

Mestrado em Engenharia Química  
Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental



# Efeito das condições ambientais na produtividade lipídica da *Dunaliella* *tertiolecta*

Ricardo Estêvão de Oliveira Almeida  
Outubro de 2011

**Orientador:** Doutora Nídia Caetano  
**Co-Orientador:** Doutora Teresa Mata

Departamento de Engenharia Química



“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é  
alguém que acredite que ele possa ser realizado”

Roberto Shinyashiki



## **Agradecimentos**

A escrita deste documento não seria possível sem os pequenos passos de muitas pessoas que, directa ou indirectamente, contribuíram para a concretização do mesmo. Não poderia deixar de expressar aqui uma palavra de agradecimento e de gratidão, em particular:

À Doutora Nídia de Sá Caetano por toda a atenção e orientação ao longo de todo o trabalho, pelos ensinamentos, ajuda e imensa disponibilidade sempre demonstrada.

À Doutora Teresa Mata pelo conhecimento e respeito com que sempre me tratou.

Ao Engenheiro Octávio Oliveira pela paciência, amizade e companheirismo.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, mais concretamente a todos os docentes e auxiliares do Departamento de Engenharia Química pela disponibilidade imediata sempre que necessitei.

Ao RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Grupo Portucel/Soporcel e ao CIIMAR – Centro de Investigação Marinha e Ambiental, em especial ao Doutor Carlos Gravato pela ajuda, disponibilidade e utilização das instalações.

A todos os meus amigos, em especial à Susana Teixeira que além de amiga é também namorada, com quem partilho todos os momentos da minha vida, pelo carinho, compreensão, respeito, tolerância e incentivo.

Por fim, mas não por último, aos meus Pais e Irmão por me inculirem valores fundamentais em toda a minha formação, por estarem incondicionalmente a meu lado e sem os quais nada teria sido possível.



## Resumo

Este trabalho teve como objectivo a optimização das condições de crescimento de biomassa algal tendo em vista a sua utilização como fonte de lípidos para biocombustíveis. Assim, procedeu-se à inoculação de duas estirpes, a *Dunaliella tertiolecta* (água salgada) e a *Tetraselmis subcordiformis* (água salobra), seleccionando-se a *Dunaliella tertiolecta* uma vez que esta apresentou um crescimento mais rápido. Escolhida a estirpe a usar, avaliou-se a influência da composição do meio de cultura da espécie, variando-se a concentração de macronutrientes (Magnésio, Potássio, Azoto, Fósforo) e de micronutrientes (Manganês, Zinco, Ferro, Cobalto) presentes no meio em 10 e 20 vezes, comparativamente à do meio de cultura padrão, o meio *Artificial Seawater Medium with Vitamins*. Avaliou-se o crescimento algal, a uma temperatura de  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , com uma intensidade de iluminação de 5000 lux (lâmpadas luz dia) e fotoperíodos 12:12 h, controlando possíveis contaminações nas culturas em estudo.

Para os ensaios realizados com a *Dunaliella tertiolecta*, os melhores resultados para a produtividade média e máxima de biomassa,  $63,06\text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L.dia}$  e  $141,79\text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L.dia}$ , respectivamente, foram obtidos no ensaio em que se fez variar 10 vezes a concentração de azoto (sob a forma de nitrato). Os resultados mais satisfatórios para o teor lipídico e para a produtividade lipídica máxima,  $33,45\%$  e  $47,43\text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$  respectivamente, também foram obtidos no ensaio em que se fez variar 10 vezes a concentração de azoto (sob a forma de nitrato), (com extracção dos lípidos usando o método de Bligh e Dyer).

Foram testados dois solventes para a extracção de lípidos, o clorofórmio e o hexano, tendo-se obtido resultados superiores com o clorofórmio, comparativamente aos obtidos quando se usou hexano, com excepção do ensaio em que se aumentou 20 vezes a concentração de fósforo no meio de cultura das microalgas.

Verificou-se que, em todos os ensaios foi atingido o estado estacionário sensivelmente na mesma altura, isto é, decorridos cerca de 25 dias após o início do estudo, excepto os ensaios em que se fez variar a concentração de cobalto, para os quais as culturas não se adaptaram às alterações do meio, acabando por morrer passados 15 dias.

A adição dos macronutrientes e micronutrientes usados nos ensaios, nas quantidades testadas, não influenciou significativamente a produtividade lipídica, com excepção do azoto e ferro. Conclui-se que o aumento da concentração de azoto para 10x o valor padrão potencia o aumento da produtividade lipídica máxima para mais do dobro (3,6 vezes – Padrão:  $13,25\text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ; 10x N:  $47,43\text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ) e que o aumento da concentração de ferro para 10x o valor padrão potencia o aumento da produtividade lipídica máxima para aproximadamente o dobro (1,9 vezes - Padrão:  $14,61\text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ; 10x Fe:  $28,04\text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ).

Nos ensaios realizados com adição de azoto ou ferro, os resultados obtidos para a concentração, teor lípidico e produtividade lipídica máxima, foram sempre superiores aos do padrão correspondente, pelo que se pode concluir que estes ensaios se apresentam como os mais promissores deste estudo, embora o ensaio mais satisfatório tenha sido aquele em que se promoveu a alteração da concentração de azoto para 10 vezes o valor padrão.

**Palavras-chave:** *Dunaliella tertiolecta*, macronutrientes, microalgas, micronutrientes, produtividade lipídica.

**Abstract**

This study aimed to optimize the growth conditions of algae biomass, considering its use as a source of lipids for biofuels. Therefore, two strains were inoculated, *Dunaliella tertiolecta* (saltwater) and *Tetraselmis subcordiformis* (brackish water), in order to choose the one that presented a faster growth, being *Dunaliella tertiolecta* the fastest growing specie. The selection of the strain to be used was followed by varying the composition of the culture medium used for the two species (Artificial Seawater Medium with Vitamins), changing the concentration of macronutrients (Magnesium, Potassium, Nitrogen, Phosphorous), as well as of micronutrients (Manganese, Zinc, Iron, Cobalt) by a factor of 10 and 20, relatively to the ones of the standard culture medium. The algae growth was assessed, at a temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , illumination intensity of 5000 lux (daylight lamps) and photoperiods 12:12 h, by checking potential contamination of the cultures under study.

The best results for the average and maximum biomass productivity,  $63.06\text{ mg}_{\text{dry biomass}}/\text{L}\cdot\text{day}$  and  $141.79\text{ mg}_{\text{dry biomass}}/\text{L}\cdot\text{day}$ , respectively, were obtained in the test where the nitrogen concentration (in the form of nitrate) was increased by a factor of 10.

The most satisfying results for the lipid content and maximum lipid productivity  $33.45\%$  and  $47.43\text{ mg}_{\text{oil}}/\text{L}\cdot\text{day}$ , respectively, were also obtained in the test where the nitrogen concentration (in the form of nitrate) was changed by 10 times (with lipid extraction using the Bligh and Dyer method).

Two solvents (chloroform and hexane) were tested for the extraction of lipids and chloroform has produced superior results when compared to those obtained for extraction with hexane except for the assay when the concentration of phosphorus in the culture medium was increased 20 times.

In all the tests done, the stationary phase was attained essentially at the same time, i.e. after 25 days from the beginning of the study, except in the tests where the cobalt concentration was increased. In these tests, the cultures didn't adapt to the cobalt variations, leading to their death after 15 days from the beginning of the test.

The addition of macronutrients and micronutrients in the quantities tested, did not influence the lipid productivity, with the exception of nitrogen and iron. It is concluded that increasing the concentration of nitrogen to the standard value of 10x increases the maximum lipid productivity growth more than doubled (3,6 times - Standard:  $13,25\text{ mg}_{\text{oil}}/\text{L}\cdot\text{day}$ ; 10x N:  $47,43\text{ mg}_{\text{oil}}/\text{L}\cdot\text{day}$ ) and that increasing the concentration of iron to the standard value of 10x increases the maximum lipid productivity increased to nearly double (1,9 times - Standard:  $14,61\text{ mg}_{\text{oil}}/\text{L}\cdot\text{day}$ ; 10x Fe:  $28,04\text{ mg}_{\text{oil}}/\text{L}\cdot\text{day}$ ).

In the tests with nitrogen or iron addition, the results obtained for the concentration, lipid content, and maximum lipid productivity were always higher relatively to the corresponding standard conditions. Therefore, it can be concluded that these tests are the most promising

of this study, even though the most satisfying test was the one where the nitrogen concentration was varied to 10 times of the standard value.

**Keywords:** *Dunaliella tertiolecta*, macronutrients, microalgae, micronutrients, lipids productivity.

## Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Biocombustíveis.....	1
1.1.1.	Valor energético de algumas culturas agrícolas .....	7
1.1.2.	Potencial de produção de bioetanol.....	8
1.1.3.	O futuro dos biocombustíveis.....	9
1.2.	Biodiesel .....	11
1.3.	Algas.....	15
1.3.1.	Algas Procariontes (do Reino Monera ou bacteria) .....	15
1.3.2.	Algas Eucariontes (Reino Protista) .....	15
1.4.	Microalgas .....	19
2.	Parte Experimental .....	27
2.1	Descrição Genérica .....	27
2.2	Procedimento.....	27
2.3	Materiais e Métodos .....	30
3.	Resultados e Discussão .....	35
3.1	Monitorização das culturas.....	35
3.2	Avaliação do crescimento da <i>Dunaliella tertiolecta</i> por alteração da concentração de macronutrientes no meio de cultura.....	35
3.3	Avaliação do crescimento da <i>Dunaliella tertiolecta</i> por alteração da concentração de micronutrientes.....	37
3.4	Avaliação do crescimento da <i>Dunaliella tertiolecta</i> por alteração da concentração de Fósforo e Cobalto.....	39
3.5	Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios com adição de macronutrientes (padrão, 10x Mg, 20x Mg, 10x P, 20x P, 10x N, 20x N).....	41
3.6	Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios referidos em 3.3. (padrão, 10x Mn, 20x Mn, 10x Zn, 20x Zn, 10x Fe, 20x Fe).....	42
3.7	Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios referidos em 3.4. (padrão, 10x P, 20x P, 10x Co, 20x Co) .....	43
3.8	Quantificação de óleos por gravimetria .....	44
3.9	Produtividade lipídica máxima para os ensaios com adição de macronutrientes (padrão, 10x Mg, 20x Mg, 10x P, 20x P, 10x N, 20x N).....	47
3.10	Produtividade lipídica máxima para os ensaios com adição de micronutrientes (padrão, 10x Mn, 20x Mn, 10x Zn, 20x Zn, 10x Fe, 20x Fe).....	48
3.11	Resumo dos resultados obtidos .....	49

3.12 Índice de risco dos solventes.....	49
4. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros .....	51
5. Referências Bibliográficas.....	55
Anexo A – Avaliação do crescimento microalgal.....	63
Anexo B – Meio de cultura .....	77
Anexo C – Curva de calibração Absorvância vs concentração de Biomassa seca.....	79
Anexo D – Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm) .....	81
Anexo E – Determinação da massa de água contida na biomassa algal húmida.....	83
Anexo F – Determinação das produtividades máximas e médias de biomassa seca.....	85
Anexo G – Quantificação gravimétrica de óleos.....	89
Anexo H – Produtividade lipídica máxima .....	93
Anexo I – Índice de risco dos solventes .....	95

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Reacção geral de esterificação (Corro, 2010). .....	6
Figura 1.2 – Reacção geral de transesterificação (Mata <i>et. al</i> , 2009).....	11
Figura 1.3 – Representação esquemática da curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor fechado (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) (Mata <i>et al.</i> , 2009).....	21
Figura 1.4 – Imagem de microscópio óptico de <i>Neochloris oleoabundans</i> : a) Ampliação de 1000x (Renimel <i>et al.</i> , 2010); b) Ampliação de 10000x (Renimel <i>et al.</i> , 2010). ....	25
Figura 1.5 – Imagem de microscópio óptico de microalgas com ampliação de 1000x: a) <i>Nannochloropsis sp.</i> (Seambiotic); b) <i>Scenedesmus obliquus</i> (Morgan, 2005). .....	25
Figura 1.6 – Imagem de microscópio óptico na ampliação de 1000x: a) <i>Dunaliella tertiolecta</i> (Patterson, 2009); b) <i>Chlorella protothecoides</i> (JNIESAD).....	26
Figura 2. 1 – Esquema explicativo da replicagem efectuada.....	28
Figura 2. 2 – Câmara de fluxo laminar. ....	29
Figura 2. 3 – Curva de intensidade luminosa 5000 lux. ....	30
Figura 2. 4 – Cultivo de microalgas onde é possível observar diferentes conjuntos de estirpes. ....	30
Figura 2. 5 – Gráfico de variação de pH Vs fracção molar. (REEF- Aquariorfilia Marinha, 2008).....	31
Figura 2. 6 – Tubos de ensaio após centrifugação (esquerda - clorofórmio como solvente; direita – hexano como solvente). ....	33
Figura 2. 7 – Gobelés com os óleos, após evaporação dos solventes (vista de cima).....	33
Figura 3. 1 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) vs dia para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Magnésio, Potássio e Azoto.....	36
Figura 3. 2 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) vs dia para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Manganês, Zinco e Ferro. ....	38
Figura 3. 3 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) Vs dia para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Fósforo e Cobalto.....	40
Figura 3. 4 – Produtividade (máxima e média) de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados. ....	41
Figura 3. 5 – Produtividade (máxima e média) de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados. ....	43
Figura 3. 6 – Produtividade média de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados. ....	44
Figura 3. 7 – Teor lipídico da biomassa algal dos ensaios padrão, com adição de magnésio, potássio ou azoto, usando dois solventes (clorofórmio e hexano). ....	45
Figura 3. 8 – Teor lipídico da biomassa algal dos ensaios padrão, com adição de manganês, zinco ou ferro, usando dois solventes (clorofórmio e hexano).....	46

Figura 3. 9 – Teor lipídico da biomassa algal dos ensaios padrão e com adição de potássio, usando dois solventes (clorofórmio e hexano).....	46
Figura 3. 10 – Produtividade lipídica máxima para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Magnésio, Potássio e Azoto.....	47
Figura 3. 11 – Produtividade lipídica máxima para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Manganês, Zinco e Ferro. ....	48
Figura B. 1 – Meio de cultura ( <a href="http://www.epsag.uni-goettingen.de">www.epsag.uni-goettingen.de</a> ). ....	75
Figura C. 1 – Curva de calibração Absorvância vs concentração de Biomassa seca (mg/L) para a microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	80
Figura D. 1 – Curva de Abs vs $\lambda$ (nm).....	81

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Valor energético de algumas culturas agrícolas. (www.portal-energia.com) .....	8
Tabela 1.2 – Potencial de produção nacional de bioetanol. (www.biblioteca.universia.net) .....	9
Tabela 1.3 – Comparação entre microalgas e outras matérias-primas base do biodiesel (Adaptado de Mata et al., 2009). .....	14
Tabela 1.4 – Grupos, pigmentos fotossintetizantes e substâncias de reserva das algas. (Guimarães et al., 2009) .....	16
Tabela 1.5 – Alguns produtos obtidos a partir de microalgas (Barbosa, 2003). .....	23
Tabela 1.6 – Conteúdo e produtividades lipídicas de algumas microalgas (adaptado de Mata et al., 2009). .....	24
Tabela 1.7 – Características do biodiesel de oleaginosas e de microalga (Teixeira et al. 2010). .....	24
Tabela 2. 1 – Parâmetros físicos fixados em cada tipo de reservatório de cultivo no estudo. ....	29
Tabela 3.1 – Resumo dos resultados obtidos para as diferentes condições testadas .....	24
Tabela A. 1 – Concentrações de biomassa obtidas para os cultivos com diferentes concentrações de macronutrientes. ....	63
Tabela A. 2 – Concentrações de biomassa obtidas para os cultivos com diferentes concentrações de macronutrientes. ....	67
Tabela A. 3 – Absorvâncias medidas nas culturas com diferentes concentrações de micronutrientes. ....	68
Tabela A. 4 – Concentrações obtidas para os ensaios com variação na concentração de micronutrientes. ....	72
Tabela A. 5 – Absorvâncias medidas nas culturas com diferentes concentrações de Cobalto e Fósforo. ....	73
Tabela A. 6 – Concentrações obtidas para os ensaios com variação na concentração de Cobalto e Fósforo. ....	75
Tabela C. 1 – Valores de absorvância obtidos para os ensaios com as concentrações padrão. ....	79
Tabela E. 1 – Determinação do teor de Biomassa algal seca .....	83
Tabela F. 1 – Produtividade máxima e média de biomassa obtida para os ensaios em que se variou a concentração de macronutrientes .....	85
Tabela F. 2 – Produtividade máxima e média de biomassa obtida para os ensaios em que se variou a concentração de micronutrientes .....	86
Tabela F. 3 – Produtividade média obtida para os ensaios onde se variou a concentração de Fósforo e Cobalto .....	87

Tabela G. 1 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de macronutrientes .....	90
Tabela G. 2 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de micronutrientes .....	91
Tabela G. 3 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de Fósforo.....	92
Tabela H. 1 – Produtividade lipídica máxima obtida para os ensaios em que se variou a concentração dos macronutrientes .....	93
Tabela H. 2 – Produtividade lipídica máxima obtida para os ensaios em que se variou a concentração dos micronutrientes .....	93

**Lista de Siglas/Abreviaturas**

Abs - Absorvância

AEIBOM – Associação Europeia de Biomassa

BBC – British Broadcasting Corporation

C – concentração.....(ppm, mg/L)

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Co - Cobalto

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

DGAIEC – Direcção Geral das Alfândegas e dos Impostos Especiais sobre o Consumo

DGEG – Direcção Geral de Energia e Geologia

DOE – Departamento de Energia dos Estados Unidos da América

EEA – Agência Europeia do Ambiente

EN – Norma Europeia

Epp - Eppendorf

FAME – Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos

Fe – Ferro

GC – Cromatografia Gasosa

GEE – Gases de Efeito Estufa

Gj – Gigajoule

GWh – Gigawatt

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Hidrogenocarbonato

I – Intensidade luminosa.....(lux)

INETI – Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial

INIAP – Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas

IR – índice de risco

ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto

ISP – Imposto Sobre os Produtos Petrolíferos

IST – Instituto Superior Técnico de Lisboa

JNIESAD - Japan National Institute of Environmental Studies Algal Database

K – Potássio

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia

m – massa.....(mg, g, Kg)

m/m – relação massa de composto por massa total

Mg – Magnésio

Mn – Mangânes

N – Azoto

NaCl – Cloreto de Sódio

NaNO<sub>3</sub> – Nitrato de Sódio  
NP – Norma Portuguesa  
P - Fósforo  
PCI – Poder Calorífico Inferior  
Pv – Pressão de vapor do solvente.....(mm Hg)  
RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Grupo Portucel/Soporcel  
Reagentes p.a. – Reagentes pró-análise  
rpm – Rotações por minuto  
SAG – Goettingen University Culture Collection, Alemanha  
TDM – Tonelada de matéria seca  
t/ha – Tonelada por hectare  
T<sub>máx.</sub> – Temperatura máxima  
T<sub>mín.</sub> – Temperatura mínima  
UC – Universidade de Coimbra  
UE – União Europeia  
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América  
USDE – Departamento de Energia dos Estados Unidos da América  
UV – Radiação Ultravioleta  
UV-Vis – Ultravioleta Vísivel  
V – Volume.....(mL, L)  
VLE – Valor limite de exposição.....(ppm)  
v/v – Relação volume de composto por volume total  
v.v.m. – Volume de ar por volume de cultura e por minuto  
Zn – Zinco  
 $\lambda$  – Comprimento de onda.....(nm)

## 1. Introdução

### 1.1. Biocombustíveis

Presentemente, na maioria dos países, a matriz energética baseia-se no consumo de combustíveis fósseis, isto é, derivados de petróleo, gás natural e carvão mineral. No entanto, este modelo apresenta o grave problema de assentar em recursos não renováveis, e portanto finitos, cuja exploração e utilização gera graves impactes ambientais, para além do facto de estes recursos serem explorados e produzidos em poucos países, deixando uma maioria de países importadores e consumidores mais vulneráveis do ponto de vista económico e político. A necessidade de encontrar alternativas que permitam reduzir a dependência dos combustíveis fósseis é urgente. Neste contexto, surge o interesse pelos biocombustíveis.

O combustível de origem biológica, não fóssil, é designado de biocombustível, sendo normalmente produzido a partir de uma ou mais espécies vegetais. Os produtos agrícolas mais usados na produção de biocombustível em escala comercial são a cana-de-açúcar, mamona, soja, canola, babaçu, mandioca, milho e beterraba (World Energy Council, 2009).

Os biocombustíveis podem ser usados como combustíveis isoladamente ou em misturas com os combustíveis convencionais (gasóleo e gasolina). Os exemplos mais comuns nesta categoria são o biodiesel, o bioetanol e o biometanol.

Nesta nova era de preocupação ambiental, cresce a importância das energias renováveis “limpas”. De entre estas, os biocombustíveis são uma aposta da União Europeia (UE), e de Portugal em particular, para reduzir as emissões de gases poluentes para a atmosfera, em especial o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que provocam o chamado efeito de estufa. A UE tomou a iniciativa e promoveu há alguns anos, campanhas com vista a encorajar o desenvolvimento das energias renováveis, com o objectivo de combater as alterações climáticas e reduzir a dependência dos combustíveis petrolíferos.

Em Portugal, esta matéria é regulada pelo Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de Março, que transpõe a Directiva nº 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho. Segundo este decreto, *“a promoção da produção e da utilização de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis no espaço comunitário é uma importante medida para, no âmbito do desenvolvimento sustentável da Comunidade Europeia, reduzir a dependência das importações de energia e influenciar o mercado dos combustíveis no sector dos transportes e, deste modo, a segurança do abastecimento energético a médio e longo prazo”*.

De facto, um dos principais problemas ambientais resulta da utilização de combustíveis fósseis, como a gasolina e o gasóleo, que geram emissões de gases poluentes para a atmosfera, em especial de dióxido de carbono. O petróleo é derivado de matéria orgânica

dos meios marinho e terrestre, fossilizada e composto por uma mistura de hidrocarbonetos, os quais após a queima, geram essencialmente CO<sub>2</sub> e água, para além de outro tipo de poluentes, os quais são lançados na atmosfera. Este processo contribui para o designado efeito de estufa e conseqüentemente o aquecimento global, para além da acidificação (p.ex. devido aos SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>), algo que acontece em menor dimensão no caso dos biocombustíveis. No processo de crescimento das espécies vegetais para a produção de biocombustíveis, o CO<sub>2</sub> que é captado da atmosfera pelos seres fotossintéticos volta a ser depois devolvido à atmosfera durante a queima do biocombustível. Se for permitido o desenvolvimento de organismos fotossintéticos no volume ou área de colheita, este ciclo não incrementa a concentração de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, e por isso os seres fotossintéticos são considerados neutros do ponto de vista de balanço de carbono. Contudo e apesar de serem muitos os benefícios em relação aos combustíveis fósseis, os biocombustíveis não garantem zero emissões de gases poluentes, até porque há sempre um consumo de energia fóssil na sua produção para o cultivo, transporte, e processamento da biomassa.

Considera-se o processo produtivo tão mais eficiente quanto menor for a emissão de dióxido de carbono. Actualmente a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais eficiente, hoje em dia, para a produção de álcool (bioetanol). Se analisarmos o rendimento que o álcool fornece, comparado com o investimento em energia que foi feito, podemos pensar em redução de emissões de CO<sub>2</sub> de 86-90% em relação ao uso da gasolina. Quanto ao álcool proveniente do milho, a sua queima representa uma redução de emissões da ordem dos 20%. Essa diferença está relacionada com os consumos energéticos na produção do milho. Esta planta não tem a mesma concentração de açúcar que a cana-de-açúcar e requer muito mais fertilizante e mais manutenção pelo facto de ser uma cultura anual. Desta forma, pode-se dizer que a melhor matéria-prima é aquela que representar as maiores reduções nas emissões de gases com efeito de estufa, para além de causar menores impactes ambientais e necessitar de um menor investimento para a sua produção (World Energy Council, 2009).

De acordo com Ferrari e colaboradores (Ferrari *et al.*, 2005), no início deste milénio o consumo de petróleo correspondia a cerca de 30% da energia mundial e deverá representar menos de 5% no final do século, devido ao esgotamento das reservas, mesmo que sejam descobertas novas reservas deste produto.

Neste contexto, os países podem beneficiar com a produção de biocombustíveis, visto que se tornam mais independentes dos fornecedores de petróleo, não ficando sujeitos às variações de mercado, evitando assim a continuidade da escalada de preços do petróleo. Outra vantagem é o desenvolvimento rural que se pode gerar, em particular nos países em desenvolvimento e que têm grande potencial para a produção de biomassa.

Apesar de todas as vantagens que os biocombustíveis representam, é muito difícil estes

conseguirem substituir totalmente a gasolina e o gasóleo. As limitações prendem-se com o facto de competirem por solo e por matéria-prima usados para a produção de alimentos. Nenhum país tem na sua política de fomento de uso dos biocombustíveis a intenção de proceder completamente a essa substituição, tanto mais que seria impossível providenciar todo o solo necessário para a produção das matérias-primas a utilizar.

Segundo o Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de Março é considerado biocombustível todo o combustível líquido ou gasoso para transportes, produzido a partir de biomassa.

Assim, e perante o mesmo documento legal, são considerados biocombustíveis:

- **Bioetanol:** *etanol produzido a partir de biomassa e/ou da fracção biodegradável de resíduos para utilização como biocombustível;*
- **Biodiesel:** *éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel, para utilização como biocombustível;*
- **Biogás:** *gás combustível produzido a partir de biomassa e/ou da fracção biodegradável de resíduos, que pode ser purificado até à qualidade do gás natural, para utilização como biocombustível, ou gás de madeira;*
- **Biometanol:** *metanol produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;*
- **Bioéter dimetílico:** *éter dimetílico produzido a partir de biomassa para utilização como biocombustível;*
- **Bio-ETBE (bioéter etil-ter-butílico):** *ETBE produzido a partir do bioetanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-ETBE considerada como biocombustível de 47%;*
- **Bio-MTBE (bioéter metil-ter-butílico):** *combustível produzido com base no biometanol, sendo a percentagem volumétrica de bio-MTBE considerada como biocombustível de 36%;*
- **Biocombustíveis sintéticos:** *hidrocarbonetos sintéticos ou misturas de hidrocarbonetos sintéticos produzidos a partir de biomassa;*
- **Biohidrogénio:** *hidrogénio produzido a partir de biomassa e/ou da fracção biodegradável de resíduos para utilização como biocombustível;*
- **Óleo vegetal puro produzido a partir de plantas oleaginosas:** *óleo produzido por pressão, extracção ou métodos comparáveis, a partir de plantas oleaginosas, em bruto ou refinado, mas quimicamente inalterado, quando a sua utilização for compatível com o tipo de motores e os respectivos requisitos relativos a emissões.*

Os biocombustíveis são apontados como uma das soluções no curto prazo, em termos de redução das emissões de GEE (Gases de Efeito Estufa) nos transportes. No entanto tanto a sua produção, como comercialização continuam envoltas em debate. A utilização de terras

agrícolas para produções energéticas levanta inúmeras preocupações, das quais se destacam as de ordem social e económica, devido à falta de alimentos ou subida especulativa dos preços face à crescente procura de biocombustíveis, e as de ordem ambiental, já que a utilização intensiva dos solos, além de promover a libertação de GEE em maior escala que num terreno em pousio, pode supor um elevado uso de pesticidas e de outros químicos, para além de também serem utilizados combustíveis fósseis para a sua produção.

A União Europeia está atenta e procura uma estratégia para o uso sustentável da biomassa e dos biocombustíveis em particular, em conjunto com a agricultura tradicional, o que se reflectiu por exemplo na publicação da Directiva 2009/28/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, no Decreto-Lei nº 141/2010, de 31 de Dezembro e no Decreto-Lei nº 117/2010, de 25 de Outubro. Essa estratégia assenta na utilização dos recursos locais e de importações, suportada por alterações na legislação que regulamenta a qualidade dos combustíveis com vista a aumentar a percentagem de biocombustíveis passível de ser incorporada nos combustíveis fósseis (actualmente limita-se em 5% em teor energético, valor a ser gradualmente aumentado até à meta de 10% para 2019 e 2020). Assim, ao contrário do que chegou a ser anunciado pelo Governo português, numa estratégia de antecipação às metas comunitárias impostas para 2020, a taxa de 10% de introdução de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários não foi alcançada em 2010 (Diário Económico, 2011). Os vários cenários traçados pela Agência Europeia do Ambiente (EEA) apontam para o uso de 7 a 13% de terra arável, para as culturas menos intensivas em termos de uso do solo – adequadas para a produção de bioetanol – e entre 11 e 25% para as culturas mais intensivas em termos de uso do solo – adequadas para a produção de biodiesel (EEA, 2010).

Em termos de políticas para a promoção do uso de biocombustíveis, a União Europeia propõe duas: a isenção fiscal dos biocombustíveis (polémico porque os biocombustíveis de origem europeia não são competitivos com os importados, caso haja isenção total de impostos) e a obrigatoriedade das empresas de combustíveis convencionais terem de incorporar nos seus combustíveis um certo teor de biocombustíveis. Esta medida só será possível mediante a alteração da Directiva sobre a Qualidade dos Combustíveis. “*A incorporação de biocombustíveis em combustíveis fósseis deve realizar-se em condições que assegurem a sua qualidade e homogeneidade e que permitam determinar o seu conteúdo em biocombustíveis*” (Decreto-Lei nº 117/2010).

De acordo com o Decreto-Lei nº 62/2006, os biocombustíveis podem ser disponibilizados na forma de: “*biocombustíveis puros ou em concentração elevada em derivados do petróleo (em conformidade com normas específicas de qualidade para os transportes); biocombustíveis misturados com derivados do petróleo (em conformidade com as normas*

comunitárias EN 228 e EN 590 que estabelecem as especificações técnicas aplicáveis aos combustíveis para transportes); ou líquidos derivados de biocombustíveis (como o bio-ETBE)”. Assim fica evidente a urgência da alteração das normas de qualidade Europeias para permitir uma maior incorporação de biocombustíveis.

A problemática do cumprimento das metas estabelecidas pela União Europeia, e que se traduzem nas metas nacionais, leva a que tenha sido prevista a imposição de “quotas mínimas de incorporação obrigatória destes combustíveis nos carburantes de origem fóssil” (caso o ritmo da introdução de biocombustíveis seja inferior ao previsto) – Decreto-Lei nº 117/2010. No entanto essa decisão é da responsabilidade dos “ministros responsáveis pelas áreas das finanças, do ambiente, da economia, da agricultura e dos transportes”.

Outra das medidas previstas foi a isenção de Impostos sobre os Produtos Petrolíferos (ISP). O Decreto-Lei nº 66/2006, de 22 de Março, previa a isenção total de ISP (até 5 anos) aos pequenos produtores dedicados até ao máximo global de 15000 toneladas e parcial entre 0,28 e 0,30 €/litro para o restante, no entanto este incentivo foi abolido em Novembro de 2010.

A comercialização de biocombustíveis apenas pode ser feita por entidades titulares de entrepostos fiscais de produtos petrolíferos ou energéticos se os biocombustíveis estiverem destinados a ser incorporados em produtos petrolíferos. A excepção verifica-se no caso da introdução no mercado ser feita no estado puro e para os “Pequenos Produtores Dedicados”, figura criada (cujo reconhecimento está sujeito a Despacho Conjunto do Director-Geral de Energia e Geologia – DGEG – e do Director-Geral das Alfândegas e dos Impostos Especiais sobre o Consumo – DGAIEC) para as empresas cuja produção máxima anual seja de 3000 toneladas de biocombustível ou de outros combustíveis renováveis (com origem no “aproveitamento de matérias residuais” ou de “produtos menos poluentes”, com base em “processos inovadores”, ou em “fase de demonstração”) e que destinem a sua produção a “frotas e consumidores cativos”, devidamente identificados e com os quais tenha sido celebrado contrato. Este regime previa a não obrigatoriedade de entrega dos impostos, mas exigia a comunicação trimestral à DGEG e à DGAIEC da quantidade de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis bem como a identificação dos consumidores e das respectivas quantidades que lhes tivessem sido entregues.

O Decreto-Lei nº 66/2006 promovia ainda a “utilização de biodiesel em frotas de transportes públicos” exigindo no entanto que a sua “incorporação nos carburantes fósseis fosse superior a 10%” e aliviava, neste caso, as empresas fornecedoras da obrigação de entregarem as suas produções às empresas petrolíferas para posterior comercialização.

Ainda de acordo com o Artigo 9º do Decreto-Lei nº 62/2006, para os retalhistas é obrigatória a fixação nos postos de venda se a percentagem de biocombustíveis, em mistura com derivados de petróleo, exceder “5% de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), ou 5%

de bioetanol”.

A incorporação de mais de 5% de biocombustíveis em mistura com o gasóleo “em veículos não adaptados” fica sujeita ao “controlo dos efeitos da sua utilização no ambiente” (emissões para a atmosfera).

O mercado português, à semelhança do Europeu, é caracterizado por um elevado número de veículos a gasóleo (29% do consumo é em gasolina e 62% em gasóleo), ficando assim limitado o uso de bioetanol e havendo uma procura muito maior de biodiesel, bem patente na redacção do Decreto-Lei nº 66/2006. Para a produção de biodiesel utilizam-se essencialmente culturas oleaginosas, das quais é extraído o óleo que posteriormente é submetido a uma esterificação (Figura 1.1) ou transesterificação. As culturas oleaginosas tradicionais são a colza e o girassol.

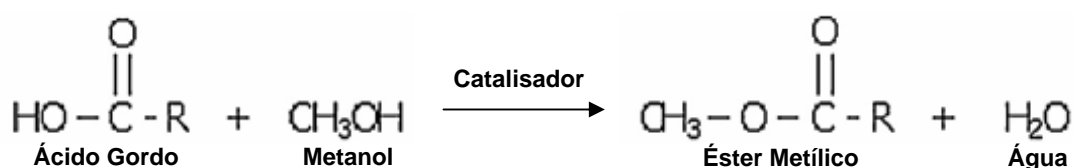


Figura 1.1 – Reacção geral de esterificação (Adaptado de Corro, 2010).

Para a produção de bioetanol utilizam-se derivados da fermentação das culturas ricas em celulosas, em açúcar e em amido e, em Portugal, as culturas interessantes são os cereais (cevada, milho, trigo, centeio, sorgo) e tubérculos (beterraba sacarina, batata).

A nível nacional, a meta de 5,75% foi aumentada (anunciado pelo anterior Primeiro Ministro, José Sócrates) para 10% em 2010 (o que, como já foi referido, não foi atingido, levando a um reajuste dos valores indicados) e será possível a comercialização de combustíveis com uma incorporação até 20% de biocombustíveis. Portugal, que até 2007 não atingiu nenhuma das metas intermédias da EU, comprometeu-se quase a duplicar o objectivo da EU até ao final do ano de 2008, voltando a falhar nesse capítulo (Direcção Geral de Energia e Geologia – DGEG, 2009). Nesse horizonte a Agência Europeia do Ambiente indica como estimativa para o uso intensivo do terreno arável, para Portugal, 50%, o que resulta em 250000 ha disponíveis para culturas bioenergéticas, mas a decrescer para 2020 e 2030. Em termos de potencial energético, a EEA aponta para 0,7 Mtep de base agrícola, 0,2 Mtep à base de resíduos florestais e 2,7 Mtep à base de resíduos (EEA, 2010).

Actualmente as grandes produtoras nacionais de biocombustíveis – biodiesel – são a Iberol e a Torrejana, detida pela Tracopol (base soja e colza). Estas duas empresas têm uma capacidade instalada de 200 mil toneladas/ano que é adquirida na totalidade pela Galp. Isto permitiu atingir os 3% de incorporação. Novos projectos da Martifer (detentora da Prio Energy que produz 100 mil toneladas/ano), Enersis e Galp permitiram atingir o valor de cerca de 700.000 toneladas/ano. No entanto, em termos de área agrícola necessária, a

GALP aponta para 700.000 e 1.000.000 de ha, o que não existe disponível em Portugal, a não ser que terrenos destinados à produção alimentar sejam convertidos para produção energética. Atendendo aos 250.000 ha apontados pela EEA, a importação de biocombustíveis é inevitável (DGEG, 2009).

Deve-se fazer uma chamada de atenção para os vários projectos de produção de energia eléctrica a partir de biomassa e de biogás que não entram nas contas dos biocombustíveis, mas sim nas da electricidade de origem renovável, o que pode levar a que o potencial energético dos biocombustíveis seja “desviado” para a produção de energia eléctrica. Em 2007 a DGE indicou 6 GWh de produção eléctrica apenas a partir do biogás. Acrescente-se que a eficiência de obtenção de energia (calor ou electricidade) através da queima de biomassa é dramaticamente superior à utilização dessa mesma biomassa na produção de biocombustíveis, o que quer dizer que o potencial de redução de emissões de GEE é muito superior na produção de energia. Isto leva a que muitos se oponham aos biocombustíveis como forma de reduzir as emissões de GEE.

Os portugueses estão alheios a estas problemáticas e seriam extremamente sensíveis a soluções que permitissem baixar a sua factura com os combustíveis, atendendo à evolução do preço dos combustíveis fósseis. A face mais conhecida dos biocombustíveis está patente nos transportes públicos onde abundam os veículos movidos a biodiesel (percentualmente) e alguns a gás natural. Seria muito interessante sensibilizar os cidadãos para a utilização dos biocombustíveis e as suas vantagens, bem como a problemática das emissões de GEE nos transportes.

### **1.1.1. Valor energético de algumas culturas agrícolas**

A utilização de culturas agrícolas, ainda que atractiva do ponto de vista ambiental, deve tomar em consideração diversos outros aspectos. Na verdade, não devem ser esquecidos os impactos negativos que podem resultar do desvio da utilização de culturas alimentares para fins energéticos, o da alteração da utilização do solo de culturas alimentares para culturas energéticas, ou ainda da desflorestação intensiva que pode parecer atraente para os produtores de culturas energéticas.

Na Tabela 1.1 encontra-se um breve resumo do potencial energético de diversas culturas agrícolas na área de influência da Comunidade Europeia.

Tabela 1.1 – Valor energético de algumas culturas agrícolas. (www.portal-energia.com)

Cultura	PCI (GJ/TDM)	TDM/ha	GJ/ha
Milho (total da planta)	16,5	13	214,5
Espiga de milho	21,4	9,5	203,3
Triticale/cevada (total da planta)	16,4	12	196,8
Trigo (total da planta)	17	10	171
Choupo (rotação curta)	18,5	7,5	138,8
Salgueiro (rotação curta)	18,4	7,5	138
Espiga de trigo	17	6	102
Espiga de cevada	17	5,5	93,5
Colza	26,5	2,5	66,3
Girassol	26,5	2,5	66,3
Beterraba	1,9	14	26,6

PCI – poder calorífico inferior

TDM – toneladas de matéria seca

GJ – gigajoules

**Nota:** Os valores apresentados são possíveis apenas em alguns países europeus, onde o clima o permite, já que exige colher toda a produção. É considerada a situação ótima.

Analisando a referida tabela, pode-se concluir que embora o poder calorífico inferior das culturas oleaginosas seja superior, a produtividade energética específica das culturas cerealíferas é substancialmente superior.

### 1.1.2. Potencial de produção de bioetanol

A importância da dependência nacional da importação de fontes energéticas tem vindo a ser reduzida, quer devido ao investimento em energias renováveis não convencionais, como a eólica, quer devido ao investimento em fontes de bioenergia. O potencial bioenergético nacional é importante para a redução da dependência internacional.

Na Tabela 1.2 apresenta-se uma estimativa da produção nacional de bioetanol, distribuída pelas diversas províncias nacionais, a partir de distintas culturas. Analisando a referida tabela, verifica-se que a região nacional com maior potencial para a produção de bioetanol é o Alentejo e, dentro desta região a cultura energética que mais contribui é o trigo. Verifica-se também que, a cultura energética que mais contribui a nível nacional para a produção de bioetanol é o milho.

Tabela 1.2 – Potencial de produção nacional de bioetanol. (www.biblioteca.universia.net)

Cultura energética	Entre Douro e Minho	Trás-os-Montes	Beira litoral	Beira Interior	Ribatejo e Oeste	Alentejo	Algarve	Regiões Autónomas	Total Portugal t/ha
Trigo	30	7016	873	989	11924	114427	1272	33	136564
Cevada	2	94	30	28	1088	6341	268	-	7851
Milho	64131	5097	688864	15781	120502	61470	2790	1001	339636
Batata	8514	15232	27502	6971	18834	2251	1707	6614	87625
Beterraba Sacarina	-	-	982	-	30463	12597	-	747	44789
<b>Total t/ha</b>	<b>72677</b>	<b>27439</b>	<b>98251</b>	<b>23769</b>	<b>182811</b>	<b>197086</b>	<b>6037</b>	<b>8395</b>	<b>616465</b>

t/ha – tonelada por hectare

### 1.1.3. O futuro dos biocombustíveis

Os biocombustíveis estão divididos entre os de primeira e os de segunda geração, sendo os primeiros os demonstrados comercialmente como capazes de serem produzidos e os segundos, os que se encontram sob investigação. Os de primeira geração usam sementes de óleos vegetais (ex.: colza, soja, girassol, palma, jatropha, mamona) e são obtidos por esterificação ou por hidrogenação seguido de isomerização. Os de segunda geração, que utilizam biomassa, são obtidos por um processo BTL – Fischer Tropsch, encontrando-se em fase de investigação e desenvolvimento. Actualmente pensa-se que a segunda geração não será capaz de entrar no mercado antes de 2015-2020, o que leva a uma certa pressão para favorecer a sua entrada de uma forma mais rápida. No entanto a Associação Europeia de Biomassa (AEBIOM) não apoia esta ideia porque não há razões para acreditar que a segunda geração – subprodutos da madeira, palha e resíduos – não seja economicamente viável sem os apoios extra, pelo simples facto de estar disponível em grandes quantidades. Este último facto não parece ser verdade, o que pode distorcer o mercado e acima de tudo reduzir a eficiência de processos energéticos que até à data consumiam esses recursos de uma forma diferente (exemplo da queima de madeira para processos industriais *versus* a queima de biocombustíveis) (EEA, 2010).

Os biocombustíveis de primeira geração – biodiesel produzido a partir de óleos vegetais e bioetanol produzido a partir de cana-de-açúcar ou milho (para citar os mais conhecidos) – ainda vão sendo capazes de satisfazer o mercado, mas a questão da eficiência energética está no topo das preocupações. Produções agrícolas como a cana-do-açúcar são

apontadas como altamente eficientes em termos do seu conteúdo energético enquanto outras formas, como a soja, colza ou o girassol, não o são. Os biocombustíveis de segunda geração são fabricados a partir de resíduos agrícolas, isto é, matérias-primas não alimentares, o que se poderá vir a tornar numa alternativa ambientalmente viável para o desenvolvimento económico de países pobres.

No panorama nacional há que referir o que está a ser feito em termos de Investigação nesta área e aí os intervenientes principais são o IST (Instituto Superior Técnico de Lisboa), o INETI (Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, presentemente denominado de LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia), a UC (Universidade de Coimbra), o INIAP (Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas) e, mais recentemente o ISEP (Instituto Superior de Engenharia do Porto). O foco está no biodiesel, pelas razões já apresentadas, e na forma de o produzir com bases noutras culturas – mais adequadas ao clima mediterrânico – e de outras formas de produção que o tornem economicamente mais viável (National Geographic – Portugal, 2010).

Na questão do bioetanol e do biogás, não houve, até à data, qualquer mudança na estratégia dos fabricantes de automóveis nem da União Europeia para conseguir mudar o cenário do domínio do gasóleo (diesel), nem tão pouco ao nível das máquinas agrícolas, havendo no entanto notáveis exemplos de excepção em bastantes países europeus (Suécia, Itália, Alemanha, entre outros). Seria muitíssimo interessante dispormos de motores que permitissem o uso de bioetanol a 85% e mesmo biodiesel a 100%, para não falar do biogás. Esta medida é apontada pela AEBIOM como fundamental para se atingir uma utilização de 25% de biocombustíveis nos transportes nas próximas décadas (AEBIOM, 2010).

O biogás esteve fora das estratégias energéticas, inexplicavelmente, pois todo o resíduo orgânico produzido (quer por animais quer pelo homem) tem um grande potencial em metano e noutros gases susceptíveis de serem aproveitados sob a forma de biogás ou de outros biocombustíveis. A tecnologia dos digestores já existe há muito tempo, mas a falha de incorporação no produto final – combustível para veículos ou biometano no gás natural – condiciona o seu desenvolvimento. O biometano é um gás produzido através da valorização de resíduos mas só recentemente foi reconhecido que pode vir a desempenhar um papel importante tanto pela possibilidade de redução da dependência energética, quer como um factor relevante na redução de emissões de gases com efeito de estufa. Actualmente, o Decreto-Lei 77/2011, de 20 de Junho, já estabelece o acesso deste gás às redes de transporte, distribuição, assim como à sua comercialização, garantindo que as instalações tenham as características adequadas à sua injeção nas redes.

## 1.2. Biodiesel

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis. Pode ser obtido comumente a partir da reacção química de lipídios, óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool na presença de um catalisador (reacção conhecida como transesterificação – Figura 1.2). Pode também ser obtido pelos processos de craqueamento e esterificação.

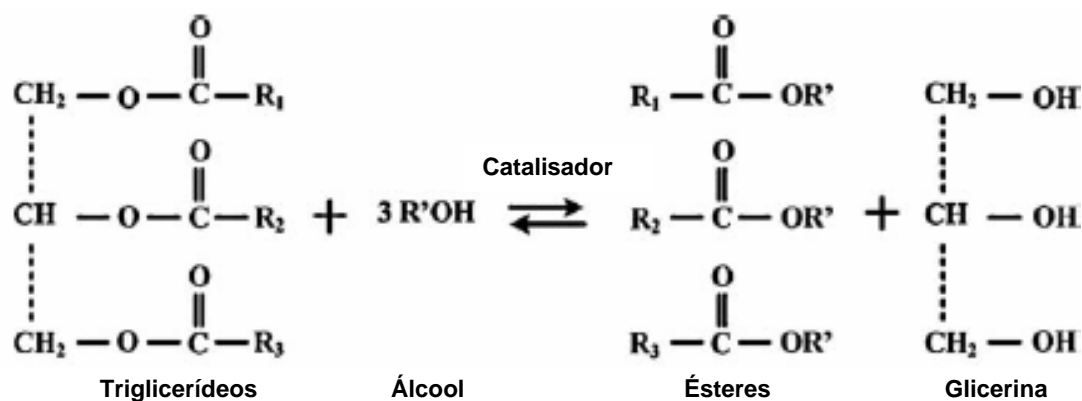


Figura 1.2 – Reacção geral de transesterificação (Adaptado de Mata *et. al.*, 2009).

O biodiesel substitui total ou parcialmente o diesel de petróleo em motores de combustão interna (de camiões, tractores, camionetas, automóveis, etc.) ou estacionários (geradores de electricidade, calor, etc). Pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções (Benjumea *et al.*, 2008).

O nome biodiesel é muitas vezes 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 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até ao biodiesel puro, denominado B100. Geralmente podem-se usar misturas de 20% de biodiesel com 80% de diesel de petróleo (B20) em motores diesel sem modificações. O biodiesel pode também ser utilizado na sua forma pura (B100), mas para isso podem ser necessárias modificações no motor para evitar certos problemas de manutenção e desempenho.

Obviamente, quanto maior a quantidade de biodiesel, mais ambientalmente amigável é o combustível, desde que a matéria-prima não tenha sido obtida à custa da desflorestação intensiva.

Como principais vantagens, o biodiesel apresenta as seguintes (Torvanger e Meadowcroft, 2011):

- É constituído por carbono neutro, ou seja, o combustível tem origem renovável ao invés do diesel fóssil. Desta forma, a sua obtenção e queima não contribuem para o aumento das emissões de CO<sub>2</sub> na atmosfera, neutralizando assim o balanço de

massa entre emissão de gases pelos veículos e absorção dos gases pelas plantas;

- É uma energia renovável. As terras cultiváveis podem produzir uma enorme variedade de oleaginosas como fonte de matéria-prima para o biodiesel;
- Contribui para a geração de empregos no sector primário. Com isso, evita-se o êxodo do trabalhador agrícola, reduzindo a migração para as grandes cidades;
- O seu manuseamento e armazenamento são mais seguros do que o gásóleo convencional;
- Com a incidência de petróleo em poços cada vez mais profundos, muito dinheiro é gasto na sua prospecção e extração, o que torna cada vez mais cara a exploração e refinação das riquezas naturais do subsolo. Surge então necessidade de se explorar os recursos da superfície, abrindo assim um novo nicho de mercado, e uma nova oportunidade de uma aposta estratégica no sector primário.

Como desvantagens podemos considerar (Bozbas, 2005):

- A produção intensiva da matéria-prima de origem vegetal leva a um esgotamento das capacidades do solo, o que pode ocasionar a destruição da fauna e flora, aumentando portanto o risco de erradicação de espécies e o possível aparecimento de novos parasitas, como o parasita causador da malária;
- O balanço de CO<sub>2</sub> do biodiesel não é neutro, mesmo sendo emissor de menos CO<sub>2</sub> que o diesel de petróleo, se for considerada a energia necessária à sua produção, mesmo que as plantas utilizem o carbono da atmosfera: é preciso contabilizar a energia necessária para a produção de adubos, para a locomoção das máquinas agrícolas, para a irrigação, para o armazenamento e transporte dos produtos;
- Não é possível saber com certeza de que modo é que o mercado irá assimilar a grande quantidade de glicerina obtida como subproduto da produção do biodiesel (entre 5 e 10% do produto bruto). A queima parcial da glicerina gera acroleína, um produto suspeito de ser cancerígeno.
- Suspeita-se que poderá provocar uma subida nos preços dos alimentos, ocasionada pelo aumento da procura de matéria-prima para a produção de biodiesel. Como exemplo, podem-se citar alguns factos ocorridos em Portugal, no início de Julho de 2007, quando o milho era vendido a 200 euros por tonelada (152 em Julho de 2006), a cevada a 187 (contra 127), o trigo a 202 (137 em Julho de 2006) e o bagaço de soja a 234 (contra 178).

O debate sobre o balanço energético de biodiesel está ainda em curso. A transição total para os biocombustíveis poderá exigir extensões de terra imensas, se as culturas alimentares tradicionais forem utilizadas (embora culturas não alimentares possam ser

utilizadas). O problema seria especialmente grave para os países com grandes economias, dadas as escalas de consumo de energia com a produção económica (Gouveia *et al.* 2009). Para além disso, pode ser argumentado que podem ser usadas terras inférteis para o cultivo de outras matérias-primas mas, acresce ainda o problema da necessidade de irrigação.

Se forem usadas somente plantas alimentares tradicionais, a maioria das nações (como Portugal) não tem solos agrícolas suficientes para produzir biocombustíveis para os seus veículos. Nações com economias menores (consumo de energia, portanto, menor) e mais terra arável podem estar em situação melhor, apesar de muitas regiões não poderem dar-se ao luxo de desviar a terra da produção de alimentos.

Na Tabela 1.3 apresenta-se uma breve comparação entre distintas culturas oleaginosas típicas. Conforme se pode concluir da análise da referida tabela, o uso de algas como fonte de matéria-prima para a produção do biodiesel poderia poupar as terras férteis e a água doce destinadas à produção de alimentos.

O rendimento em combustível produzido a partir de algas não foi ainda determinado com exactidão, mas o DOE (*Department of Energy*, dos Estados Unidos da América) tem relatado a produção de algas como sendo 30 vezes mais rentável em energia por hectare do que as culturas do solo como a soja. Rendimentos de 36 toneladas/hectare são referidos por Ami Ben-Amotz, do Instituto de Oceanografia de Haifa, que possui agricultura de algas em escala comercial há mais de 20 anos (Strahan, 2008). Contudo, para que se estabeleça esta prática urge que se faça um estudo extenso com cepas que possam ter o seu teor de lípidos e qualidade dos mesmos adequados para biocombustíveis, de forma a maximizá-lo. Em relação ao sistema de cultivo, torna-se necessário aumentar a produtividade em biomassa, sem aumentar os custos de instalação e operação. Ainda existem alguns problemas para que a produção em grande escala de biodiesel a partir de microalgas seja um sucesso, como existir demasiada água para separar, o que é um processo simples mas caro, ou como o rebentamento da parede celular e a extracção dos lípidos, tudo processos conhecidos mas que têm de ser melhorados. “Para que isto resulte, vai ter de ser mais barato do que o gasóleo. Se for um só cêntimo mais caro do que o custo do petróleo por litro, não temos hipóteses” (Marcus Gay, Greenfuel).

Tabela 1.3 – Comparação entre microalgas e outras matérias-primas base do biodiesel (Adaptado de Mata *et al.*, 2009).

Planta	Teor em óleo (% p/p de óleo na biomassa)	Rendimento em óleo (L +óleo/ha ano)	Uso do solo (m <sup>2</sup> ano/kg biodiesel)	Productividade em biodiesel (kg biodiesel/ha ano)
Milho ( <i>Zea mays L.</i> )	44	172	66	152
Cânhamo ( <i>Cannabis sativa L.</i> )	33	363	31	321
Soja ( <i>Glycine max L.</i> )	18	636	18	562
Jatropha ( <i>Jatropha curcas L.</i> )	28	741	15	656
Camelina ( <i>Camelina sativa L.</i> )	42	915	12	809
Canola/Colza ( <i>Brassica napus L.</i> )	41	974	12	862
Girassol ( <i>Helianthus annuus L.</i> )	40	1070	11	946
Rícino ( <i>Ricinus communis</i> )	48	1307	9	1156
Palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor em óleo)	30	58700	0.2	51927
Microalga (teor médio em óleo)	50	97800	0.1	86515
Microalga (alto teor em óleo)	70	136900	0.1	121104

Estudos ecotoxicológicos sobre diesel e biodiesel conduzidos por Lapinskiene *et al.*, (2006) revelaram que as análises de toxicidade, indicadas pela intensidade de respiração e actividade de desidrogenases do solo, mostraram que o combustível biodiesel não é tóxico até uma concentração de 12 % (v/v) e que o diesel exhibe propriedades tóxicas em concentrações superiores a 3 % (v/v). O estudo revelou também que o nível de biodegradação completa para o diesel foi de 61 % mas, para o biodiesel foi de 80 %, e conclui que o diesel contém mais materiais que são resistentes à oxidação microbológica e que não são utilizados para a produção de húmus. Além disso, o biodiesel contém materiais que são facilmente acessíveis como fonte de energia e mais facilmente biotransformados.

Um estudo realizado em 1988 pelos Departamentos de Agricultura (USDA) e de Energia (USDE) dos Estados Unidos da América sobre a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pelo biodiesel produzido a partir de soja, desde a produção agrícola até à queima pelo motor, e do diesel de petróleo, desde a extracção à combustão, concluiu que as emissões de CO<sub>2</sub> pelo B20 e pelo B100 foram, respectivamente, 15,7 % e 78,5 % menores do que as do gasóleo (Agarwal *et al.*, 2011). Entretanto, esse mesmo estudo concluiu que a emissão de alguns gases, tais como os óxidos de nitrogénio (NO e NO<sub>2</sub>), é maior durante a combustão do biodiesel, aumentando a sua soma em 2,6 % na mistura B20 e em 13,3 % no B100. A emissão de ácido clorídrico (HCl) aumenta em 2,8 % no B20 e em 13,6 % no B100.

A toxicidade de um composto para o solo depende das características de cada tipo de solo, e da sua concentração e actividade. Lapinskiene *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade do biodiesel e do diesel no solo em concentrações de 1 a 13 % de massa do solo. Num solo contaminado com biodiesel, as actividades respiratórias dos microrganismos e das enzimas desidrogenases cresceram até uma concentração de 13 %. Num solo contaminado com gasóleo, essas actividades aumentaram até a concentração de 3 % e diminuíram para

concentrações maiores, ficando abaixo da actividade do solo não contaminado (controle), indicando toxicidade do óleo diesel quando a concentração é superior a 3 %.

### 1.3. Algas

As algas compreendem vários grupos de seres vivos aquáticos e tendencialmente autotróficos, ou seja, que produzem a energia necessária ao seu metabolismo através da fotossíntese. A maior parte das espécies de algas são unicelulares e, mesmo as mais complexas – algumas com tecidos diferenciados – não possuem raízes, caules ou folhas verdadeiras (Lee, 2008). A disciplina da biologia que estuda as algas é a *ficologia* ou algologia, tradicionalmente uma especialização da botânica.

Embora tenham, durante muito tempo, sido consideradas como *plantas*, apenas as algas verdes têm uma relação evolutiva com as plantas terrestres (Embriófitas); os grupos restantes de algas representam linhas independentes de desenvolvimento evolutivo paralelo (Lee, 2008).

#### 1.3.1. Algas Procariontes (do Reino Monera ou bactéria)

As "algas azuis" ou cianofíceas, modernamente classificadas como Cyanobacteria, como uma divisão dentro do domínio Eubacteria ou "verdadeiras" bactérias (ou reino Monera), foram dos primeiros seres vivos a aparecerem na Terra, com o mais antigo fóssil datado em 3800 milhões de anos (Pré-Câmbrico) e acredita-se que tenham tido um papel preponderante na formação do oxigénio da atmosfera (Richmond, 2004).

Estes organismos têm uma estrutura procariótica, sem uma verdadeira membrana nuclear e com os pigmentos fotossintéticos dispersos no citoplasma.

#### 1.3.2. Algas Eucariontes (Reino Protista e Reino Plantae)

Todos os restantes grupos de algas são eucarióticos (com uma verdadeira membrana nuclear) e realizam a fotossíntese usando organelos chamados plastos. Os cloroplastos (presentes nas algas verdes e pertencentes aos cromoplastos) contêm DNA e têm uma estrutura semelhante às cianobactérias – pensa-se que evoluíram a partir de uma alga mais "primitiva" que era endossimbionte (Richmond, 2004).

Há diferentes tipos de cloroplastos, que podem refletir diferentes eventos endosimbóticos. Existem três grupos de organismos que têm plastos "primários" (Krienitz, 2009):

- As algas verdes e as plantas terrestres;
- As algas vermelhas (*Rhodophyta*);
- As algas do tipo *Glaucophyta*.

Nestes grupos, o cloroplasto é rodeado por duas membranas que se pensa terem origem na cianobactéria endossimbionte. As glaucófitas possuem cloroplastos muito

primitivos (denominados "canelos"), muito semelhantes aos das cianobactérias e mantendo ainda a camada de peptidoglicano entre as duas membranas. Os rodoplastos das algas vermelhas têm uma pigmentação mais próxima das cianobactérias actuais. As algas verdes e as plantas "superiores" tem cloroplastos com clorofilas *a* e *b*, esta última encontrada em algumas cianobactérias, mas não na maioria. Estes factos indicam que provavelmente estes três grupos de plantas têm origem num antepassado comum – uma espécie de alga com uma cianobactéria endossimbionte.

A Tabela 1.4 apresenta os pigmentos fotossintéticos e as substâncias de reserva de alguns grupos de algas.

Tabela 1.4 – Grupos, pigmentos fotossintetizantes e substâncias de reserva das algas. (Guimarães *et al.*, 2009)

Grupo	Pigmentos fotossintéticos	Substância de reserva
Euglenófitas	Clorofilas A e B	Paramido
Pirrófitas (Dinoflagelados)	Clorofilas A e C	Óleo e amido
Crisófitas (Diatomáceas)	Clorofilas A e C	Crisolaminarina
Feófitas (algas pardas)	Clorofilas A e C	Laminarina e manitol
Rodófitas (algas vermelhas)	Clorofilas A e D	Amido da florídeas
Clorófitas (algas verdes)	Clorofilas A e B	Amido

Há dois outros grupos de organismos com clorofila *b* – as *Euglenophyta* e as *Chlorarachniophyta* – mas, nestes grupos, os cloroplastos são rodeados, respectivamente, por três e por quatro membranas, que se pensa serem provenientes do próprio endossimbionte. Os cloroplastos dos *Chlorarachniophyta* contêm um nucleomorfo reduzido, que poderia ser um resíduo do núcleo do endossimbionte, o que indica que provavelmente são originários de uma alga eucarionte que já possuía cloroplastos. Há uma teoria segundo a qual os cloroplastos da *Euglena* têm apenas três membranas por terem sido adquiridos por mizocitose em vez de fagocitose (El Gamal, 2009).

Os restantes grupos de algas têm todos cloroplastos com clorofilas *a* e *c* – que não são conhecidas em nenhum procarionte, nem nos cloroplastos primários. No entanto, algumas semelhanças genéticas entre estes grupos e as algas vermelhas sugerem que existem relações evolutivas entre todos. Estes grupos são os seguintes:

- *Heterokonta* (divisão *Heterokontophyta*) incluem as algas douradas, diatomáceas e algas castanhas;
- *Haptophyta* ou *Prymnesiophyta*, que têm pigmentos semelhantes aos *Heterokonta*, mas a estrutura das células é muito diferente, tipicamente com dois flagelos

ligeiramente diferentes um do outro e um outro organelo chamado "haptonema", que é superficialmente semelhante a um flagelo, mas que difere no arranjo dos microtúbulos e no comportamento (pertencem a este grupo os cocolitoforídeos);

- *Cryptomonadina* (ou *Cryptophyta*);
- Dinoflagelados.

Nos primeiros três destes grupos (também conhecidos pelo nome Chromista), o cloroplasto possui quatro membranas e, no grupo *Cryptomonadina* mantém o nucleomorfo. O cloroplasto do dinoflagelado típico possui apenas três membranas, mas este grupo apresenta considerável variabilidade nos cloroplastos. O grupo *Apicomplexa*, a que pertence o plasmódio da malária, e que é relacionado com os dinoflagelados (de acordo com o projecto Árvore Evolutiva, estes seres encontram-se agrupados nos Alveolata), não possui cloroplastos típicos, mas sim plastídeos (Harwood e Guschina, 2009).

As "algas verdes" são modernamente agrupadas em duas linhagens dentro do reino *Plantae* (ou *Viridaeplantae*):

- Um grupo que inclui as classes *Prasinophyta* (que está ainda em estudo, pensando-se que pode ser parafilética), *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae* (anteriormente considerada a ordem *Microthmaniales*), e *Ulvophyceae*.
- O outro grupo, o clade (ou seja, que contém um ancestral) *Streptophyta*, inclui as ordens *Chlorokybales*, *Klebsormidiales*, *Zygnematales*, *Charales*, *Coleochaetales* e os embriófitos, ou seja, as plantas terrestres. Estas ordens estavam anteriormente colocadas dentro duma classe *Charophyceae*, dentro da tradicional divisão *Chlorophyta*, mas estudos filogenéticos recentes levaram a adoptar a presente classificação.

A organização de algas também é chamada de talo (estrutura vegetativa não diferenciada). Muitas espécies de algas são seres unicelulares, vivendo livres na água e movendo-se com o auxílio de flagelos ou por movimento *amebóide*. Algumas espécies não têm movimento próprio e ocorrem no meio ambiente quer na forma *cocóide* (de *coccus*, o tipo mais simples de bactéria), quer na forma *capsóide*, cobertas de mucilagem. No entanto, mesmo as algas unicelulares agrupam-se por vezes em formas coloniais, móveis ou não. Alguns destes tipos de organização, que podem ocorrer ao longo do ciclo de vida duma espécie, são (Duperon *et al.*, 1982):

- Colónia simples – pequenos grupos de células móveis (por exemplo: *Volvox*);
- Colónia palmelóide – grupo de células sem mobilidade embebidas em mucilagem;
- Filamento – uma fiada de células unidas, quer pelas paredes celulares, quer por mucilagem, por vezes ramificados;

- Colónia parenquimatosa – grandes grupos de células formando um pseudo-talo, por vezes com diferenciação parcial de tecidos;

As algas castanhas, vermelhas e alguns grupos de algas verdes apresentam indivíduos com tecidos totalmente diferenciados em órgãos parcialmente equivalentes aos das plantas verdes. O corpo do indivíduo é chamado talo e em muitos casos apresenta um estipe, parecido com um caule, mas sem tecidos vasculares, um órgão de fixação que se pode assemelhar a uma raiz, e lâminas foliares, parecidas com verdadeiras folhas. As formas mais complexas encontram-se na ordem *Charales*, que aparentemente são os parentes mais próximos das plantas verdes (Guschina *et al.*, 2006).

As algas desempenham um importantíssimo papel na biosfera – aliás, sempre desempenharam, basta recordar que elas foram as primeiras produtoras de oxigénio no nosso planeta. Actualmente, elas são as responsáveis pela maior parte da produção nos ecossistemas aquáticos formando a base da cadeia alimentar dos mesmos como produtores primários.

As macroalgas marinhas, ou seja, as que têm dimensões maiores que as do plâncton vegetal (fotossintético), como as algas verdes, vermelhas e castanhas, podem, por vezes colonizar grandes porções do substrato, fornecendo refúgio, alimento e mesmo substrato secundário a uma grande variedade de organismos, tornando-se num microhabitat específico dentro de um ecossistema maior (Duperon *et al.*, 1982).

Algumas algas são excelentes indicadores de determinados problemas ecológicos. Por exemplo, quando se vê um tapete de alfaces-do-mar (*Ulva lactuca*) ou de algas azuis numa zona, isso é normalmente indicador de poluição por excesso de efluentes nitrogenados.

Por vezes, as algas planctónicas multiplicam-se demasiado – normalmente em condições de temperatura óptima e de nutrientes abundantes – formando o que se chama "flor-da-água". Este fenómeno pode ser uma indicação de poluição, como referido anteriormente, e pode levar à destruição da biodiversidade de uma massa de água (lago, estuário), uma vez que as algas que morrem são decompostas, levando à diminuição do oxigénio dissolvido na água. Mas pode também ser um fenómeno natural, que desaparece quando a temperatura muda e quando os nutrientes são esgotados pelas algas; nesse caso, a população planctónica normalmente regressa aos níveis normais (Krienitz, 2009).

Um fenómeno semelhante mas mais grave acontece quando, associada à poluição, a grande acumulação de nutrientes provoca um aumento desenfreado das algas Pirrofíceas (Alga Cor-de-Fogo), formando o que se chama maré vermelha. Nesta situação, estes organismos produzem toxinas avermelhadas e podem provocar a morte de uma grande quantidade de peixes e mesmo de aves ou outros animais que deles se alimentam (Krienitz, 2009).

Além da sua importância ecológica, muitas espécies de algas têm importância económica para o homem. A grande variedade de microalgas permite a sua utilização para os mais diversificados fins; algumas são utilizadas como fonte de energia, outras como alimento para consumo humano, existindo também as que são utilizadas como matéria-prima para a produção de espessantes: de certas Feofícias extrai-se a algina, utilizada na indústria alimentar e de cosméticos; de algumas Rodofícias, obtém-se o ágar, usado na indústria farmacêutica e para a produção de meios de cultura de fungos e bactérias em laboratórios. Muitas diatomáceas, que produzem um esqueleto silicioso, são utilizadas na indústria de tintas e de filtros. As microalgas apresentam ainda teores de proteínas superiores aos encontrados no trigo, arroz e legumes; contêm esteróis e vários compostos antioxidantes; a *Spirulina sp.* auxilia o sistema imunitário, promovendo o equilíbrio saudável nos humanos; a *Chlorella sp.* pode aumentar a concentração de hemoglobina. São ainda relatadas várias propriedades anti-cancerígenas. As microalgas são frequentemente usadas como alimento de animais aquáticos e podem também ter aplicações ambientais, servindo de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuais e de gases de combustão (Mata *et al.*, 2009).

#### 1.4. Microalgas

Em biologia aquática, denominam-se de microalgas as algas unicelulares, embora estas possam estar associadas em colónias, por vezes de grandes dimensões.

Usa-se este termo em oposição a macroalga, que refere normalmente as algas com órgãos diferenciados, como as algas vermelhas e as algas castanhas.

As microalgas, não só perfazem uma grande parte do plâncton – e têm sido consideradas responsáveis pela maior parte do oxigénio da atmosfera terrestre – mas também são a base da cadeia trófica dos bentos (ou bêtôn), que ao contrário do plâncton, vive no substrato (fixos ou não).

O grupo de microalgas mais importante é o das diatomáceas, mas em certos sistemas, principalmente em água doce, as clorofíceas ou cianofíceas podem ser dominantes.

Numa época em que o mundo responsabiliza os biocombustíveis pela crise alimentar, produzir biocombustíveis a partir de microalgas parece ser a solução ideal contra a crise alimentar mundial, numa altura em que continua a ser cada vez mais urgente encontrar alternativas ao petróleo.

As microalgas serão seguramente uma das soluções ideais, senão a única. Elas conseguem assegurar duas coisas importantes: sequestram o CO<sub>2</sub>, necessário para crescer, e no final ainda produzem o óleo para biodiesel ou outros produtos (como hidratos de carbono para bioetanol, pigmentos, etc.). É difícil conjugar estas duas propriedades em outras culturas.

Quando se pretende efectuar o cultivo de microalgas tem de se ter em conta um conjunto de factores para que a cultura tenha êxito, destacando-se a energia luminosa (se esta energia for artificial, as lâmpadas devem produzir o máximo de radiação eficaz, isto é, que venha a ser absorvida pelos pigmentos das microalgas, uma vez que a luz solar tem um espectro muito mais completo do que a luz artificial), a temperatura, a concentração de sais minerais e vitaminas no meio de cultura, quantidade de água, turbulência e pH.

Porquê optar pelas algas em detrimento do milho ou do girassol?

Quando estamos a produzir microalgas não estamos a produzir nada que seja necessário para a alimentação e essa produção pode ser feita em qualquer tipo de terreno, inclusivamente em zonas áridas, não competindo com a utilização dos solos férteis pelas culturas alimentares. Apesar disso, há que considerar a necessidade de fazer chegar água a essas zonas áridas porque, por muito pouca água que seja consumida, efectivamente a cultura é feita em meio aquoso.

As microalgas são microrganismos que se reproduzem de uma forma exponencial (Figura 1.3) e cuja duplicação se faz num dia ou dia e meio, desenvolvendo-se em qualquer tipo de água – salgada, salobra, residual – e necessitam de pouco mais do que luz solar e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). É possível observar definidamente 5 fases distintas de crescimento:

- 1 – Fase de Indução ou Fase Lag:** 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 existir uma redução na densidade celular.
- 2 – Fase Exponencial ou Fase Log:** A biomassa duplica-se sucessivamente em intervalos regulares de tempo. A cultura apresenta uma elevada e constante (exponencial) velocidade (taxa) de crescimento.
- 3- Fase de Diminuição do Crescimento Relativo ou Desaceleração:** 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 consequente 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:** 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.

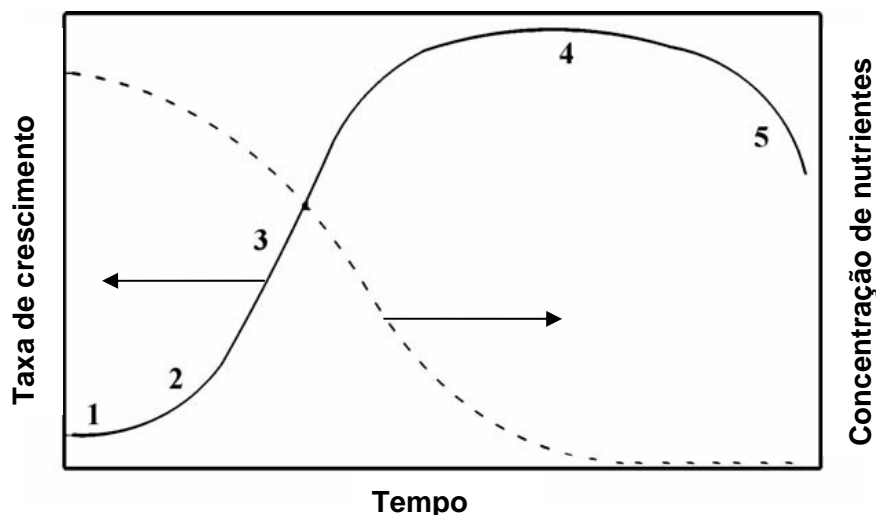


Figura 1.3 – Representação esquemática da curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor fechado (linha sólida) e da concentração de nutrientes (linha tracejada) (Adaptado de Mata *et al.*, 2009).

Para serem seleccionadas como matéria-prima de excelência para a produção de biocombustíveis, as microalgas devem obedecer a critérios relevantes para o fim em causa, tais como:

- Ter uma elevada produtividade específica em óleo (quantidade produzida por unidade de área e por período de cultivo);
- A cultura deve apresentar um balanço energético favorável;
- O seu preço deve ser compatível com a necessidade de fornecer biodiesel com preços equivalentes aos do diesel;
- O óleo deve ter características tais que o biodiesel produzido satisfaça as especificações regulamentares e dos motores;
- O subproduto de extracção do óleo deve ser aproveitado, sempre que possível.

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas e químicas similares às de óleos vegetais e, por isto elas podem ser consideradas como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel.

O cultivo de microalgas apresenta várias características interessantes, destacando-se o menor consumo de água quando comparado ao do cultivo de plantas; pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais; apresentam muito maior eficiência fotossintética do que os vegetais e são fixadoras eficientes de CO<sub>2</sub>.

Em relação ao rendimento em óleo, o das microalgas é pelo menos quinze vezes superior ao de palma, que é o de maior produtividade. Existe uma estimativa de produção de óleo de

microalgas de 15000 a 30000 L/km<sup>2</sup>. Há ainda a possibilidade de aproveitar os resíduos, como por exemplo, por fermentação a metano (Benjumea *et al.*, 2007). Outra vantagem das microalgas é que, contrariamente a todas as outras culturas podem ser produzidas ininterruptamente em qualquer altura do ano e podem, por isso, ser colhidas todos os dias.

Apesar das inúmeras vantagens, o processo de obtenção de óleo através de microalgas apresenta uma desvantagem que, no final, torna o óleo duas vezes mais caro do que o óleo obtido através de qualquer outra oleaginosa: As microalgas crescem num meio aquoso, que não pode ter uma densidade de microalgas muito alta porque senão a radiação não as atinge de forma homogénea em todo o fotobioreactor; tal implica a necessidade de ter alguma diluição no meio, logo há que concentrar e, a concentração (que é feita geralmente com uma centrífugadora) é um processo que não é barato, uma vez que é altamente consumidor de energia.

O custo da produção de microalgas ainda é bastante elevado por falta de produção ao mesmo nível da procura, isto porque toda a produção mundial nunca foi pensada para este fim. Assim, se existir um investimento massivo em tecnologia e um grande “know-how” na produção de microalgas, é crível que nas próximas dezenas de anos, talvez nem tanto, existam frotas de automóveis ou aviões movidos a biodiesel que pode ser obtido a partir de microalgas.

As microalgas assumem extrema importância neste campo, visto que para a produção de biocombustíveis são necessários grandes volumes de oleaginosas, uma vez que das sementes se extrai em média 80% de farinha e apenas 20% de óleo. Daí, a importância das microalgas, que podem ser uma solução duplamente eficaz para a produção de biocombustíveis, tanto a nível das produtividades lipídicas que permitem atingir, quanto a nível dos custos de produção, que podem ser minimizados desde que sejam desenvolvidas tecnologias rentáveis para a colheita das microalgas e recuperação dos óleos produzidos, ou para a produção directa de biocombustíveis, seguida da sua recuperação da biomassa algal residual.

Na Tabela 1.5 pode-se observar que a produção mundial de microalgas foi pensada essencialmente para fins alimentares, aquacultura e cosmética, ou ainda para fins medicinais, que têm condicionantes de preço completamente diferentes das dos biocombustíveis.

De acordo com os especialistas, a produção de microalgas numa escala industrial poderá levar à substituição da colza e soja, duas oleaginosas usadas para produzir os biocombustíveis, dado os seus interessantes teores e produtividades lipídicas (Tabela 1.6), comparativamente com os daquelas oleaginosas convencionais, e a qualidade do biodiesel que pode ser produzido com o óleo das microalgas (Tabela 1.7). No entanto é de salientar que o teor de lípidos depende muito das condições de cultura.

Tabela 1.5 – Alguns produtos obtidos a partir de microalgas (Adaptado de Barbosa, 2003).

	<b>Produto</b>	<b>Aplicações</b>
		Alimentos naturais
Biomassa	Biomassa	Alimentos funcionais Aditivos alimentares Aquicultura Condicionador do solo
Corantes e Antioxidantes	Xantofilas (astaxantina e cantaxantina) Luteína Beta-caroteno Vitamina C e E	Aditivos alimentares Cosméticos
Ácidos gordos	Ácido araquidónico – ARA Ácido eicosapentaenóico – EPA Ácido decosaheptaenóico – DHA Ácido gama-linolênico – GCA Ácido linoléico – LA	Aditivos alimentares
Enzimas	Superóxido dismutase – SOD Fosfoglicerato quinase – PGK Luciferase e Luciferina Enzimas de restrição	Alimentos naturais Pesquisa Medicina
Polímeros	Polissacarídeos Amido Ácido poli-beta-hidroxibutírico – PHB Peptídeos Toxinas	Aditivos alimentares Cosméticos Medicina
Produtos especiais	Isótopos Aminoácidos (prolina, arginina, ácidos aspártico) Esteróis	Pesquisa Medicina

As microalgas têm uma produtividade que pode ser 200 a 300 vezes superior à das restantes oleaginosas e a área ocupada na sua produção é cerca de 100 vezes inferior à das culturas tradicionais. Ou seja, são precisos apenas 2.500 hectares para abastecer uma refinaria de 250 mil toneladas contra a necessidade de 500 mil hectares para a produção de soja e de 250 mil hectares para a produção de girassol com o mesmo propósito (GreenCyber, 2009).

Segundo os peritos, por cada tonelada de microalgas produzidas, são consumidas duas toneladas de CO<sub>2</sub>, ou seja, dez a vinte vezes mais do que o que é consumido pelas restantes oleaginosas, como a colza, soja, girassol e palma (GreenCyber, 2009).

Pode-se então afirmar que, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas será uma revolução total, que pode por em causa o negócio tradicional das petrolíferas. É que, em caso de sucesso, o recurso a microalgas permitirá produzir biodiesel a 20 cêntimos o litro, face aos actuais 40 cêntimos que custam a fazê-lo nas refinarias de petróleo (Gallagher, 2010). Este preço está intimamente ligado ao preço das matérias-primas, uma vez que elas são responsáveis por 60 a 75 % do custo total do biodiesel.

Tabela 1.6 – Conteúdo e produtividades lipídicas de algumas microalgas (adaptado de Mata *et al.*, 2009).

Espécie de microalga marinha e de água doce	Teor líidico (% massa seca)	Produtividade lipídica (mg/L/dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g/L/dia)	Produtividade específica de biomassa (g/m <sup>2</sup> /dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0-31,0	-	-	11,5-17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	0,02	3,0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	0,07	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041	0,91-0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	1214	2,00-7,70	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20	0,57-0,95
<i>Chlorella sp.</i>	10,0-48,0	42,1	0,02-2,5	1,61-16,47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	2,90-3,64	72,5/130
<i>Chlorella</i>	18,0-57,0	18,7	-	3,50-13,90
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	0,28	-
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34	1,6-3,5/20-38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0	-	0,12	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67,0	33,5	-	-
<i>Euglena gracilis</i>	14,0-20,0	-	7,70	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-	0,05-0,06	10,2-36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0-40,0	-	0,32-1,60	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1-33	37,8	0,08-0,17	-
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0-56,0	60,9-76,5	0,17-0,51	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-124,0	0,37-0,48	-
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12,0-53,0	37,6-90,0	0,17-1,43	1,9-5,3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0	-	-
<i>Nitzschia sp.</i>	16,0-47,0	-	-	8,8-21,6
<i>Oocystis pusilla</i>	10,5	-	-	40,6-45,8
<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4	0,16	-
<i>Pavlova lutheri</i>	35,5	40,2	0,14	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	44,8	0,003-1,9	2,4-21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,0-18,8/60,7	34,8	0,36-1,50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	-	0,004-0,74	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9-18,4	35,1	0,19	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26	2,43-13,52
<i>Skeletonema sp.</i>	13,3-31,8	27,3	0,09	-
<i>Skeletonema costatum</i>	13,5-51,3	17,4	0,08	-
<i>Spirulina platensis</i>	4,0-16,6	-	0,06-4,3	1,5-14,5/24-51
<i>Spirulina máxima</i>	4,0-9,0	-	0,21-0,25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20,6	17,4	0,08	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,5-23,0	27,0-36,4	0,12-0,32	19
<i>Tetraselmis sp.</i>	12,6-14,7	43,4	0,30	-

Tabela 1.7 – Características do biodiesel de oleaginosas e de microalgas (Teixeira *et al.* 2010).

Características do Biodiesel	Oleaginosa					
	Soja	Girassol	Canola	Mamona	Amendoim	Microalga
Ponto de Inflamação (°C)	149	152	159	153	149	115
Índice de acidez max. (mg KOH/g)	0,30	0,50	0,33	0,80	0,60	0,37
Massa específica 20 °C (kg/m <sup>3</sup> )	876	877	878	913	872	864

Os estudos conduzidos por Gouveia e Oliveira (2009) revelaram que as espécies *Neochloris oleabundans* (uma microalga de água doce – Figura 1.4) e *Nannochloropsis sp.* (uma microalga marinha – Figura 1.5-a) se mostraram adequadas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis devido ao seu alto teor em óleo (29,0 e 28,7%, respectivamente). Porém, se o objectivo for produzir óleo para biodiesel a partir de uma única espécie, a *Scenedesmus obliquus* (uma microalga de água doce – Figura 1.5-b) apresenta o perfil de ácidos gordos mais adequado.

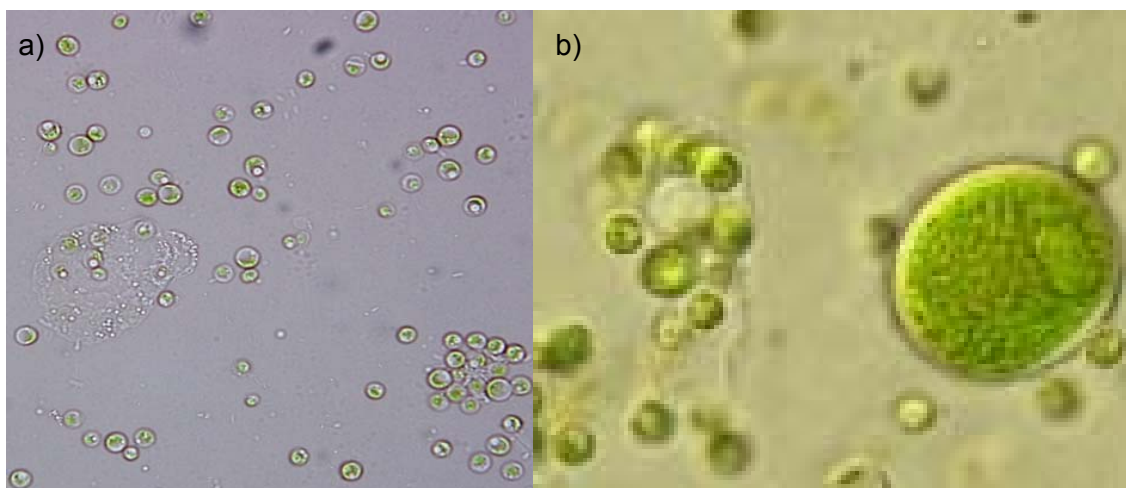


Figura 1.4 – Imagem de microscópio óptico de *Neochloris oleabundans*: a) Ampliação de 1000x (Renimel *et al.*, 2010); b) Ampliação de 10000x (Renimel *et al.*, 2010).

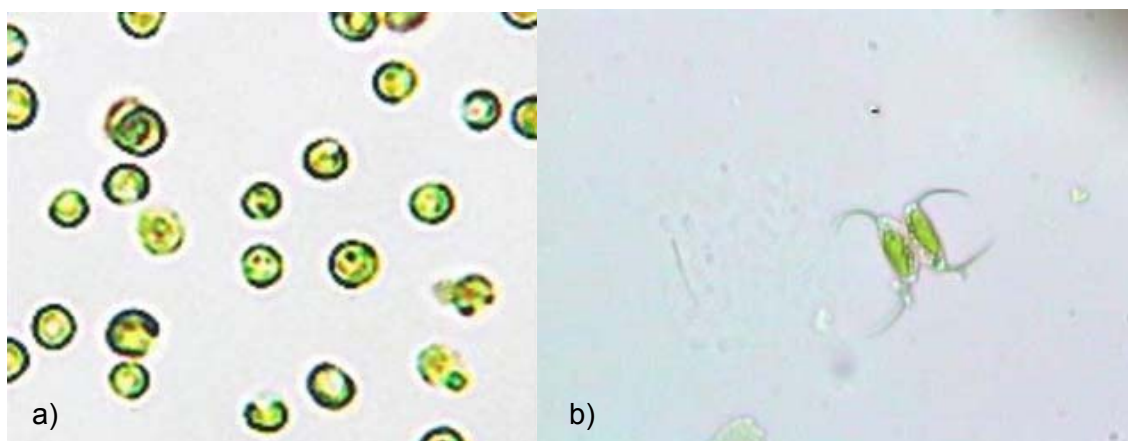


Figura 1.5 – Imagem de microscópio óptico de microalgas com ampliação de 1000x: a) *Nannochloropsis sp.* (Seambiotic); b) *Scenedesmus obliquus* (Morgan, 2005).

No entanto, também as microalgas *Neochloris oleabundans*, *Nannochloropsis sp.* e *Dunaliella tertiolecta* (Figura 1.6-a)) podem ser utilizadas se os seus óleos forem associados com outros óleos de microalgas e/ou óleos vegetais. Estudos de Miao & Wu (2006) revelaram que a microalga *Chlorella protothecoides* (Figura 1.6-b)) se desenvolve

heterotroficamente, apresentando alto conteúdo lipídico (55%) nas células e elevada produção de biomassa em menor tempo do que as culturas oleaginosas tradicionais.

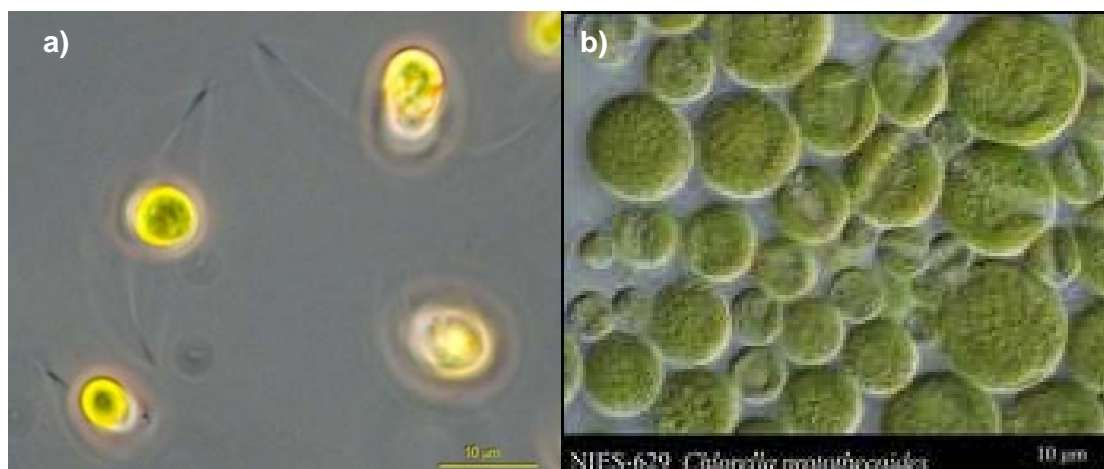


Figura 1.6 – Imagem de microscópio óptico na ampliação de 1000x: a) *Dunaliella tertiolecta* (Patterson, 2009); b) *Chlorella protothecoides* (JNIESAD).

Pelos motivos anteriormente expostos, as microalgas são uma fonte praticamente inesgotável, apresentam uma produtividade superior à das plantas terrestres, alimentando-se de dióxido de carbono. Estas características fazem das microalgas uma matéria-prima interessante tanto em termos energéticos como no auxílio às indústrias poluentes. Contudo, só o factor escala poderá torná-las num sucesso, sendo que para os biocombustíveis reduzirem a dependência do consumo de combustíveis fósseis o seu conteúdo energético deve ser superior à energia necessária para os produzir.

## 2. Parte Experimental

### 2.1 Descrição Geral

O objectivo deste estudo foi o de otimizar as condições de crescimento de biomassa algal de modo a maximizar a produção de óleo a utilizar como matéria-prima para biocombustíveis.

Para o efeito, foi avaliada a influência da concentração de diferentes factores nutricionais, isto é, da concentração de macro e micronutrientes, quer nas curvas de crescimento, quer na produtividade lipídica de duas estirpes microalgais.

As estirpes de microalgas usadas neste estudo são provenientes da SAG (EPSAG, algoteca alemã).

Numa primeira etapa procedeu-se à manutenção das estirpes existentes no laboratório. Para isso foi adicionado o meio novo apropriado em cada uma das espécies, sendo que algumas também foram inoculadas em meio ágar, de modo a prolongar a sua preservação sem necessidade de tanto esforço de manutenção, uma vez que o meio líquido exige uma manutenção mais frequente.

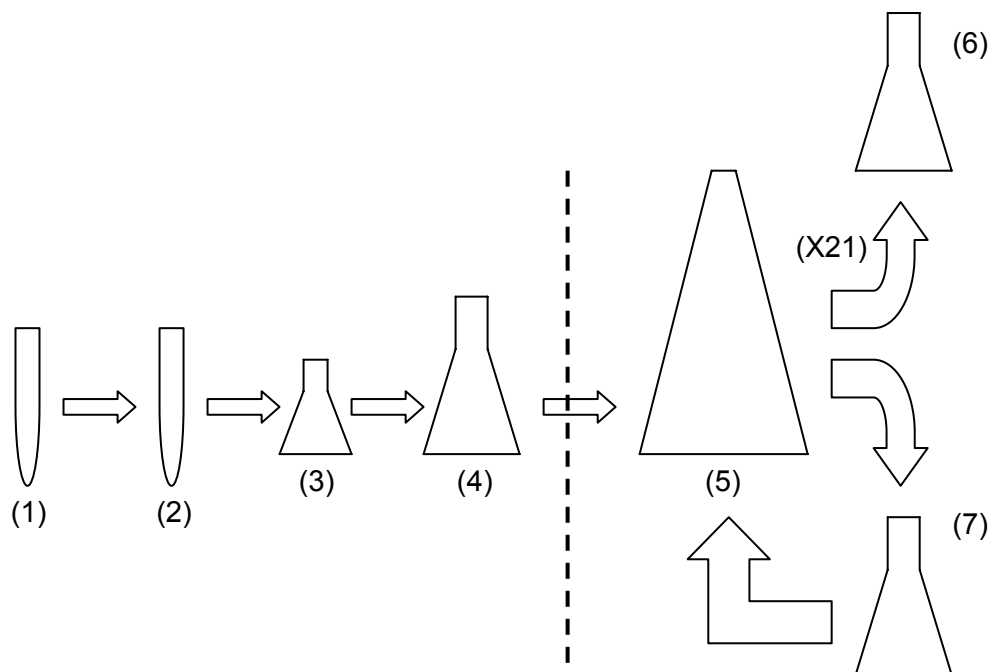
De seguida foram seleccionadas as duas estirpes a testar, uma de água salobra (*Tretaselmis subcordiformis*, SAG 161.1a) e outra de água salgada (*Dunaliella tertiolecta*, SAG 13.86). Inicialmente a inoculação destas espécies foi feita em tubos de ensaio para aclimação e aumento da densidade celular e posteriormente em *erlenmeyers* de 250 mL. A inoculação para os tubos de ensaio da estirpe *Tretaselmis subcordiformis* foi realizada com a técnica da raspagem (uma vez que se encontrava em meio ágar) e a da *Dunaliella tertiolecta* foi realizada através de uma diluição cepa algal: meio (uma vez que esta se encontrava em meio líquido).

O meio de cultura utilizado para o cultivo da *Tretaselmis subcordiformis* foi o mesmo que para a *Dunaliella tertiolecta*, sendo que como a *Tretaselmis subcordiformis* é uma espécie de água salobra, foi reduzida a concentração de NaCl para metade. Assim, o meio de cultura utilizado foi o Artificial Seawater Medium with Vitamins (conforme descrito no Anexo B), que é o indicado pela SAG para as estirpes usadas.

### 2.2 Procedimento

Após o período de aclimação, iniciou-se a reprodução das estirpes mencionadas (processo realizado em triplicado), com parâmetros físicos fixados (Tabela 2.1), verificando-se que a *Dunaliella tertiolecta* apresentou níveis de crescimento muito superiores, potenciando a produtividade lipídica.

O estudo passou então a incidir apenas nesta estirpe, visto que era de todo conveniente ter um crescimento bastante rápido. O cultivo foi efectuado em *erlenmeyers* de 250 mL, 1 L e 5 L, servindo este último como cultura mãe para as inoculações necessárias. A Figura 2.1 exemplifica o processo de repicagem.



**Legenda:**

- (1) – Tubo de ensaio com cepa algal (cultura monoespecifica de microalgas proveniente da SAG, perfeitamente assépticas e mantida em condições que possibilitem o desenvolvimento lento da cultura).
- (2) – Tubo de ensaio replicado.
- (3) – Erlenmeyer de 250 mL replicado.
- (4) – Erlenmeyer de 1 L replicado.
- (5) – Cultura mãe de 5 L.
- (6) – Erlenmeyers de 1 L com as culturas do estudo (220 mL de cultura de (5) + 780 mL de meio novo).
- (7) – Erlenmeyer de 1L (200 mL de cultura de (5) + 800 mL de meio novo) que vai originar nova cultura mãe.

Figura 2. 1 – Esquema explicativo da repicagem efectuada.

O cultivo de *Dunaliella tertiolecta* 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.

Como referido anteriormente, foram fixados alguns parâmetros físicos, de modo a permitir controlar as condições experimentais e a reproduzir o estudo. Na Tabela 2.1 são indicados os valores dos parâmetros que foram fixados.

Tabela 2.1 – Parâmetros físicos fixados em cada tipo de reservatório de cultivo no estudo.

Parâmetro	Tubos de ensaio	Erlenmeyers (250 mL)	Erlenmeyers (1L e 5 L)
Temperatura	25 °C ± 2 °C	25 °C ± 2 °C	25 °C ± 2 °C
Intensidade Luminosa	2500 lux	5000 lux	5000 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

O material usado em todos os ensaios era semelhante, de modo a reduzir e minimizar possíveis alterações nas condições de cultivo.

Assim, antes de cada utilização todo o material usado foi lavado em água corrente com detergente e lixívia, passado por água destilada, fervido durante 30 minutos e colocado em câmara de fluxo laminar sob radiação UV durante 2 h (Figura 2. 2). Excepção das tampas de borracha dos erlenmeyers e dos tubos de arejamento que, devido à sua baixa resistência a elevadas temperaturas somente foram submetidos a fervura durante 5 minutos, sendo as restantes etapas iguais. Foram ainda feitas rolhas de algodão para os tubos de ensaio, rolhas estas que foram desinfectadas com álcool etílico e colocadas na câmara de fluxo laminar. Estes procedimentos tentam eliminar, ou pelo menos minimizar, que possíveis organismos entrem em competição com as microalgas.



Figura 2. 2 – Câmara de fluxo laminar.

A intensidade de radiação luminosa foi medida com um luxímetro, os tubos de ensaio foram posicionados de forma a receberem 2500 lux e os cultivos em erlenmeyer 5000 lux (Figura 2. 3), ambos em fotoperíodos de 12:12 horas, controlados por um temporizador automático. A inoculação das microalgas foi efectuada em câmara de fluxo laminar e o cultivo foi efectuado sobre bancadas e com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes “luz dia” (Figura 2. 4).

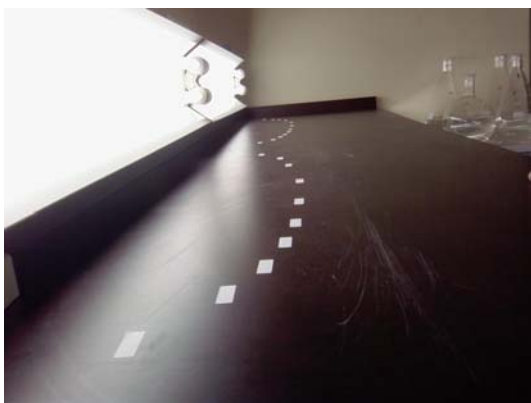


Figura 2. 3 – Curva de intensidade luminosa 5000 lux.

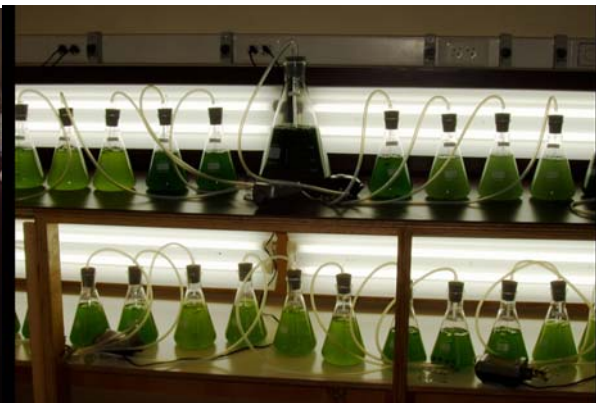


Figura 2. 4 – Cultivo de microalgas onde é possível observar diferentes conjuntos de estirpes.

### 2.3 Materiais e Métodos

Os meios de cultura utilizados (ver Anexo B) foram preparados com reagentes p.a. da marca MERCK, de modo a diminuir a variabilidade e aumentar a precisão no controlo das condições de crescimento.

Os reagentes foram pesados numa balança digital com precisão  $\pm 5 \times 10^{-4}$  g (OHAUS Pioneer TM) e as soluções foram misturadas com recurso a agitação magnética. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (CRUMA 870-FL) em condições assépticas. O pH do meio de cultura foi fixado em  $7,7 \pm 0,15$ , encontrando-se assim dentro da gama considerada óptima que é de 7,5 a 8,5. Esta gama óptima pode ser confirmada na Figura 2. 5, uma vez que geralmente as plantas e algas utilizam  $\text{HCO}_3^-$  em vez de  $\text{CO}_2$ , devido à maior disponibilidade desse composto.

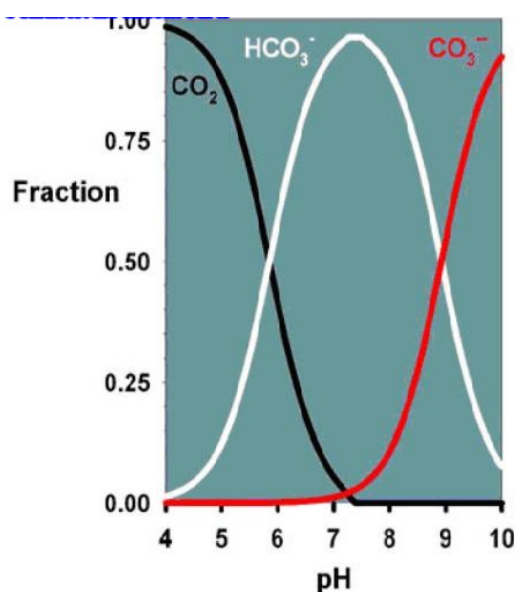


Figura 2. 5 – Gráfico de variação de pH vs fracção molar. (REEF- Aquariofilia Marinha, 2008)

A monitorização de possíveis contaminações das culturas foi efectuada por controlo visual através de um microscópio óptico, desde a fase de inoculo até ao cultivo em *erlenmeyers* de 5 L.

Realizou-se o seguinte procedimento para traçar a curva de calibração Absorvância (Abs) vs Biomassa seca (mg/L) (ver Anexo C):

- Crescimento no volume de 1 L de cultura até à fase estacionária;
- Colheita da biomassa húmida por centrifugação (Ort alresa, Digicen) a 4000 rpm durante 15 minutos;
- Liofilização da biomassa húmida (realizado no RAIZ – Instituto de investigação de pasta e papel, grupo Portucel/Soporcel).
- Pesagem de diferentes massas da biomassa liofilizada numa balança digital de precisão  $\pm 5 \times 10^{-5}$  g (KERN ALJ 220-4), para preparar soluções padrão com diferentes concentrações.
- As leituras foram efectuadas em duplicado, sendo a leitura realizada num comprimento de onda de 685 nm, para o qual a absorvância era máxima (espectrofotómetro DR 2800 – Hach LANGE) (ver Anexo D).

Quanto ao estudo propriamente dito, foram efectuados ensaios em triplicado (*erlenmeyers* de 1 L), fazendo-se variar a concentração de nutrientes (10 e 20 vezes). Os macronutrientes ensaiados foram o magnésio (Mg), o potássio (K), o azoto (N, sob a forma de Nitrato) e o

fósforo (P), e os micronutrientes foram o manganês (Mn), o zinco (Zn), o ferro (Fe) e o cobalto (Co).

Todas as culturas foram inoculadas com 200 mL da cultura mãe e, a avaliação do crescimento das culturas foi efectuada diariamente através da leitura da absorvância por espectrofotometria UV-Vis. A fase estacionária era atingida quando os valores de absorvância estabilizavam, procedendo-se à colheita.

As concentrações de biomassa algal foram obtidas com base na curva de calibração Abs vs biomassa seca (mg/L) (ver Anexo A).

Quando a cultura se encontrava em fase estacionária procedia-se à sua colheita. Assim, a biomassa era centrifugada, catalogada e armazenada no frio ( $-20 \pm 5$  °C).

Posteriormente a biomassa foi descongelada de modo a dela se extrair o óleo. O método usado foi o de Bligh e Dyer (1959). Testou-se também a utilização do hexano como solvente, em substituição do clorofórmio. O procedimento foi o seguinte:

- Tarar os tubos da centrífuga numa balança digital de precisão  $\pm 5 \times 10^{-5}$  g (KERN ALJ 220-4).
- Pesar a biomassa algal húmida nos tubos de centrífuga previamente tarados.
- Determinar a massa de água ( $m_{\text{água}} = 0,71 \times m_{\text{biomassa húmida}}$ ), isto porque cerca de 71 % da biomassa algal húmida é água (ver Anexo E). Aproximar  $m_{\text{biomassa húmida}}(\text{g}) \approx V_{\text{biomassa húmida}}(\text{mL})$ , considerando  $\rho_{\text{água}} = \rho_{\text{biomassa húmida}} = 1$  g/mL, uma vez que uma grande quantidade da biomassa algal húmida é água.
- A 1ª extracção é feita com (1:2:0,8 em volume) clorofórmio:metanol:água (as proporções são corrigidas tendo em conta a fracção de água na biomassa algal húmida ser de 71%). Adicionar ao tubo de centrífuga com a biomassa algal húmida  $V_{\text{clorofórmio}}(\text{mL}) = 0,8875 \times V_{\text{biomassa húmida}}(\text{mL})$ , em seguida adicionar  $V_{\text{metanol}}(\text{mL}) = 1,775 \times V_{\text{biomassa húmida}}(\text{mL})$  e agitar a mistura num vortex (Snijders 34524) a velocidade moderada durante aproximadamente 5 min.
- Colocar os tubos de centrífuga num banho de ultrasons (Crest), durante 20 min a 25°C.
- A 2ª extracção é feita com (2:2:1,8) clorofórmio:metanol:água, seguida de nova agitação em vortex durante 1 min.
- Centrifugar (Ort alresa, Digicen) a 4000 rpm durante 20 min.
- Após centrifugação observam-se 3 fases distintas: a superior (metanólica), a intermédia (biomassa residual) e a inferior (clorofórmica), esta última é aquela onde se encontram os lípidos dissolvidos (Figura 2. 6).
- Pipetar e rejeitar a fase superior, furar a fase intermédia e recolher para um gobelé previamente pesado a fase inferior.

- Deixar evaporar, na hotte, o clorofórmio presente no gobelé e pesar até que não se verifique alteração de massa. Aquando da estabilização do peso e por diferença da massa do gobelé encontra-se a massa de lípidos extraídos (Figura 2. 7).
- Determinar a percentagem de óleo presente na biomassa algal (considerando que segundo este método 10% dos lípidos totais ficam retidos na biomassa residual).
- Repetir todo o procedimento utilizando hexano em substituição do clorofórmio (as 3 fases ficaram invertidas, encontrando-se os lípidos na fase superior - Figura 2. 6).

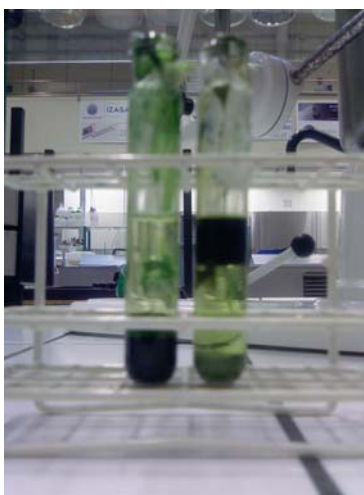


Figura 2. 6 – Tubos de ensaio após centrifugação (esquerda - clorofórmio como solvente; direita – hexano como solvente).



Figura 2. 7 – Gobelés com os óleos, após evaporação dos solventes (vista de cima).

A análise qualitativa da composição do óleo para avaliação da sua adequação à produção de biodiesel conforme a norma EN 14214 não pode ser realizada, uma vez que o ISEP ainda não possui uma matriz para GC de óleos insaturados, saturados e polinsaturados. Além disso, não se produziu óleo suficiente para realizar a referida análise em laboratório

externo.

Finalmente, o programa SIGMASTAT 2.03<sup>1</sup> foi usado para a análise estatística da avaliação do crescimento da *Dunaliella tertiolecta*. Os dados foram primeiro testados para a normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Sempre que os dados obedeciam a estes critérios foi utilizada uma análise univariada (ANOVA) seguida de um teste de Dunnett's comparando com o padrão. Quando os pressupostos não eram verificados utilizou-se uma análise não-paramétrica One Way Anova On Ranks seguido de Dunn's test. Utilizou-se ainda o teste de Tukey precedido de ANOVA quando se pretendiam comparações múltiplas.

---

<sup>1</sup> Teste estatístico realizado no CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Monitorização das culturas

As culturas foram monitorizadas de modo a detectar, caso existissem, contaminações. Esta monitorização, como anteriormente referido, foi efectuada desde a fase de inóculo (em tubo de ensaio) até aos *erlenmeyers* de 5 L. As observações microscópicas eram realizadas 2 vezes por semana, não tendo sido verificado qualquer tipo de contaminação.

Todos os resultados apresentados são referentes à *Dunaliella tertiolecta*, uma vez que, das duas estirpes inoculadas inicialmente, esta revelou-se a mais viável para o estudo em causa, visto apresentar um crescimento bastante superior.

#### 3.2 Avaliação do crescimento da *Dunaliella tertiolecta* por alteração da concentração de macronutrientes no meio de cultura

A Figura 3.1 apresenta as curvas de crescimento da *Dunaliella tertiolecta* expressa em Biomassa seca (mg/L) vs Dias de cultivo para o padrão e para os ensaios com alteração da concentração de macronutrientes. Assim, designaram-se por 10x Mg, 10x K, 10x N, 20x Mg, 20x K e 20x N, respectivamente os ensaios em que as concentrações de magnésio, potássio e azoto foram aumentadas 10 e 20 vezes relativamente às concentrações do ensaio padrão. Os ensaios foram comparados estatisticamente com o padrão no primeiro dia e, no dia em que se atingiu o estado estacionário.

Assim, para o dia 1, não se verificaram diferenças entre os vários ensaios e o ensaio padrão, uma vez que se obteve  $p > 0,05$  em todos os testes. Para o ensaio padrão vs 10x Mg vs 20x Mg obteve-se  $F_{(8,2)} = 1,737$ ,  $p = 0,254$ . Para o ensaio padrão vs 10x K vs 20x K obteve-se  $F_{(8,2)} = 3,637$ ,  $p = 0,092$ . Para o ensaio padrão vs 10x N vs 20x N obteve-se  $F_{(8,2)} = 6,750$ ,  $p = 0,029$  (não existe diferença apesar de  $p < 0,05$  porque este  $p$  foi devido ao 10x N vs 20x N e não ao ensaio padrão que funciona como controlo). Em termos quantitativos obteve-se o valor de 37,33 mg<sub>biomassa seca</sub>/L para o ensaio padrão, para o ensaio 10x Mg obteve-se o valor de 36,44 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 20x Mg obteve-se o valor de 39,90 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 10x K obteve-se o valor de 43,87 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 20x K obteve-se o valor de 44,13 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 10x N obteve-se o valor de 35,92 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, e por último para o ensaio 20x N obteve-se o valor de 44,26 mg<sub>biomassa seca</sub>/L. Repetiu-se o mesmo teste, agora com os valores referentes ao dia 26 (quando se atingiu o estado estacionário), sendo que para este teste se excluiu o valor do terceiro *erlenmeyer* do ensaio padrão, por este ser muito díspar, em contraste com os restantes dois valores. Para o ensaio padrão vs 10x Mg ou vs 20x Mg obteve-se  $F_{(7,2)} = 15,664$ ,  $p = 0,007$ , indicando que o ensaio padrão é diferente do 10x Mg e diferente do 20x Mg; Para o ensaio padrão vs 10x K

vs 20x K obteve-se  $F_{(7,2)} = 0,600$ ,  $p = 0,584$ , não existindo diferenças entre estes ensaios. Para o ensaio padrão vs 10x N ou vs 20x N obteve-se  $F_{(7,2)} = 39,498$ ,  $p < 0,001$ , existindo diferenças significativas entre o ensaio padrão e o ensaio 10x N e entre o ensaio padrão e o ensaio 20x N. Em termos quantitativos obteve-se o valor de  $942 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  para o ensaio padrão, para o ensaio 10x Mg obteve-se o valor de  $750,9 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 20x Mg obteve-se o valor de  $711,7 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 10x K obteve-se o valor de  $875,4 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 20x K obteve-se o valor de  $894 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 10x N obteve-se o valor de  $1497 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , e por último para o ensaio 20x N obteve-se o valor de  $1421 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ .

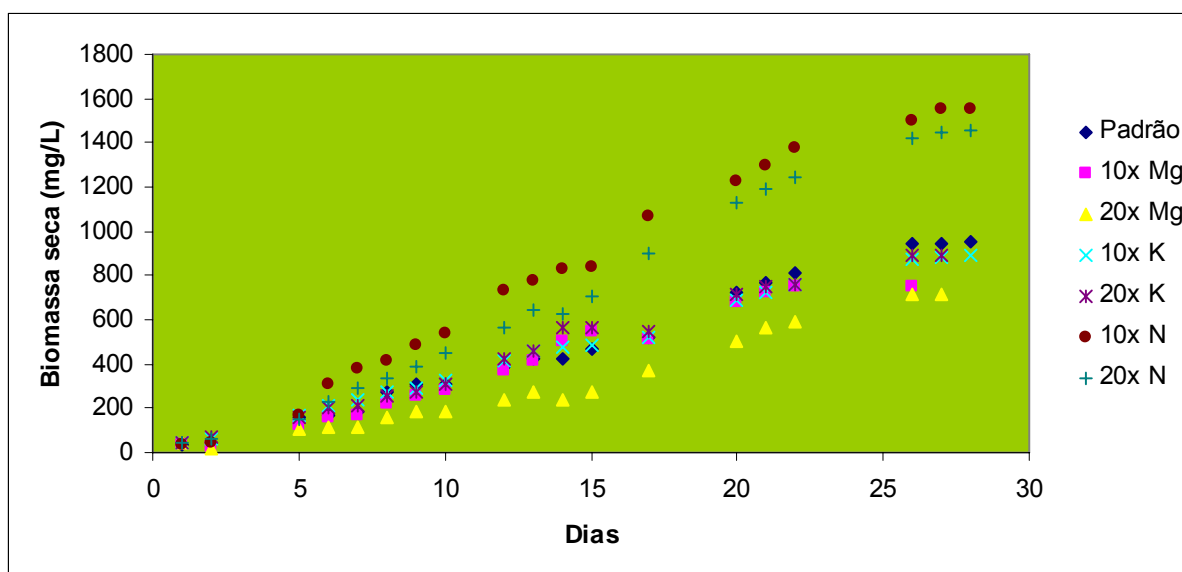


Figura 3.1 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) vs dia para o ensaio padrão e ensaios com adição de Magnésio, Potássio ou Azoto.

Ao observarmos a Figura 3.1, verifica-se que no início todos os ensaios apresentaram valores de concentração muito semelhantes, garantindo assim as mesmas condições para o estudo em causa. É de referir que, em ambos os ensaios realizados com o magnésio, se verificou uma situação excepcional, com a concentração a baixar do dia 1 (10x Mg =  $36,44 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , 20x Mg =  $39,90 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ) para o dia 2 (10x Mg =  $29,00 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , 20x Mg =  $20,03 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ), começando a apresentar um crescimento a partir daqui.

Observa-se ainda que, todos os ensaios atingiram o estado estacionário sensivelmente na mesma altura (passados 26 dias). Também é perceptível que os ensaios com adição de azoto foram aqueles que atingiram uma concentração de biomassa seca mais elevada, significativamente superior ao ensaio com as condições padrão que serviu de controlo. Dentro dos ensaios com adição de azoto, aquele em que se fez variar a concentração 10 vezes, apresentou valores ligeiramente superiores ( $1497 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , cerca de 59%

superior à concentração atingida no ensaio de controlo) ao ensaio em que se variou a concentração deste macronutriente 20 vezes ( $1421 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ), isto passados 26 dias do início deste estudo (dia em que se atingiu o estado estacionário). Nos restantes ensaios (variação da concentração de magnésio e potássio) os valores de concentração de biomassa obtidos, tanto para a variação de concentração 10 vezes como para a de 20 vezes superior, foram apenas ligeiramente inferiores aos do ensaio padrão, sendo que os ensaios com o potássio ( $10x \text{ K} = 875,4 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ,  $20x \text{ K} = 894 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ) registaram valores semelhantes aos do ensaio padrão ( $942 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ), ficando os ensaios com a adição de magnésio mais distantes ( $10x \text{ Mg} = 750,9 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ,  $20x \text{ Mg} = 711,7 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ).

Quando se efectuou uma comparação múltipla, obteve-se  $H=16,848$ ,  $p=0,010$  sendo o ensaio  $10x \text{ N}$  estatisticamente diferente do ensaio  $20x \text{ Mg}$ .

Estes resultados permitem concluir que a adição de magnésio reduz a produtividade em biomassa, o mesmo acontecendo com a adição de potássio, embora com uma menor influência. No entanto, a adição de azoto ( $10x$  a concentração padrão) permitiu aumentar significativamente a produtividade em biomassa (cerca de 59%).

### 3.3 Avaliação do crescimento da *Dunaliella tertiolecta* por alteração da concentração de micronutrientes

A Figura 3.2 apresenta as curvas de crescimento da *Dunaliella tertiolecta* expressa em biomassa seca ( $\text{mg}/\text{L}$ ) vs dias de cultivo para o ensaio padrão e para os ensaios com adição de micronutrientes. Assim, designaram-se por  $10x \text{ Mn}$ ,  $10x \text{ Zn}$ ,  $10x \text{ Fe}$ ,  $20x \text{ Mn}$ ,  $20x \text{ Zn}$  e  $20x \text{ Fe}$ , respectivamente os ensaios em que as concentrações de manganês, zinco e ferro foram aumentadas 10 e 20 vezes relativamente às concentrações do ensaio padrão. Os ensaios foram comparados estatisticamente com o ensaio padrão no primeiro dia e, no dia em que se atingiu o estado estacionário.

Para o dia 1, o resultado para o ensaio padrão vs  $10x \text{ Mn}$  vs  $20x \text{ Mn}$  foi  $F_{(8,2)} = 4,774$ ,  $p=0,057$  e, para o ensaio padrão vs  $10x \text{ Fe}$  vs  $20x \text{ Fe}$  obteve-se  $H = 0,695$ ,  $p = 0,721$ ,  $n=2$ , não existindo por isso diferenças. Para o ensaio padrão vs  $10x \text{ Zn}$  vs  $20x \text{ Zn}$ , obteve-se  $F_{(8,2)} = 11,069$ ,  $p=0,010$ , indicando diferença entre o ensaio padrão e o ensaio  $10x \text{ Zn}$ . Em termos quantitativos obteve-se o valor de  $150,5 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  para o ensaio padrão, para o ensaio  $10x \text{ Mn}$  obteve-se o valor de  $132,7 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio  $20x \text{ Mn}$  obteve-se o valor de  $139,0 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio  $10x \text{ Zn}$  obteve-se o valor de  $137,2 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio  $20x \text{ Zn}$  obteve-se o valor de  $149,8 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio  $10x \text{ Fe}$  obteve-se o valor de  $153,7 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , e por último para o ensaio  $20x \text{ Fe}$  obteve-se o valor de  $153,6 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ .

Passados 25 dias, as culturas atingiram o estado estacionário, não se verificando nenhuma diferença estatística. O resultado obtido para o ensaio padrão vs 10x Mn vs 20x Mn foi  $H=3,822$ ,  $p=0,168$ ,  $n=2$ , para o ensaio padrão vs 10x Zn vs 20x Zn obteve-se  $F_{(8,2)} = 2,058$ ,  $p=0,209$  e, para o ensaio padrão vs 10x Fe vs 20x Fe obteve-se  $F_{(8,2)} = 1,301$ ,  $p=0,339$ .

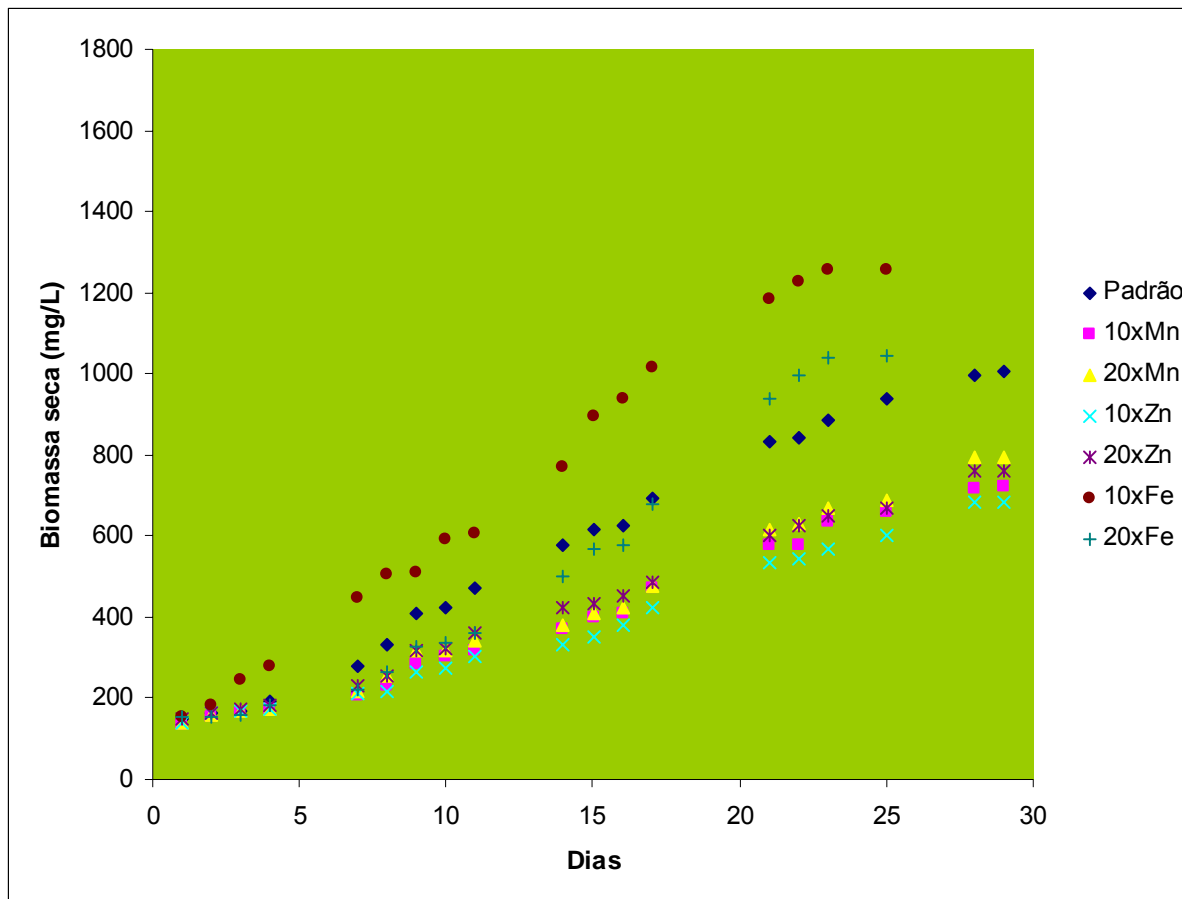


Figura 3.2 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) vs dia para o ensaio padrão e ensaios com adição de Manganês, Zinco ou Ferro.

Ao observarmos a Figura 3.2 verifica-se que no início todos os ensaios apresentaram valores de concentração muito semelhantes, apesar de existir diferença estatística entre o ensaio padrão e o ensaio 10x Zn.

Observa-se ainda que, todos os ensaios atingiram o estado estacionário sensivelmente na mesma altura (passados 25 dias). Também é perceptível que os ensaios com adição de ferro foram aqueles que permitiram atingir uma concentração de biomassa seca mais elevada, sendo estes ensaios os únicos a superar a concentração obtida no ensaio padrão que serviu de controlo. Dentro dos ensaios com adição de ferro, aquele em que se fez variar a concentração 10 vezes, apresentou valores de produtividade ligeiramente superiores ( $1257 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ) ao ensaio em que se variou a concentração deste micronutriente 20 vezes ( $1042 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ) e correspondendo a um aumento da produtividade de cerca de

33,8%, relativamente à produtividade obtida nas condições padrão. Verifica-se que o ensaio 20x Fe só apresentou valores de concentração superiores ao padrão a partir do dia 21, sendo que até esse dia os valores deste ensaio eram ligeiramente inferiores aos do padrão. Para os restantes ensaios (adição de manganês ou zinco), os valores de concentração de biomassa obtidos foram sempre inferiores ao obtido no ensaio padrão. Para o ensaio 10X Mn obteve-se o valor de 657,1 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 20X Mn obteve-se o valor de 687,1 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 10X Zn obteve-se o valor de 600,9 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 20X Zn obteve-se o valor de 669,4 mg<sub>biomassa seca</sub>/L e, para o ensaio padrão obteve-se o valor de 939,4 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.

Quando se efectuou uma comparação múltipla, obteve-se  $F_{(20,6)} = 6,857$ ,  $p=0,001$  sendo o ensaio 10x Fe estatisticamente diferente dos ensaios 10x Zn, 10x Mn, 20x Zn e 20x Mn. Estes resultados permitem concluir que a adição de manganês reduz a produtividade em biomassa, o mesmo acontecendo com a adição de zinco, embora com uma menor influência. No entanto, a adição de ferro (10x a concentração padrão) permitiu aumentar significativamente a produtividade em biomassa (cerca de 33,8%).

### 3.4 Avaliação do crescimento da *Dunaliella tertiolecta* por alteração da concentração de Fósforo ou Cobalto

A Figura 3.3 apresenta as curvas de crescimento expressas em concentração de biomassa seca (mg/L) vs dias de cultivo para o ensaio padrão e para os ensaios com alteração da adição de fósforo ou de cobalto. Assim, designaram-se por 10x Co, 10x P, 20x Co e 20x, respectivamente os ensaios em que as concentrações de cobalto e fósforo foram aumentadas 10 e 20 vezes relativamente às concentrações do ensaio padrão. Os ensaios foram comparados estatisticamente com o padrão no primeiro dia, passados 15 dias (dia em que se verificou que as culturas dos ensaios com cobalto tinham morrido) e, no dia em que se atingiu o estado estacionário (passados 25 dias).

Para o dia 1, não se verificaram diferenças entre o ensaio padrão e os demais ensaios realizados. O resultado para o ensaio padrão vs 10x Co vs 20x Co foi  $F_{(8,2)} = 4,668$ ,  $p=0,060$  e, para o ensaio padrão vs 10x P vs 20x P obteve-se  $F_{(8,2)} = 4,074$ ,  $p=0,076$ . Em termos quantitativos obteve-se o valor de 35,54 mg<sub>biomassa seca</sub>/L para o ensaio padrão, para o ensaio 10x P obteve-se o valor de 30,15 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 20x P obteve-se o valor de 34,77 mg<sub>biomassa seca</sub>/L, para o ensaio 10x Co obteve-se o valor de 45,54 mg<sub>biomassa seca</sub>/L e, para o ensaio 20x Co obteve-se o valor de 38,62 mg<sub>biomassa seca</sub>/L. Passados 15 dias do início dos ensaios verificou-se que as culturas onde se alterou a concentração de Cobalto estavam mortas, uma vez que a densidade das mesmas era muito diminuta, comprovado pelas leituras dos valores de concentração obtidos. O resultado, nesta fase do ensaio, para

o ensaio padrão vs 10x Co vs 20x Co foi  $F_{(8,2)} = 4697,179$ ,  $p < 0,001$ , indicando que o ensaio padrão é diferente do ensaio 10x Co e do 20x Co. Para o ensaio padrão vs 10x P vs 20x P obteve-se  $F_{(8,2)} = 56,171$ ,  $p < 0,001$ , indicando que o ensaio padrão é diferente do ensaio 10x P e do 20x P. Em termos quantitativos obteve-se o valor de 634,0  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  para o ensaio padrão, para o ensaio 10x P obteve-se o valor de 163,2  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 20x P obteve-se o valor de 455,5  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 10x Co obteve-se o valor de 27,85  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  e, para o ensaio 20x Co obteve-se o valor de 4,77  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ . Quando se atingiu o estado estacionário (passados 25 dias), obteve-se para o ensaio padrão vs 10x P vs 20x P,  $H = 15,174$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 2$ , indicando diferença entre o ensaio padrão e o ensaio 10x P. Quantitativamente o valor obtido para o ensaio padrão foi de 952,5  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ , para o ensaio 10x P obteve-se o valor de 604,0  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  e, para o ensaio 20x P obteve-se o valor de 823,2  $\text{mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ .

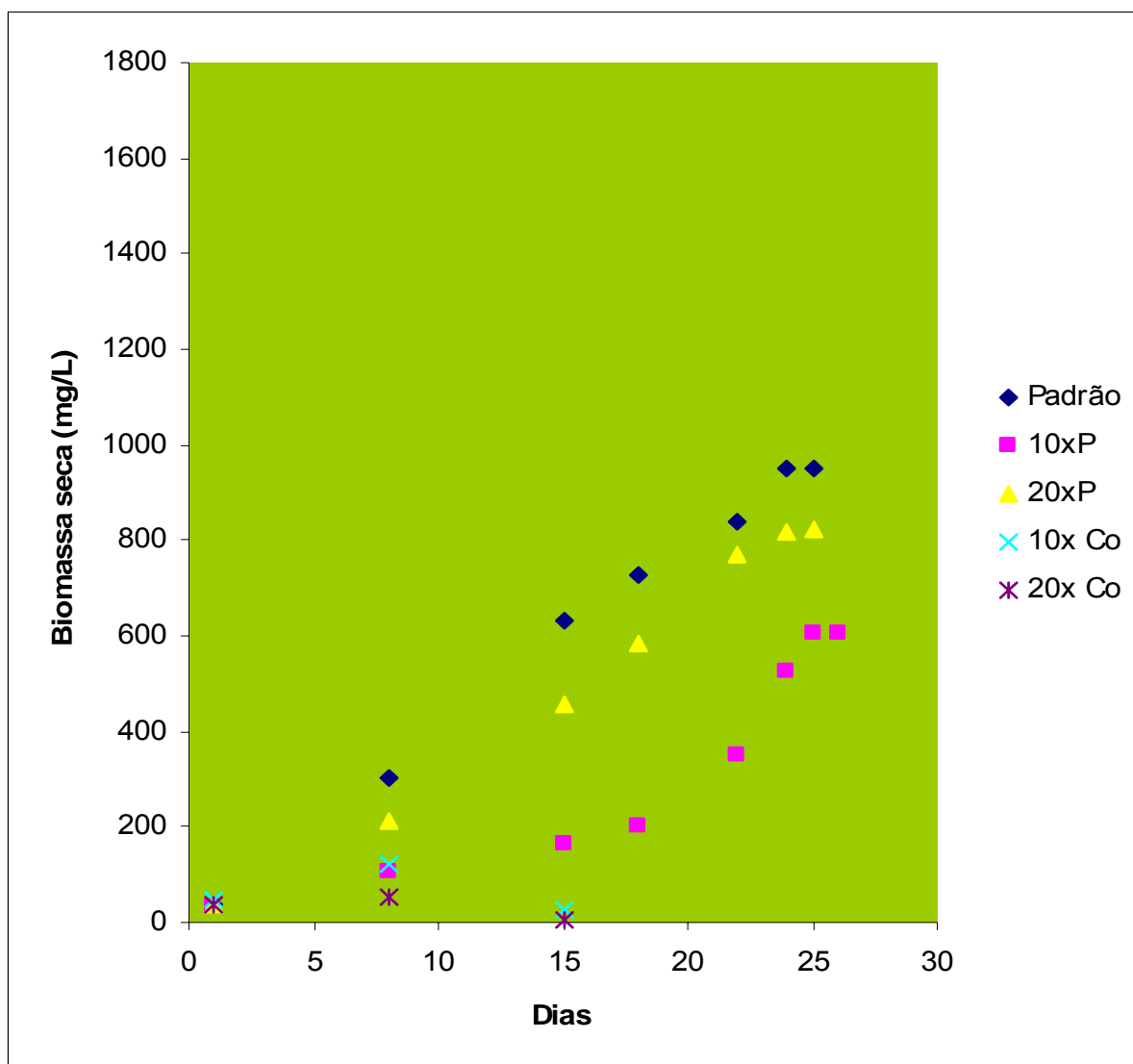


Figura 3.3 – Curvas de crescimento Biomassa seca (mg/L) vs dia para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Fósforo e Cobalto.

Ao observarmos a Figura 3.3, verifica-se que no início todos os ensaios apresentaram valores de concentração muito semelhantes. Porém, verificou-se que passados 15 dias, ambos os ensaios com adição de cobalto apresentavam uma concentração bastante diminuta comparativamente com a leitura anterior, indicando a morte destas duas culturas.

Os restantes ensaios (padrão, 10x P e 20x P) atingiram o estado estacionário sensivelmente na mesma altura (passados 25 dias), embora nenhum dos ensaios onde se adicionou P tenha superado o ensaio padrão.

Estes resultados permitem concluir que a adição de fósforo reduz a produtividade em biomassa, o mesmo acontecendo com a adição de cobalto, embora com uma maior influência, conduzindo mesmo à morte da cultura. Neste caso, seria interessante estudar o efeito que a carência destes nutrientes provocaria no crescimento de biomassa seca.

### 3.5 Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios com adição de macronutrientes (padrão, 10x Mg, 20x Mg, 10x P, 20x P, 10x N, 20x N)

A Figura 3.4 apresenta os valores (máximos e médios) para a produtividade de biomassa seca (mg/L) obtidos em cada ensaio realizado (ver Anexo F). Os valores médios apresentados foram calculados até se atingir o estado estacionário e, os máximos são referentes a um período de 24 h de cultivo.

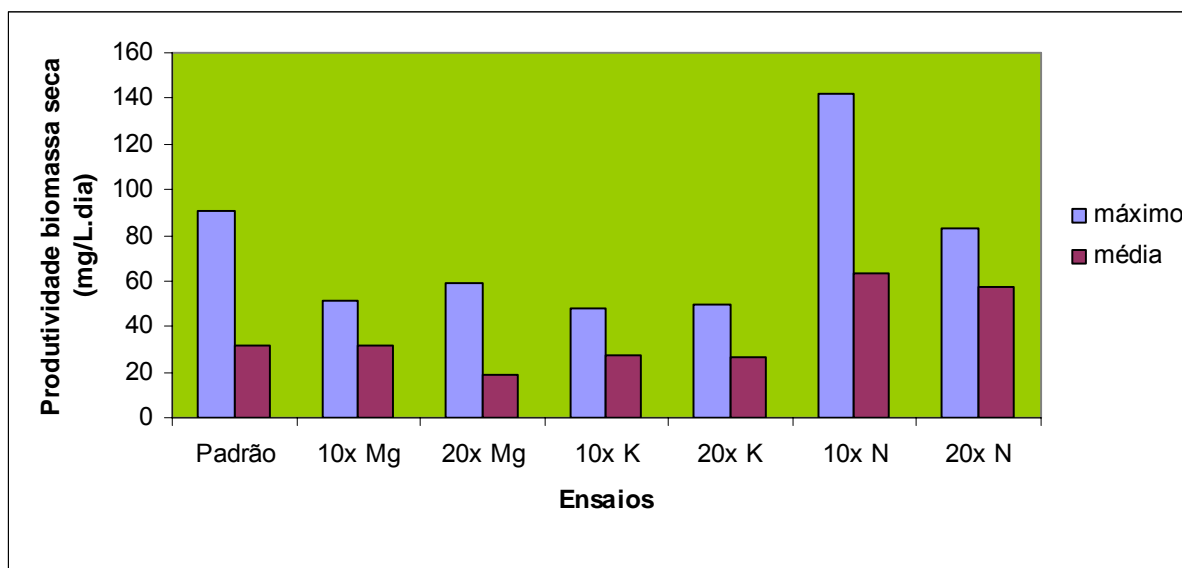


Figura 3.4 – Produtividade (máxima e média) de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados.

Verifica-se que, para os ensaios em causa, aquele que apresentou um valor máximo mais elevado para a produtividade de biomassa seca foi o ensaio 10x N (141,79 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.dia - valor obtido do dia 5 para o dia 6), sendo mesmo o único ensaio com um valor superior ao do ensaio padrão (90,77 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.dia - valor obtido do dia 7 para o dia 8). No entanto, quando se observam os valores médios, não só o ensaio 10x N (63,06 mg<sub>biomassa seca</sub>/L) apresenta um valor de produtividade superior ao ensaio padrão (31,30 mg<sub>biomassa seca</sub>/L), como também o ensaio 20x N (57,09 mg<sub>biomassa seca</sub>/L). O ensaio 10x N apresenta portanto os valores mais elevados deste grupo de ensaios, tanto a produtividade máxima como a média, o que significa que a adição de N sob a forma de Nitrato (para 10x a quantidade padrão) potencia o crescimento da biomassa algal de *Dunaliella tertiolecta*.

### **3.6 Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios referidos em 3.3. (padrão, 10x Mn, 20x Mn, 10x Zn, 20x Zn, 10x Fe, 20x Fe)**

A Figura 3.5 apresenta os valores (máximos e médios) obtidos para a produtividade de biomassa seca (mg/L) em cada ensaio realizado (ver Anexo F). Os valores médios apresentados foram calculados até se atingir o estado estacionário e, os máximos são referentes a um período de 24 h de cultivo.

Verifica-se que, para os ensaios em causa, aquele que apresentou um valor máximo mais elevado para a produtividade de biomassa seca foi o ensaio 10x Fe (124,56 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.dia - valor obtido do dia 14 para o dia 15), seguido do ensaio 20x Fe (100,00 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.dia - valor obtido do dia 16 para o dia 17). Estes dois ensaios foram os que superaram o valor obtido pelo ensaio padrão (76,41 mg<sub>biomassa seca</sub>/L.dia – valor obtido do dia 8 para o dia 9). Esta situação voltou a repetir-se para os valores médios, onde também só estes ensaios (10x Fe = 46,01 mg<sub>biomassa seca</sub>/L; 20x Fe = 34,69 mg<sub>biomassa seca</sub>/L) apresentaram valores superiores aos do ensaio padrão (32,86 mg<sub>biomassa seca</sub>/L). O ensaio 10x Fe apresenta portanto os valores mais elevados deste grupo de ensaios, tanto o máximo como a média, o que significa que a adição de Fe (para 10x a quantidade padrão) potencia o crescimento da biomassa algal de *Dunaliella tertiolecta*.

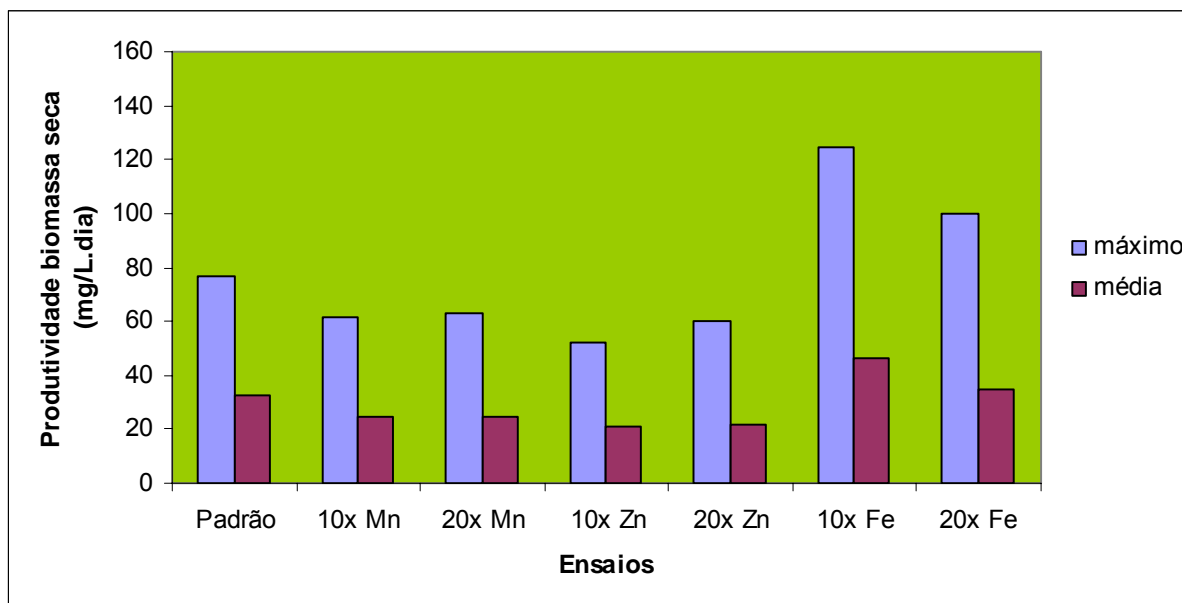


Figura 3.5 – Produtividade (máxima e média) de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados com adição de manganês, zinco ou ferro, comparativamente com as condições padrão.

### 3.7 Determinação da produtividade de biomassa seca para os ensaios referidos em 3.4. (padrão, 10x P, 20x P, 10x Co, 20x Co)

A Figura 3.6 apresenta os valores médios para a produtividade de biomassa seca (mg/L) obtidos em cada ensaio realizado (ver Anexo F). Os valores médios apresentados foram calculados até se atingir o estado estacionário. Não é possível apresentar a produtividade máxima em períodos de 24 h de cultivo, visto que nesta fase do estudo não existiu a possibilidade de acompanhar as culturas diariamente.

Verifica-se que, para os ensaios em causa, aquele que apresentou um valor médio mais elevado para a produtividade de biomassa seca foi o ensaio 10x P ( $34,02 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ), valor semelhante ao obtido no ensaio padrão ( $33,64 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ). Para o ensaio 20x P obteve-se um valor inferior ( $29,66 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$ ) aos dois ensaios referidos acima. Quanto aos ensaios com adição de Co (10x e 20x) os resultados obtidos foram únicos neste estudo, uma vez que as culturas morreram, não se verificando assim produtividade.

Verifica-se que a adição de P não afecta significativamente e que a adição de Co inibe o crescimento da biomassa algal de *Dunaliella tertiolecta*.

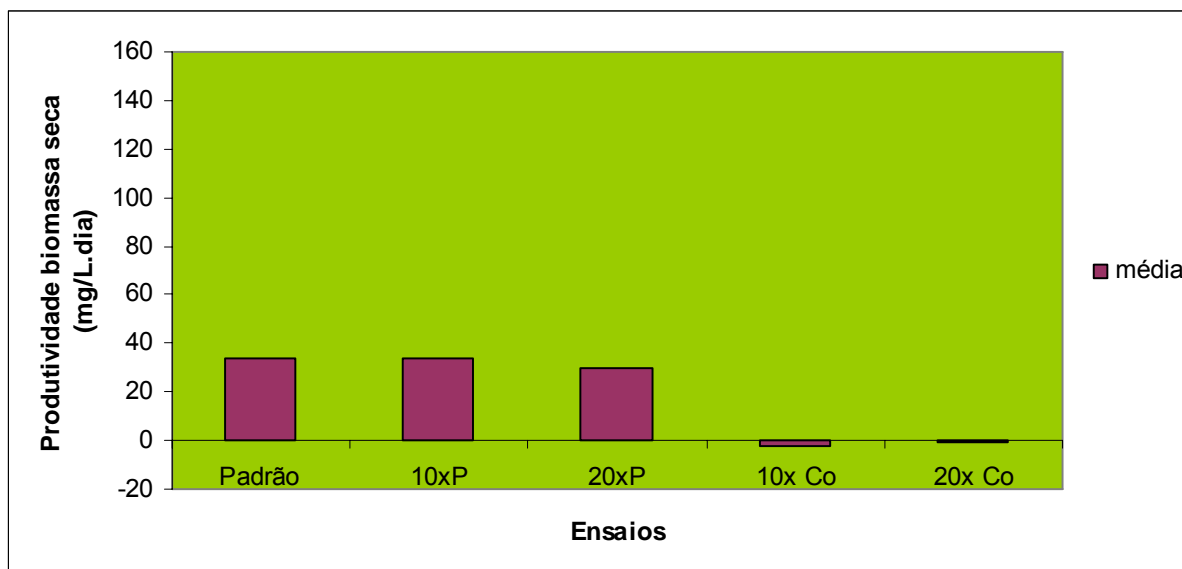


Figura 3.6 – Produtividade média de biomassa seca (mg/L) nos ensaios efectuados com adição de fósforo ou cobalto, comparativamente com as condições padrão.

### 3.8 Quantificação de óleos por gravimetria

A quantificação gravimétrica dos óleos foi feita conforme descrito anteriormente em 2.2. Os resultados obtidos são os apresentados nas Figura 3.7 , Figura 3.8 e Figura 3.9 (ver dados no Anexo G).

Verifica-se que, em todos os ensaios representados na Figura 3.7, o valor de teor lipídico determinado quando se usou o clorofórmio como solvente foi superior ao valor obtido usando o hexano e, que os ensaios apresentaram resultados semelhantes entre si, com excepção dos ensaios com adição de azoto, que apresentaram valores de teor lipídico superiores aos restantes ensaios.

A percentagem de teor lipídico mais elevada foi obtida para o ensaio 10x N realizando a extracção com o clorofórmio (33,45%). Foi também neste ensaio que se verificou uma maior discrepância de valores entre os dois solventes usados, sendo o valor obtido com o clorofórmio 57,46% superior ao obtido com o hexano.

Comparando o valor mais elevado de teor lipídico obtido, correspondente ao ensaio com 10x N, fazendo a extracção com clorofórmio (33,45%), com o obtido para o ensaio padrão com o mesmo solvente (14,60%) verifica-se que existe uma diferença de 18,85%.

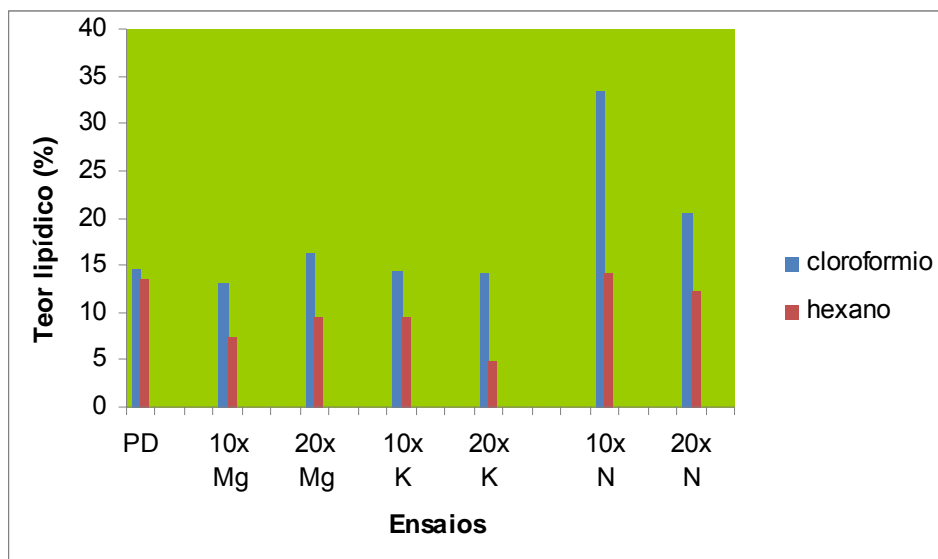


Figura 3.7 – Teor lipídico da biomassa algal obtido na biomassa dos ensaios padrão, com adição de magnésio, potássio ou azoto, usando dois solventes (clorofórmio ou hexano).

Na Figura 3.8 observa-se que, neste grupo de ensaios em que foi adicionado manganês zinco ou ferro, aquele em que se obteve um maior teor lipídico foi o ensaio 10x Fe, usando o clorofórmio como solvente de extracção. Este ensaio foi mesmo o único a apresentar um valor de teor lipídico mais elevado do que o obtido no ensaio padrão e, foi também o ensaio onde se verificou uma maior diferença entre o resultado obtido com o clorofórmio e o obtido usando o hexano, sendo o valor obtido com o clorofórmio 44,8 % superior ao do hexano. Comparando o valor mais elevado de teor lipídico obtido, correspondente ao ensaio com adição de 10x Fe usando clorofórmio (22,6%), com o obtido para o ensaio padrão com o mesmo solvente (19,1%), verifica-se que existe uma diferença de 3,4%.

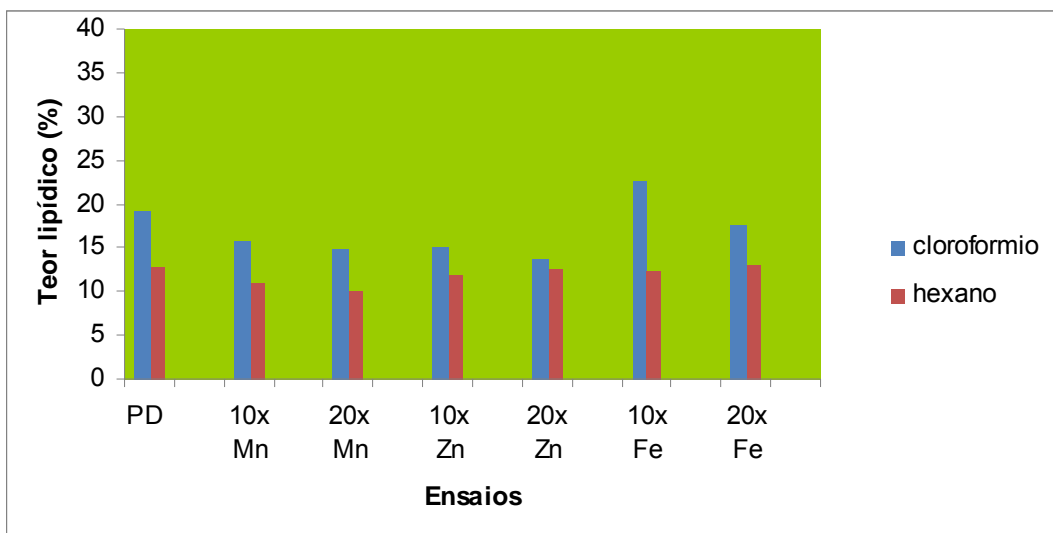


Figura 3.8 – Teor lipídico da biomassa algal obtida nos ensaios padrão, com adição de manganês, zinco ou ferro, usando dois solventes (clorofórmio e hexano).

Para o último grupo de ensaios, observando a Figura 3.9 verifica-se que, aquele em que se obteve um teor lipídico mais elevado foi o ensaio 20x P usando o hexano como solvente de extracção. Neste ensaio o resultado obtido com o hexano foi 23,04% superior ao obtido com o clorofórmio.

Comparando o valor mais elevado de teor lipídico obtido, correspondente ao ensaio com adição de 20x P usando hexano (18,66%), com o valor mais elevado obtido para o ensaio padrão, correspondente ao clorofórmio (16,12%) verifica-se que existe uma diferença de 2,54%.

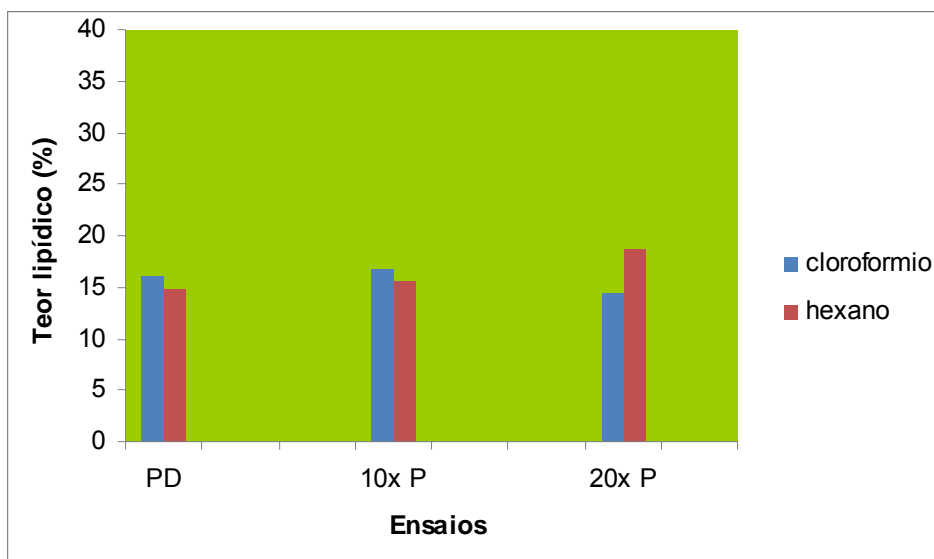


Figura 3.9 – Teor lipídico da biomassa algal obtida nos ensaios padrão e com adição de potássio, usando dois solventes (clorofórmio e hexano).

### 3.9 Produtividade lipídica máxima para os ensaios com adição de macronutrientes (padrão, 10x Mg, 20x Mg, 10x K, 20x K, 10x N, 20x N)

A produtividade lipídica máxima foi obtida multiplicando o teor lipídico pela produtividade máxima de biomassa seca num período de 24 h (Anexo H).

O resultado para este conjunto de ensaios encontra-se representado na Figura 3.10, onde se verifica que, usando o clorofórmio como solvente de extracção obtemos valores para a produtividade lipídica máxima superiores aos que se obtêm usando o hexano.

Os dados referentes à extracção com clorofórmio mostram que o ensaio 10x N e 20x N superaram o ensaio padrão, sendo que o ensaio 10x N apresentou o valor mais elevado deste conjunto de ensaios. Em termos quantitativos obteve-se o valor de 13,25 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio padrão, 47,43 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio 10x N e, 16,99 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio 20x N.

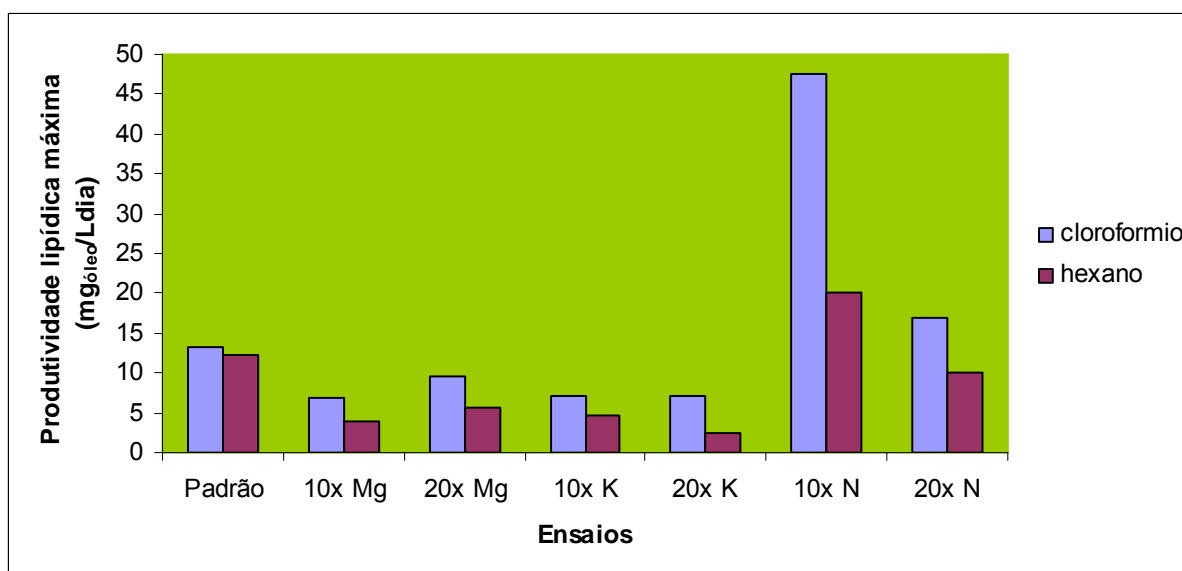


Figura 3.10 – Produtividade lipídica máxima para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Magnésio, Potássio e Azoto.

Os dados referentes à extracção com hexano mostram que somente no ensaio 10x N a produtividade lipídica superou a do ensaio padrão. Em termos quantitativos obteve-se o valor de 12,24 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio padrão e, 20,18 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio 10x N, pelo que se pode concluir que o aumento da concentração de N para 10x o valor padrão potencia o aumento da produtividade lipídica para mais do dobro (3,6 vezes, quando a extracção é feita com clorofórmio).

### 3.10 Produtividade lipídica máxima para os ensaios com adição de micronutrientes (padrão, 10x Mn, 20x Mn, 10x Zn, 20x Zn, 10x Fe, 20x Fe)

A produtividade lipídica máxima foi obtida multiplicando o teor lipídico pela produtividade máxima de biomassa seca num período de 24 h (ver Anexo H).

O resultado para este conjunto de ensaios encontra-se representado na Figura 3.11, onde se verifica que, usando o clorofórmio obtemos, para a produtividade lipídica máxima, valores superiores aos que se obtêm usando o hexano. Os dados referentes ao clorofórmio mostram que os ensaios 10x Fe e 20x Fe superaram o ensaio padrão, sendo que o ensaio 10x Fe apresentou o valor mais elevado deste conjunto de ensaios. Em termos quantitativos obteve-se o valor de 14,61 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio padrão, 28,04 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio 10x Fe e, 17,50 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio 20x Fe.

Os dados referentes à extracção com hexano mostram que os ensaios 10x Fe e 20x Fe superaram o ensaio padrão. Em termos quantitativos obteve-se o valor de 9,79 mg<sub>óleo</sub>/L.dia para o ensaio padrão, 15,47 mg/L.dia para o ensaio 10x Fe e, 13,04 mg/L.dia para o ensaio 20x Fe.

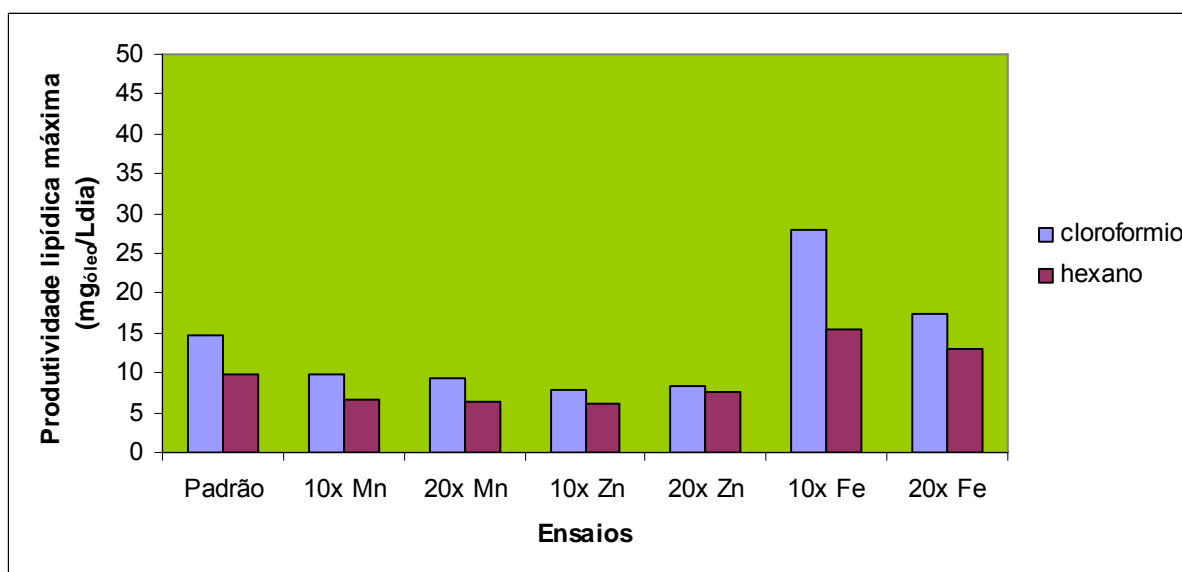


Figura 3.11 – Produtividade lipídica máxima para o ensaio padrão e ensaios com alteração da concentração de Manganês, Zinco ou Ferro.

Não é possível apresentar o gráfico referente aos ensaios de Cobalto e Fósforo, uma vez que, como foi referido anteriormente, não existem dados suficientes para calcular a produtividade máxima em períodos de 24 h de cultivo, o que impossibilita o cálculo da produtividade lipídica máxima.

### 3.11 Resumo dos resultados obtidos

Face aos ensaios realizados, apresenta-se em seguida na Tabela 3. 1, um resumo dos resultados obtidos para cada um dos parâmetros objecto de alteração e de estudo.

Tabela 3. 1 – Resumo dos resultados obtidos para as diferentes condições testadas.

Ensaio em Estudo	Produtividade de Biomassa (mg <sub>biomassa seca</sub> /L.dia)			Teor de Lípidos (%)		Produtividade Lípidica Máxima (mg <sub>óleo</sub> /L.dia)	
	Média	Máxima	Dia	Clorofórmio	Hexano	Clorofórmio	Hexano
	Padrão	31,30	90,77	8	14,60	13,48	13,25
10X Mg	31,24	51,67	8	13,09	7,48	6,76	3,86
20X Mg	19,10	59,36	21	16,23	9,57	9,63	5,68
10X K	27,07	48,33	6	14,50	9,59	7,01	4,64
20X K	26,34	49,62	8	14,26	4,84	7,08	2,40
10X N	63,06	141,79	6	33,45	14,23	47,43	20,18
20X N	57,09	83,08	13	20,45	12,24	16,99	10,17
Padrão	32,86	76,41	9	19,12	12,81	14,61	9,79
10X Mn	24,66	61,54	17	15,85	10,95	9,75	6,74
20X Mn	24,59	62,69	9	14,91	10,04	9,35	6,29
10X Zn	21,07	51,92	9	15,09	12,00	7,83	6,23
20X Zn	21,66	60,13	9	13,77	12,64	8,28	7,60
10X Fe	46,01	124,36	15	22,55	12,44	28,04	15,47
20X Fe	34,69	100,00	17	17,50	13,04	17,50	13,04
Padrão	33,64	---	---	16,12	14,66	---	---
10X P	34,02	---	---	16,65	15,55	---	---
20X P	29,66	---	---	14,36	18,66	---	---
10X Co	-1,97	---	---	---	---	---	---
20X Co	-1,07	---	---	---	---	---	---

Todos os resultados apresentados na Tabela 3. 1, foram obtidos a uma intensidade luminosa de 5000 lux com fotoperíodos 12 : 12 h, a uma temperatura de 25 °C ± 2°C e, com arejamento de 4 mL<sub>ar</sub>/s. Verifica-se que os melhores resultados obtidos para a produtividade de biomassa (média e máxima), para o teor de lípidos e para a produtividade lípidica máxima, foram obtidos no ensaio onde se aumentou a concentração de azoto (sob a forma de nitrato) para 10X o valor padrão.

### 3.12 Índice de risco dos solventes

Sabe-se que o hexano é um solvente usado frequentemente na extracção de diversos produtos. O clorofórmio é um solvente orgânico muito potente, no entanto o seu manuseamento exige cuidados muito rigorosos, uma vez que é um solvente muito tóxico.

O risco de um solvente no ambiente de trabalho é tanto maior quanto maior for a sua concentração no ar e quanto menor for o seu valor limite de exposição.

Calculou-se o índice de risco para os dois solventes utilizados, clorofórmio e hexano, usando as seguintes equações: (ver Anexo I)

$$C = \frac{P_v}{760} \times 10^7 \text{ (ppm)}$$

$$IR = \frac{C}{VLE}$$

Onde

Pressão de vapor ( $P_v$ )

Concentração ( $C$ )

Valor limite de exposição ( $VLE$ )

Para o clorofórmio obteve-se o valor de 210526 e, para o hexano obteve-se o valor de 32105. Assim, o hexano apresenta um índice de risco substancialmente menor (cerca de uma ordem de grandeza) que o clorofórmio. Por esse motivo se recomenda a utilização do hexano em substituição do clorofórmio na extracção dos lípidos. No entanto, a capacidade de extracção dos lípidos pelo hexano é significativamente menor (com excepção do ensaio em que se variou 20x a concentração de fósforo), o que torna o processo menos aconselhável, do ponto de vista da validade dos resultados obtidos, pelo menos quando se trabalha em muito pequena escala, como é o caso.

#### 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Inicialmente neste estudo, foram testadas duas estirpes, uma de água salobra (*Tetraselmis subcordiformis*) e outra de água salgada (*Dunaliella tertiolecta*), usando os meios de cultura sugeridos (SAG – ver Anexo B). A estirpe que apresentou uma maior taxa de crescimento foi a *Dunaliella tertiolecta*, pelo que o estudo prosseguiu usando só esta estirpe, podendo-se concluir que esta espécie apresentou supremacia para este estudo quando comparada com a *Tetraselmis subcordiformis*.

Provocou-se alteração na composição do meio de cultura da espécie, aumentando a concentração de macronutrientes e micronutrientes para 10 e 20 vezes comparativamente à do meio de cultura padrão. Concluiu-se que, o ensaio em que se obteve uma concentração e uma produtividade média superiores foi aquele em que se aumentou 10 vezes a concentração de azoto (na forma de nitrato), com  $1497 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  e  $63,06 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L}$  respectivamente. A produtividade máxima também foi obtida neste ensaio,  $141,79 \text{ mg}_{\text{biomassa seca}}/\text{L.dia}$  do dia 5 para o dia 6.

Em termos do teor lípidico concluiu-se que, usando o clorofórmio como solvente (apesar deste apresentar um índice de risco substancialmente mais elevado) os resultados obtidos foram superiores, comparativamente aos obtidos quando se usou hexano, com excepção do ensaio em que se aumentou 20 vezes a concentração de fósforo. Em termos percentuais o ensaio em que se variou 10 vezes a concentração de azoto voltou a ser o que apresentou um teor mais elevado de lípidos (33,45%), sendo também este o ensaio em que se verificou uma diferença mais elevada relativamente ao ensaio padrão (18,85%). O valor obtido está de acordo com a gama reportada por Mata *et al.* (2009) e apresentada na Tabela 1.6 para esta estirpe (16,7 a 71 %).

O clorofórmio voltou a mostrar-se como um solvente mais eficiente do que o hexano na determinação da produtividade lipídica máxima, visto que todos os resultados obtidos com o clorofórmio foram superiores aos obtidos com o hexano.

Concluiu-se que, em todos os ensaios foi atingido o estado estacionário sensivelmente na mesma altura, isto é, decorridos cerca de 25 dias após o início do estudo, excepto nos ensaios em que se fez variar a concentração de cobalto, para os quais as culturas não se adaptaram às alterações, acabando por morrer passados 15 dias.

A adição de macronutrientes e micronutrientes, nas quantidades testadas, não influenciaram significativamente a produtividade lipídica, com excepção do azoto e ferro. Concluiu-se também que, o aumento da concentração de azoto para 10x o valor padrão potencia o aumento da produtividade lipídica máxima para mais do dobro (3,6 vezes – Padrão:  $13,25 \text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ; 10x N:  $47,43 \text{ mg}_{\text{óleo}}/\text{L.dia}$ ) e que o aumento da concentração de ferro para 10x o

valor padrão potencia o aumento da produtividade lipídica máxima para aproximadamente o dobro (1,9 vezes - Padrão: 14,61 mg<sub>óleo</sub>/L.dia; 10x Fe: 28,04 mg<sub>óleo</sub>/L.dia).

Nos ensaios realizados com adição de azoto ou ferro, os resultados obtidos para a concentração, produtividade lípidica, extracção lípidica e produtividade lipídica máxima, foram sempre superiores aos do padrão correspondente, pelo que se pode concluir que estes ensaios apresentam-se como os mais promissores deste estudo, embora o ensaio mais satisfatório tenha sido aquele em que se promoveu a alteração da concentração de azoto, sob a forma de Nitrato, para 10 vezes o valor padrão. A variação da concentração de azoto no meio tem bastante influência no crescimento da espécie em estudo, conforme demonstrado por Fabregas *et al.* (1986) quando obteve uma densidade celular máxima aumentando a concentração de NaNO<sub>3</sub> ao meio e, quando o mesmo autor em 1989 (Fabregas *et al.*, 1989) concluiu que a produção de biomassa na fase estacionária foi afectada pela concentração de azoto no meio. O aumento da concentração de ferro conduziu a um aumento da concentração de biomassa algal, indo de encontro ao noticiado pela BBC News, quando em 2010 a nuvem de cinzas do vulcão islandês com níveis elevados de ferro, incitou o aumento da concentração de ferro no meio, causando o aparecimento de uma extensa mancha de minúsculos organismos, conhecidos como fitoplâncton, provocando o florescimento de uma enorme quantidade de algas microscópicas no Atlântico Norte.

Os resultados aqui apresentados evidenciam o potencial existente nas microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel, sendo que estes resultados podem ser aplicados para maximizar a produção de lípidos das microalgas. Conclui-se ainda que, o crescimento da cultura traduziu-se num aumento da produção lípidica e que esse crescimento está intimamente ligado a alterações da concentração de nutrientes presentes no meio, desempenhando assim um papel fundamental. Os resultados obtidos vão de encontro ao estudo de Chen *et al.* (2011).

Para futuros trabalhos seria interessante partir para o cultivo em grande escala da espécie *Dunaliella tertiolecta*, nas condições em que se obteve melhores resultados, isto é, com os mesmos parâmetros físicos e com o aumento de 10 vezes a concentração de azoto comparativamente ao meio considerado padrão para esta espécie.

Poderia ser estudado o efeito da variação da temperatura, pH e luminosidade no crescimento da *Dunaliella tertiolecta*, avaliando se a alteração desses parâmetros também permite aumentar a produção lípidica e, testar ainda o aumento da concentração de macronutrientes e micronutrientes para valores intermédios aos testados.

Seria também interessante comparar resultados obtidos nas microalgas com outras matérias-primas base do biodiesel (por exemplo: colza, soja, girassol), analisar o efeito da carência de macronutrientes e micronutrientes e/ou substituir os reagentes p.a. por fontes nutricionais residuais, avaliar a qualidade do biodiesel produzido, testar diferentes métodos de extracção dos lipídios e, no final fazer uma análise detalhada de custos.



## 5. Referências Bibliográficas

- Agarwal A., Gupta T., Kothari A., 2011. Particulate emissions from biodiesel vs diesel fuelled compression ignition engine. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(6): 3278-3300.
- Barbosa M., 2003. *Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation*. Tese Doutorado em Ciências. Wageningen University. 166pp.
- Benjumea P., Agudelo J., Agudelo A., 2008. Basic properties of palm oil biodiesel – diesel blends. *Fuel*. 87(12): 2069 – 2075.
- Bligh G., Dyer W., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37(8): 911 – 917.
- Bozbas K., 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 12(2): 542-552.
- Chen M., Haiying T., Hongzhi M., Holland T., Ng S., Salley S., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*. 102(2): 1649 – 1655.
- Corro G., Tellez N., Jimenez T., Tapia A., Banuelos F., Cuchillo O., 2010. Biodiesel from waste frying oil. Two step process using acidified SiO<sub>2</sub> for esterification step. *Catalysis Today*. 166(1): 116-122.
- Dupéron R., Thiersault M., Dupéron P., 1982. Occurrence of steryl glycosides and acylated steryl glycosides in same marine algae. *Phytochemistry*. 22: 535 – 538.
- El Gamal, A.A., 2009. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*.18: 1-25.
- EPSAG- Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (EPSAG).
- Fabregas J., Abalde J., Herrero C., 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*. 83(3-4): 289-304.
- Fabregas J., Herrero C., Abalde J., Cabezas B., 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*. 53(3-4): 187 – 199.
- Ferrari R., Oliveira V., Scabio A., 2005. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*. 28: 19-23.
- Gallagher B., 2010. The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable energy*. 36: 158-162.

- Gouveia L., 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer Briefs in Microbiology. Heidelberg, 69pp.
- Gouveia L., Oliveira C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(2): 269-274.
- Guimarães, J., Amaral, R., Santos, M.F., Santos, L.M.A., 2009. *Colheita, identificação e conservação de microalgas*. ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 88pp.
- Guschina, I.A. e Harwood, J., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 45(2): 160-186.
- Harwood J., Guschina I., 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*. 91(6): 679-684.
- JNIESAD, Japan National Institute of Environmental Studies Algal Database, culture collection, Image NIES 629, <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0629.jpg> (acedido em 15.10.2011).
- Krienitz, L., 2009. Algae. In: Likens, G. (Ed.) *Encyclopedia of Inland Waters*, Vol. I, Oxford.103pp.
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F., Langenhove, H., 2010. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*. 28(7): 371-380.
- Lapinskienė A., Martinkus P., Rėbždaitė, V., 2006. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution*. 142(3): 432-437.
- Lee, A., Lewis, D., Ashman, P., 2010. Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. *Chemical Engineering Research and Design*. 88(8): 988-996.
- Lee, R., 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, Fourth Edition. 560pp.
- Mata T., Martins A., Caetano N., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(1): 217-232.
- Miao X., Wu Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97(6): 841-849.
- Morgan, M., 2005. Images of desmids from the genus *Scenedesmus*. *Micscape*. 120. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/oct05ind.html> (acedido em 15.10.2011).
- Patterson, D.J., 2009. *Encyclopedia of Life*, <http://eol.org/pages/901806/overview> (acedido em 15.10.2011).
- Renimel I., Lamy C., Dupont D., Darnault S., 2010. Cosmetic slimming composition containing an extract of biomass of the alga *Nannochloris oleoabundans*. *LVMH Recherche*, <http://www.freshpatents.com/Cosmetic-slimming-composition-containing-an->

extract-of-biomass-of-the-alga-neochloris-oleoabundans-  
dt20080214ptan20080038290.php (acedido em 18.10.2010).

- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd., 584 pp.
- Sarris, D., Panayotou, M., Koutinas, A., Komaitis, M., Papanikolau, S., 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86(11): 1439-1448.
- Seambiotic. [http://www.seambiotic.com/research/microalgae-speices/nannochloro\\_psis-sp/](http://www.seambiotic.com/research/microalgae-speices/nannochloro_psis-sp/) (acedido em 15.10.2011).
- Singh, A., Nigam, P.S., Murphy, J.D., 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*. 102(1): 10-16.
- Singh, J., Gu, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(9): 2596-2610.
- Strahan D., 2008. Green Fuel for the Airline Industry. *New Scientist*. 2669: 34-37.
- Subhadra, B., 2010. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*. 38(10): 5892-5901.
- Teixeira, C., 2010. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Instituto Nacional de Tecnologia*. 91:95.
- Torvanger A., Meadowcroft J., 2011. The political economy of technology support: Making decisions about carbon capture and storage and low carbon energy. *Global Environmental Change*. 21(2): 303-312.

### Bibliografia consultada

- Amin S., 2009. Review on biofuel oil and gás production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*. 50(7): 1834-1840.
- Brennan L., Owende P., 2009. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(2): 557-577.
- Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R., Das K. (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*. 101(9): 3097-3105.
- Cooney M., Young G., Nagle N., 2009. Extraction of Bio-oils from Microalgae. *Separation & Purification Reviews*. 38(4): 291-325.
- Damiani M., Popovich C., Constenla D., Leonardi P., 2010, Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*. 101(11): 3801-3807.

- Demirbas A., Demirbas M., 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*. 52(1): 163-170.
- Francavilla, M., Trotta P., Luque R., 2009. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology*. 101(11): 4144-4150.
- Grima, E., Medina, A., Giménez, A., Pérez, J., Camacho, F., Sánchez, J., 1994. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *JAOCS*. 71(9): 955-959.
- Kovacevic, V., Wesseler, J., 2010. Cost-effectiveness analysis of algae energy production in the EU. *Energy Policy*. 38(10): 5749-5757.
- Pittman, J., Dean, A., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 102(1): 17-25.
- Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V., 2010. Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *American Chemical Society*. 49(6): 2979-2985.
- Strahan D., 2008. Green Fuel for the Airline Industry. *New Scientist*. 2669: 34-37.
- Subhadra, B., 2010. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*. 38(10): 5892-5901.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*. 101(14): 5494-5500.
- Wawrik, B., Harriman, B., 2010. Rapid, Colorimetric quantification of lipid from algae cultures. *Journal of Microbiological Methods*. 80(3): 262-266.
- Widjaja, A., 2009. Lipid production from microalgae as a promising candidate for biodiesel production. *Makara Teknologi*. 13(1): 47-51.
- Young, G., Nippgen, F., Titterbrandt, S., Cooney, M., 2010. Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Separation and Purification technology*. 72(10): 118-121.

### Sítios da Internet

- [www.biblioteca.universia.net](http://www.biblioteca.universia.net) - 23/11/2010
- [www.diarioeconomico.com](http://www.diarioeconomico.com) – 02/01/2011
- [www.dgge.pt](http://www.dgge.pt) – 15/12/2010 (DGEG, 2009)
- [www.energy.gov](http://www.energy.gov) – 15/12/2010
- [www.greencyber.pt](http://www.greencyber.pt) – 10/01/2010
- [www.greenfuelonline.pt](http://www.greenfuelonline.pt) – 10/01/2010
- [www.portal-energia.com](http://www.portal-energia.com) – 10/12/2010
- [www.merck-chemicals.com](http://www.merck-chemicals.com) – 03/03/2010

- REEF- Aquariofilia Marinha, 2008. [www.reefforum.net](http://www.reefforum.net) – 07/01/2011
- [www.worldenergy.org](http://www.worldenergy.org) – 13/11/2010

### **Legislação**

- Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de Março
- Decreto-Lei nº 66/2006, de 22 de Março
- Directiva nº 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho
- Directiva 2009/28/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009
- Decreto-Lei nº 141/2010, de 31 de Dezembro
- Decreto-Lei nº 117/2010, de 25 de Outubro
- Decreto-Lei 77/2011, de 20 de Junho
- NP 1796:2007



# ANEXOS



## Anexo A – Avaliação do crescimento microalgal

A avaliação do crescimento microalgal foi efectuada por comparação da absorvância de uma amostra representativa da cultura, usando uma curva de calibração construída especificamente para a estirpe em estudo, a *Dunaliella tertiolecta* (*Dt*). Todas as leituras foram efectuadas a 685 nm, valor para o qual a absorvância era máxima. Na Tabela A. 1 apresentam-se os resultados obtidos para os ensaios com variação da concentração de macronutrientes.

Tabela A. 1 – Concentrações de biomassa obtidas para os cultivos com diferentes concentrações de macronutrientes.

		18-03-2010 (Tmáx.=25,7°C; Tmín=23,0°C)			19-03-2010 (Tmáx.=25,1°C; Tmín=23,6°C)			22-03-2010 (Tmáx.=25,8°C; Tmín=23,7°C)			23-03-2010 (Tmáx.=25,1°C; Tmín=23,4°C)			24-03-2010 (Tmáx.=25,1°C; Tmín=23,5°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	0,073	0,080	0,077	0,073	0,073	0,073	0,181	0,164	0,173	0,282	0,264	0,273	0,317	0,318	0,318
	2	0,065	0,075	0,070	0,094	0,102	0,098	0,220	0,209	0,215	0,223	0,202	0,213	0,195	0,214	0,205
	3	0,077	0,070	0,074	0,069	0,058	0,064	0,299	0,298	0,299	0,400	0,386	0,393	0,520	0,526	0,523
<b>10x Mg</b>	1	0,069	0,068	0,069	0,045	0,056	0,051	0,192	0,208	0,200	0,259	0,264	0,262	0,290	0,271	0,281
	2	0,072	0,077	0,075	0,075	0,089	0,082	0,230	0,233	0,232	0,272	0,281	0,277	0,307	0,293	0,300
	3	0,070	0,077	0,074	0,055	0,055	0,055	0,125	0,124	0,125	0,133	0,147	0,140	0,148	0,139	0,144
<b>20x Mg</b>	1	0,071	0,078	0,075	0,059	0,062	0,061	0,175	0,200	0,188	0,207	0,224	0,216	0,209	0,202	0,206
	2	0,078	0,079	0,079	0,033	0,036	0,035	0,142	0,151	0,147	0,139	0,154	0,147	0,139	0,134	0,137
	3	0,074	0,080	0,077	0,062	0,053	0,058	0,151	0,167	0,159	0,162	0,163	0,163	0,173	0,196	0,185
<b>10x K</b>	1	0,083	0,092	0,088	0,129	0,121	0,125	0,321	0,332	0,327	0,395	0,404	0,400	0,436	0,441	0,439
	2	0,078	0,080	0,079	0,110	0,099	0,105	0,218	0,223	0,221	0,286	0,267	0,277	0,321	0,291	0,306
	3	0,079	0,079	0,079	0,070	0,068	0,069	0,166	0,186	0,176	0,225	0,246	0,236	0,239	0,250	0,245
<b>20x K</b>	1	0,075	0,080	0,078	0,098	0,093	0,096	0,166	0,185	0,176	0,226	0,234	0,230	0,201	0,227	0,214
	2	0,084	0,080	0,082	0,117	0,111	0,114	0,272	0,264	0,268	0,322	0,311	0,317	0,322	0,341	0,332
	3	0,083	0,091	0,087	0,141	0,114	0,128	0,258	0,247	0,253	0,333	0,303	0,318	0,333	0,356	0,345
<b>10x N</b>	1	0,065	0,062	0,064	0,083	0,077	0,080	0,265	0,247	0,256	0,427	0,396	0,412	0,518	0,515	0,517
	2	0,064	0,062	0,063	0,085	0,077	0,081	0,203	0,201	0,202	0,425	0,411	0,418	0,499	0,507	0,503
	3	0,094	0,082	0,088	0,084	0,078	0,081	0,253	0,266	0,260	0,450	0,432	0,441	0,512	0,562	0,537
<b>20x N</b>	1	0,088	0,080	0,084	0,116	0,101	0,109	0,255	0,265	0,260	0,399	0,426	0,413	0,463	0,489	0,476
	2	0,086	0,079	0,083	0,099	0,114	0,107	0,187	0,197	0,192	0,280	0,279	0,280	0,359	0,363	0,361
	3	0,084	0,077	0,081	0,085	0,082	0,084	0,209	0,214	0,212	0,299	0,288	0,294	0,373	0,367	0,370

		25-03-2010 (Tmáx.=24,9°C; Tmín=23,0°C)			26-03-2010 (Tmáx.=24,4°C; Tmín=23,0°C)			27-03-2010 (Tmáx.=26,5°C; Tmín=23,8°C)			29-03-2010 (Tmáx.=26,0°C; Tmín=23,9°C)			30-03-2010 (Tmáx.=25,6°C; Tmín=23,4°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	Média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média
<b>Padrão</b>	1	0,411	0,386	0,399	0,434	0,451	0,443	0,491	0,447	0,469	0,597	0,586	0,592	0,640	0,625	0,633
	2	0,368	0,351	0,360	0,394	0,414	0,404	0,399	0,384	0,392	0,461	0,467	0,464	0,528	0,520	0,524
	3	0,657	0,624	0,641	0,689	0,724	0,707	0,842	0,811	0,827	1,142	1,187	1,165	1,237	1,194	1,216
<b>10x Mg</b>	1	0,374	0,361	0,368	0,430	0,431	0,431	0,485	0,450	0,468	0,600	0,571	0,586	0,645	0,618	0,632
	2	0,384	0,355	0,370	0,400	0,419	0,410	0,490	0,465	0,478	0,600	0,580	0,590	0,657	0,632	0,645
	3	0,197	0,180	0,189	0,220	0,241	0,231	0,246	0,230	0,238	0,370	0,344	0,357	0,431	0,415	0,423
<b>20x Mg</b>	1	0,302	0,286	0,294	0,350	0,316	0,333	0,322	0,334	0,328	0,400	0,393	0,397	0,472	0,450	0,461
	2	0,167	0,150	0,159	0,205	0,191	0,198	0,211	0,222	0,217	0,286	0,266	0,276	0,327	0,300	0,314
	3	0,217	0,244	0,231	0,263	0,254	0,259	0,250	0,260	0,255	0,338	0,318	0,328	0,364	0,390	0,377
<b>10x K</b>	1	0,527	0,480	0,504	0,536	0,545	0,541	0,589	0,607	0,598	0,724	0,723	0,724	0,775	0,784	0,780
	2	0,346	0,340	0,343	0,345	0,372	0,359	0,390	0,388	0,389	0,528	0,520	0,524	0,611	0,577	0,594
	3	0,323	0,293	0,308	0,333	0,309	0,321	0,353	0,347	0,350	0,460	0,448	0,454	0,481	0,479	0,480
<b>20x K</b>	1	0,265	0,246	0,256	0,264	0,280	0,272	0,288	0,282	0,285	0,487	0,473	0,480	0,548	0,518	0,533
	2	0,425	0,409	0,417	0,428	0,442	0,435	0,505	0,486	0,496	0,654	0,623	0,639	0,728	0,686	0,707
	3	0,427	0,395	0,411	0,413	0,430	0,422	0,516	0,503	0,510	0,617	0,587	0,602	0,648	0,632	0,640
<b>10x N</b>	1	0,562	0,539	0,551	0,652	0,624	0,638	0,732	0,694	0,713	0,963	0,963	0,963	0,969	1,020	0,995
	2	0,566	0,545	0,556	0,648	0,684	0,666	0,718	0,700	0,709	0,939	0,938	0,939	0,999	0,988	0,994
	3	0,572	0,598	0,585	0,681	0,671	0,676	0,776	0,749	0,763	1,004	1,021	1,013	1,073	1,122	1,098
<b>20x N</b>	1	0,542	0,582	0,562	0,667	0,710	0,689	0,763	0,798	0,781	0,964	0,996	0,980	1,081	1,123	1,102
	2	0,405	0,417	0,411	0,434	0,452	0,443	0,514	0,533	0,524	0,650	0,618	0,634	0,738	0,793	0,766
	3	0,406	0,423	0,415	0,464	0,461	0,463	0,527	0,550	0,539	0,615	0,695	0,655	0,703	0,748	0,726

		31-03-2010 (Tmáx.=25,3°C; Tmín=23,2°C)			01-04-2010 (Tmáx.=26,1°C; Tmín=23,7°C)			03-04-2010 (Tmáx.=25,9°C; Tmín=23,1°C)			06-04-2010 (Tmáx.=25,2°C; Tmín=23,5°C)			07-04-2010 (Tmáx.=25,0°C; Tmín=23,2°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	0,698	0,665	0,682	0,740	0,715	0,728	0,735	0,730	0,733	0,966	1,001	0,984	1,057	1,023	1,040
	2	0,590	0,561	0,576	0,634	0,630	0,632	0,687	0,667	0,677	0,928	0,952	0,940	1,021	1,004	1,013
	3	1,301	1,309	1,305	1,361	1,351	1,356	1,521	1,493	1,507	1,834	1,872	1,853	1,881	1,956	1,919
<b>10x Mg</b>	1	0,711	0,693	0,702	0,780	0,745	0,763	0,784	0,737	0,761	1,005	0,943	0,974	1,048	1,007	1,028
	2	0,690	0,666	0,678	0,773	0,707	0,740	0,784	0,742	0,763	1,015	0,931	0,973	1,036	0,995	1,016
	3	0,472	0,479	0,476	0,531	0,486	0,509	0,580	0,534	0,557	0,820	0,754	0,787	0,894	0,831	0,863
<b>20x Mg</b>	1	0,499	0,527	0,513	0,513	0,537	0,525	0,593	0,563	0,578	0,797	0,748	0,773	0,879	0,817	0,848
	2	0,333	0,339	0,336	0,371	0,388	0,380	0,460	0,470	0,465	0,652	0,618	0,635	0,738	0,686	0,712
	3	0,404	0,398	0,401	0,396	0,424	0,410	0,464	0,457	0,461	0,635	0,613	0,624	0,721	0,685	0,703
<b>10x K</b>	1	0,800	0,840	0,820	0,822	0,849	0,836	0,840	0,850	0,845	1,094	1,072	1,083	1,121	1,075	1,098
	2	0,625	0,664	0,645	0,661	0,641	0,651	0,663	0,663	0,663	0,861	0,845	0,853	0,951	0,905	0,928
	3	0,498	0,544	0,521	0,517	0,525	0,521	0,599	0,593	0,596	0,864	0,810	0,837	0,884	0,881	0,883
<b>20x K</b>	1	0,577	0,590	0,584	0,634	0,627	0,631	0,696	0,694	0,695	0,922	0,891	0,907	0,960	0,962	0,961
	2	0,752	0,766	0,759	0,777	0,749	0,763	0,760	0,763	0,762	1,012	0,964	0,988	1,027	1,027	1,027
	3	0,692	0,697	0,695	0,720	0,700	0,710	0,769	0,759	0,764	0,976	0,983	0,980	1,001	1,012	1,007
<b>10x N</b>	1	1,065	1,115	1,090	1,186	1,158	1,172	1,376	1,381	1,379	1,620	1,600	1,610	1,699	1,777	1,738
	2	1,095	1,111	1,103	1,112	1,114	1,113	1,379	1,362	1,371	1,530	1,528	1,529	1,652	1,663	1,658
	3	1,214	1,254	1,234	1,315	1,288	1,302	1,484	1,479	1,482	1,758	1,709	1,734	1,772	1,712	1,742
<b>20x N</b>	1	1,202	1,195	1,199	1,310	1,306	1,308	1,467	1,423	1,445	1,697	1,689	1,693	1,795	1,712	1,754
	2	0,853	0,817	0,835	0,938	0,939	0,939	1,068	1,053	1,061	1,431	1,411	1,421	1,478	1,488	1,483
	3	0,826	0,800	0,813	0,911	0,885	0,898	1,094	1,075	1,085	1,400	1,335	1,368	1,458	1,534	1,496

		08-04-2010 (Tmáx.=25,7°C; Tmín=23,1°C)			12-04-2010 (Tmáx.=25,1°C; Tmín=23,5°C)			13-04-2010 (Tmáx.=25,2°C; Tmín=23,5°C)			14-04-2010 (Tmáx.=25,9°C; Tmín=24,7°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	1,125	1,098	1,112	1,306	1,255	1,281	1,311	1,263	1,287	1,321	1,268	1,295
	2	1,071	1,041	1,056	1,206	1,228	1,217	1,219	1,233	1,226	1,230	1,231	1,231
	3	1,988	1,981	1,985	2,272	2,239	2,256	2,353	2,342	2,348	2,290	2,394	2,342
<b>10x Mg</b>	1	1,038	1,066	1,052	1,039	1,065	1,052						
	2	1,091	0,997	1,044	1,092	1,000	1,046						
	3	0,916	0,887	0,902	0,918	0,889	0,904						
<b>20x Mg</b>	1	0,886	0,849	0,868	0,993	0,985	0,989	0,992	0,986	0,989			
	2	0,774	0,762	0,768	0,964	0,878	0,921	0,966	0,877	0,922			
	3	0,757	0,737	0,747	0,976	0,904	0,940	0,975	0,901	0,938			
<b>10x K</b>	1	1,172	1,141	1,157	1,345	1,245	1,295	1,350	1,257	1,304	1,386	1,238	1,312
	2	0,966	0,964	0,965	1,145	1,103	1,124	1,168	1,117	1,143	1,177	1,148	1,163
	3	0,923	0,895	0,909	1,079	1,060	1,070	1,084	1,076	1,080	1,096	1,021	1,059
<b>20x K</b>	1	0,974	0,969	0,972	1,154	1,109	1,132	1,155	1,111	1,133			
	2	1,049	1,026	1,038	1,286	1,227	1,257	1,285	1,223	1,254			
	3	1,033	1,015	1,024	1,179	1,167	1,173	1,178	1,179	1,179			
<b>10x N</b>	1	1,832	1,819	1,826	1,978	1,928	1,953	2,039	2,035	2,037	2,040	2,040	2,040
	2	1,752	1,773	1,763	1,970	1,928	1,949	2,026	2,041	2,034	2,026	2,043	2,035
	3	1,875	1,830	1,853	2,027	1,993	2,010	2,093	2,015	2,054	2,094	2,020	2,057
<b>20x N</b>	1	1,880	1,837	1,859	1,970	2,097	2,034	2,104	2,308	2,206	2,160	2,163	2,162
	2	1,588	1,508	1,548	1,785	1,811	1,798	1,760	1,747	1,754	1,773	1,786	1,780
	3	1,534	1,513	1,524	1,761	1,807	1,784	1,756	1,789	1,773	1,771	1,832	1,802

**Nota:** Os valores em fundo amarelo foram desprezados nos cálculos, visto serem muito díspares dos restantes 2 relativos ao mesmo ensaio.

Os valores das absorvâncias médias foram então lançados na curva de calibração, obtendo-se as concentrações de biomassa algal apresentadas na Tabela A. 2.

Tabela A. 2 – Concentrações de biomassa obtidas para os cultivos com diferentes concentrações de macronutrientes.

	<b>Padrão</b> <b>mg/L</b>	<b>10x Mg</b> <b>mg/L</b>	<b>20x Mg</b> <b>mg/L</b>	<b>10x K</b> <b>mg/L</b>	<b>20x K</b> <b>mg/L</b>	<b>10x N</b> <b>mg/L</b>	<b>20x N</b> <b>mg/L</b>
<b>Dia 1</b>	0,073	0,072	0,077	0,082	0,082	0,072	0,082
<b>Dia 2</b>	0,078	0,063	0,051	0,100	0,112	0,081	0,100
<b>Dia 5</b>	0,229	0,185	0,164	0,241	0,232	0,239	0,221
<b>Dia 6</b>	0,243	0,226	0,175	0,304	0,288	0,424	0,329
<b>Dia 7</b>	0,261	0,241	0,176	0,330	0,297	0,519	0,402
<b>Dia 8</b>	0,379	0,309	0,228	0,385	0,361	0,564	0,463
<b>Dia 9</b>	0,423	0,357	0,263	0,407	0,376	0,660	0,531
<b>Dia 10</b>	0,430	0,394	0,267	0,446	0,430	0,728	0,614
<b>Dia 12</b>	0,528	0,511	0,334	0,567	0,574	0,971	0,756
<b>Dia 13</b>	0,578	0,566	0,384	0,618	0,627	1,029	0,864
<b>Dia 14</b>	0,576	0,678	0,336	0,645	0,759	1,103	0,835
<b>Dia 15</b>	0,632	0,740	0,380	0,651	0,763	1,113	0,939
<b>Dia 17</b>	0,70475	0,694	0,501	0,701	0,740	1,410	1,197
<b>Dia 20</b>	0,96175	0,911	0,677	0,924	0,958	1,624	1,494
<b>Dia 21</b>	1,02625	0,969	0,754	0,970	0,998	1,713	1,578
<b>Dia 22</b>	1,08375	0,999	0,794	1,010	1,011	1,814	1,643
<b>Dia 26</b>	1,24875	1,001	0,950	1,163	1,187	1,971	1,872
<b>Dia 27</b>	1,2565		0,950	1,175	1,189	2,042	1,911
<b>Dia 28</b>	1,2625			1,178		2,044	1,914

A avaliação do crescimento microalgal para os ensaios com variação da concentração de micronutrientes, representada na Tabela A. 3, foi efectuada por comparação da absorvância de uma amostra representativa da cultura de *Dt*, usando uma curva de calibração construída especificamente para a estirpe em estudo. Todas as leituras foram efectuadas a 685 nm, valor para o qual a absorvância era máxima.

Tabela A. 3 – Absorvâncias medidas nas culturas com diferentes concentrações de micronutrientes.

		20-04-2010 (Tmáx.=27,0°C; Tmín=24,6°C)			21-04-2010 (Tmáx.=25,3°C; Tmín=23,8°C)			22-04-2010 (Tmáx.=26,0°C; Tmín=24,6°C)			23-04-2010 (Tmáx.=27,0°C; Tmín=25,8°C)			26-04-2010 (Tmáx.=26,9°C; Tmín=25,8°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	Média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média
<b>Padrão</b>	1	0,217	0,231	0,224	0,238	0,227	0,2325	0,231	0,253	0,242	0,285	0,270	0,2775	0,378	0,393	0,386
	2	0,206	0,217	0,212	0,230	0,243	0,2365	0,207	0,233	0,220	0,223	0,216	0,2195	0,280	0,278	0,279
	3	0,227	0,225	0,226	0,259	0,244	0,2515	0,259	0,270	0,265	0,328	0,322	0,325	0,517	0,496	0,507
<b>10x Mn</b>	1	0,182	0,189	0,186	0,215	0,242	0,2285	0,242	0,227	0,235	0,269	0,255	0,262	0,262	0,248	0,255
	2	0,206	0,216	0,211	0,225	0,203	0,214	0,217	0,216	0,217	0,225	0,243	0,234	0,291	0,299	0,295
	3	0,206	0,185	0,196	0,239	0,239	0,239	0,267	0,264	0,266	0,268	0,253	0,2605	0,322	0,327	0,325
<b>20x Mn</b>	1	0,217	0,208	0,213	0,231	0,219	0,225	0,228	0,214	0,221	0,231	0,231	0,231	0,259	0,236	0,248
	2	0,208	0,194	0,201	0,223	0,227	0,225	0,254	0,242	0,248	0,267	0,272	0,2695	0,297	0,312	0,305
	3	0,201	0,205	0,203	0,252	0,240	0,246	0,267	0,273	0,270	0,246	0,260	0,253	0,368	0,373	0,371
<b>10x Zn</b>	1	0,212	0,198	0,205	0,232	0,240	0,236	0,272	0,268	0,270	0,260	0,269	0,2645	0,386	0,386	0,386
	2	0,202	0,201	0,202	0,246	0,237	0,2415	0,252	0,268	0,260	0,266	0,275	0,2705	0,277	0,265	0,271
	3	0,204	0,202	0,203	0,249	0,228	0,2385	0,196	0,202	0,199	0,225	0,214	0,2195	0,244	0,226	0,235
<b>20x Zn</b>	1	0,222	0,207	0,215	0,218	0,217	0,2175	0,238	0,248	0,243	0,258	0,261	0,2595	0,302	0,297	0,300
	2	0,22	0,222	0,221	0,226	0,243	0,2345	0,255	0,257	0,256	0,256	0,258	0,257	0,336	0,315	0,326
	3	0,219	0,227	0,223	0,255	0,257	0,256	0,254	0,260	0,257	0,267	0,259	0,263	0,360	0,341	0,351
<b>10x Fe</b>	1	0,224	0,217	0,221	0,321	0,335	0,328	0,397	0,395	0,396	0,436	0,416	0,426	0,652	0,632	0,642
	2	0,222	0,225	0,224	0,224	0,208	0,216	0,362	0,356	0,359	0,421	0,413	0,417	0,647	0,639	0,643
	3	0,234	0,226	0,230	0,269	0,222	0,2455	0,287	0,269	0,278	0,323	0,322	0,3225	0,539	0,549	0,544
<b>20x Fe</b>	1	0,297	0,298	0,298	0,242	0,243	0,2425	0,273	0,279	0,276	0,294	0,287	0,2905	0,338	0,328	0,333
	2	0,240	0,254	0,247	0,218	0,225	0,2215	0,237	0,252	0,245	0,243	0,248	0,2455	0,399	0,400	0,400
	3	0,124	0,134	0,129	0,212	0,224	0,218	0,175	0,187	0,181	0,259	0,243	0,251	0,196	0,201	0,199

		27-04-2010 (Tmáx.=27,0°C; Tmín=25,8°C)			28-04-2010 (Tmáx.=27,0°C; Tmín=24,2°C)			29-04-2010 (Tmáx.=25,7°C; Tmín=23,5°C)			30-04-2010 (Tmáx.=25,8°C; Tmín=23,1°C)			03-05-2010 (Tmáx.=26,3°C; Tmín=23,1°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	0,440	0,411	0,426	0,533	0,518	0,526	0,525	0,508	0,517	0,571	0,541	0,556	0,671	0,643	0,657
	2	0,274	0,278	0,276	0,373	0,388	0,381	0,372	0,356	0,364	0,431	0,415	0,423	0,475	0,466	0,471
	3	0,671	0,659	0,665	0,740	0,777	0,759	0,838	0,841	0,840	0,948	0,912	0,930	1,155	1,226	1,191
<b>10x Mn</b>	1	0,301	0,297	0,299	0,383	0,402	0,393	0,377	0,388	0,383	0,416	0,402	0,409	0,449	0,479	0,464
	2	0,325	0,317	0,321	0,401	0,426	0,414	0,432	0,420	0,426	0,453	0,442	0,448	0,534	0,556	0,545
	3	0,368	0,349	0,359	0,380	0,377	0,379	0,452	0,456	0,454	0,465	0,449	0,457	0,507	0,528	0,518
<b>20x Mn</b>	1	0,291	0,279	0,285	0,389	0,374	0,382	0,393	0,360	0,377	0,400	0,401	0,401	0,424	0,429	0,427
	2	0,384	0,356	0,370	0,438	0,435	0,437	0,445	0,427	0,436	0,483	0,469	0,476	0,538	0,547	0,543
	3	0,429	0,398	0,414	0,496	0,494	0,495	0,513	0,492	0,503	0,532	0,519	0,526	0,576	0,588	0,582
<b>10x Zn</b>	1	0,396	0,390	0,393	0,439	0,458	0,449	0,449	0,448	0,449	0,502	0,513	0,508	0,553	0,574	0,564
	2	0,288	0,265	0,277	0,323	0,354	0,339	0,395	0,377	0,386	0,429	0,430	0,430	0,441	0,436	0,439
	3	0,242	0,244	0,243	0,328	0,328	0,328	0,310	0,296	0,303	0,335	0,319	0,327	0,350	0,369	0,360
<b>20x Zn</b>	1	0,337	0,330	0,334	0,403	0,384	0,394	0,440	0,414	0,427	0,479	0,485	0,482	0,547	0,590	0,569
	2	0,343	0,350	0,347	0,451	0,475	0,463	0,438	0,440	0,439	0,479	0,487	0,483	0,560	0,572	0,566
	3	0,381	0,401	0,391	0,458	0,440	0,449	0,468	0,460	0,464	0,522	0,507	0,515	0,584	0,590	0,587
<b>10x Fe</b>	1	0,711	0,760	0,736	0,768	0,789	0,779	0,858	0,832	0,845	0,891	0,868	0,880	1,045	1,105	1,075
	2	0,694	0,710	0,702	0,620	0,621	0,621	0,744	0,738	0,741	0,758	0,766	0,762	0,931	0,963	0,947
	3	0,616	0,590	0,603	0,667	0,664	0,666	0,810	0,780	0,795	0,801	0,797	0,799	1,023	1,093	1,058
<b>20x Fe</b>	1	0,357	0,353	0,355	0,467	0,464	0,466	0,515	0,490	0,503	0,461	0,459	0,460	0,734	0,765	0,750
	2	0,486	0,532	0,509	0,589	0,612	0,601	0,584	0,580	0,582	0,631	0,618	0,625	0,747	0,808	0,778
	3	0,236	0,242	0,239	0,275	0,292	0,284	0,310	0,310	0,310	0,401	0,404	0,403	0,484	0,520	0,502

		04-05-2010 (Tmáx.=25,0°C; Tmín=23,8°C)			05-05-2010 (Tmáx.=25,8°C; Tmín=23,2°C)			06-05-2010 (Tmáx.=25,0°C; Tmín=23,7°C)			10-05-2010 (Tmáx.=25,7°C; Tmín=23,9°C)			11-05-2010 (Tmáx.=26,4°C; Tmín=24,8°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	0,728	0,697	0,713	0,711	0,718	0,715	0,808	0,765	0,787	0,909	0,887	0,898	0,894	0,880	0,887
	2	0,476	0,482	0,479	0,473	0,483	0,478	0,576	0,554	0,565	0,794	0,706	0,750	0,779	0,780	0,780
	3	1,272	1,308	1,290	1,320	1,340	1,330	1,400	1,439	1,420	1,629	1,704	1,667	1,683	1,704	1,694
<b>10x Mn</b>	1	0,502	0,503	0,503	0,549	0,516	0,533	0,628	0,603	0,616	0,739	0,740	0,740	0,778	0,751	0,765
	2	0,541	0,545	0,543	0,599	0,574	0,587	0,645	0,631	0,638	0,780	0,782	0,781	0,795	0,761	0,778
	3	0,562	0,602	0,582	0,544	0,554	0,549	0,651	0,656	0,654	0,806	0,805	0,806	0,800	0,778	0,789
<b>20x Mn</b>	1	0,458	0,444	0,451	0,489	0,479	0,484	0,562	0,562	0,562	0,753	0,791	0,772	0,772	0,762	0,767
	2	0,565	0,569	0,567	0,589	0,560	0,575	0,635	0,640	0,638	0,792	0,832	0,812	0,863	0,857	0,860
	3	0,641	0,658	0,650	0,671	0,667	0,669	0,744	0,732	0,738	0,877	0,901	0,889	0,905	0,900	0,903
<b>10x Zn</b>	1	0,586	0,614	0,600	0,628	0,640	0,634	0,691	0,710	0,701	0,814	0,848	0,831	0,851	0,833	0,842
	2	0,486	0,483	0,485	0,474	0,459	0,467	0,598	0,597	0,598	0,747	0,781	0,764	0,719	0,705	0,712
	3	0,358	0,350	0,354	0,470	0,460	0,465	0,433	0,418	0,426	0,574	0,609	0,592	0,604	0,611	0,608
<b>20x Zn</b>	1	0,607	0,582	0,595	0,608	0,612	0,610	0,632	0,645	0,639	0,770	0,795	0,783	0,807	0,805	0,806
	2	0,561	0,575	0,568	0,577	0,611	0,594	0,658	0,642	0,650	0,780	0,802	0,791	0,842	0,835	0,839
	3	0,623	0,598	0,611	0,638	0,627	0,633	0,686	0,678	0,682	0,824	0,876	0,850	0,877	0,867	0,872
<b>10x Fe</b>	1	1,242	1,349	1,296	1,304	1,288	1,296	1,456	1,419	1,438	1,632	1,741	1,687	1,766	1,757	1,762
	2	1,013	1,065	1,039	1,143	1,151	1,147	1,291	1,203	1,247	1,327	1,385	1,356	1,439	1,419	1,429
	3	1,199	1,262	1,231	1,292	1,304	1,298	1,307	1,395	1,351	1,639	1,671	1,655	1,687	1,662	1,675
<b>20x Fe</b>	1	0,770	0,811	0,791	0,824	0,803	0,814	0,975	0,979	0,977	1,291	1,376	1,334	1,377	1,388	1,383
	2	0,937	1,021	0,979	0,987	0,981	0,984	1,049	1,044	1,047	1,354	1,443	1,399	1,504	1,530	1,517
	3	0,504	0,535	0,520	0,538	0,530	0,534	0,685	0,707	0,696	0,996	1,019	1,008	1,066	1,074	1,070

		12-05-2010 (T <sub>máx.</sub> =26,7°C; T <sub>mín.</sub> =25,0°C)			14-05-2010 (T <sub>máx.</sub> =26,1°C; T <sub>mín.</sub> =24,7°C)			17-05-2010 (T <sub>máx.</sub> =25,9°C; T <sub>mín.</sub> =24,0°C)			18-05-2010 (T <sub>máx.</sub> =26,2°C; T <sub>mín.</sub> =25,5°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média
<b>Padrão</b>	1	0,946	0,964	0,955	1,035	1,013	1,024	1,150	1,012	1,081	1,151	1,011	1,081
	2	0,845	0,842	0,844	0,928	0,91	0,919	1,015	1,015	1,015	1,05	1,011	1,031
	3	1,676	1,764	1,720	1,820	1,772	1,796	1,867	1,871	1,869	1,872	1,897	1,885
<b>10x Mn</b>	1	0,841	0,828	0,835	0,910	0,871	0,891	0,942	0,954	0,948	0,953	0,951	0,952
	2	0,873	0,866	0,870	0,884	0,865	0,875	0,984	0,964	0,974	0,988	0,986	0,987
	3	0,857	0,823	0,840	0,886	0,858	0,872	0,926	0,981	0,954	0,932	0,968	0,950
<b>20x Mn</b>	1	0,820	0,824	0,822	0,880	0,836	0,858	0,961	0,964	0,963	1,000	1,007	1,004
	2	0,941	0,934	0,938	0,962	0,962	0,962	1,044	1,078	1,061	1,068	1,062	1,065
	3	0,924	0,911	0,918	0,925	0,940	0,933	1,126	1,179	1,153	1,114	1,107	1,111
<b>10x Zn</b>	1	0,861	0,850	0,856	0,888	0,868	0,878	0,966	1,034	1,000	0,991	0,997	0,994
	2	0,769	0,768	0,769	0,831	0,820	0,826	0,909	0,964	0,937	0,924	0,947	0,936
	3	0,657	0,661	0,659	0,712	0,718	0,715	0,760	0,834	0,797	0,803	0,814	0,809
<b>20x Zn</b>	1	0,853	0,858	0,856	0,871	0,873	0,872	0,997	0,994	0,996	1,017	0,950	0,984
	2	0,851	0,876	0,864	0,901	0,889	0,895	1,001	1,004	1,003	1,021	0,993	1,007
	3	0,874	0,909	0,892	0,916	0,920	0,918	1,037	1,030	1,034	1,079	1,017	1,048
<b>10x Fe</b>	1	1,759	1,847	1,803	1,762	1,821	1,792						
	2	1,404	1,483	1,444	1,410	1,477	1,444						
	3	1,679	1,763	1,721	1,723	1,758	1,741						
<b>20x Fe</b>	1	1,388	1,461	1,425	1,401	1,442	1,422						
	2	1,535	1,582	1,559	1,541	1,581	1,561						
	3	1,138	1,168	1,153	1,142	1,172	1,157						

Os valores das absorvâncias médias foram então lançados na curva de calibração, obtendo-se as concentrações de biomassa algal apresentadas na Tabela A. 4.

Tabela A. 4 – Concentrações obtidas para os ensaios com variação na concentração de micronutrientes.

	<b>Padrão mg/L</b>	<b>10x Mn mg/L</b>	<b>20x Mn mg/L</b>	<b>10x Zn mg/L</b>	<b>20x Zn mg/L</b>	<b>10x Fe mg/L</b>	<b>20x Fe mg/L</b>
<b>Dia 1</b>	0,221	0,197	0,206	0,203	0,220	0,225	0,225
<b>Dia 2</b>	0,240	0,227	0,232	0,239	0,236	0,263	0,227
<b>Dia 3</b>	0,242	0,239	0,246	0,243	0,252	0,344	0,234
<b>Dia 4</b>	0,274	0,252	0,251	0,252	0,260	0,389	0,262
<b>Dia 7</b>	0,390	0,292	0,308	0,297	0,325	0,610	0,310
<b>Dia 8</b>	0,456	0,326	0,356	0,304	0,357	0,680	0,368
<b>Dia 9</b>	0,555	0,395	0,438	0,372	0,435	0,688	0,450
<b>Dia 10</b>	0,573	0,421	0,438	0,379	0,443	0,794	0,465
<b>Dia 11</b>	0,636	0,438	0,467	0,421	0,493	0,814	0,496
<b>Dia 14</b>	0,773	0,509	0,517	0,454	0,574	1,027	0,676
<b>Dia 15</b>	0,827	0,543	0,556	0,480	0,591	1,188	0,763
<b>Dia 16</b>	0,841	0,556	0,576	0,522	0,612	1,247	0,777
<b>Dia 17</b>	0,924	0,636	0,646	0,575	0,657	1,345	0,907
<b>Dia 21</b>	1,105	0,775	0,824	0,721	0,808	1,566	1,247
<b>Dia 22</b>	1,12	0,777	0,843	0,729	0,839	1,622	1,323
<b>Dia 23</b>	1,173	0,848	0,892	0,761	0,870	1,656	1,379
<b>Dia 25</b>	1,246	0,879	0,918	0,806	0,895	1,659	1,380
<b>Dia 28</b>	1,322	0,959	1,059	0,911	1,011		
<b>Dia 29</b>	1,332	0,963	1,06	0,913	1,013		

A avaliação do crescimento microalgal para os ensaios com variação da concentração de cobalto e fósforo, representada na Tabela A. 5, foi efectuada por comparação da absorvância de uma amostra representativa da cultura, usando uma curva de calibração construída especificamente para a estirpe em estudo. Todas as leituras foram efectuadas a 685 nm, valor para o qual a absorvância era máxima.

Tabela A. 5 – Absorvâncias medidas nas culturas com diferentes concentrações de Cobalto e Fósforo.

		01-07-2010 (Tmáx.=26,7°C; Tmín=25,1°C)			05-07-2010 (Tmáx.=26,4°C; Tmín=25,0°C)			12-07-2010 (Tmáx.=25,8°C; Tmín=24,9°C)			19-07-2010 (Tmáx.=26,3°C; Tmín=25,9°C)			22-07-2010 (Tmáx.=26,2°C; Tmín=25,5°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	Média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	Média
<b>Padrão</b>	1	0,063	0,071	0,067	0,389	0,396	0,3925	0,861	0,872	0,8665	0,974	0,989	0,982	1,127	1,112	1,1195
	2	0,069	0,076	0,0725	0,444	0,454	0,449	0,859	0,842	0,8505	0,978	0,966	0,972	1,119	1,126	1,1225
	3	0,071	0,076	0,0735	0,403	0,413	0,408	0,832	0,828	0,83	0,958	0,947	0,953	1,109	1,112	1,1105
<b>10x Co</b>	1	0,084	0,090	0,087	0,183	0,172	0,1775	0,051	0,069	0,06						
	2	0,072	0,080	0,076	0,193	0,191	0,192	0,054	0,059	0,0565						
	3	0,084	0,092	0,088	0,185	0,189	0,187	0,066	0,069	0,0675						
<b>20x Co</b>	1	0,073	0,080	0,0765	0,118	0,124	0,121	0,035	0,041	0,038						
	2	0,067	0,072	0,0695	0,079	0,080	0,0795	0,030	0,033	0,0315						
	3	0,075	0,083	0,079	0,070	0,073	0,0715	0,022	0,027	0,0245						
<b>10x P</b>	1	0,071	0,066	0,0685	0,171	0,163	0,167	0,203	0,188	0,1955	0,249	0,263	0,256	0,454	0,432	0,443
	2	0,062	0,057	0,0595	0,203	0,187	0,195	0,337	0,328	0,3325	0,337	0,396	0,367	0,551	0,528	0,5395
	3	0,064	0,061	0,0625	0,116	0,121	0,1185	0,187	0,176	0,1815	0,250	0,239	0,245	0,455	0,441	0,448
<b>20x P</b>	1	0,071	0,073	0,072	0,309	0,296	0,3025	0,609	0,644	0,6265	0,782	0,725	0,754	0,973	0,939	0,956
	2	0,071	0,070	0,0705	0,325	0,328	0,3265	0,697	0,707	0,702	0,880	0,866	0,873	1,131	1,123	1,127
	3	0,070	0,066	0,068	0,239	0,289	0,264	0,523	0,524	0,5235	0,744	0,704	0,724	0,991	0,988	0,9895

		26-07-2010 (Tmáx.=27,0°C; Tmín=26,6°C)			28-07-2010 (Tmáx.=26,8°C; Tmín=26,2°C)			29-07-2010 (Tmáx.=26,8°C; Tmín=26,1°C)		
		1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média	1ª leitura	2ª leitura	média
<b>Padrão</b>	1	1,250	1,241	1,246	1,261	1,253	1,257			
	2	1,299	1,290	1,295	1,289	1,282	1,286			
	3	1,238	1,242	1,240	1,247	1,247	1,247			
<b>10x Co</b>	1									
	2									
	3									
<b>20x Co</b>	1									
	2									
	3									
<b>10x P</b>	1	0,538	0,533	0,536	0,658	0,668	0,663	0,659	0,667	0,663
	2	0,805	0,822	0,814	0,969	0,945	0,957	0,971	0,953	0,962
	3	0,780	0,756	0,768	0,793	0,827	0,810	0,795	0,826	0,811
<b>20x P</b>	1	1,124	1,141	1,133	1,122	1,043	1,083			
	2	1,102	1,107	1,105	1,169	1,166	1,168			
	3	1,028	1,042	1,035	1,027	1,040	1,034			


Os valores das absorvâncias médias foram então lançados na curva de calibração, obtendo-se as concentrações de biomassa algal apresentadas na Tabela A. 6.

Tabela A. 6 – Concentrações obtidas para os ensaios com variação na concentração de Cobalto e Fósforo.

	<b>Padrão mg/L</b>	<b>10x P mg/L</b>	<b>20x P mg/L</b>	<b>10x Co mg/L</b>	<b>20x Co mg/L</b>
<b>Dia1</b>	35,54	30,15	34,77	45,54	38,62
<b>Dia8</b>	301,69	104,00	210,15	124,00	50,92
<b>Dia15</b>	634,00	163,23	455,54	27,85	4,77
<b>Dia18</b>	726,31	203,23	584,00		
<b>Dia22</b>	840,92	347,85	768,62		
<b>Dia24</b>	950,15	524,00	820,15		
<b>Dia25</b>	952,46	604,00	823,23		
<b>Dia26</b>		605,54			



## Anexo B – Meio de cultura



**Sammlung von Algenkulturen Göttingen**  
Culture Collection of Algae

**Medium Recipe**  
Version 10.2008

**25. Artificial Seawater Medium with Vitamins (full strength= ASM30 + V;  
25. a brackish/ half-strength = ASM15 + V)**  
(after J. Brand, from Starr & Zeikus 1993, modified)

Preparation: to 944 mL of glass-distilled water, add 30 g NaCl (half-strength = 15 g NaCl) and 1 g TRIS (SERVA). Then add:

ml	stock solution	g/100 mL H <sub>2</sub> O
10	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24.4
10	KCl	6.0
10	NaNO <sub>3</sub>	10.0
10	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.0
10	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
6	trace element solution	

Adjust to pH 8.0 with 1 N HCl.

Autoclave, then add (in sterile conditions):

vitamin B <sub>12</sub> (*)	0,5 ml/l
vitamin B <sub>1</sub> (0,12 g/ 100 ml H <sub>2</sub> O)	0,5 ml/l

(\*) prepared in two steps: dilute 100 mg B12 in 100 ml H<sub>2</sub>O, than dilute 1 ml of this stock solution in 99 ml H<sub>2</sub>O.

trace element solution:  
add 0,75 g EDTA (Titrplex III) in 1 l aqua bidest., than add salts in the given order(!):

FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	97 mg
MnCl <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	41 mg
ZnCl <sub>2</sub>	5 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2 mg
NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	4 mg

Optional ingredients: agar at 15 g/L to solidify.

**Reference:** modified after Starr & Zeikus 1993

Figura B.1 – Meio de cultura (www.epsag.uni-goettingen.de).

**Nota:** a trace element solution foi preparada com FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (100 mg), MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (30 mg), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (9 mg), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (2,5 mg) e Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (4,5 mg), devido à disponibilidade de reagentes.



## Anexo C – Curva de calibração Absorvância vs concentração de Biomassa seca

A densidade celular pode ser avaliada através da absorvância de uma amostra representativa de cultura, sendo a absorvância específica para cada espécie.

Para que a avaliação da concentração de biomassa algal pudesse ser feita de forma expedita, procedeu-se à obtenção de uma curva de calibração que permitisse correlacionar a concentração de biomassa algal com a absorvância, medida num espectrofotómetro UV-vis (DR 2800 – Hach LANGE), no comprimento de onda de 685 nm, valor para o qual a absorvância era máxima para a estirpe em estudo, *Dunaliella tertiolecta*. Na Tabela C. 1 encontram-se os valores obtidos.

Tabela C. 1 – Valores de absorvância obtidos para os ensaios com as concentrações padrão.

Biomassa seca (mg/L)	Abs (685 nm)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
3512	*		
1756	2,187	2,295	2,241
878	1,229	1,199	1,214
439	0,622	0,614	0,618
219,5	0,315	0,301	0,308
109,75	0,155	0,149	0,152
54,875	0,077	0,072	0,0745
27,4375	0,039	0,036	0,0375

\* - Fora do limite de detecção.

Com os valores apresentados na Tabela C. 1 traçou-se a curva de calibração para a Absorvância vs concentração de biomassa seca da *Dunaliella tertiolecta*, tendo sido obtido um factor de correlação bastante satisfatório:  $r = 0,999$  (Figura C. 1).

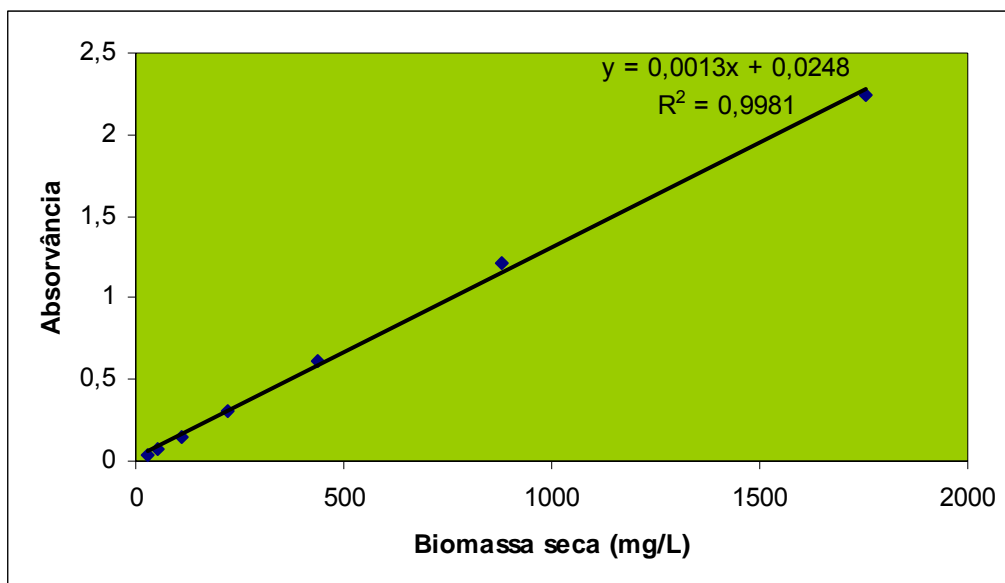


Figura C. 1 – Curva de calibração Absorvância vs concentração de Biomassa seca (mg/L) para a microalga *Dunaliella tertiolecta*.

**Anexo D – Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm)**

Traçou-se o gráfico Absorvância vs Comprimento de onda (nm), na zona do visível (200 a 800 nm). Verificou-se que o pico de absorvância foi obtido sensivelmente a 685 nm (figura D. 1), pelo que as leituras foram efectuadas nesse comprimento de onda.

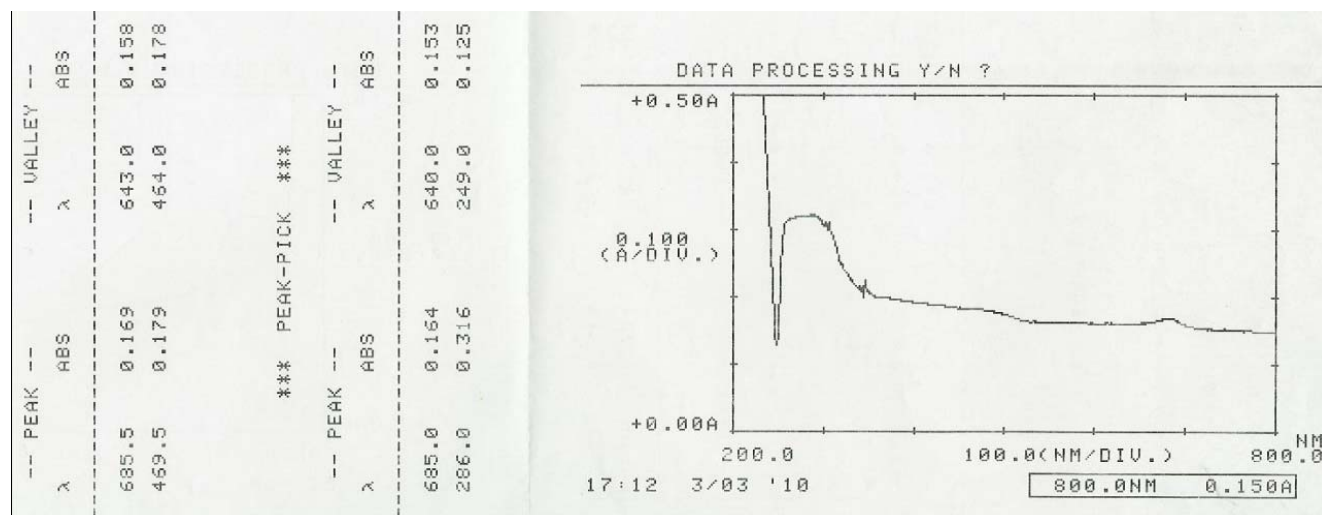


Figura D. 1 – Curva de Abs vs λ (nm).



## Anexo E – Determinação da massa de água contida na biomassa algal húmida

Procedeu-se à liofilização da biomassa algal húmida, isto é, desidratou-se completamente, a frio, sob vácuo, esta biomassa. Os valores obtidos apresentam-se na Tabela E. 1.

Tabela E. 1 – Determinação do teor de Biomassa algal seca.

$M_{Eppendorf}$ (g)	$m_{Eppendorf+Biomassa\ húmida}$ (g)	$m_{Biomassa\ húmida}$ (g)	$M_{Eppendorf+Biomassa\ seca}$ (g)	$m_{Biomassa\ seca}$ (g)	Biomassa seca %	H <sub>2</sub> O %	Média % H <sub>2</sub> O
0,9193	2,8203	1,9010	1,48	0,5557	29,23	70,77	70,6
0,9207	2,8254	1,9047	1,48	0,5621	29,51	70,49	

### Exemplo de cálculo:

$$m(\text{Biomassa húmida}) = m(\text{Eppendorf} + \text{Biomassa húmida}) - m(\text{Eppendorf}) \text{ (g)}$$

$$m(\text{Biomassa Seca}) = m(\text{Eppendorf} + \text{Biomassa Seca}) - m(\text{Eppendorf})(\text{g})$$

$$\% \text{Biomassa seca} = \frac{m(\text{Biomassa seca}) \times 100}{m(\text{Biomassa húmida})} \Leftrightarrow \% \text{Biomassa seca} = \frac{0,5557 \times 100}{1,9010} = 29,23\%$$

### Determinação do teor de água (m/m):

$$\% \text{H}_2\text{O} = 100 - \% \text{Biomassa Seca} \Leftrightarrow \% \text{H}_2\text{O} = 100 - 29,23 = 70,77\%$$



## Anexo F – Determinação das produtividades máximas e médias de biomassa seca

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

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

### Exemplo de cálculo:

Para o estudo da influência da variação da concentração de de macronutrientes entre o dia 7 a 8, tem-se:

$$\text{produtividade} = \frac{272,5 - 181,7}{8 - 7} = 90,77 \text{ mg/L.dia}$$

Na Tabela F. 1 encontram-se os valores obtidos para as produtividades máxima e média de biomassa, para as diversas condições de ensaio testadas (efeito das concentrações de macronutrientes).

Tabela F. 1 – Produtividade máxima e média de biomassa obtida para os ensaios em que se variou a concentração de macronutrientes.

Dias	Padrão (mg/L.dia)	10x Mg (mg/L.dia)	20x Mg (mg/L.dia)	10x K (mg/L.dia)	20x K (mg/L.dia)	10x N (mg/L.dia)	20x N (mg/L.dia)
1 a 2	3,72	-7,44	-19,87	13,59	23,21	7,31	13,21
5 a 6	10,96	31,28	8,08	48,33	43,21	141,79	82,56
6 a 7	14,04	11,79	0,51	19,87	6,54	73,33	56,79
7 a 8	90,77	51,67	40,13	42,44	49,62	34,49	46,28
8 a 9	34,04	37,18	27,31	16,79	11,54	74,10	52,95
9 a 10	5,38	28,85	2,56	30,00	41,41	52,44	63,72
12 a 13	38,85	42,69	38,72	38,97	40,90	43,97	83,08
13 a 14	38,65	40,13	25,26	33,85	40,26	87,56	65,00
14 a 15	39,42	39,87	16,54	5,64	17,05	40,90	76,41
20 a 21	49,62	43,97	59,36	34,74	30,90	68,46	64,36
21 a 22	44,23	23,59	30,64	31,28	9,87	77,69	50,64
26 a 27	5,96		0,00	9,36	1,54	54,62	30,13
27 a 28	4,62			2,31		1,54	2,31
<b>Máximo</b>	90,77	51,67	59,36	48,33	49,62	141,79	83,08
<b>Média</b>	31,30	31,24	19,10	27,07	26,34	63,06	57,09

Na Tabela F. 2 encontram-se os valores obtidos para as produtividades máxima e média de biomassa, para as diversas condições de ensaio testadas (efeito das concentrações de micronutrientes).

Tabela F. 2 – Produtividade máxima e média de biomassa obtida para os ensaios em que se variou a concentração de micronutrientes.

<b>Dias</b>	<b>Padrão (mg/L.dia)</b>	<b>10x Mn (mg/L.dia)</b>	<b>20x Mn (mg/L.dia)</b>	<b>10x Zn (mg/L.dia)</b>	<b>20x Zn (mg/L.dia)</b>	<b>10x Fe (mg/L.dia)</b>	<b>20x Fe (mg/L.dia)</b>
<b>1 a 2</b>	15,13	22,95	20,38	27,31	12,69	29,62	2,18
<b>2 a 3</b>	1,54	8,97	11,03	3,33	12,31	62,44	5,00
<b>3 a 4</b>	24,49	10,26	3,72	6,54	6,03	33,97	21,92
<b>7 a 8</b>	50,13	26,67	37,44	5,26	24,49	54,23	44,10
<b>8 a 9</b>	76,41	52,82	62,69	51,92	60,13	6,15	63,21
<b>9 a 10</b>	14,23	20,00	0,51	5,77	6,28	81,15	11,54
<b>10 a 11</b>	48,46	13,08	22,31	32,44	38,33	15,26	23,72
<b>14 a 15</b>	41,92	25,90	29,87	19,74	13,21	124,36	66,67
<b>15 a 16</b>	10,64	10,38	15,51	32,69	16,15	45,13	10,77
<b>16 a 17</b>	63,85	61,54	53,85	40,77	34,62	75,38	100,00
<b>21 a 22</b>	11,54	1,54	14,62	6,15	23,85	43,08	58,46
<b>22 a 23</b>	40,77	54,62	37,69	24,62	23,85	26,15	43,08
<b>23 a 25</b>	28,08	11,92	10,00	17,31	9,62	1,15	0,38
<b>Máximo</b>	76,41	61,54	62,69	51,92	60,13	124,36	100,00
<b>Média</b>	32,86	24,66	24,59	21,07	21,66	46,01	34,69

Na Tabela F. 3 encontram-se os valores obtidos para as produtividades médias de biomassa, para as diversas condições de ensaio testadas (efeito das concentrações de Fósforo e Cobalto).

Tabela F. 3 – Produtividade média obtida para os ensaios onde se variou a concentração de Fósforo e Cobalto.

Dias	Padrão (mg/L.dia)	10xP (mg/L.dia)	20xP (mg/L.dia)	10x Co (mg/L.dia)	20x Co (mg/L.dia)
1 a 8	38,02	10,55	25,05	11,21	1,76
8 a 15	47,47	8,46	35,05	-13,74	-6,59
15 a 18	30,77	13,33	42,82	-9,28	-1,59
18 a 22	28,65	36,15	46,15	0,00	0,00
22 a 24	54,62	88,08	25,77	0,00	0,00
24 a 25	2,31	80,00	3,08	0,00	0,00
25 a 26		1,54			
<b>Média</b>	33,64	34,02	29,66	-1,97	-1,07



## Anexo G – Quantificação gravimétrica de óleos

### Exemplo de cálculo (tabela G.1, para o ensaio padrão com clorofórmio):

A quantificação gravimétrica dos óleos produzidos pelas microalgas foi feita por pesagem das amostras de óleo extraído das microalgas e recolhidas num gobelé, após evaporação total do solvente usado na extracção.

Os valores das massas determinadas para as amostras de microalgas recolhidas nos diversos ensaios encontram-se na Tabela G. 1.

$$m_{\text{óleo}} = m(\text{goblé} + \text{óleo}) - m_{\text{goblé}} \text{ (g)}$$

$$m_{\text{seca}} = \frac{(29,4^* \times m_{\text{húmida}})}{100} \text{ (g)} \Leftrightarrow m_{\text{seca}} = \frac{(29,4 \times 1,0655)}{100} = 0,3129 \text{ g}$$

$$\% \text{ óleo} = \frac{(m_{\text{óleo}} \times 100)}{\text{massa}_{\text{seca}}} \text{ (g)} \Leftrightarrow \% \text{ óleo} = \frac{(0,0407 \times 100)}{0,3129} = 13,01, \text{ como } 10\% \text{ do óleo fica}$$

retido na biomassa algal (segundo o método de extracção Bligh e Dyer, temos que:

$$\% \text{ óleo}_{\text{final}} = \frac{13,01}{100} \times 90 \Leftrightarrow \% \text{ óleo}_{\text{final}} = 14,45\%$$

\* 29,4 = 100 – %biomassa seca (Anexo E)

Tabela G. 1 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de macronutrientes.

ensaio	solvente	m <sub>goblé</sub> (g)	m <sub>goblé+óleo</sub> (g)	m <sub>óleo</sub> (g)	m <sub>húmida</sub> (g)	massa seca (g)	%óleo	%óleo <sub>final</sub>	Média %óleo final
padrão	cloroformio	32,2169	32,2576	0,0407	1,0655	0,3129	13,01	14,45	14,60
	cloroformio	33,0170	33,0596	0,0426	1,0929	0,3210	13,27	14,75	
	hexano	31,4554	31,4916	0,0362	1,0162	0,2985	12,13	13,48	13,48
	hexano	32,5656	32,6016	0,0360	1,0096	0,2965	12,14	13,49	
10x Mg	cloroformio	33,7338	33,7732	0,0394	1,1528	0,3386	11,64	12,93	13,09
	cloroformio	32,7545	32,7898	0,0353	1,0085	0,2962	11,92	13,24	
	hexano	32,2364	32,2571	0,0207	1,088	0,3195	6,48	7,20	7,48
	hexano	32,3697	32,3923	0,0226	1,1021	0,3237	6,98	7,76	
20x Mg	cloroformio	31,3218	31,3656	0,0438	1,0822	0,3178	13,78	15,31	16,23
	cloroformio	31,8036	31,8492	0,0456	1,0058	0,2954	15,44	17,15	
	hexano	33,7500	33,7784	0,0284	1,1003	0,3232	8,79	9,76	9,57
	hexano	32,7693	32,7965	0,0272	1,0987	0,3227	8,43	9,37	
10x K	cloroformio	33,5960	33,6367	0,0407	1,0456	0,3071	13,25	14,73	14,50
	cloroformio	55,5606	55,6059	0,0453	1,2013	0,3528	12,84	14,27	
	hexano	42,3526	42,3737	0,0211	1,0319	0,3031	6,96	7,74	9,59
	hexano	55,9402	55,9679	0,0277	1,0162	0,2688	10,30	11,45	
20X K	cloroformio	34,3678	34,4144	0,0466	1,0096	0,3079	15,14	16,82	14,26
	cloroformio	32,2365	32,2702	0,0337	1,1528	0,3199	10,53	11,71	
	hexano	32,6478	32,6617	0,0139	1,0085	0,3200	4,34	4,83	4,84
	hexano	32,0699	32,0830	0,0131	1,088	0,2999	4,37	4,85	
10x N	cloroformio	51,5132	51,6072	0,094	1,1021	0,3358	28,00	31,11	33,45
	cloroformio	52,6476	52,7433	0,0957	1,0822	0,2970	32,22	35,80	
	hexano	32,9199	32,9687	0,0488	1,0058	0,3298	14,80	16,44	14,23
	hexano	35,6932	35,7299	0,0367	1,1003	0,3392	10,82	12,02	
20x N	cloroformio	32,3694	32,4329	0,0635	1,0987	0,3014	21,07	23,41	20,45
	cloroformio	32,4292	32,4799	0,0507	1,0456	0,3222	15,73	17,48	
	hexano	33,0170	33,0534	0,0364	1,2013	0,3214	11,32	12,58	12,24
	hexano	32,7550	32,791	0,036	1,0319	0,3364	10,70	11,89	

Os valores das massas determinadas para as amostras de microalgas recolhidas nos diversos ensaios com variação da concentração de micronutrientes encontram-se na Tabela G. 2.

Tabela G. 2 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de micronutrientes.

ensaio	solvente	m <sub>goblé</sub> (g)	m <sub>goblé+óleo</sub> (g)	m <sub>óleo</sub> (g)	m <sub>húmida</sub> (g)	massa seca (g)	%óleo	%óleo <sub>final</sub>	Média %óleo final
padrão	cloroformio	33,5945	33,6515	0,057	1,036	0,3205	17,79	19,76	19,12
	cloroformio	33,7277	33,7824	0,0547	1,097	0,3289	16,63	18,48	
	hexano	32,4247	32,4677	0,043	1,0865	0,3177	13,53	15,04	12,81
	hexano	32,3680	32,4020	0,034	1,149	0,3573	9,52	10,57	
10x Mn	cloroformio	33,7363	33,7827	0,0464	1,0467	0,3074	15,09	16,77	15,85
	cloroformio	31,8033	31,8486	0,0453	1,148	0,3372	13,44	14,93	
	hexano	32,1038	32,1343	0,0305	1,088	0,3195	9,54	10,61	10,95
	hexano	32,5637	32,5918	0,0281	0,9417	0,2766	10,16	11,29	
20x Mn	cloroformio	32,8708	32,9151	0,0443	1,0981	0,3088	14,35	15,94	14,91
	cloroformio	32,2366	32,2769	0,0403	1,0665	0,3225	12,50	13,88	
	hexano	55,3833	55,411	0,0277	1,1032	0,3132	8,84	9,83	10,04
	hexano	34,2451	34,275	0,0299	1,1179	0,3240	9,23	10,25	
10x Zn	cloroformio	49,9162	49,965	0,0488	1,1003	0,3283	14,86	16,51	15,09
	cloroformio	33,6464	33,6838	0,0374	1,0096	0,3043	12,29	13,66	
	hexano	32,6483	32,6853	0,0370	1,1095	0,3222	11,48	12,76	12,00
	hexano	31,9072	31,9395	0,0323	1,0911	0,3191	10,12	11,25	
20X Zn	cloroformio	32,3406	32,3814	0,0408	1,1198	0,3375	12,09	13,43	13,77
	cloroformio	33,6653	33,7063	0,0410	1,0817	0,3232	12,69	14,10	
	hexano	34,0390	34,0737	0,0347	1,2164	0,2965	11,70	13,00	12,64
	hexano	31,7847	31,8207	0,0360	1,2209	0,3259	11,05	12,28	
10x Fe	cloroformio	32,8725	32,9423	0,0698	1,1832	0,3586	19,47	21,63	22,55
	cloroformio	33,1899	33,2633	0,0734	1,0182	0,3475	21,12	23,47	
	hexano	31,5770	31,6097	0,0327	1,3823	0,2990	10,93	12,15	12,44
	hexano	32,7118	32,7583	0,0465	1,1097	0,4060	11,45	12,73	
20x Fe	cloroformio	33,0134	33,0643	0,0509	1,1754	0,3259	15,62	17,35	17,50
	cloroformio	34,3649	34,4197	0,0548	1,2478	0,3452	15,87	17,64	
	hexano	50,4934	50,5357	0,0423	1,2163	0,3665	11,54	12,82	13,04
	hexano	31,8020	31,8446	0,0426	1,036	0,3572	11,93	13,25	

Os valores das massas determinadas para as amostras de microalgas recolhidas nos diversos ensaios em que se variou a concentração de fósforo encontram-se na Tabela G. 3.

Tabela G. 3 – Percentagem de óleo obtida para as microalgas dos ensaios em que se variou a concentração de Fósforo.

ensaio	solvente	m <sub>goblé</sub> (g)	m <sub>goblé+óleo</sub> (g)	m <sub>óleo</sub> (g)	m <sub>húmida</sub> (g)	massa seca (g)	%óleo	%óleo <sub>final</sub>	Média %óleo final
padrão	cloroformio	33,7497	33,7948	0,0451	1,0614	0,3117	14,47	16,08	16,12
	cloroformio	32,9744	33,0167	0,0423	0,9905	0,2909	14,54	16,16	
	hexano	33,0177	33,0470	0,0293	0,748	0,2197	13,34	14,82	14,66
	hexano	33,4913	33,5298	0,0385	1,0038	0,2948	13,06	14,51	
10x P	cloroformio	32,9220	32,9669	0,0449	1,0328	0,3033	14,80	16,45	16,65
	cloroformio	32,5639	32,6091	0,0452	1,0142	0,2979	15,17	16,86	
	hexano	31,6626	31,7039	0,0413	0,9711	0,2852	14,48	16,09	15,55
	hexano	32,1701	32,2103	0,0402	1,0132	0,2976	13,51	15,01	
20x P	cloroformio	33,6486	33,6809	0,0323	0,9999	0,2937	11,00	12,22	14,36
	cloroformio	30,8604	30,9063	0,0459	1,0522	0,3090	14,85	16,50	
	hexano	33,7345	33,7871	0,0526	1,0862	0,3190	16,49	18,32	18,66
	hexano	34,0482	34,0985	0,0503	1,0011	0,2940	17,11	19,01	

## Anexo H – Produtividade lipídica máxima

### Exemplo de cálculo (tabela H.1, para o ensaio padrão com clorofórmio):

A produtividade lipídica máxima foi calculada de acordo com a expressão

$$Pr od_{Lip Máx.} (clorofórmio) = Pr od_{Máx. Biomassa seca} \times Teor lipídico (clorofórmio)$$

$$Pr od_{Lip Máx.} (clorofórmio) = 90,77 \times 14,60$$

$$Pr od_{Lip Máx.} (clorofórmio) = 13,25 \text{ mg / L.dia}$$

Os valores das produtividades lipídicas máximas determinadas para as amostras de microalgas recolhidas nos diversos ensaios em que se variou a concentração de macronutrientes encontram-se na Tabela H. 1.

Tabela H. 1 – Produtividade lipídica máxima obtida para os ensaios em que se variou a concentração dos macronutrientes.

	Padrão	10x Mg	20x Mg	10x K	20x K	10x N	20x N
<b>Prod.Máx.Biomassa seca (mg/Ldia)</b>	90,77	51,67	59,36	48,33	49,62	141,79	83,08
<b>Teor Lipídico (%) (clorofórmio)</b>	14,60	13,08	16,23	14,50	14,26	33,45	20,45
<b>Teor Lipídico (%) (hexano)</b>	13,48	7,48	9,57	9,59	4,84	14,23	12,24
<b>Prod.Lip.Máx. (clorofórmio) (mgóleo/Ldia)</b>	13,25	6,76	9,63	7,01	7,08	47,43	16,99
<b>Prod.Lip.Máx. (hexano) (mgóleo/Ldia)</b>	12,24	3,86	5,68	4,64	2,40	20,18	10,17

Os valores das produtividades lipídicas máximas determinadas para as amostras de microalgas recolhidas nos diversos ensaios em que se variou a concentração de micronutrientes encontram-se na Tabela H. 2.

Tabela H. 2 – Produtividade lipídica máxima obtida para os ensaios em que se variou a concentração dos micronutrientes.

	Padrão	10x Mn	20x Mn	10x Zn	20x Zn	10x Fe	20x Fe
<b>Prod.Máx.Biomassa seca (mg/Ldia)</b>	76,41	61,54	62,69	51,92	60,13	124,36	100,00
<b>Teor Lipídico (%) (clorofórmio)</b>	19,12	15,85	14,91	15,09	13,77	22,55	17,50
<b>Teor Lipídico (%) (hexano)</b>	12,81	10,95	10,04	12,00	12,64	12,44	13,04
<b>Prod.Lip.Máx. (clorofórmio) (mgóleo/Ldia)</b>	14,61	9,75	9,35	7,83	8,28	28,04	17,50
<b>Prod.Lip.Máx. (hexano) (mgóleo/Ldia)</b>	9,79	6,74	6,29	6,23	7,60	15,47	13,04



**Anexo I – Índice de risco dos solventes**

O índice de risco de um solvente é calculado pela expressão:

$$IR = \frac{C}{VLE}$$

Onde

$$C = \frac{P_v}{760} \times 10^7 \text{ (ppm)}$$

$P_v$  - Pressão de vapor do solvente, expressa em mmHg

$C$  - Concentração do solvente no ar, expressa em ppm

$VLE$  - Valor Limite de Exposição, expresso em ppm

**Exemplo de cálculo para o clorofórmio:**

$$P_v = 160 \text{ mmHg} *$$

$$VLE = 10 \text{ ppm} *$$

$$C = \frac{160}{760} \times 10^7 = 2105263 \text{ ppm}$$

$$IR = \frac{2105263}{10} = 210526$$

\* Valores tabelados obtidos na NP 1796:2007