todo o óleo.

**Extracção Enzimática:** Com o auxílio da água (no papel de solvente), este método utiliza enzimas para degradar a parede celular das microalgas, o que facilita a migração do óleo contido na mesma para o meio aquoso.

**Choque Osmótico:** Trata-se de um processo em que uma redução repentina na pressão osmótica permite causar a ruptura das paredes das células das microalgas em solução. O choque osmótico é usado para libertar componentes celulares, tais como o óleo e as proteínas.

**Ruptura por Ultrasons:** A aplicação de ultrasons facilita o processo de extracção. No banho de ultrasons as ondas são usadas para criar bolhas de cavitação no conjunto microalgas - solvente. Quando essas bolhas rebentam perto das paredes da célula, criam ondas de choque e jactos líquidos que causam a ruptura da parede celular e a libertação do óleo para o solvente.

## II. Parte Experimental: Materiais, Reagentes e Métodos

O estudo experimental aqui apresentado tem como objectivo otimizar as condições de crescimento de biomassa algal com vista à maximização da produção de óleo para utilização como matéria-prima na produção de biodiesel.

Numa fase inicial do estudo foram testadas diferentes estirpes. Assim, na fase de inoculação foram usados tubos de ensaio e erlenmeyers de 250 mL, tendo sido efectuado o crescimento de cinco espécies correspondendo a cinco estirpes distintas de algas (*Arthrospira platensis*, *Porphyridium aeruginum*, *Schizomeris leibleinii*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus brauni*).

Numa fase posterior, o estudo de optimização do crescimento incidiu em particular sobre a *Arthrospira platensis*, devido ao facto de esta ser uma estirpe de elevado interesse comercial, muito resistente à contaminação pelo pH alcalino do meio, e com rápido crescimento. O cultivo foi efectuado em erlenmeyers de 250 mL, 1 L e 5 L, sucessivamente. O cultivo de *Arthrospira platensis* em erlenmeyer de 5 L foi efectuado com o propósito de obter uma cultura mãe de volume suficiente para todas as inoculações necessárias.

O cultivo de *Arthrospira platensis* nas condições optimizadas foi efectuado em erlenmeyers de 1 L, de modo a permitir obter uma quantidade de microalgas suficiente para a extracção de óleo para permitir a sua quantificação.

### II.1. Parâmetros físicos fixados

Para a realização do estudo foram fixados alguns parâmetros, de modo a permitir controlar as condições experimentais e a reproduzir o estudo. Deste modo, resumem-se na tabela II.1 os parâmetros que foram fixados na realização do trabalho experimental.

**Tabela II.1** – Parâmetros físicos fixados

Parâmetros	Tubos de ensaio	Erlenmeyers de 250 mL	Erlenmeyers de 1 e 5 L
Temperatura ambiente	28°C ± 2°C	28 ± 2°C	28 ± 2°C
Intensidade luminosa	2000 lux	4500 lux	4500 lux
Fonte de luz	lâmpadas luz dia	lâmpadas luz dia	lâmpadas luz dia
Fotoperíodo	12:12 h	12:12 h	12:12 h
Arejamento	—	0,12 v.v.m. 2 mL <sub>ar</sub> /s	0,24 v.v.m. 4 mL <sub>ar</sub> /s

## II.2. Inoculação das microalgas de água doce *Arthrospira platensis*, *Porphyridium aerugineum*, *Schizomeris leibleinii*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus brauni*

Conforme mencionado anteriormente, o estudo do crescimento e cultivo de microalgas inicia-se pela inoculação das espécies/estirpes a estudar. Neste estudo, optou-se pelo estudo de espécies adaptadas ao crescimento em água doce.

### II.2.1. Identificação das microalgas repicadas/inoculadas

As microalgas usadas no estudo foram provenientes de três algotecas, uma nacional, a Algoteca de Coimbra (ACOI), outra Alemã (SAG) e uma Norte-Americana (UTex). A sua identificação e meio de cultura base usado no estudo encontram-se na tabela II.2.

**Tabela II.2** – Identificação das microalgas estudadas

Espécie	Estirpe		Meio de Cultura
	Algoteca	Código	
<i>Arthrospira platensis</i>	UTex	LB 2340	Zarrouk modificado
<i>Porphyridium aerugineum</i>	SAG	43.94	BBM 3N
<i>Schizomeris leibleinii</i>	SAG	42.96	BBM 3N
<i>Haematococcus pluvialis</i>	SAG	49.96	BBM 3N
<i>Botryococcus brauni</i>	ACOI	58	BBM 3N

### II.2.2. Preparação do material utilizado na inoculação / cultivo

Foi escolhido material com as mesmas características para cada conjunto de ensaios, de modo a reduzir a influência de pequenas alterações nas condições de cultivo.

- a)** Antes de cada inoculação / cultivo, todo o material usado (pipetas, provetas, ansas, tubos de ensaio, erlenmeyers, etc.) foi lavado em água corrente e detergente, passado por água destilada, autoclavado a 121 °C durante 20 minutos em autoclave (Memmert) e colocado em câmara de fluxo laminar (Cruma) sob radiação UV durante 60 minutos.

**b)** As tampas de borracha dos erlenmeyers com os respectivos tubos para arejamento e respiração e as tubagens de silicone foram sujeitas ao mesmo procedimento descrito na alínea anterior, com excepção da autoclavagem, devido à sua baixa resistência a elevadas temperaturas. Este passo foi substituído por fervura a 100 °C durante 5 min.

**c)** Para os tubos de ensaio foram feitas rolhas de algodão e gaze que foram desinfectadas com álcool etílico (96% v/v) e posteriormente colocadas numa estufa (WTC binder) a 80 °C durante 60 minutos.

### **II.2.3. Condições de Inoculação / Cultivo**

A inoculação das microalgas (figura II.1) foi efectuada em câmara de fluxo laminar vertical (CRUMA) e o cultivo (figura II.2) foi efectuada em sala climatizada, sobre bancadas, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes “luz dia”, posicionadas lateralmente às bancadas.

**a)** A intensidade de irradiação luminosa foi medida com um luxímetro (Lutron LX-1102) e os tubos de ensaio foram posicionados de forma a receberem 2000 lux num fotoperíodo de 12:12 horas, controlado por um temporizador automático (Perfu electric).

**b)** A temperatura da sala foi mantida a  $28 \pm 2$  °C por um aparelho de ar condicionado do tipo *Splitt* (Samsung) de 18000 BTU.

**c)** Das cinco estirpes inoculadas, a que primeiro se conseguiu cultivar em erlenmeyers de 1 L foi a espécie *Arthrospira platensis* (com taxa de crescimento mais rápido, observável pelo aumento de densidade óptica, e que permitiu prosseguir com o estudo) sendo este o critério de selecção da espécie para estudo como fonte de lípidos para produção de biodiesel.



**Figura II.1** – Inoculação em tubos de ensaio, na câmara de fluxo laminar.



**Figura II.2** – Tubos de ensaio e erlenmeyers inoculados.

**d)** Para uniformizar as condições de cultivo nos erlenmeyers, foi avaliada a curva de intensidade luminosa à altura média das lâmpadas luz de dia.

Na figura II.3 apresenta-se a curva de intensidade luminosa de 4500 lux, marcada sobre as bancadas, bem como os erlenmeyers de 1 L de cultura dispostos em função da mesma.



**Figura II.3** - Curva de intensidade luminosa à altura média das lâmpadas luz de dia.

**e)** Calibração das bombas de ar (arejamento a v.v.m. constante) (ver Anexo 1)

**f)** No cultivo com vista ao aumento de concentração de biomassa algal, para determinação da curva de calibração (Abs vs [biomassa seca] (mg/L)), nas condições padrão, para avaliação do crescimento foram utilizados erlenmeyers de 1 L, com 1 L de meio de cultura sob arejamento constante a 0,24 v.v.m., feito através de bombas de ar (Pacific AP6) e difusores (Rena). O arejamento tinha a duração de 12 h/dia, coincidindo com o período luz dia do fotoperíodo, de modo a assemelhar-se às condições de iluminação natural.

#### **II.2.4. Meios de Cultura**

Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura a seguir mencionados são reagentes p.a., para microbiologia, que permitem menor variabilidade e maior precisão no controlo das condições de crescimento.

##### **a) Meio de cultura padrão Zarrouk modificado**

O meio de cultura padrão utilizado nos cultivos de *Arthrospira platensis* foi o Zarrouk modificado (Zarrouk, UTex), cuja composição dos reagentes utilizados por cada litro de cultura se encontra descrita na Tabela II.3:

**Tabela II.3** – Composição do meio Zarrouk modificado, meio de cultura padrão para cultivo de *Arthrospira platensis*

Reagentes		Massa (g/L <sub>final</sub> )	Massa (g/L <sub>conc</sub> )	Volume (mL <sub>conc</sub> /L <sub>final</sub> )	[elemento] (ppm)	
					Elemento	mg/L
Macronutrientes	NaHCO <sub>3</sub>	16,00	—	—	C	2.285,7
					Na	4.381,0
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,00	50,00	40,0	C	226,4
					Na	867,9
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	25,00	20,0	P	89,0
					K	224,5
	NaNO <sub>3</sub>	2,50	50,00	50,0	N	411,8
					Na	676,5
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00	50,00	20,0	S	184,2
					K	448,7
	NaCl	1,00	50,00	20,0	Na	393,2
					Cl	606,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20	20,00	10,0	S	26,1	
				Mg	19,7	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04	4,00	10,0	Ca	10,9	
				Cl	19,3	
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,08	40,00	2,0	C	25,8	
				N	6,0	
				Na	98,9	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01	5,00	2,0	Fe	2,0	
				S	1,2	
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,002860	2,860	1,0	B	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,000222	0,222		Zn	
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,001810	1,810		S	
					Mn	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,000079	0,079		Cu	
					S	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,000044	0,044		Co	
N						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,000018	0,018	Mo			
			Na			
H <sub>2</sub> O destilada	—	—	—	825		

Todos os reagentes foram pesados numa balança digital com precisão  $\pm 5 \times 10^{-4}$  g (OHAUS Pioneer TM).

Todas as soluções concentradas e meios de cultura final foram misturadas com recurso a placa de aquecimento e agitação magnética (Labinco L-82) (Figura II.4).

A solução concentrada de micronutrientes foi a única a necessitar de aquecimento a 70 °C, além da agitação magnética, devido à presença de  $H_3BO_3$ .

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (CRUMA) sob condições assépticas. O pH do meio Zarrouk modificado é de  $8,90 \pm 0,15$ .

As soluções concentradas foram rotuladas, com nome do meio de cultura, nome da solução, concentração, data de preparação e rubricadas. Foram armazenadas e refrigeradas a  $5 \pm 2$  °C num frigorífico (Teka) (Figura II.4.).



**Figura II.4** – Homogeneização dos meios de cultura (à esquerda) e armazenamento dos meios de cultura concentrados em frio (à direita).

**b) Meio de cultura BBM 3N**

Conforme referido em II.2.1. foi usado o meio de cultura BBM 3N na inoculação de quatro espécies. A única variação relativamente ao meio padrão BBM (Bold Basal Medium, UTex) é o volume de  $\text{NaNO}_3$  que é três vezes superior ao volume usado para o meio de cultivo BBM, por cada litro de cultura, sendo o volume de água destilada corrigido de acordo. A composição dos reagentes utilizados por cada litro de cultura encontra-se na Tabela II.4.

**Tabela II.4 – Composição do meio de cultura BBM 3N**

Reagentes		Massa (g/L <sub>final</sub> )	Massa (g/L <sub>conc</sub> )	Volume (mL <sub>conc</sub> /L <sub>final</sub> )	[elemento] (ppm)	
					Elemento	mg/L
Macronutrientes	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,0750	7,50	10,0	K	33,7
					P	13,3
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1750	17,50	10,0	K	50,3
					P	39,9
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0750	7,50	10,0	Mg	7,4
					S	9,8
	$\text{NaNO}_3$	0,7500	25,00	30,0	N	123,6
					Na	202,8
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0250	2,50	10,0	Ca	6,8
					Cl	12,1
NaCl	0,0250	2,50	10,0	Na	9,8	
				Cl	15,2	
EDTA- $\text{Na}_2$ + KOH	0,0500 + 0,0310	50,00 + 31,00	1,0	C	16,1	
				N	3,7	
				Na	6,2	
				K	21,6	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{H}_2\text{SO}_4^*$	0,0050 + 0,0010 mL	4,98 + 1,00 mL	1,0	Fe	1,0	
				S	1,6	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0114	11,42	1,0	B	2,0	
Micronutrientes	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001412	1,412	Zn		
				S		
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,000232	0,232	Mn		
				S		
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,000252	0,252	Cu		
				S		
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,000080	0,080	Co			
			N			
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,000192	0,192	Mo			
			Na			
H <sub>2</sub> O destilada	—	—	916			

\*  $m_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,84 \text{ g/mL}$

Todas as soluções concentradas e de meio de cultura final foram misturadas com recurso a placa de aquecimento e agitação magnética marca Labinco L-82 e barra magnética.

As soluções concentradas de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foram preparadas em hotte e as soluções concentradas de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  foram as únicas a necessitar de aquecimento além da agitação magnética.

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical marca Cruma, sob condições assépticas. O pH do meio BBM 3N é de  $6,85 \pm 0,15$ .

## II.3. Cultivo de *Arthrospira platensis*

### II.3.1. Repicagens

As cinco estirpes de microalgas referidas em II.2.1. foram todas repicadas, após o período de crescimento em tubos de ensaio, para erlenmeyers de 250 mL, com arejamento constante a 0,12 v.v.m.

A primeira espécie a ser repicada para erlenmeyers de 250 mL foi a *Arthrospira platensis* (Figura II.5), conseguindo-se repicar em seguida para erlenmeyers de 1 L quando das repicagens para erlenmeyers de 250 mL das outras quatro espécies.

A *Arthrospira platensis* foi repicada do volume de 1 L para 5 L, sendo esta última cultura, a cultura mãe para futuras inoculações.



**Figura II.5** – Cultivo de *Arthrospira platensis* em erlenmeyers de 250 mL, antes de se introduzir o arejamento.

### II.3.2. Monitorização de possíveis contaminações das culturas

A monitorização de possíveis contaminações das culturas, desde a fase de inóculo em tubo de ensaio até erlenmeyers de 5 L, foi efectuada por controlo visual (microscópico) com o apoio do guia de taxonomia de microalgas de água doce ilustrado (Guimarães *et al.*, 2009) da Algoteca do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

## **II.4. Curvas de crescimento da *Arthrospira platensis***

### **II.4.1. Metodologia para traçar a curva de calibração**

A curva de calibração – Abs vs [biomassa seca] (mg/L) (ver Anexo 2) – foi traçada para o regime de crescimento autotrófico. Para tal foi observado o seguinte procedimento:

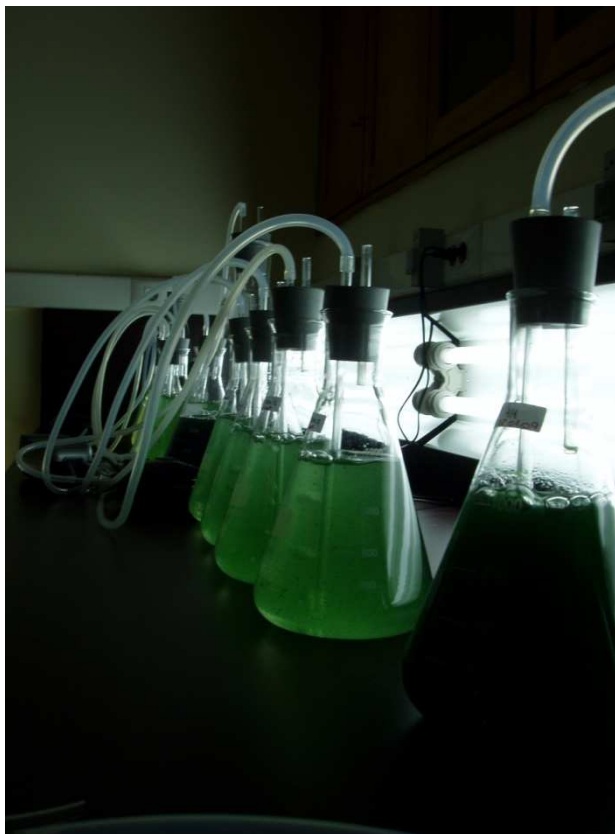
- a)** Crescimento de 1 L de cultura até à fase estacionária (cultura densa);
- b)** Colheita da biomassa húmida, por centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos, numa centrífuga (Sorvall superspeed centrifuge SS-3 automatic);
- c)** Liofilização da biomassa húmida colhida (procedimento gentilmente facultado pela Universidade Católica do Porto - Faculdade de Tecnologia)
- d)** Pesagem de diferentes quantidades de biomassa liofilizada numa balança digital de precisão  $\pm 5 \times 10^{-5}$  g (Kern ALJ 220-4) para preparação de oito soluções padrão de diferentes concentrações. As absorvâncias das amostras de concentração conhecida foram lidas a 680 nm (pico de absorvância máxima). A leitura das absorvâncias foi efectuada num espectrofotómetro UV-visível (Shimadzu UV-160A).
- e)** Todas as leituras foram efectuadas em triplicado.

### **II.4.2. Avaliação do crescimento microalgal**

Foram efectuados três conjuntos de ensaios, em erlenmeyers de 1 L, em que se variaram as fontes nutricionais (aumento de Carbono e diminuição de Azoto) e de *stress* (aumento da salinidade), de acordo com o esquema seguinte:

- a)** Cultura em regime autotrófico e quatro culturas (em triplicado) de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico, sob a forma de glucose;
- b)** Três culturas (em triplicado) de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L e com subtração de azoto ao meio de cultura;
- c)** Quatro culturas (em triplicado) de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L e com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura.

Todas as culturas foram efectuadas em triplicado, tendo sido inoculadas com 200 mL da solução Mãe referida em II.3.1, ou seja, o inóculo inicial (dia zero) de todas as culturas acima referidas era iniciado a partir do equivalente de um volume de colheita de 80% de uma cultura densa em fase estacionária (Çelekli *et al.*, 2009).



**Figura II.6** – Cultivos em triplicado para avaliação do crescimento microalgal.

A avaliação do crescimento das culturas (Figura II.6) (ver III. Resultados experimentais e Anexo 3) foi efectuada diariamente através de leitura da absorvância por espectrofotometria UV-Vísivel. Para cada leitura era recolhido um volume de 3 mL. Como a absorvância para cada cultura era lida em duplicado e os ensaios feitos em triplicado, no total retiraram-se 18 mL de cada cultura distinta. O respectivo meio de cultura era repostado em volume proporcional. A estabilização dos valores de absorvância indicava que a cultura tinha entrado em fase estacionária.

Todos os dias foram realizadas as leituras de pH e temperatura, feitas com equipamento da marca Schott Instruments (Figura II.7) – foi usado um eléctrodo para cada estirpe para reduzir a possibilidade de contaminação das culturas;



**Figura II.7** – Leitura de pH e temperatura.

#### **II.4.3. Cálculo da concentração de biomassa algal produzida**

O cálculo das concentrações de biomassa algal para os três conjuntos de ensaios referidos em II.4.2. foi feito com base na curva de calibração Abs vs [biomassa seca] (mg/L) obtida para o regime de crescimento autotrófico (ver II.4.1. e Anexo 2) (os valores correspondentes a estes ensaios encontram-se nas tabelas constantes do Anexo 3)

## II.5. Extração de óleo por solventes e quantificação por gravimetria

A avaliação do crescimento microalgal para os três conjuntos de ensaios referidos em II.4.2. cessava após um a dois dias das culturas terem entrado em fase estacionária. A biomassa era colhida por centrifugação, catalogada e armazenada em frio ( $-20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), numa arca congeladora (Teka).

Após o término de todos os ensaios de avaliação do crescimento microalgal, a biomassa foi descongelada e deu-se início à extração do óleo. A extração foi feita com uma mistura de clorofórmio:metanol:água (2:2:1,8 em volume), de acordo com o procedimento adaptado de Bligh e Dyer (1959) e descrito de seguida:

- a) Na balança digital de precisão  $\pm 5 \times 10^{-5}$  g (Kern ALJ 220-4) tarar tubos de centrífuga (ECCO);
- b) Nos tubos de ensaio tarados pesar as biomassas algais húmidas;
- c) Sabendo-se que cerca de 85% da biomassa algal húmida é constituída por água (ver Anexo 4), determina-se a massa de água como  $m_{\text{água}} = 0,85 * m_{\text{biomassa húmida}} \text{ (g)}$ ;
- d) Como 85% da biomassa algal é água e sendo  $\rho_{\text{água}} = 1 \text{ g/mL}$ , pode-se considerar que  $\rho_{\text{biomassa húmida}} \cong 1 \text{ g/mL}$ , o que permite obter a aproximação:  $m_{\text{biomassa húmida}} \text{ (g)} \cong V_{\text{biomassa húmida}} \text{ (mL)}$ ;
- e) A 1ª extração é feita com (1:2:0,8) clorofórmio:metanol:água. Como a fracção de água na  $m_{\text{biomassa húmida}}$  é de 0,85 a proporção de solventes deverá ser corrigida para (1,0625; 2,125; 0,85) clorofórmio:metanol:água:
  - i. Na hotte, com a extração de ar ligada, adicionar no tubo de ensaio tarado com a biomassa algal húmida  $V_{\text{clorofórmio}} = 1,0625 * V_{\text{biomassa húmida}} \text{ (mL)}$ ;
  - ii. Em seguida adicionar  $V_{\text{metanol}} = 2,125 * V_{\text{biomassa húmida}} \text{ (mL)}$ ;
  - iii. Agitação da mistura em tubos fechados com tampa, em vortex (Snijders 34524), a velocidade moderada, durante cerca de cinco minutos;
- f) Colocar os tubos de ensaio num banho de ultra-sons (Crest), de modo a que os tubos fiquem imersos na água até à altura do seu conteúdo. O procedimento deverá ser executado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos;
- g) A 2ª extração é feita com base na relação (2:2:1,8) clorofórmio:metanol:água, ou seja, o volume dos solventes na nova adição será ( $\chi_1$ : 0:  $\chi_2$ ):
  - i.  $\chi_1$  (clorofórmio) =  $V_{\text{metanol}} - V_{\text{clorofórmio}}$  (volumes da alínea e) i.);
  - ii.  $\chi_2$  (água) =  $(V_{\text{metanol}} * 1,8) / 2$  (volume de metanol da alínea e) ii.);
  - iii. Agitação em vortex a velocidade moderada, durante cerca de um minuto;
- h) Centrifugação (Centrifuga Orto alresa, Digicen) a 4000 rpm durante 20 minutos;

- i) Após a centrifugação distinguem-se nitidamente três fases:
  - i. Superior (menos densa ou metanólica);
  - ii. Intermédia, constituída pela biomassa residual;
  - iii. Inferior (densa ou clorofórmica); os lípidos encontram-se dissolvidos nesta fase;
- j) Com uma pipeta de Pasteur pipetar e rejeitar a fase superior; furar a fase intermédia e recolher para um goblé previamente pesado a fase inferior;
- k) Deixar evaporar, na hotte, o clorofórmio presente na fase recolhida e pesar o conjunto “goblé + lípidos” até que não se verifiquem alterações de massa (Figura II.8). Está assim encontrada a massa de lípidos para o ensaio em estudo;
- l) Determinar a percentagem de óleo presente na biomassa algal (considerando que 10% dos lípidos totais ficam retidos na biomassa residual).

**NOTA:** A análise qualitativa da composição do óleo para avaliação da sua maior ou menor adequação à produção de biodiesel conforme com a norma EN 14214 deveria ser feita por Cromatografia Gasosa, sendo a identificação dos compostos obtida com base nos tempos de retenção. Tal procedimento não pode ser levado a cabo pois ainda não se encontra disponível no local onde foi efectuado este estudo uma matriz para GC de óleos insaturados, saturados e polinsaturados.



**Figura II.8** - Quantificação gravimétrica dos lípidos presentes na biomassa microalgal.

### III. Resultados experimentais e discussão de resultados

#### III.1. Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo

A monitorização de possíveis contaminações das culturas desde a fase de inóculo em tubo de ensaio até erlenmeyers de 5 L foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em II.3.2. Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo. Nas Figuras III.1 a III.5 apresentam-se imagens de microscópio óptico das estirpes estudadas.

De modo a monitorizar possíveis contaminações, todas as culturas foram verificadas diariamente, conforme descrito em II.3.2. Até ao final dos ensaios não se verificaram qualquer tipo de contaminantes biológicos.

O critério utilizado para seleccionar a estirpe a estudar baseou-se na observação do crescimento e da correspondente variação da coloração (forma indicativa da densidade da cultura) dos meios de cultivo das cinco estirpes, desde o momento de repicagem para tubos de ensaio até à inoculação de reactores de volume de 1 L. A estirpe que permitisse em primeiro lugar a inoculação de 1 L de volume seria a escolhida para o presente estudo de optimização da produtividade lipídica em diferentes meios de cultura.

Das cinco estirpes objecto de estudo de crescimento, a *Arthrospira platensis*, UTex LB 2340 foi a primeira a ser inoculada num reactor de 1 L com sucesso e, deste modo, mediante o critério utilizado, a escolhida para o desenvolvimento restante deste estudo.

### III.2. Avaliação do crescimento da *Arthrospira platensis*

A avaliação do crescimento microalgal para os três conjuntos de ensaios, em erlenmeyers de 1 L, em que se variaram as fontes nutricionais (aumento da concentração de Carbono e redução da concentração de Azoto) e as condições de *stress* (por aumento da salinidade) foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em II.4.2.

#### III.2.1. Cultura em regime autotrófico e quatro culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico, sob a forma de glucose

Os primeiros ensaios foram realizados em regime autotrófico e em regime mixotrófico com a adição de  $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ . Para este último ensaio as três culturas (réplicas) de *Arthrospira platensis* tiveram decréscimo populacional até à morte da cultura ao fim de 3 a 4 dias de cultivo.

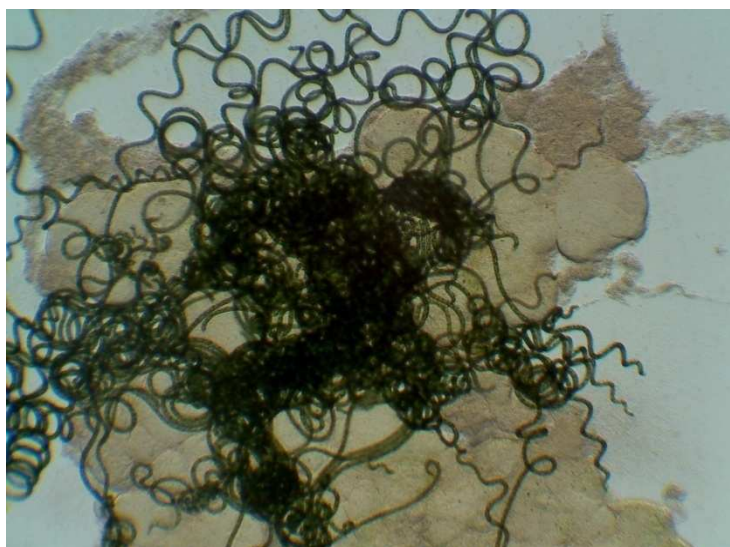
As Figuras III.1 e III.2 mostram uma das culturas de *Arthrospira platensis* ao fim de 2 e 4 dias de cultivo, respectivamente, sendo evidente o decréscimo de população algal na cultura em condições mixotróficas com adição de  $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ . O pH do meio nesta fase era inferior a 8,5, o que é indicativo do estado de morte da cultura para esta espécie. Outro factor indicativo do declínio foi o aumento do odor a matéria orgânica putrefacta nas culturas ao longo dos três últimos dias, o qual era cada vez mais intenso.



**Figura III.1** - Culturas de *Arthrospira platensis* em regime autotrófico (ao canto esquerdo) e em regime mixotrófico com a adição de  $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  (três erlenmeyers à direita) ao fim de 2 dias de cultivo.



**Figura III.2** - Cultura de *Arthrospira platensis* em regime mixotrófico com a adição de 4,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> ao fim de 4 dias de cultivo.

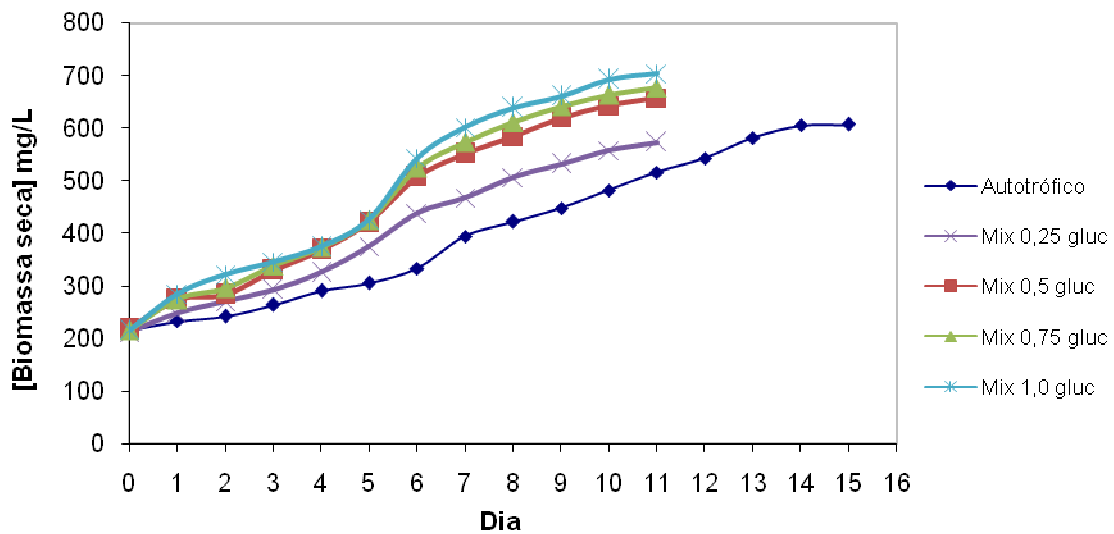


**Figura III.3** – Imagem de microscópio óptico (ampliação 100x) da estirpe de *Arthrospira platensis* cultivada em condições mixotróficas com adição de 4,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub>, ao fim de 2 dias.

Concluiu-se assim que, a adição de glucose em concentrações desta ordem de grandeza não era adequada para a realização do estudo pelo que se realizaram novos ensaios,

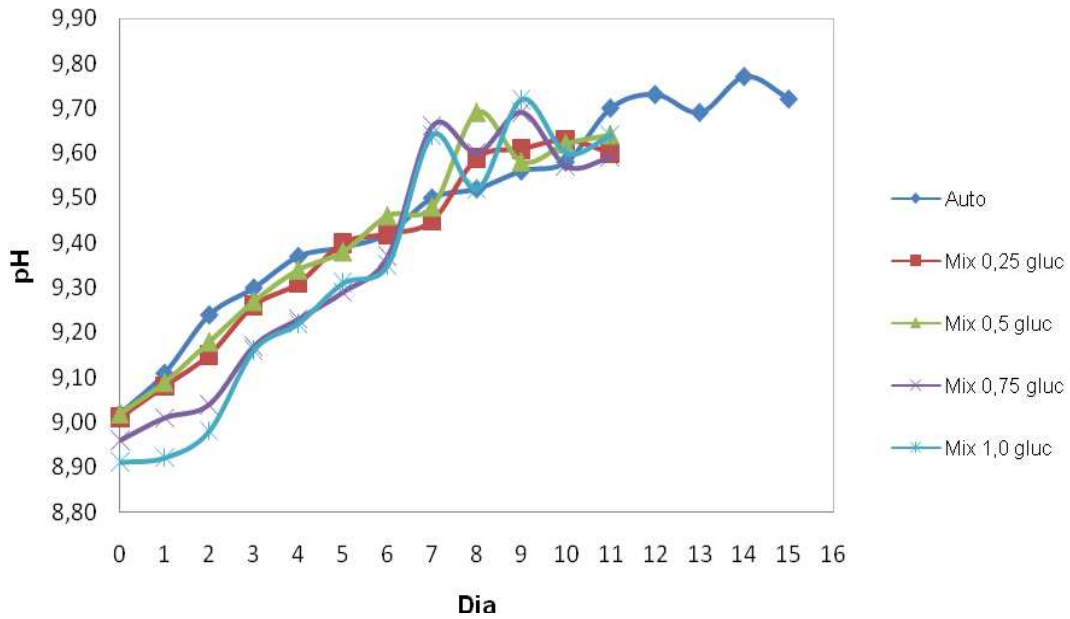
reduzindo a quantidade de glucose adicionada ao meio Zarrouk modificado desde um valor de  $0,25 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  até um valor máximo de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ .

Nas Figuras III.4 III.5 apresentam-se as curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo e curvas de pH vs dias de cultivo, respectivamente para os regimes de crescimento autotrófico (meio de cultura Zarrouk modificado padrão) e mixotrófico. O crescimento em regime mixotrófico foi efectuado com meio de cultura Zarrouk modificado ao qual foi adicionado uma fonte de carbono (glucose). Como referido anteriormente, as concentrações de glucose em estudo variaram entre  $0,25 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ .



**Figura III.4** – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia.

Nesta figura é evidente que a adição de glucose ao meio potencia o crescimento da microalga *Arthrospira platensis*. Pela análise dos resultados apresentados na Tabela III.1 e na Figura III.11, foi seleccionada como cultura base para os ensaios seguintes (variação de azoto e de salinidade) a “mix 1,0 gluc”, por ser a que apresenta um conjunto de valores de produtividade máxima [ $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L}.\text{dia}$ ] mais elevados.



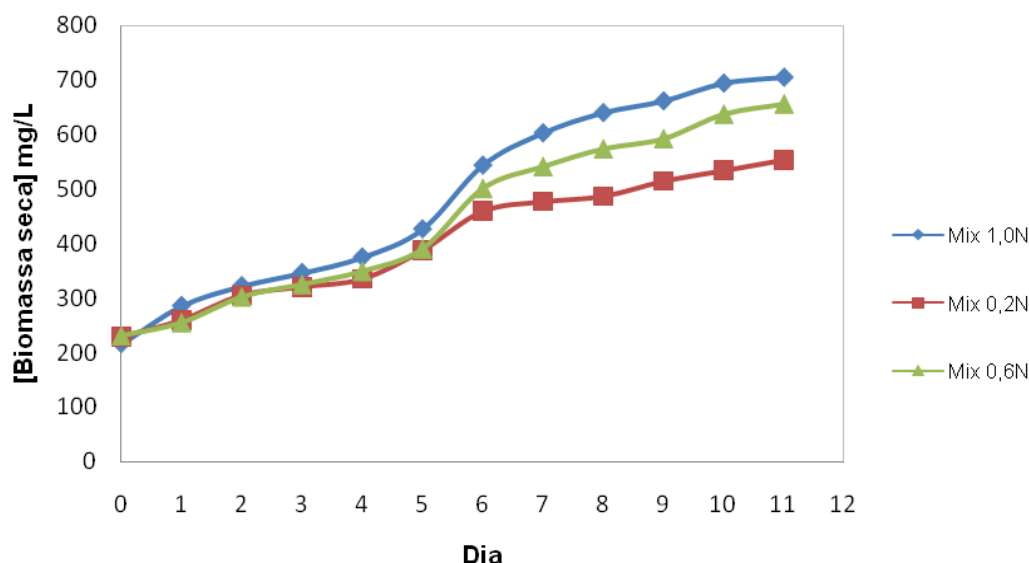
**Figura III.5 – Curvas de pH vs Dia.**

Nesta figura pode-se observar que a adição de glucose ao meio afecta a variação de pH do meio de cultura da microalga *Arthrospira platensis*. Para os ensaios “Mix 0,5 gluc”, “Mix 0,75 gluc” e “Mix 1,0 gluc” a variação do pH é mais pronunciada e oscilante a partir do sexto dia de cultivo, comparativamente com os restantes ensaios.

### III.2.2. Três culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L com subtracção de azoto ao meio de cultura

Os ensaios realizados com subtracção de azoto foram designados pela variação da percentagem de azoto adicionado ao meio de cultura relativamente à quantidade de azoto do meio Zarrouk modificado padrão. Como exemplo, tem-se que o ensaio com 60% de azoto (designado como “mix 0,6N”) teve como adição apenas 60% da massa de NaNO<sub>3</sub> do meio padrão (Tabela II.3), cujo valor corresponde a 1,5 g<sub>NaNO<sub>3</sub></sub>/L<sub>meio</sub>.

Na Figura III.6 apresenta-se as curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo e na figura III.8 as correspondentes curvas de pH vs dias de cultivo, para este conjunto de ensaios. O crescimento foi efectuado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado e adição de 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub>. Em duas culturas foi feita a subtracção da fonte de azoto (NaNO<sub>3</sub>) em percentagens de 40% (0,6N) e 80% (0,2N).



**Figura III.6** – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0  $g_{gluc}/L_{meio}$  e diferentes reduções de azoto.

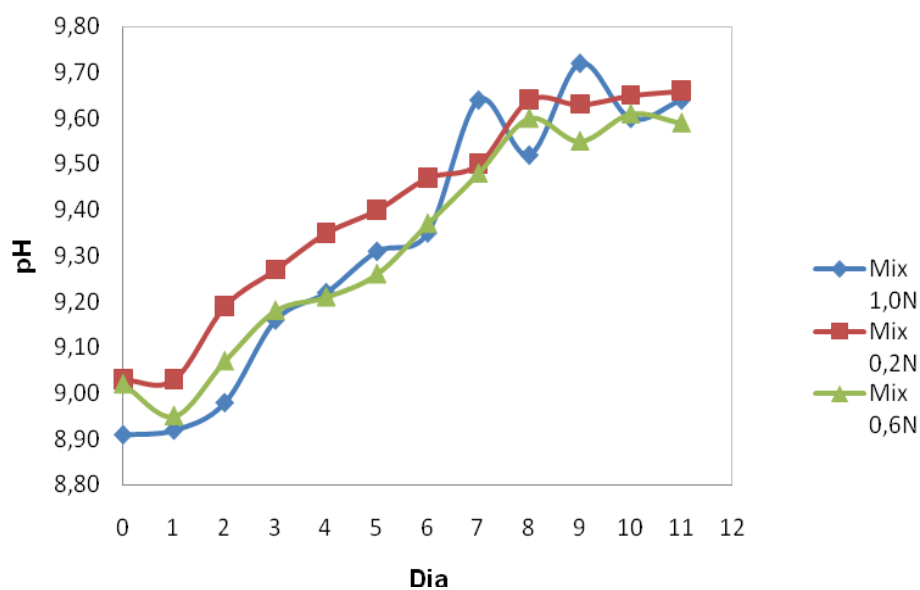
Analisando esta figura conclui-se que a remoção de azoto ao meio faz diminuir a concentração de biomassa da microalga *Arthrospira platensis*, diminuição essa que é mais significativa a partir do sexto dia de cultivo.

Os valores de produtividade de biomassa seca [ $mg_{seca}/L.dia$ ] correspondentes aos ensaios com redução de fonte de azoto foram todos inferiores ao valor do ensaio “mix 1,0 gluc” (padrão para este conjunto de ensaios). As diferenças percentuais relativas a este ensaio foram de -5,2% e -38,5%, para os ensaios “mix 0,6N” e “mix 0,2N”, respectivamente. O decréscimo da concentração de azoto no meio de cultura inicial reduz o valor de produtividade máxima de biomassa seca de *Arthrospira platensis*. Estes resultados eram os esperados, já que o azoto é um dos macronutrientes no cultivo de microalgas, reconhecido como capaz de aumentar a produtividade em biomassa.

Antes da colheita, a cultura com 20% de azoto tinha a tonalidade verde azulada menos intensa que a cultura com 60% de azoto (Figura III.7), indicadora de uma menor concentração de biomassa algal.



**Figura III.7** – Culturas de *Arthrospira platensis* em regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  com subtração de azoto ( $0,6\text{N}$  à esquerda;  $0,2\text{N}$  à direita).



**Figura III.8** – Curvas de pH vs Dia, regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e diferentes reduções de azoto.

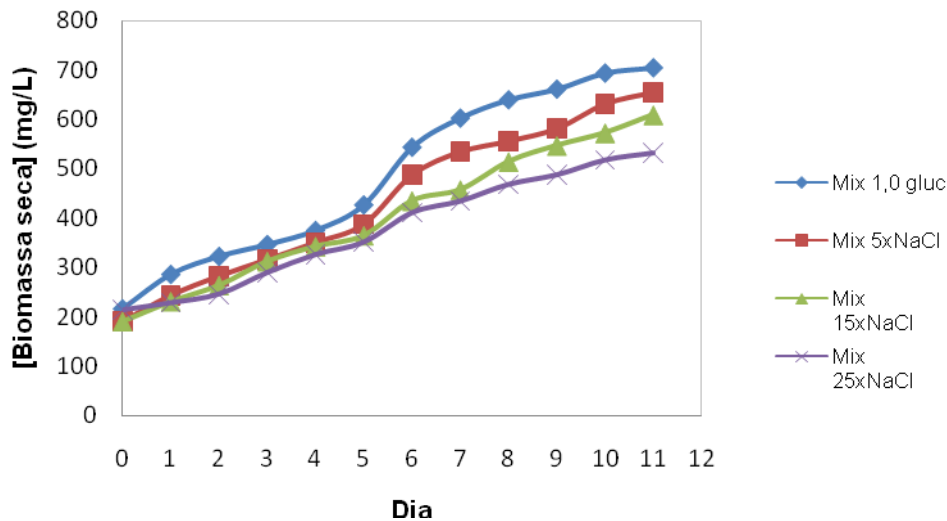
Na figura III.8 verifica-se que a remoção de azoto ao meio, por inibir o crescimento da microalga *Arthrospira platensis*, permite um maior controlo do pH, o que é confirmado pela variação das curvas de pH vs Dia menos pronunciadas.

A variação de pH foi quase sempre crescente ao longo do tempo de cultivo, sendo as variações e oscilações mais acentuadas quanto maior a concentração de azoto presente no meio de cultura (Figura III.8).

### III.2.3. Quatro culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 $\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura

A adição de cloreto de sódio ao meio de cultura em percentagens superiores ao meio padrão Zarrouk modificado foi efectuada como fonte de *stress*, no cultivo de *Arthrospira platensis* (microalga de água doce). Em três culturas foi feita a adição de cloreto de sódio em percentagens de 500%, 1.500% e 2.500% (5x, 15 e 25x mais NaCl em massa, respectivamente, do que o presente no meio de cultura Zarrouk modificado padrão).

Na figura III.9 apresentam-se as curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo e na figura e III.10 as correspondentes curvas de pH vs dias de cultivo. O crescimento foi efectuado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado e adição de 1,0  $\text{g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ .

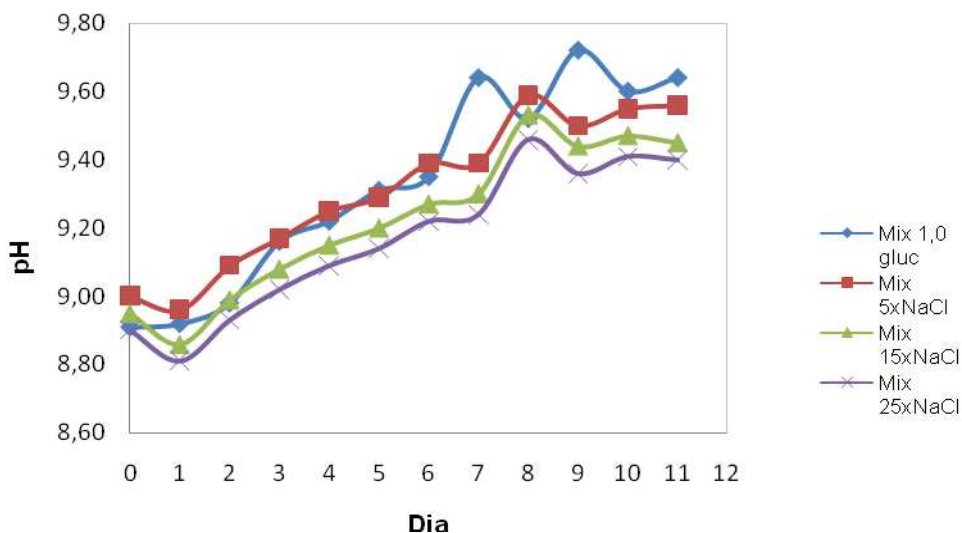


**Figura III.9** – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia, regime mixotrófico com adição de 1,0  $\text{g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e diferentes adições de NaCl.

Na figura III.9 observa-se que o aumento da concentração salina no meio de cultura provoca uma redução na velocidade de crescimento com a consequente diminuição da concentração de biomassa de *Arthrospira platensis* a partir do segundo dia de cultivo.

Os ensaios com majoração de NaCl foram os de adição de 500%, 1500% e 2500% de NaCl relativamente ao meio Zarrouk modificado padrão; nestes ensaios verificou-se um decréscimo na produtividade máxima de biomassa seca relativamente ao ensaio padrão “mix 1,0 gluc”, de -14,8%, -39,8% e -48,6%, respectivamente.

A adição de 500%, 1500% e 2500% de NaCl na preparação do meio de cultura corresponde a  $5 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}_{\text{meio}}$ ,  $15 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e  $25 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}_{\text{meio}}$ . Estas quantidades de cloreto de sódio presentes nos meios correspondem em termos de salinidade aproximadamente a um meio “pouco” salobro, salobro e salgado, quando comparados com uma água salgada (meio de oceano), cuja concentração salina é de  $30 \pm 5 \text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}_{\text{meio}}$ .



**Figura III.10** – Curvas de pH vs Dia, regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e diferentes reduções de azoto.

A variação de pH ao longo do período de cultivo é semelhante à observada nos ensaios representados na figura III.8, mas as variações são mais oscilantes ao longo do ensaio com  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e com adição padrão de NaCl (“Mix 1,0 gluc”).

Conclui-se que a microalga *Arthrospira platensis* se adapta ao crescimento nos meios salgados ensaiados, pela razão de não ter ocorrido a morte de nenhuma cultura nem o aparecimento de odor a matéria orgânica putrefacta (como foi constatado no caso de adição

de  $4\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  – indicado em III.2.1).

O valor de produtividade máxima da *Arthrospira platensis* decresce à medida que a concentração de cloreto de sódio introduzida aumenta; o valor de produtividade mássica máxima no meio de cultura com uma concentração de cloreto de sódio aproximada à concentração verificada nos oceanos, foi de  $60,00\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ , e corresponde a cerca de metade do valor da produtividade máxima no cultivo em meio Zarrouk modificado padrão com adição de  $1\text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ , de  $116,79\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$  (Tabela III.1).

### III.2.4 Determinação das produtividades máximas para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.

Observa-se na Figura III.4 e nos resultados apresentados no Anexo 6, nas Tabelas A5.1 a A5.9, que nos regimes de cultivo mixotrófico a fase exponencial ocorre entre o dia 4 e o dia 7 do período de cultivo. Para o regime autotrófico a fase exponencial ocorreu entre os dias 5 e 8 de cultivo.

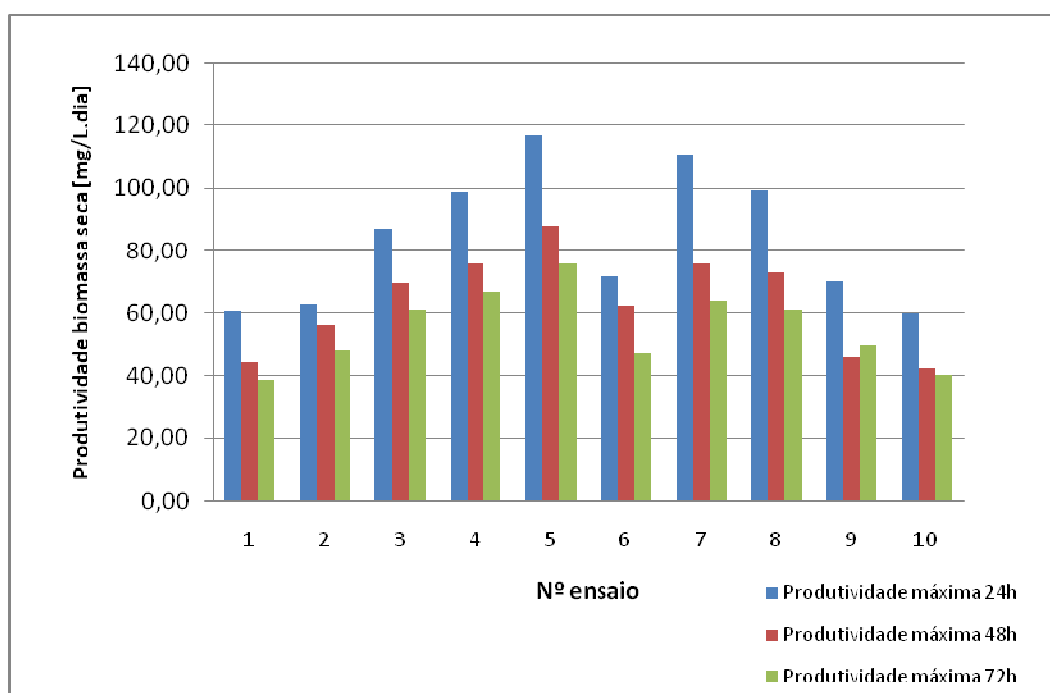
Os valores de produtividade máxima e média são apresentados na Tabela III.1 e na Figura III.11 (ver também Anexo 5 – Determinação das produtividades máxima e média)

Para o regime de crescimento autotrófico a produtividade máxima em 24 h foi obtida do dia 6 ao dia 7, sendo o valor máximo correspondente de  $60,95\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ . A produtividade máxima para períodos de cultura de 48 h e 72 h ocorreu entre os dias 5 e 7 e os dias 5 e 8, respectivamente. Os valores de produtividade obtidos na ordem referida foram de  $44,76\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$  e de  $39,13\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ .

Os valores mais elevados de produtividade de biomassa seca, para os restantes ensaios verificaram-se durante o período de 24 h do dia 5 ao dia 6. Os ensaios com maiores produtividades máximas foram os “mix 1,0 gluc” e “mix 0,6N”, cujos valores corresponderam a  $116,79$  e  $110,71\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ , respectivamente. Os valores inferiores de produtividade máxima corresponderam ao cultivo autotrófico e com adição de 2.500% de NaCl, sendo de  $60,95$  e  $60,00\text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ , respectivamente. Estes dois resultados são próximos e são indicativos de que a adição de  $1,0\text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  compensa a indução de *stress* salino por aplicação de  $25\text{ g}_{\text{NaCl}}/\text{L}_{\text{meio}}$  relativamente ao cultivo autotrófico em culturas da estirpe de *Arthrospira platensis* estudada.

**Tabela III.1** – Produtividade máxima de biomassa seca para 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Nº ensaio	Ensaio <i>Arthrospira platensis</i>	Produtividade média máxima [mg <sub>secas</sub> /L.dia]		
		24h	48h	72h
1	Regime Autotrófico	60,95	44,76	39,13
2	Regime Mixotrófico 0,25 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	62,98	56,31	48,25
3	Regime Mixotrófico 0,50 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	87,26	69,70	61,11
4	Regime Mixotrófico 0,75 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	99,17	75,71	66,83
5	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	116,79	87,98	75,83
6	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 20%N de Zarrouk,mod./L <sub>meio</sub>	71,79	62,38	47,46
7	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 60%N de Zarrouk,mod./L <sub>meio</sub>	110,71	76,01	64,09
8	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 500%NaCl de Zarrouk,mod./L <sub>meio</sub>	99,52	73,15	61,23
9	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 1500%NaCl de Zarrouk,mod./L <sub>meio</sub>	70,36	46,37	49,84
10	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 2500%NaCl de Zarrouk,mod./L <sub>meio</sub>	60,00	42,68	40,67

**Figura III.11** – Produtividade máxima para os ensaios constantes na Tabela III.1.

A produtividade mássica máxima para o ensaio “Mix 1,0 gluc” e em períodos de 48 h e 72 h foram de 87,98 mg<sub>secas</sub>/L.dia e 75,83 mg<sub>secas</sub>/L.dia, respectivamente. Estes valores representam uma diferença percentual relativa ao ensaio “mix 0,6N” e para os mesmos períodos de -13,6% e -15,5%. Estas diferenças são próximas e destacam-se da diferença relativa à produtividade máxima em 24 h de -5,2%. Este facto pode ser representativo da maior facilidade de controlo na produção da estirpe em sistemas semicontínuos ou contínuos em condições de cultivo em meio Zarrouk modificado com adição de 1 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> e sem subtração de azoto.

Pela estabilidade de resultados de produtividade máxima relativos ao ensaio “Mix 1,0 gluc” nos diversos períodos da fase exponencial de crescimento (24 h, 48 h e 72 h) escolheu-se o valor de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> como constante nos ensaios seguintes, de estudo da influência da limitação de azoto no meio de cultura e da adição majorada de NaCl em comparação com o meio Zarrouk modificado padrão.

### III.3. Quantificação de óleos por gravimetria

Após a etapa de extracção de óleo, foi feita a sua quantificação gravimétrica, de acordo com o procedimento descrito anteriormente em II.5. Os resultados obtidos são os apresentados na Tabela III.2 e Figuras III.12 e III.13.

**Tabela III.2** – Produtividade lipídica para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.

Nº ensaio	Ensaio <i>Arthrospira platensis</i>	Teor lipídico (%)	Produtividade lipídica média máxima [mg <sub>secas</sub> /L.dia]		
			24h	48h	72h
1	Regime Autotrófico	7,06	4,31	3,16	2,76
2	Regime Mixotrófico 0,25 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	7,15	4,51	4,03	3,45
3	Regime Mixotrófico 0,50 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	7,74	6,76	5,40	4,73
4	Regime Mixotrófico 0,75 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	8,53	8,45	6,45	5,70
5	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub>	9,72	11,35	8,55	7,37
6	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 20%N de Zarrouk, mod./L <sub>meio</sub>	15,06	10,81	9,40	7,15
7	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 60%N de Zarrouk, mod./L <sub>meio</sub>	11,95	13,23	9,09	7,66
8	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 500%NaCl de Zarrouk, mod./L <sub>meio</sub>	10,92	10,87	7,99	6,69
9	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 1500%NaCl de Zarrouk, mod./L <sub>meio</sub>	12,44	8,75	5,77	6,20
10	Regime Mixotrófico 1,0 g <sub>gluc</sub> /L <sub>meio</sub> ; 2500%NaCl de Zarrouk, mod./L <sub>meio</sub>	15,45	9,27	6,59	6,28

O valor de teor lipídico em regime autotrófico relativo a biomassa seca foi de 7,06% (m/m) e está de acordo com o valor referido na Tabela I.4 (Becker, 2004). Dos ensaios realizados em regime mixotrófico, os que proporcionaram um teor lipídico superior foram os realizados com adição de 0,75 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub> e 1,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub>, cujo teor de lípidos relativo à biomassa seca foi de 8,53 e 9,72% (m/m), respectivamente. Note-se que a máxima adição de glucose efectuada ao meio não fez aumentar significativamente o teor lipídico (aumentou aproximadamente 2,7%).

Para os ensaios realizados em regime mixotrófico, com adição de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L<sub>meio</sub>, respectivamente, e com redução da concentração de azoto e aumento da concentração de

NaCl no meio, os teores lipídicos máximos foram obtidos para uma redução em 80% de NaNO<sub>3</sub> (0,2N) e para um aumento da concentração de NaCl em 2.500%, sendo de 15,06% e 15,45%, respectivamente. Este aumento já é significativo relativamente ao regime autotrófico e representa um acréscimo percentual em teor lipídico de aproximadamente 8% para ambos, isto é, o teor lipídico mais do que duplica.

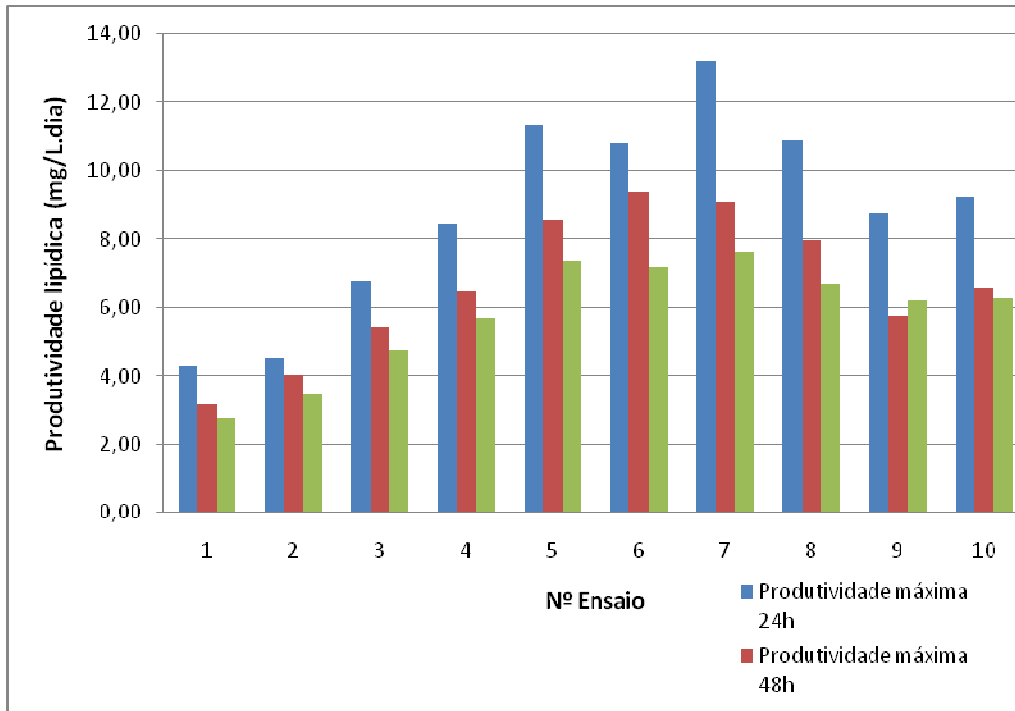


Figura III.12 – Produtividade lipídica para os ensaios constantes na Tabela III.2.

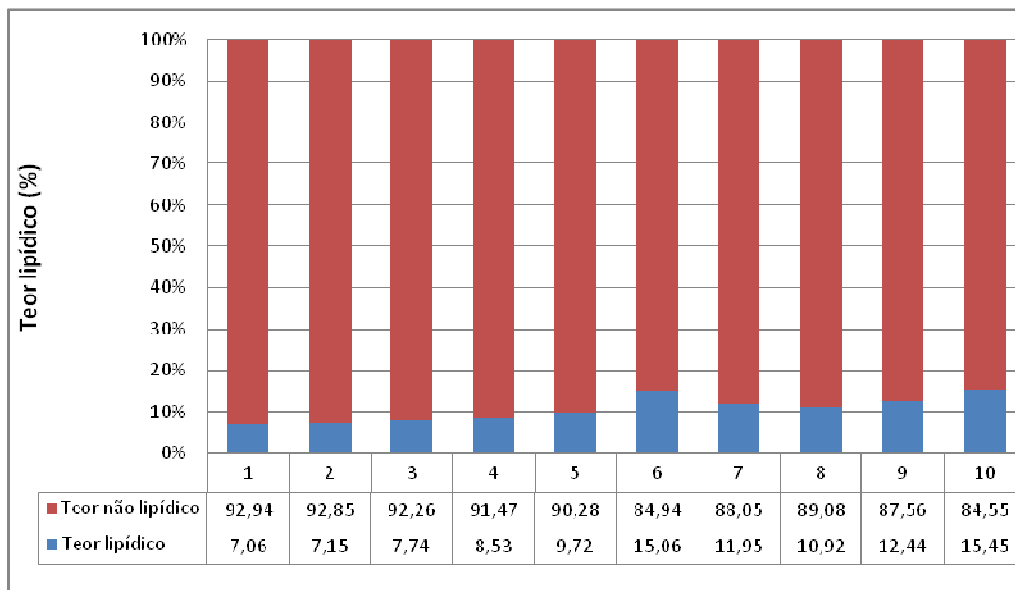


Figura III.13 – Fracções lipídicas e não lipídicas da biomassa algal, para a biomassa algal obtida nos ensaios constantes na Tabela III.2.

A produtividade máxima lipídica foi calculada por multiplicação do teor lipídico pela produtividade máxima de biomassa seca.

De acordo com os resultados obtidos, a produtividade máxima lipídica foi obtida nos ensaios de cultivo em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ , sem alteração da concentração de azoto e com redução em 40% de fonte de azoto ( $\text{NaNO}_3$ ), sendo de 11,35 e 13,23  $\text{mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$ , respectivamente.

O valor da produtividade lipídica máxima obtida neste estudo, foi obtido no ensaio de cultivo em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e redução em 40% de  $\text{NaNO}_3$  ao meio inicial e foi cerca de três vezes superior, quando comparado com o valor obtido para cultivo em regime autotrófico, de 4,31  $\text{mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$ .

A redução de fonte de azoto no meio tem como consequência a redução do teor proteico, uma vez que o azoto é um nutriente essencial na síntese das proteínas. Esta redução traduz-se parcialmente num aumento do teor lipídico em 5 e 8%, respectivamente, para os ensaios “Mix 0,6N” e “Mix 0,2N”, relativamente ao ensaio padrão em regime autotrófico.

No que diz respeito ao aumento da salinidade do meio, a *Arthrospira platensis* acumula, no interior das células, mais energia que é necessária para expelir o excesso de iões sódio que poderá ser tóxico. Para estes ensaios, o aumento da energia acumulada traduziu-se também num aumento do teor lipídico em 4%, 5,5% e 8,5% para os ensaios “Mix 5xNaCl”, “Mix 15xNaCl” e “Mix 25xNaCl”, relativamente ao ensaio padrão em regime autotrófico.

## IV. Conclusões

Foi efectuado o estudo do crescimento de cinco estirpes de microalgas de água doce (*Arthrospira platensis*, *Porphyridium aeruginum*, *Schizomeris leibleinii*, *Haematococcus pluvialis* e *Botryococcus brauni*), em regime autotrófico, usando os meios de cultura mais indicados – Zarrouk modificado para a primeira e BBM 3N para as restantes). Concluiu-se que, deste conjunto, a estirpe que apresenta uma maior taxa de crescimento no regime de cultivo autotrófico é a *Arthrospira platensis*, UTex LB2340, pelo que todo o restante estudo de influência das condições de cultivo (regime autotrófico ou mixotrófico, com redução de fonte de azoto –  $\text{NaNO}_3$  – ou indução de *stress* salino – por adição de NaCl) na produtividade mássica e na produtividade lipídica foi efectuado sobre esta estirpe.

Face aos resultados obtidos e à análise efectuada, considera-se que o ensaio em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  em conjugação com redução do teor de azoto em 40%, é o mais adequado para produção de biomassa da estirpe de *Arthrospira platensis* UTex LB2340 em estudo, com vista à maximização da produtividade lipídica, permitindo obter uma produtividade lipídica máxima de  $13,23 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ .

No entanto, no ensaio em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e com subtração de azoto em 80% obteve-se um valor de produtividade máxima em 48 h de  $9,40 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ , valor esse que foi o maior em todos os ensaios para este período.

No que diz respeito aos ensaios efectuados com indução de *stress* salino, o ensaio com incremento em 2.500% da concentração de NaCl proporcionou um aumento do teor lipídico para cerca de 15,45%, mas com produtividade de biomassa de  $60,00 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ . Para este ensaio, mesmo assim a produtividade lipídica máxima para um período de 24 h foi de  $9,27 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ , sendo mais de duas vezes a obtida em condições de cultivo autotrófico, de  $4,31 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ . Neste caso considera-se que se o *stress* tivesse sido aplicado no início da fase estacionária poderia ter facultado uma produtividade lipídica superior, já que o crescimento na fase exponencial é favorecido em condições de regime mixotrófico de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e para uma taxa de redução de azoto de 40%. No entanto, tal deveria ser comprovado a partir da realização de ensaios suplementares.

Em termos de produtividade de biomassa seca o ensaio realizado em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e sem alteração na concentração de azoto é o mais apropriado para facilmente controlar a produção em sistemas semicontínuo e contínuo, devido ao facto de, nestas condições, os valores de produtividade serem superiores a todos

os obtidos nos restantes ensaios para os três períodos de tempo definidos (24 h, 48 h e 72 h) – é cerca de duas vezes o valor da produtividade mássica obtida em regime autotrófico.

Considerando um fotobioreactor com um volume total de cultivo equivalente ao volume de uma piscina de 1 ha e 15 cm de profundidade ( $V = 1.500 \text{ m}^3$ ) tem-se que o valor de produtividade lipídica máxima de  $13,23 \text{ mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$  corresponde a uma produtividade máxima de cerca de 8.050 L/ha.ano. Este valor é de cerca de 7 e 10 vezes superior quando comparado com a produtividade de óleo em monoculturas de colza e girassol (Tabela I.1).

Esta produtividade é muito atractiva quando comparada com a produtividade de uma oleaginosa vegetal convencional, tanto mais que a *Arthrospira platensis* não é uma estirpe reconhecida como excepcionalmente interessante para a produção de óleos como matéria-prima na indústria de biodiesel.

Um outro aspecto vantajoso nestas condições de cultivo será a redução de custos na produção pela diminuição de fonte de azoto a fornecer ao meio de cultura, já que o ensaio com maior produtividade lipídica foi o realizado com redução em 40% de  $\text{NaNO}_3$ .

O cultivo de microalgas em regime mixotrófico poderá ter interesse quando a fonte de carbono suplementar for por exemplo uma água residual rica em carbono utilizável pelas microalgas. Poderão para o efeito ser usadas águas residuais de processamento de vinhos e outras bebidas como a cerveja, indústrias de lacticínios e outras. No entanto, estes meios apenas poderão ser considerados como adequados após testes.

O estudo do efeito da aplicação de *stress* salino sobre microalgas de água salgada foi realizado por diversos autores (exemplo Takagi *et al.*, 2006; Mishra e Jha, 2009). A vertente mais inovadora do presente estudo consistiu na conjugação de cultivo mixotrófico e na aplicação de *stress* salino numa microalga de água doce para aumentar o teor lipídico. Conclui-se que esta se comporta de modo análogo às de água salgada, isto é, quanto maior a concentração salina (até um valor máximo de 2.500% de NaCl – 25x concentração de NaCl no meio Zarrouk modificado, para a *Arthrospira platensis*) maior será o teor lipídico presente na biomassa algal.

## V. Sugestões para trabalhos futuros

A análise dos resultados obtidos após a realização deste trabalho, permite sugerir que, em trabalhos futuros sejam efectuadas as seguintes alterações:

**1)** Nas mesmas condições mencionadas em II.1., isto é, mantendo-se os mesmos parâmetros físicos constantes produzir biomassa algal nas condições que majoram a produtividade máxima lipídica:

Cultivo em regime mixotrófico de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  em conjugação com redução do teor de azoto em 40% e indução de *stress* salino aplicado apenas no início da fase estacionária, para diferentes concentrações de NaCl.

**2)** Avaliar o efeito da variação da temperatura no cultivo da *Arthrospira platensis* nas condições mencionadas em 1).

**3)** Realização do mesmo estudo, mas fazendo variar a fonte de luz, ou seja, substituindo a exposição a lâmpadas luz dia por exposição apenas à luz solar, que é uma luz mais completa. Os restantes parâmetros físicos mencionados em II.1. deveriam ser mantidos constantes uma vez que se encontram dentro de gamas óptimas de trabalho.

**4)** Realização do mesmo estudo, substituindo os reagentes p.a. por fontes nutricionais residuais (como por exemplo as águas residuais provenientes da indústria alimentar)

**5)** Realização de um estudo idêntico com outras espécies / estirpes de microalgas.

**6)** Realização de um estudo similar de cultivo de *Arthrospira platensis* em que o *stress* é provocado por adição majorada de ferro e outros micronutrientes ao meio de cultura.

**7)** Realização de ensaios de cultivo em regime mixotrófico com adição de glucose entre 1,0 e  $4,0 \text{ g}/\text{L}_{\text{meio}}$ , de modo a determinar o limite de aceitabilidade da espécie/estirpe ao cultivo em regime mixotrófico e nas condições de parâmetros físicos constantes mencionados em II.1.

**8)** Avaliar a qualidade do biodiesel produzido a partir dos lípidos extraídos.

**9)** A partir da conjugação das fontes nutricionais e de *stress* que majoram a produtividade máxima lipídica (cultivo em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$  em conjugação com redução de teor de azoto em 40% e indução de *stress* salino de 2500% (25x) da

concentração de NaCl, aplicado no início da fase estacionária) proceder ao *scale-up* deste estudo, ou seja, implementação deste estudo à escala piloto.

## VI. Referências bibliográficas

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C., 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Servicio de Publicacions, Universidade da Coruna. 210p.
- Abalde, J., Porta, F., Gabeiras, M., Fabregas, J., 1987. *Potencial de utilizacion de la microalga marina Dunaliella tertiolecta como fuente de vitaminas A, C y E*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 505-510.
- Abdin el Sherif, S.A., Clément, G., 1982. "Spirulina sp. Food algae: discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republica of Egypt". *Revue d'Institut Français du Petrole et Annales des Combustibles Liquides*, v.37, p.123-130.
- Balboa, B., Abalde, J., Herrero, C., Fabregas, J., 1987. *Utilizacion de nutrientes comerciales Algal-1 en cultivos estaticos y masivos de las microalgas marinas Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 517-520.
- Barclay, W.R., Meager, K.M., Abril, J.R., 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 6: 123-129.
- Becker, W., 1981. Algae mass cultivation – production and utilization. *Process Biochemistry*, 16 (5): 10-14.
- Becker, W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. Em: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science, 566p.
- Becker, W., Venkataraman, L.V., 1994. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. *Biomass*, 4: 105-125.
- Behrenfeld MJ, Randerson JT, McClain CR, Feldman GC, Los SO, 2001. Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science*, 291: 2594–97.
- Belay, A., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 235-240.
- Beneman, J. R., 1990. Microalgae products and production: an overview. *Journal of Industrial Microbiology*, 31 (5): 247-256.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8): 911-917.
- Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393-401.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H., 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource*

*Technology.*

- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1): 21-34.
- COM, 2006. 34 final. *An EU Strategy for Biofuels*. Commission of the European Communities, Brussels.
- Cornet, J.F., Dussap, C.G., Gros, J.B., 1998. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59: 155-223.
- Demirbas, A., 2009. Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 31:2, 163-168.
- Dewulf, J., Van Langenhove, H., 2006. *Renewables-Based Technology: Sustainability Assessment*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Esteves, F.A., 1988. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 575p.
- European Environmental Agency (EEA), 2004. *Greenhouse gas emission trends and projections in Europe 2004: Progress by the EU and its Member States towards achieving their Kyoto Protocol targets*, Report N°5, Copenhagen, Denmark.
- European Environmental Agency (EEA), 2007. *Greenhouse gas emission trends and projections in Europe 2007: Tracking progress towards Kyoto targets*, European Environmental Agency (EEA) Report N°5, Copenhagen, Denmark.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1990. *Aquatic photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science, 375p.
- Fogg, G.E., 1975. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Second Edition. The University of Wisconsin Press, 108p.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Gilbert, R., Perl, A., 2008. *Transport Revolutions: Moving People and Freight without Oil*. Earthscan.
- Grima, E.M., E.-H. Belarbi, E.H., Fernández, F.G., Medina A.R., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20: 491-515.
- Grobbelaar, J.U., 2004. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, 70: 140-144.
- Guillard, R.L., 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Em: Smith, W., Chanley, M., (eds). *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press., 338p.

- Guimarães, J., Amaral, R., Santos, M.F., Santos, L.M.A., 2009. *Colheita, identificação e conservação de microalgas*. ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 88p.
- Henrikson, R., 1989. *Earth food Spirulina*. California: Ronore Enterprises. 180p.
- Herrero, C., Liaño, R., Abalde, J., Fabregas, J., (1987) (1). "Utilización de la microalga marina Tetraselmis suecica en nutrición animal". Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12, p.483-488.
- Herrero, C., Vecino, E., Cancelo, M.J., Fabregas, J., (1987) (2). *Composición en vitamina E de diferentes microalgas marinas utilizadas en acuicultura*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 495-498.
- International Energy Agency (IEA), 2007. *World Energy Outlook 2007. China and India Insights*, Paris, France.
- Laherrere, J., 2005. *Forecasting production from discovery*, ASPO, Lisbon May 19-20.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. *Manual on the production and use of life food for aquaculture*. FAO Fisc Tech. Pap, 361: 7-42.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, Fourth Edition, 547 pp.
- Lee, Y.K., Shen, H., 2004. Basic culturing techniques. Em: Richmond, A., (Ed.). *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, 566 pp..
- Mahasneh, I.A., 1997. Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella sp. (Chlorophyta)*. *Cytobios*, 90: 153-161.
- Miao, X., WU, Q., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110: 85-93.
- Mirón, A.S., García, M.C.C., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors, *Biochem. Eng. J.*, 16: 287-297.
- Mishra, A., Jha, B., 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2009.02.006
- Ogonna, J.C., Tanaka, H., 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (6): 558-564.
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20: 459-466.
- Ormerod, W.G., Freund, P., Smith, A., Davison J., 2002. *Ocean Storage of CO<sub>2</sub>*. IEA Greenhouse Gas R&D Programme, International Energy Agency, UK.

- Phang, S.M., Miah, M.S., Chu, W.L., Hashim, M., 2000. Spirulina culture in digest sago starch factory waste water. *J. Appl. Phycol.*, 12: 395-400.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems of phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 287-293.
- Raven, J.A., 1990. Sensing pH?. *Plant, Cell and Environment*, 13: 721-729.
- Rehm, H.J., Reed, G., 1995. *Enzymes, biomass, food and feed*. Biotechnology Multi Volume Comprehensive Treatise, 9: 170-215.
- Richmond, A., 1990. *CRC Handbook of microalgal mass culture*. Florida, CRC, 528p.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford, Blackwell Science, 566 pp.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R., 1993. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.*, 5: 327-332.
- Rigano, V.D.M., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S., Rigano, C., 1998. The physiological significance of light and dark  $\text{NH}_4^+$  metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, 47: 177-181.
- Stein, J.R., 1973. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University, 448p.
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (3): 223-226.
- Tokusoglu, Ö., Ünal, M.K., 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68 (4): 1144-48.
- Tomaselli, L., 2004. The microalgal cell. Em: Richmond, A., (ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford, Blackwell Science, 566 p.
- Vonshak, A., 1990. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. Em: Richmond, A., (ed). *CRC Handbook of microalgae mass culture*. Boca Raton: CRC, 117-145.
- Vonshak, A., 2002. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis e-Library, 233 pp.

## VII. Anexos

### Anexo 1. Calibração – bomba de ar

Uma bomba de ar (Pacific AP6), com duas saídas para difusão foi calibrada pelo método da bolha de sabão:

- i) Fixou-se, em posição invertida e vertical, uma pipeta graduada de 20,0 mL, a um suporte com garra;
- ii) colocou-se água com sabão no interior de uma mini-pompete e esta foi colocada no topo (que se encontra invertido) da pipeta graduada e ligada através de tubagem de silicone à bomba de ar;
- iii) bombeou-se a água com sabão ao longo da pipeta;
- iv) com recurso a um cronómetro (SILVA, 1/100 sec. Precision) registou-se o tempo que as bolhas de sabão demoram a percorrer 15 mL;
- v) o procedimento foi repetido para todas as posições da bomba de ar;
- vi) o procedimento de calibração foi efectuado para o conjunto das duas saídas de difusão de ar, pelo que o caudal debitado por cada saída será metade desse valor;
- vii) a aplicação de difusores (Rena) nas saídas de difusão da bomba de ar, diminui o caudal de ar na proporção inversa do nº de saídas de cada difusor (ex:  $Q_{1 \text{ saída}} = 0,48$  v.v.m. implica que cada saída de um difusor com quatro saídas debite um caudal de 0,12 v.v.m.).

Os resultados obtidos e a curva de calibração encontram-se na Tabela A1.1 e Figura A1.1, respectivamente.

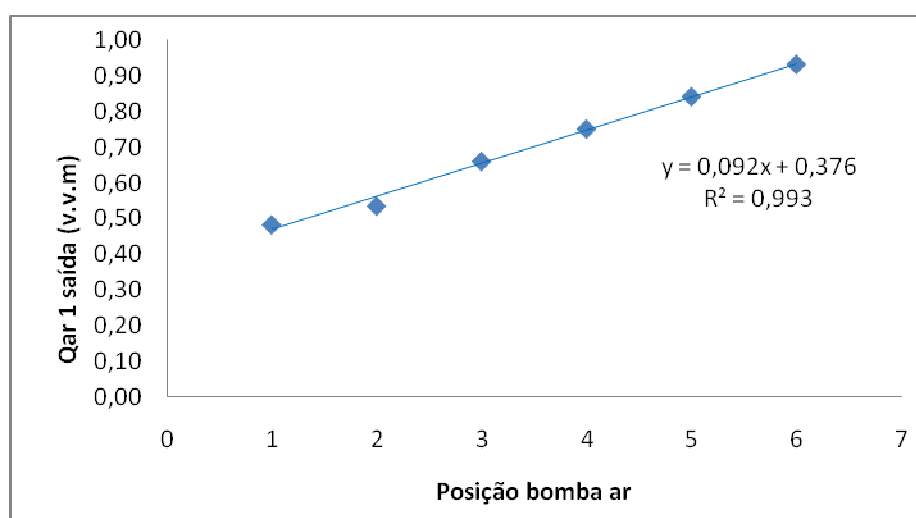
#### Exemplo de cálculo:

Para a posição 1 da bomba de ar  $Q_{ar} \text{ 1 saída} = 8 \text{ mL/s}$ :

$$\frac{V_{ar}}{V_{L.cultura}} = \frac{\frac{8 \text{ mL}}{s} \times \frac{L}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}}}{V_{L.cultura}} = \frac{0,48 L_{ar}}{L_{cultura} \cdot \text{min}} = 0,48 \text{ v.v.m.}$$

**Tabela A1.1** – Valores de  $Q_{ar}$  (v.v.m) obtidos na calibração da bomba de ar

Posição	volume (mL)	tempo (s)	$Q_{ar}$ total (mL/s)	$Q_{ar}$ 1 saída (mL/s)	$Q_{ar}$ 1 saída (v.v.m)
1	15,00	0,93	16	8,0	0,48
2	15,00	0,84	18	9,0	0,54
3	15,00	0,73	22	11	0,66
4	15,00	0,66	25	13	0,75
5	15,00	0,50	28	14	0,84
6	15,00	0,47	31	16	0,93
7	15,00	0,35	43	21	1,3

**Figura A1.1** – Curva de calibração da bomba de ar.

## Anexo 2. Calibração – Curvas de crescimento da *Arthrospira platensis*

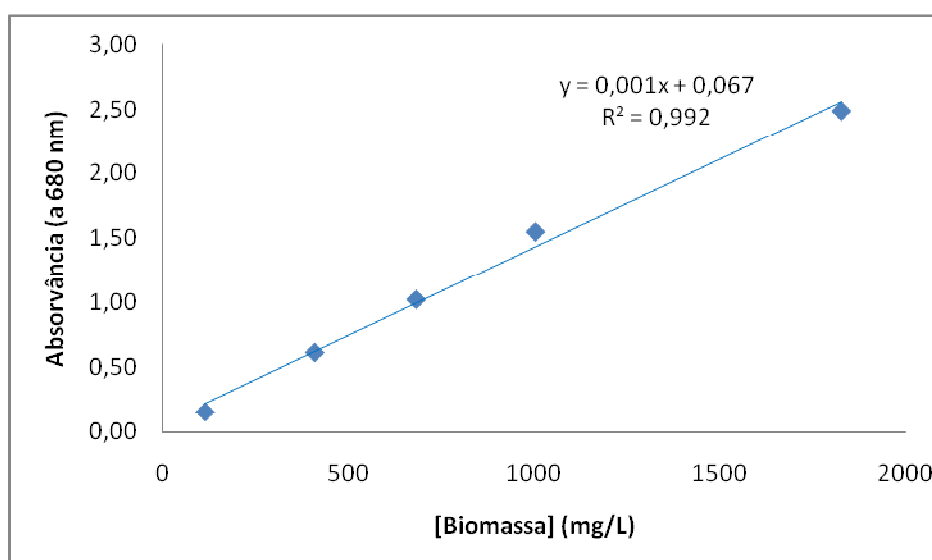
A curva de calibração – Abs vs [biomassa seca] (mg/L) – foi traçada a partir de padrões preparados com biomassa proveniente do cultivo no regime de crescimento autotrófico. Foi medida a absorvância a 680 nm, de acordo com o procedimento descrito em II.4.1. Metodologia para traçar a curva de calibração.

Os resultados obtidos e a curva de calibração encontram-se na Tabela A2.1.

**Tabela A2.1** – Valores de Absorvância obtidos para as oito concentrações padrão

Amostra	[Biomassa seca] mg/L	Abs (a 680 nm)
8	114,7	0,156
7	409,6	0,616
6	682,7	1,024
5	1004	1,55
4	1827,8	2,485
3	2688	com patamar a 680 nm
2	3360	
1	4200	

Com os valores de [Biomassa seca] mg/L e de Abs (a 680 nm) apresentados na tabela A2.1 traçou-se a curva de calibração apresentada na Figura A2.1; esta curva apresenta um valor de correlação ( $r^2$ ) = 0,9926, ou seja,  $r = 0,9963$ .



**Figura A2.1** – Curva de calibração do crescimento da *Arthrospira platensis*.

### Anexo 3. Avaliação do crescimento microalgal

A avaliação do crescimento microalgal para os três conjuntos de ensaios, em erlenmeyers de 1L, em que se fez variar as fontes nutricionais (aumento de Carbono e redução de Azoto) e as condições de stress (aumento da salinidade) foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em II.4.2.

#### Anexo 3.1. Cultura em regime autotrófico e quatro culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico (glucose)

Tabela A3.1 – Avaliação do crescimento em regime autotrófico

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,355	0,338	0,347	199,143	214,38	9,02
	2	0,377	0,378	0,378	221,286		
	3	0,393	0,366	0,380	222,714		
Dia 1	1	0,416	0,394	0,405	240,929	233,19	9,11
	2	0,385	0,392	0,389	229,143		
	3	0,382	0,396	0,389	229,500		
Dia 2	1	0,413	0,410	0,412	245,571	242,83	9,24
	2	0,417	0,397	0,407	242,357		
	3	0,401	0,408	0,405	240,571		
Dia 3	1	0,441	0,462	0,452	274,143	264,26	9,30
	2	0,404	0,411	0,408	242,714		
	3	0,453	0,455	0,454	275,929		
Dia 4	1	0,478	0,456	0,467	285,214	291,05	9,37
	2	0,489	0,481	0,485	298,071		
	3	0,519	0,428	0,474	289,857		
Dia 5	1	0,536	0,553	0,545	340,571	305,45	9,39
	2	0,498	0,480	0,489	300,929		
	3	0,448	0,457	0,453	274,857		
Dia 6	1	0,583	0,553	0,568	357,357	334,02	9,42
	2	0,539	0,542	0,541	337,714		
	3	0,504	0,491	0,498	307,000		
Dia 7	1	0,699	0,666	0,683	439,143	394,98	9,50
	2	0,608	0,614	0,611	388,071		
	3	0,575	0,562	0,569	357,714		
Dia 8	1	0,639	0,698	0,669	429,143	422,83	9,52
	2	0,648	0,657	0,653	417,714		
	3	0,677	0,639	0,658	421,643		
Dia 9	1	0,716	0,701	0,709	457,714	448,31	9,56
	2	0,683	0,700	0,692	445,571		
	3	0,693	0,679	0,686	441,643		
Dia 10	1	0,759	0,741	0,750	487,357	482,12	9,58
	2	0,732	0,742	0,737	478,071		
	3	0,733	0,749	0,741	480,929		

Dia 11	1	0,787	0,808	0,798	521,286	516,76	9,70
	2	0,792	0,780	0,786	513,071		
	3	0,799	0,781	0,790	515,929		
Dia 12	1	0,848	0,841	0,845	554,857	542,95	9,73
	2	0,779	0,825	0,802	524,500		
	3	0,841	0,833	0,837	549,500		
Dia 13	1	0,893	0,881	0,887	585,214	581,88	9,69
	2	0,871	0,881	0,876	577,357		
	3	0,883	0,885	0,884	583,071		
Dia 14	1	0,915	0,897	0,906	598,786	605,81	9,77
	2	0,919	0,929	0,924	611,643		
	3	0,922	0,913	0,918	607,000		
Dia 15	1	0,928	0,908	0,918	607,357	607,12	9,72
	2	0,917	0,916	0,917	606,286		
	3	0,926	0,911	0,919	607,714		

**Tabela A3.2** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,25 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub>

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,361	0,369	0,365	212,357	212,36	9,01
	2	0,396	0,401	0,399	236,286		
	3	0,355	0,362	0,359	207,714		
Dia 1	1	0,402	0,418	0,410	244,500	248,55	9,08
	2	0,419	0,421	0,420	251,643		
	3	0,411	0,423	0,417	249,500		
Dia 2	1	0,429	0,451	0,440	265,929	270,33	9,15
	2	0,452	0,463	0,458	278,429		
	3	0,438	0,444	0,441	266,643		
Dia 3	1	0,479	0,491	0,485	298,071	293,79	9,26
	2	0,483	0,480	0,482	295,571		
	3	0,466	0,475	0,471	287,714		
Dia 4	1	0,529	0,514	0,522	324,143	325,93	9,31
	2	0,511	0,525	0,518	321,643		
	3	0,537	0,528	0,533	332,000		
Dia 5	1	0,592	0,603	0,598	378,429	375,57	9,40
	2	0,589	0,592	0,591	373,429		
	3	0,601	0,584	0,593	374,857		
Dia 6	1	0,678	0,663	0,671	430,571	438,55	9,42
	2	0,692	0,683	0,688	442,714		
	3	0,679	0,695	0,687	442,357		
Dia 7	1	0,723	0,715	0,719	465,214	467,60	9,45
	2	0,718	0,723	0,721	466,286		
	3	0,730	0,725	0,728	471,286		
Dia 8	1	0,779	0,787	0,783	510,929	507,24	9,59
	2	0,768	0,779	0,774	504,143		
	3	0,781	0,773	0,777	506,643		
Dia 9	1	0,813	0,811	0,812	531,643	531,64	9,61
	2	0,824	0,801	0,813	532,000		
	3	0,819	0,804	0,812	531,286		
Dia 10	1	0,855	0,846	0,851	559,143	557,48	9,63
	2	0,857	0,844	0,851	559,143		
	3	0,846	0,841	0,844	554,143		
Dia 11	1	0,868	0,873	0,871	573,429	573,67	9,60
	2	0,870	0,864	0,867	570,929		
	3	0,877	0,873	0,875	576,643		

**Tabela A3.3** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,5 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub>

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,361	0,369	0,365	212,357	218,79	9,02
	2	0,396	0,401	0,399	236,286		
	3	0,355	0,362	0,359	207,714		
Dia 1	1	0,479	0,449	0,464	283,071	274,26	9,09
	2	0,423	0,435	0,429	258,071		
	3	0,472	0,452	0,462	281,643		
Dia 2	1	0,459	0,458	0,459	279,143	283,31	9,18
	2	0,476	0,440	0,458	278,786		
	3	0,482	0,471	0,477	292,000		
Dia 3	1	0,502	0,513	0,508	314,143	330,45	9,27
	2	0,532	0,530	0,531	330,929		
	3	0,560	0,545	0,553	346,286		
Dia 4	1	0,611	0,597	0,604	383,071	368,79	9,34
	2	0,567	0,531	0,549	343,786		
	3	0,602	0,596	0,599	379,500		
Dia 5	1	0,691	0,696	0,694	447,000	420,93	9,38
	2	0,642	0,637	0,640	408,429		
	3	0,631	0,645	0,638	407,357		
Dia 6	1	0,780	0,763	0,772	502,714	508,19	9,46
	2	0,784	0,792	0,788	514,500		
	3	0,774	0,782	0,778	507,357		
Dia 7	1	0,873	0,867	0,870	573,071	552,12	9,48
	2	0,772	0,765	0,769	500,571		
	3	0,874	0,893	0,884	582,714		
Dia 8	1	0,939	0,889	0,914	604,500	584,26	9,69
	2	0,835	0,813	0,824	540,214		
	3	0,911	0,927	0,919	608,071		
Dia 9	1	0,927	0,932	0,930	615,571	619,38	9,58
	2	0,924	0,941	0,933	617,714		
	3	0,938	0,947	0,943	624,857		
Dia 10	1	0,965	0,973	0,969	643,786	643,31	9,62
	2	0,961	0,969	0,965	640,929		
	3	0,972	0,970	0,971	645,214		
Dia 11	1	0,988	0,996	0,992	660,214	658,07	9,64
	2	0,995	0,978	0,987	656,286		
	3	0,994	0,983	0,989	657,714		

**Tabela A3.4** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,75 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub>

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,366	0,372	0,369	215,214	215,21	8,96
	2	0,358	0,364	0,361	209,500		
	3	0,371	0,373	0,372	217,357		
Dia 1	1	0,467	0,451	0,459	279,500	274,86	9,01
	2	0,433	0,447	0,440	265,929		
	3	0,458	0,459	0,459	279,143		
Dia 2	1	0,483	0,480	0,482	295,571	295,93	9,04
	2	0,491	0,472	0,482	295,571		
	3	0,478	0,488	0,483	296,643		
Dia 3	1	0,523	0,539	0,531	330,929	338,90	9,17
	2	0,548	0,541	0,545	340,571		
	3	0,552	0,550	0,551	345,214		
Dia 4	1	0,602	0,600	0,601	380,929	373,43	9,23
	2	0,593	0,588	0,591	373,429		
	3	0,579	0,581	0,580	365,929		
Dia 5	1	0,674	0,669	0,672	431,286	425,69	9,29
	2	0,655	0,664	0,660	422,714		
	3	0,658	0,662	0,660	423,071		
Dia 6	1	0,813	0,765	0,789	515,214	524,86	9,37
	2	0,808	0,809	0,809	529,143		
	3	0,807	0,813	0,810	530,214		
Dia 7	1	0,870	0,881	0,876	577,000	573,90	9,66
	2	0,853	0,874	0,864	568,429		
	3	0,867	0,882	0,875	576,286		
Dia 8	1	0,922	0,916	0,919	608,071	611,88	9,60
	2	0,918	0,927	0,923	610,571		
	3	0,929	0,934	0,932	617,000		
Dia 9	1	0,974	0,986	0,980	651,643	642,00	9,69
	2	0,957	0,965	0,961	638,071		
	3	0,953	0,964	0,959	636,286		
Dia 10	1	1,001	1,005	1,003	668,071	663,55	9,57
	2	0,990	0,989	0,990	658,429		
	3	0,992	1,003	0,998	664,143		
Dia 11	1	1,013	1,011	1,012	674,500	677,00	9,59
	2	1,027	1,012	1,020	679,857		
	3	1,007	1,023	1,015	676,643		

**Tabela A3.5** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub>

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,366	0,374	0,370	215,929	215,93	8,91
	2	0,369	0,361	0,365	212,357		
	3	0,382	0,373	0,378	221,286		
Dia 1	1	0,458	0,472	0,465	283,786	285,57	8,92
	2	0,472	0,469	0,471	287,714		
	3	0,463	0,471	0,467	285,214		
Dia 2	1	0,513	0,526	0,520	322,714	321,88	8,98
	2	0,519	0,508	0,514	318,429		
	3	0,517	0,527	0,522	324,500		
Dia 3	1	0,550	0,568	0,559	350,929	345,93	9,16
	2	0,546	0,556	0,551	345,214		
	3	0,540	0,552	0,546	341,643		
Dia 4	1	0,594	0,602	0,598	378,786	374,62	9,22
	2	0,597	0,591	0,594	375,929		
	3	0,580	0,589	0,585	369,143		
Dia 5	1	0,672	0,657	0,665	426,286	426,17	9,31
	2	0,654	0,663	0,659	422,000		
	3	0,675	0,665	0,670	430,214		
Dia 6	1	0,809	0,825	0,817	535,214	542,95	9,35
	2	0,817	0,819	0,818	535,929		
	3	0,847	0,850	0,849	557,714		
Dia 7	1	0,907	0,913	0,910	601,643	602,12	9,64
	2	0,912	0,919	0,916	605,571		
	3	0,909	0,904	0,907	599,143		
Dia 8	1	0,964	0,956	0,960	637,357	639,14	9,52
	2	0,953	0,969	0,961	638,071		
	3	0,972	0,961	0,967	642,000		
Dia 9	1	0,993	0,994	0,994	661,286	660,69	9,72
	2	0,987	1,003	0,995	662,357		
	3	0,984	0,995	0,990	658,429		
Dia 10	1	1,024	1,036	1,030	687,357	693,31	9,60
	2	1,037	1,044	1,041	694,857		
	3	1,032	1,057	1,045	697,714		
Dia 11	1	1,069	1,061	1,065	712,357	704,02	9,64
	2	1,055	1,048	1,052	702,714		
	3	1,048	1,039	1,044	697,000		

### Anexo 3.2. Três culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L com subtração de azoto ao meio de cultura

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados obtidos no estudo de crescimento de *Arthrospira platensis* em diferentes condições de cultivo em regime mixotrófico com redução da concentração de azoto no meio de cultura.

**Tabela A3.6** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> (igual à tabela A3.5)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,366	0,374	0,370	215,929	215,93	8,91
	2	0,369	0,361	0,365	212,357		
	3	0,382	0,373	0,378	221,286		
Dia 1	1	0,458	0,472	0,465	283,786	285,57	8,92
	2	0,472	0,469	0,471	287,714		
	3	0,463	0,471	0,467	285,214		
Dia 2	1	0,513	0,526	0,520	322,714	321,88	8,98
	2	0,519	0,508	0,514	318,429		
	3	0,517	0,527	0,522	324,500		
Dia 3	1	0,550	0,568	0,559	350,929	345,93	9,16
	2	0,546	0,556	0,551	345,214		
	3	0,540	0,552	0,546	341,643		
Dia 4	1	0,594	0,602	0,598	378,786	374,62	9,22
	2	0,597	0,591	0,594	375,929		
	3	0,580	0,589	0,585	369,143		
Dia 5	1	0,672	0,657	0,665	426,286	426,17	9,31
	2	0,654	0,663	0,659	422,000		
	3	0,675	0,665	0,670	430,214		
Dia 6	1	0,809	0,825	0,817	535,214	542,95	9,35
	2	0,817	0,819	0,818	535,929		
	3	0,847	0,850	0,849	557,714		
Dia 7	1	0,907	0,913	0,910	601,643	602,12	9,64
	2	0,912	0,919	0,916	605,571		
	3	0,909	0,904	0,907	599,143		
Dia 8	1	0,964	0,956	0,960	637,357	639,14	9,52
	2	0,953	0,969	0,961	638,071		
	3	0,972	0,961	0,967	642,000		
Dia 9	1	0,993	0,994	0,994	661,286	660,69	9,72
	2	0,987	1,003	0,995	662,357		
	3	0,984	0,995	0,990	658,429		
Dia 10	1	1,024	1,036	1,030	687,357	693,31	9,60
	2	1,037	1,044	1,041	694,857		
	3	1,032	1,057	1,045	697,714		
Dia 11	1	1,069	1,061	1,065	712,357	704,02	9,64
	2	1,055	1,048	1,052	702,714		
	3	1,048	1,039	1,044	697,000		

**Tabela A3.7** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto (NaNO<sub>3</sub>) em 40% (0,6N)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,385	0,399	0,392	231,643	231,64	9,02
	2	0,405	0,336	0,371	216,286		
	3	0,372	0,371	0,372	217,000		
Dia 1	1	0,433	0,439	0,436	263,071	255,69	8,95
	2	0,422	0,432	0,427	256,643		
	3	0,415	0,413	0,414	247,357		
Dia 2	1	0,487	0,491	0,489	300,929	302,95	9,07
	2	0,496	0,510	0,503	310,929		
	3	0,483	0,484	0,484	297,000		
Dia 3	1	0,528	0,533	0,531	330,571	325,69	9,18
	2	0,524	0,517	0,521	323,429		
	3	0,511	0,529	0,520	323,071		
Dia 4	1	0,541	0,539	0,540	337,357	349,86	9,21
	2	0,571	0,558	0,565	354,857		
	3	0,562	0,574	0,568	357,357		
Dia 5	1	0,627	0,614	0,621	394,857	391,17	9,26
	2	0,614	0,608	0,611	388,071		
	3	0,611	0,618	0,615	390,571		
Dia 6	1	0,764	0,760	0,762	495,929	501,88	9,37
	2	0,769	0,773	0,771	502,357		
	3	0,781	0,775	0,778	507,357		
Dia 7	1	0,824	0,814	0,819	536,643	542,12	9,48
	2	0,825	0,831	0,828	543,071		
	3	0,829	0,837	0,833	546,643		
Dia 8	1	0,864	0,866	0,865	569,500	574,50	9,60
	2	0,884	0,875	0,880	579,857		
	3	0,865	0,878	0,872	574,143		
Dia 9	1	0,894	0,890	0,892	588,786	593,07	9,55
	2	0,890	0,891	0,891	587,714		
	3	0,906	0,917	0,912	602,714		
Dia 10	1	0,971	0,959	0,965	640,929	638,07	9,61
	2	0,958	0,963	0,961	637,714		
	3	0,960	0,955	0,958	635,571		
Dia 11	1	0,991	1,011	1,001	666,643	656,76	9,59
	2	0,972	0,987	0,980	651,286		
	3	0,968	0,994	0,981	652,357		

**Tabela A3.8** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto (NaNO<sub>3</sub>) em 80% (0,2N)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,382	0,392	0,387	228,071	228,07	9,03
	2	0,346	0,340	0,343	196,643		
	3	0,368	0,370	0,369	215,214		
Dia 1	1	0,401	0,436	0,419	250,571	259,26	9,03
	2	0,461	0,443	0,452	274,500		
	3	0,414	0,429	0,422	252,714		
Dia 2	1	0,492	0,484	0,488	300,214	304,86	9,19
	2	0,505	0,493	0,499	308,071		
	3	0,487	0,506	0,497	306,286		
Dia 3	1	0,512	0,517	0,515	319,143	320,33	9,27
	2	0,503	0,525	0,514	318,786		
	3	0,518	0,522	0,520	323,071		
Dia 4	1	0,539	0,526	0,533	332,000	334,86	9,35
	2	0,536	0,557	0,547	342,000		
	3	0,543	0,518	0,531	330,571		
Dia 5	1	0,637	0,642	0,640	408,429	387,83	9,40
	2	0,587	0,592	0,590	372,714		
	3	0,592	0,614	0,603	382,357		
Dia 6	1	0,707	0,672	0,690	444,143	459,62	9,47
	2	0,738	0,712	0,725	469,500		
	3	0,711	0,727	0,719	465,214		
Dia 7	1	0,728	0,725	0,727	470,571	477,24	9,50
	2	0,749	0,747	0,748	485,929		
	3	0,747	0,719	0,733	475,214		
Dia 8	1	0,751	0,753	0,752	488,786	487,36	9,64
	2	0,748	0,745	0,747	484,857		
	3	0,749	0,754	0,752	488,429		
Dia 9	1	0,782	0,789	0,786	512,714	514,98	9,63
	2	0,794	0,808	0,801	523,786		
	3	0,777	0,782	0,780	508,429		
Dia 10	1	0,813	0,822	0,818	535,571	534,74	9,65
	2	0,819	0,807	0,813	532,357		
	3	0,812	0,825	0,819	536,286		
Dia 11	1	0,863	0,902	0,883	582,000	554,26	9,66
	2	0,822	0,834	0,828	543,071		
	3	0,818	0,823	0,821	537,714		

### Anexo 3.3. Quatro culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g<sub>glucose</sub>/L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados obtidos no estudo de crescimento de *Arthrospira platensis* em diferentes condições de cultivo em regime mixotrófico com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura.

**Tabela A3.9** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> (igual à tabela A3.5)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,366	0,374	0,370	215,929	215,93	8,91
	2	0,369	0,361	0,365	212,357		
	3	0,382	0,373	0,378	221,286		
Dia 1	1	0,458	0,472	0,465	283,786	285,57	8,92
	2	0,472	0,469	0,471	287,714		
	3	0,463	0,471	0,467	285,214		
Dia 2	1	0,513	0,526	0,520	322,714	321,88	8,98
	2	0,519	0,508	0,514	318,429		
	3	0,517	0,527	0,522	324,500		
Dia 3	1	0,550	0,568	0,559	350,929	345,93	9,16
	2	0,546	0,556	0,551	345,214		
	3	0,540	0,552	0,546	341,643		
Dia 4	1	0,594	0,602	0,598	378,786	374,62	9,22
	2	0,597	0,591	0,594	375,929		
	3	0,580	0,589	0,585	369,143		
Dia 5	1	0,672	0,657	0,665	426,286	426,17	9,31
	2	0,654	0,663	0,659	422,000		
	3	0,675	0,665	0,670	430,214		
Dia 6	1	0,809	0,825	0,817	535,214	542,95	9,35
	2	0,817	0,819	0,818	535,929		
	3	0,847	0,850	0,849	557,714		
Dia 7	1	0,907	0,913	0,910	601,643	602,12	9,64
	2	0,912	0,919	0,916	605,571		
	3	0,909	0,904	0,907	599,143		
Dia 8	1	0,964	0,956	0,960	637,357	639,14	9,52
	2	0,953	0,969	0,961	638,071		
	3	0,972	0,961	0,967	642,000		
Dia 9	1	0,993	0,994	0,994	661,286	660,69	9,72
	2	0,987	1,003	0,995	662,357		
	3	0,984	0,995	0,990	658,429		
Dia 10	1	1,024	1,036	1,030	687,357	693,31	9,60
	2	1,037	1,044	1,041	694,857		
	3	1,032	1,057	1,045	697,714		
Dia 11	1	1,069	1,061	1,065	712,357	704,02	9,64
	2	1,055	1,048	1,052	702,714		
	3	1,048	1,039	1,044	697,000		

**Tabela A3.10** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,338	0,333	0,336	191,286	191,29	9,00
	2	0,369	0,367	0,368	214,500		
	3	0,358	0,364	0,361	209,500		
Dia 1	1	0,415	0,417	0,416	248,786	244,14	8,96
	2	0,399	0,406	0,403	239,143		
	3	0,409	0,411	0,410	244,500		
Dia 2	1	0,468	0,455	0,462	281,286	283,43	9,09
	2	0,440	0,498	0,469	286,643		
	3	0,457	0,469	0,463	282,357		
Dia 3	1	0,512	0,520	0,516	320,214	316,88	9,17
	2	0,516	0,497	0,507	313,429		
	3	0,509	0,514	0,512	317,000		
Dia 4	1	0,551	0,560	0,556	348,429	351,17	9,25
	2	0,544	0,568	0,556	348,786		
	3	0,562	0,571	0,567	356,286		
Dia 5	1	0,615	0,608	0,612	388,429	388,55	9,29
	2	0,624	0,599	0,612	388,429		
	3	0,608	0,616	0,612	388,786		
Dia 6	1	0,769	0,755	0,762	495,929	488,07	9,39
	2	0,748	0,751	0,750	487,000		
	3	0,735	0,748	0,742	481,286		
Dia 7	1	0,831	0,805	0,818	535,929	534,86	9,39
	2	0,817	0,818	0,818	535,571		
	3	0,822	0,806	0,814	533,071		
Dia 8	1	0,855	0,848	0,852	559,857	556,52	9,59
	2	0,846	0,842	0,844	554,500		
	3	0,839	0,851	0,845	555,214		
Dia 9	1	0,882	0,867	0,875	576,286	581,88	9,50
	2	0,885	0,896	0,891	587,714		
	3	0,879	0,885	0,882	581,643		
Dia 10	1	0,934	0,966	0,950	630,214	632,00	9,55
	2	0,952	0,950	0,951	630,929		
	3	0,948	0,965	0,957	634,857		
Dia 11	1	0,969	0,989	0,979	650,929	655,45	9,56
	2	0,983	1,007	0,995	662,357		
	3	0,970	0,994	0,982	653,071		

**Tabela A3.11** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e adição de cloreto de sódio em 1.500% (15x)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,342	0,325	0,334	189,857	189,86	8,95
	2	0,350	0,337	0,344	197,000		
	3	0,344	0,353	0,349	200,571		
Dia 1	1	0,397	0,380	0,389	229,143	230,33	8,86
	2	0,394	0,411	0,403	239,143		
	3	0,389	0,370	0,380	222,714		
Dia 2	1	0,451	0,430	0,441	266,286	263,31	8,99
	2	0,421	0,432	0,427	256,286		
	3	0,447	0,437	0,442	267,357		
Dia 3	1	0,502	0,504	0,503	310,929	311,88	9,08
	2	0,513	0,495	0,504	311,643		
	3	0,497	0,515	0,506	313,071		
Dia 4	1	0,557	0,531	0,544	340,214	342,12	9,15
	2	0,546	0,563	0,555	347,714		
	3	0,549	0,534	0,542	338,429		
Dia 5	1	0,560	0,570	0,565	355,214	364,26	9,20
	2	0,585	0,581	0,583	368,071		
	3	0,588	0,582	0,585	369,500		
Dia 6	1	0,669	0,678	0,674	432,714	434,62	9,27
	2	0,673	0,679	0,676	434,500		
	3	0,688	0,670	0,679	436,643		
Dia 7	1	0,703	0,719	0,711	459,500	457,00	9,30
	2	0,705	0,713	0,709	458,071		
	3	0,694	0,711	0,703	453,429		
Dia 8	1	0,797	0,805	0,801	523,786	513,79	9,53
	2	0,781	0,789	0,785	512,357		
	3	0,767	0,783	0,775	505,214		
Dia 9	1	0,822	0,842	0,832	545,929	546,52	9,44
	2	0,830	0,841	0,836	548,429		
	3	0,829	0,833	0,831	545,214		
Dia 10	1	0,861	0,872	0,867	570,571	572,24	9,47
	2	0,884	0,864	0,874	575,929		
	3	0,859	0,873	0,866	570,214		
Dia 11	1	0,926	0,925	0,926	612,714	608,90	9,45
	2	0,912	0,920	0,916	605,929		
	3	0,931	0,907	0,919	608,071		

**Tabela A3.12** – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x)

Data	Cultura	Absorvância (a 680 nm)			Conc. (mg/L)	Conc. média final (mg/L)	pH médio
		A	B	média			
Dia 0	1	0,372	0,360	0,366	213,071	213,07	8,90
	2	0,372	0,359	0,366	212,714		
	3	0,359	0,342	0,351	202,000		
Dia 1	1	0,363	0,377	0,370	215,929	227,71	8,81
	2	0,394	0,386	0,390	230,214		
	3	0,401	0,398	0,400	237,000		
Dia 2	1	0,403	0,418	0,411	244,857	245,57	8,93
	2	0,406	0,396	0,401	238,071		
	3	0,429	0,417	0,423	253,786		
Dia 3	1	0,472	0,463	0,468	285,571	289,50	9,02
	2	0,488	0,459	0,474	289,857		
	3	0,479	0,477	0,478	293,071		
Dia 4	1	0,531	0,535	0,533	332,357	326,17	9,09
	2	0,523	0,495	0,509	315,214		
	3	0,524	0,538	0,531	330,929		
Dia 5	1	0,591	0,564	0,578	364,143	351,52	9,14
	2	0,553	0,562	0,558	349,857		
	3	0,538	0,551	0,545	340,571		
Dia 6	1	0,657	0,656	0,657	420,571	411,52	9,22
	2	0,633	0,608	0,621	394,857		
	3	0,649	0,660	0,655	419,143		
Dia 7	1	0,690	0,615	0,653	417,714	435,10	9,24
	2	0,698	0,680	0,689	443,786		
	3	0,682	0,696	0,689	443,786		
Dia 8	1	0,732	0,717	0,725	469,143	469,14	9,46
	2	0,733	0,703	0,718	464,500		
	3	0,728	0,734	0,731	473,786		
Dia 9	1	0,763	0,766	0,765	497,714	488,67	9,36
	2	0,721	0,732	0,727	470,571		
	3	0,758	0,771	0,765	497,714		
Dia 10	1	0,792	0,799	0,796	519,857	518,79	9,41
	2	0,778	0,811	0,795	519,143		
	3	0,801	0,783	0,792	517,357		
Dia 11	1	0,805	0,817	0,811	530,929	533,19	9,40
	2	0,824	0,843	0,834	547,000		
	3	0,802	0,794	0,798	521,643		

## Anexo 4. Determinação da massa de água contida na biomassa algal húmida

Para se proceder à quantificação de óleos por gravimetria (conforme descrito em II.5.) é necessário conhecer-se o teor de água contida na biomassa algal.

Com base em diversas referências bibliográficas sobre microalgas sabe-se que a biomassa algal é constituída por 85% a 90% de água.

Conforme referido em II.4.c) procedeu-se à liofilização da biomassa húmida colhida para traçar a curva de calibração. Este procedimento vai desidratar a biomassa húmida, obtendo-se no final do processo biomassa seca. Os valores obtidos são os apresentados na Tabela VII.15.

**Tabela A4.1** – Determinação do teor de Biomassa algal seca

m (Epp.) (g)	m (Epp.+ Biom húmida) (g)	m (Biom húmida) (g)	m (Epp.+ Biom seca) (g)	m (Biom seca) (g)	% Biomassa seca
0,9176	2,7474	1,8298	1,1877	0,2701	14,76

### Exemplos de cálculo:

$$m (\text{Biom húmida}) = m (\text{Epp.+ Biom húmida}) - m (\text{Epp.}) \text{ (g)}$$

$$m (\text{Biom seca}) = m (\text{Epp.+ Biom seca}) - m (\text{Epp.}) \text{ (g)}$$

$$\% \text{ Biomassa seca} = (0,2701 \times 100) / 1,8298 = 14,76\%$$

### Determinação do teor de Água (m/m) presente na biomassa húmida:

$$\% \text{ Biomassa seca} + \% \text{ Água} = 100\%$$

$$\% \text{ Água} = 100 - 14,76 = 85,24\%$$

**NOTA:** No procedimento descrito em II.5. o valor do teor de Água foi aproximado a 85%, por uma questão de simplificação de cálculos.

## Anexo 5. Determinação das produtividades máximas de biomassa seca

Neste Anexo apresenta-se um exemplo de cálculo relativo à produtividade de biomassa seca, cujos resultados foram apresentados no capítulo III.2.4.

O valor da produtividade de biomassa seca é o declive da recta de ajuste tangente da fase exponencial formada pelo conjunto dos pontos de valor de concentração de biomassa seca ao longo do tempo:

$$\text{produtividade} = \frac{\text{concentração final} - \text{concentração inicial}}{\text{dia final} - \text{dia inicial}}$$

### Exemplos de cálculo:

Para o regime autotrófico e entre os dias 2 e 4 (período de 48 h), tem-se:

$$\text{Produtividade} = (291,05 - 242,83) / (4-2) = 24,11 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$$

Todos os valores calculados são apresentados nas Tabelas A5.1 a A5.9, que serviram de base para a construção da Tabela III.1 e da Figura III.11 do capítulo III.2.4.

**Tabela A5.1** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime autotrófico e em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose

Período	Auto	Mix 0,25 gluc	Mix 0,5 gluc	Mix 0,75 gluc	Mix 1,0 gluc
Dias 0-1	18,81	36,19	55,48	59,64	69,64
Dias 1-2	9,64	21,79	9,05	21,07	36,31
Dias 2-3	21,43	23,45	47,14	42,98	24,05
Dias 3-4	26,79	32,14	38,33	34,52	28,69
Dias 4-5	14,40	49,64	52,14	52,26	51,55
Dias 5-6	28,57	62,98	87,26	99,17	116,79
Dias 6-7	60,95	29,05	43,93	49,05	59,17
Dias 7-8	27,86	39,64	32,14	37,98	37,02
Dias 8-9	25,48	24,40	35,12	30,12	21,55
Dias 9-10	33,81	25,83	23,93	21,55	32,62
Dias 10-11	34,64	16,19	14,76	13,45	10,71

**Tabela A5.2** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 48 h para a cultura em regime autotrófico e culturas em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose

Período	Auto	Mix 0,25 gluc	Mix 0,5 gluc	Mix 0,75 gluc	Mix 1,0 gluc
Dias 0-2	14,23	28,99	32,26	40,36	52,98
Dias 1-3	15,54	22,62	28,10	32,02	30,18
Dias 2-4	24,11	27,80	42,74	38,75	26,37
Dias 3-5	20,60	40,89	45,24	43,39	40,12
Dias 4-6	21,49	56,31	69,70	75,71	84,17
Dias 5-7	44,76	46,01	65,60	74,11	87,98
Dias 6-8	44,40	34,35	38,04	43,51	48,10
Dias 7-9	26,67	32,02	33,63	34,05	29,29
Dias 8-10	29,64	25,12	29,52	25,83	27,08
Dias 9-11	34,23	21,01	19,35	17,50	21,67

**Tabela A5.3** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 72 h para a cultura em regime autotrófico e culturas em regime mixotrófico com adição de concentrações distintas de glucose

Período	Auto	Mix 0,25 gluc	Mix 0,5 gluc	Mix 0,75 gluc	Mix 1,0 gluc
Dias 0-3	16,63	27,14	37,22	41,23	43,33
Dias 1-4	19,29	25,79	31,51	32,86	29,68
Dias 2-5	20,87	35,08	45,87	43,25	34,76
Dias 3-6	23,25	48,25	59,25	61,98	65,67
Dias 4-7	34,64	47,22	61,11	66,83	75,83
Dias 5-8	39,13	43,89	54,44	62,06	70,99
Dias 6-9	38,10	31,03	37,06	39,05	39,25
Dias 7-10	29,05	29,96	30,40	29,88	30,40
Dias 8-11	31,31	22,14	24,60	21,71	21,63

**Tabela A5.4** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtracção de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 0,2N	Mix 0,6N
Dias 0-1	69,64	31,19	24,05
Dias 1-2	36,31	45,60	47,26
Dias 2-3	24,05	15,48	22,74
Dias 3-4	28,69	14,52	24,17
Dias 4-5	51,55	52,98	41,31
Dias 5-6	116,79	71,79	110,71
Dias 6-7	59,17	17,62	40,24
Dias 7-8	37,02	10,12	32,38
Dias 8-9	21,55	27,62	18,57
Dias 9-10	32,62	19,76	45,00
Dias 10-11	10,71	19,52	18,69

**Tabela A5.5** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 48 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 0,2N	Mix 0,6N
Dias 0-2	52,98	38,39	35,65
Dias 1-3	30,18	30,54	35,00
Dias 2-4	26,37	15,00	23,45
Dias 3-5	40,12	33,75	32,74
Dias 4-6	84,17	62,38	76,01
Dias 5-7	87,98	44,70	75,48
Dias 6-8	48,10	13,87	36,31
Dias 7-9	29,29	18,87	25,48
Dias 8-10	27,08	23,69	31,79
Dias 9-11	21,67	19,64	31,85

**Tabela A5.6** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 72 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 0,2N	Mix 0,6N
Dias 0-3	43,33	30,75	31,35
Dias 1-4	29,68	25,20	31,39
Dias 2-5	34,76	27,66	29,40
Dias 3-6	65,67	46,43	58,73
Dias 4-7	75,83	47,46	64,09
Dias 5-8	70,99	33,17	61,11
Dias 6-9	39,25	18,45	30,40
Dias 7-10	30,40	19,17	31,98
Dias 8-11	21,63	22,30	27,42

**Tabela A5.7** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 24 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 5xNaCl	Mix 15xNaCl	Mix 25xNaCl
Dias 0-1	69,64	52,86	40,48	14,64
Dias 1-2	36,31	39,29	32,98	17,86
Dias 2-3	24,05	33,45	48,57	43,93
Dias 3-4	28,69	34,29	30,24	36,67
Dias 4-5	51,55	37,38	22,14	25,36
Dias 5-6	116,79	99,52	70,36	60,00
Dias 6-7	59,17	46,79	22,38	23,57
Dias 7-8	37,02	21,67	56,79	34,05
Dias 8-9	21,55	25,36	32,74	19,52
Dias 9-10	32,62	50,12	25,71	30,12
Dias 10-11	10,71	23,45	36,67	14,40

**Tabela A5.8** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 48 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 5xNaCl	Mix 15xNaCl	Mix 25xNaCl
Dias 0-2	52,98	46,07	36,73	16,25
Dias 1-3	30,18	36,37	40,77	30,89
Dias 2-4	26,37	33,87	39,40	40,30
Dias 3-5	40,12	35,83	26,19	31,01
Dias 4-6	84,17	68,45	46,25	42,68
Dias 5-7	87,98	73,15	46,37	41,79
Dias 6-8	48,10	34,23	39,58	28,81
Dias 7-9	29,29	23,51	44,76	26,79
Dias 8-10	27,08	37,74	29,23	24,82
Dias 9-11	21,67	36,79	31,19	22,26

**Tabela A5.9** – Produtividade em biomassa seca ( $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ) para períodos de 72 h para as culturas em regime mixotrófico com adição de  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura

Período	Mix 1,0 gluc	Mix 5xNaCl	Mix 15xNaCl	Mix 25xNaCl
Dias 0-3	43,33	41,87	40,67	25,48
Dias 1-4	29,68	35,67	37,26	32,82
Dias 2-5	34,76	35,04	33,65	35,32
Dias 3-6	65,67	57,06	40,91	40,67
Dias 4-7	75,83	61,23	38,29	36,31
Dias 5-8	70,99	55,99	49,84	39,21
Dias 6-9	39,25	31,27	37,30	25,71
Dias 7-10	30,40	32,38	38,41	27,90
Dias 8-11	21,63	32,98	31,71	21,35

## Anexo 6. Quantificação de óleos por gravimetria – determinação da produtividade máxima lipídica

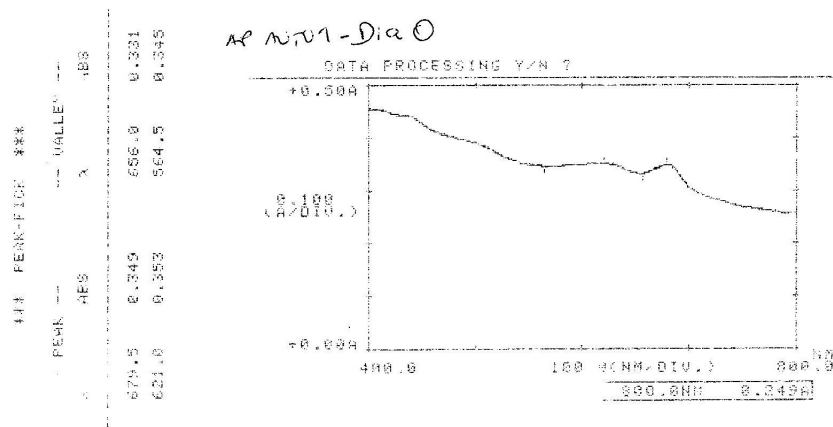
Tabela A6.1 – Teor percentual lipídico e Produtividade lipídica (mg/L.dia) para todos os ensaios realizados

Ensaio <i>Arthrospira platensis</i>	mte (g)	mte+bm (g)	mbm (g)	mH <sub>2</sub> O	Clorofórmio (mL)		Metanol (mL)		Água destilada (mL)		mgoblé (g)	mgoblé + óleo (g)	móleo (g)	%óleo	%óleo final	média %óleo final	Produtividade máxima (mgsecas/L.dia)	Produtividade máxima de lípidos (mg/L.dia)
					1ªfase	2ªfase	1ªfase	2ªfase	1ªfase	2ªfase								
Auto_1	78,4328	81,7350	3,3022	2,8069	3,51	3,51	7,02	0,00	0,00	3,51	33,5090	33,5397	0,0307	6,20	6,89	7,06	60,95	4,31
Auto_2	78,5223	81,0689	2,5466	2,1646	2,71	2,71	5,41	0,00	0,00	2,71	36,2860	36,3109	0,0249	6,52	7,24			
Mix0,25gluc_1	78,0131	80,6688	2,6557	2,2573	2,82	2,82	5,64	0,00	0,00	2,82	30,7035	30,7295	0,0260	6,53	7,25	7,15	62,98	4,51
Mix0,25gluc_2	78,1048	80,9178	2,8130	2,3911	2,99	2,99	5,98	0,00	0,00	2,99	33,1794	33,2062	0,0268	6,35	7,06			
Mix0,5gluc_1	78,9417	81,8914	2,9497	2,5072	3,13	3,13	6,27	0,00	0,00	3,13	32,9232	32,9524	0,0292	6,60	7,33	7,74	87,26	6,76
Mix0,5gluc_2	78,0389	81,2185	3,1796	2,7027	3,38	3,38	6,76	0,00	0,00	3,38	32,7126	32,7476	0,0350	7,34	8,15			
Mix0,75gluc_1	77,8629	81,0925	3,2296	2,7452	3,43	3,43	6,86	0,00	0,00	3,43	32,5582	32,5950	0,0368	7,60	8,44	8,53	99,17	8,45
Mix0,75gluc_2	77,9793	81,0937	3,1144	2,6472	3,31	3,31	6,62	0,00	0,00	3,31	32,5911	32,6273	0,0362	7,75	8,61			
Mix1,0gluc_1	79,0447	82,0219	2,9772	2,5306	3,16	3,16	6,33	0,00	0,00	3,16	33,1606	33,2005	0,0399	8,93	9,93	9,72	116,79	11,35
Mix1,0gluc_2	78,6180	81,6237	3,0057	2,5548	3,19	3,19	6,39	0,00	0,00	3,19	32,2417	32,2803	0,0386	8,56	9,51			
Mix 0,2N_1	78,8308	81,8264	2,9956	2,5463	3,18	3,18	6,37	0,00	0,00	3,18	34,3696	34,4339	0,0643	14,31	15,90	15,06	71,79	10,81
Mix 0,2N_2	77,8638	80,6748	2,8110	2,3894	2,99	2,99	5,97	0,00	0,00	2,99	30,6747	30,7287	0,0540	12,81	14,23			
Mix 0,6N_1	78,8042	81,9130	3,1088	2,6425	3,30	3,30	6,61	0,00	0,00	3,30	31,5133	31,5648	0,0515	11,04	12,27	11,95	110,71	13,23
Mix 0,6N_2	77,9211	80,7226	2,8015	2,3813	2,98	2,98	5,95	0,00	0,00	2,98	32,5634	32,6074	0,0440	10,47	11,63			
Mix 5xNaCl_1	78,8874	81,7594	2,8720	2,4412	3,05	3,05	6,10	0,00	0,00	3,05	34,3675	34,4091	0,0416	9,66	10,73	10,92	99,52	10,87
Mix 5xNaCl_2	77,1033	80,4577	3,3544	2,8512	3,56	3,56	7,13	0,00	0,00	3,56	32,2016	32,2519	0,0503	10,00	11,11			
Mix 15xNaCl_1	80,4899	83,6806	3,1907	2,7121	3,39	3,39	6,78	0,00	0,00	3,39	31,5779	31,6302	0,0523	10,93	12,14	12,44	70,36	8,75
Mix 15xNaCl_2	78,0662	81,0554	2,9892	2,5408	3,18	3,18	6,35	0,00	0,00	3,18	31,8006	31,8520	0,0514	11,46	12,74			
Mix 25xNaCl_1	78,5529	81,6354	3,0825	2,6201	3,28	3,28	6,55	0,00	0,00	3,28	32,5644	32,6337	0,0693	14,99	16,65	15,45	60,00	9,27
Mix 25xNaCl_2	77,9606	80,6799	2,7193	2,3114	2,89	2,89	5,78	0,00	0,00	2,89	34,3692	34,4215	0,0523	12,82	14,25			

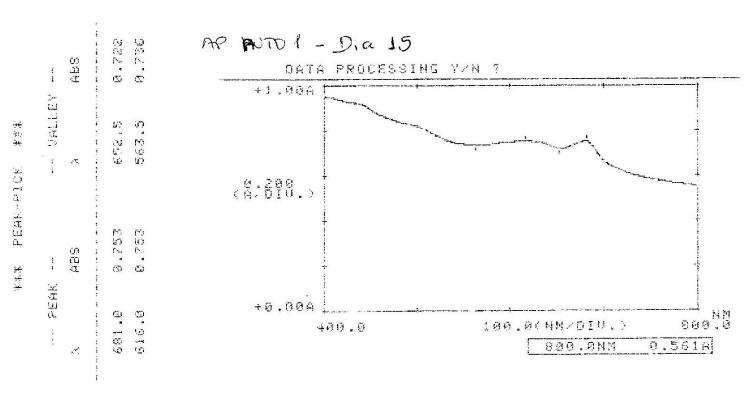
**Anexo 7. Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm), medida no espectrofotômetro UV-visível UV-160A, aquando das leituras de Abs para as culturas constantes nas Tabelas A3.1, A3.5, A3.8, A3.12 e A5.1 a A5.9**

Para todos os regimes de crescimento são apresentados os gráficos que correspondem ao dia zero e ao último dia de cultivo (ou entrada na fase estacionária).

Em todos os regimes de crescimento verifica-se que o pico de absorvância a aproximadamente 680 nm se mantém presente ao longo de todo o tempo de cultivo, sendo, com excepção do dia zero do regime autotrófico, o pico de absorvância máxima.



**Figura A7.1 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime autotrófico – dia 0.**



**Figura A7.2 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime autotrófico – dia 15.**

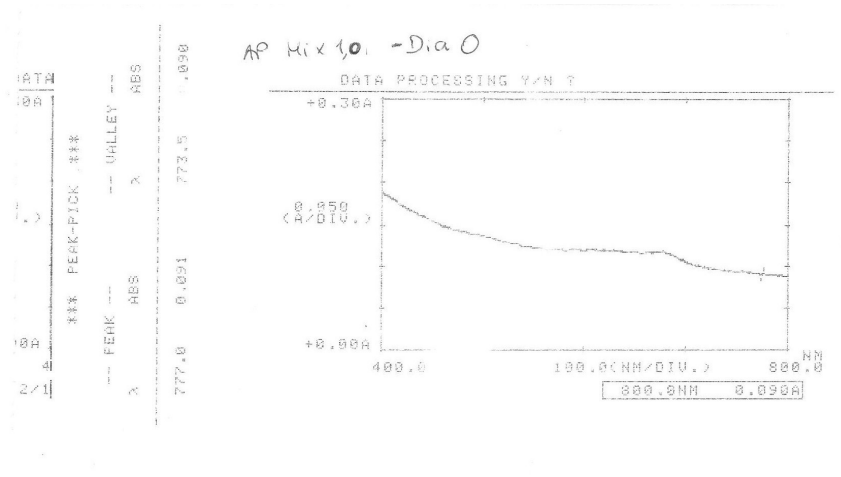


Figura A7.3 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> – dia 0.

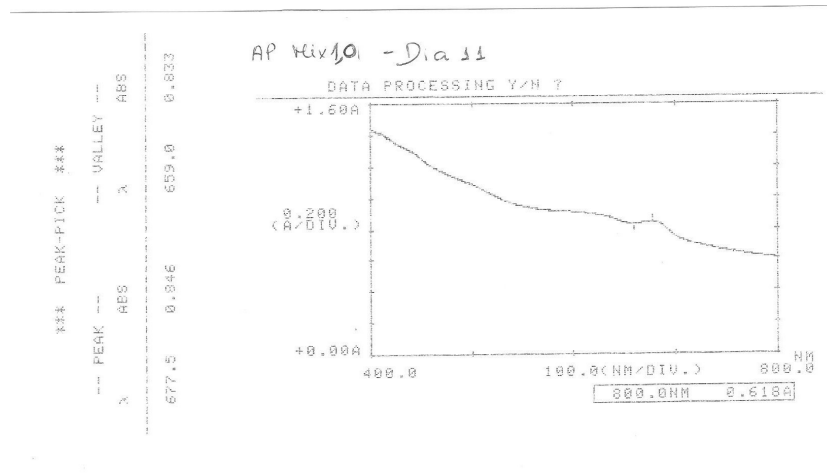


Figura A7.4 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> – dia 11.

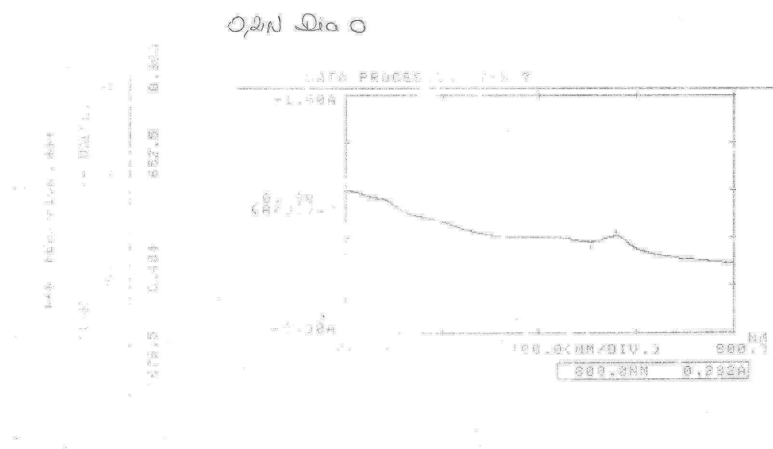


Figura A7.5 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico 1,0 g<sub>gluc</sub>/L<sub>meio</sub> e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 0.

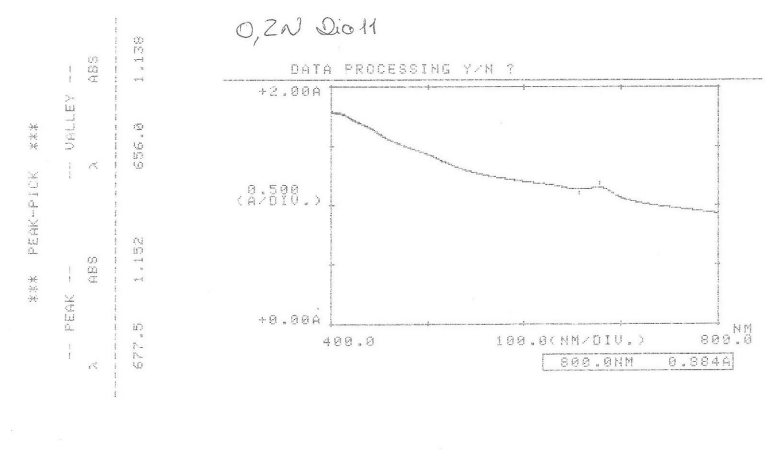


Figura A7.6 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 11.

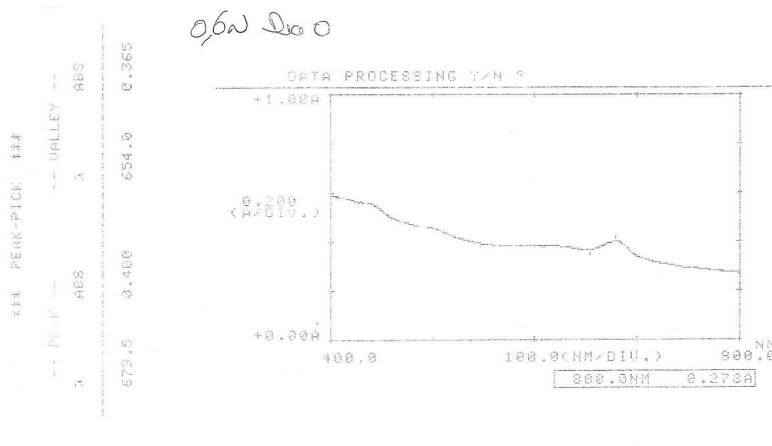


Figura A7.7 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 0.

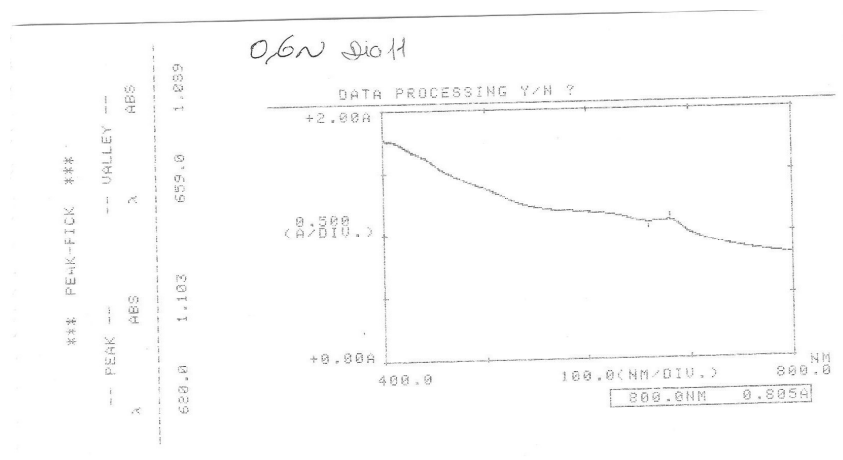
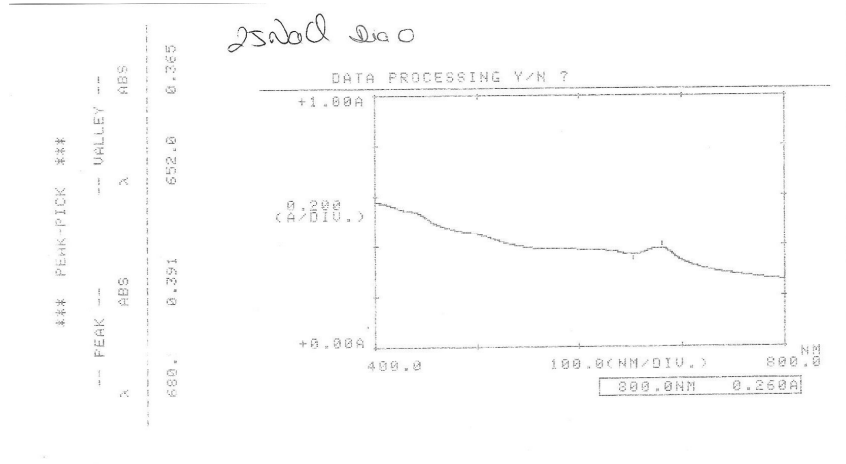
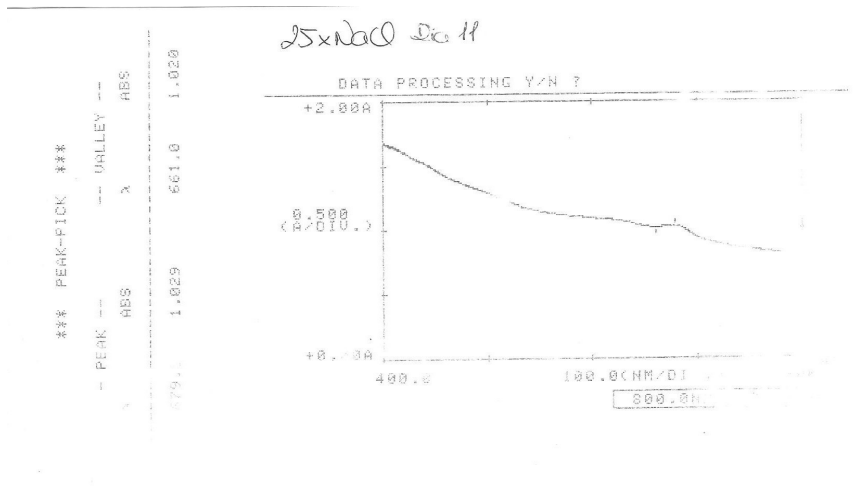


Figura A7.8 – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e subtração da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 11.



**Figura A7.9** – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x) – dia 0.



**Figura A7.10** – Curva de Abs vs  $\lambda$  (nm) para regime mixotrófico  $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$  e adição de cloreto de sódio em 2.500% (25x) – dia 11.