



Influência das condições de cultivo no potencial bioenergético e em biocompostos de valor da *Chlorella vulgaris*

ALEXANDRE RODRIGUES DE MELO

novembro de 2018

Influência das condições de cultivo no potencial
bioenergético e em biocompostos de valor da
Chlorella vulgaris

Alexandre Rodrigues de Melo

Dissertação submetida para a obtenção do grau de
Mestre em Energias Sustentáveis

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Departamento de Engenharia Mecânica

novembro de 2018

Relatório da Unidade Curricular de Dissertação/Projecto/Estágio do 2º ano do
Mestrado em Energias Sustentáveis

Candidato: Alexandre Rodrigues de Melo, N° 1160486, 1160486@isep.ipp.pt

Orientação Científica: Nídia de Sá Caetano, nsc@isep.ipp.pt

Mestrado em Energias Sustentáveis
Departamento de Engenharia Mecânica



novembro de 2018

Agradecimentos

Quero começar por agradecer à minha orientadora Professora Dr^a Nídia de Sá Caetano por se ter disponibilizado para ser minha orientadora e ter ajudado em todas as minhas dúvidas e dificuldades ao longo deste trabalho.

A todos os engenheiros e auxiliares do Laboratório de Tecnologia pela paciência, apoio e auxílio com alguns dos procedimentos.

Agradecer também à minha colega de mestrado Liza, por me ter ajudado numa fase inicial de adaptação ao laboratório e cuidados a ter com o trabalho de cultura de microalgas, e também à minha colega de laboratório Malihe, por me ter ajudado na realização de alguns procedimentos.

A todos os meus amigos pelo apoio, conselhos e compreensão naqueles momentos em que não pude estar presente.

E por fim agradecer á minha família, especialmente aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas decisões, deram confiança e motivação para não desistir, pela paciência nos momentos de maior frustração.

Resumo

Atualmente é fundamental a busca por novos cenários e soluções mais sustentáveis, novas ideias mais limpas e inovadoras de forma a privilegiar o que é natural suprimindo assim as nossas necessidades como espécie humana obtendo produtos que não acarretem um peso que não podemos pagar. De encontro com esta premissa surgem as microalgas, seres que através das suas características nos permitem através da sua exploração obter produtos de alto valor energético e comercial. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das condições de cultivo no potencial bioenergético e em biocompostos de valor de uma microalga. Para o efeito, foi avaliado o comportamento da microalga *Chlorella vulgaris*, selecionada entre três espécies por ser a de crescimento mais rápido, uniforme e estável, em cenários de *stress* diferentes e analisada a forma como a composição do meio de cultura e as condições de cultivo influenciam a produção de biomassa e de outros compostos de interesse como os pigmentos e os lípidos. A *Chlorella vulgaris* foi submetida a três cenários de *stress* nutricional com três concentrações diferentes para cada uma: com adição de glicose (0,5; 1,0 e 1,5 g/L), ferro (0,5; 1,0; 10 e 50 mg/L) e nitrato (28,4; 56,9; 170,7; 569 mg/L). Foi possível observar que a utilização de meios ricos em nitrato a partir dos 170,7 mg/L favorece a obtenção de um crescimento mais rápido da biomassa atingindo valores acima das 800mg/L biomassa, assim como maiores concentrações de pigmentos com mais ênfase para as culturas com uma concentração de nitrato de 569 mg/L onde a clorofila *a* e carotenoides atingiram concentrações máximas de 6 mg/L e 2 mg/L respetivamente. No que respeita ao teor lipídico, verifica-se que a limitação de nitrato (<28,4 mg/L) favorece a acumulação de lípidos pelas microalgas (cerca de 42%). Meios com concentrações inferiores de ferro (0,5 mg/L) revelaram-se favoráveis para a obtenção de biomassa com concentrações superiores de clorofila *a* numa fase inicial contando com valores que variam desde 0,2 a 0,6 mg/L. Nos ensaios realizados em condições mixotróficas (com adição de glicose), ocorreu contaminação em todas as culturas, possivelmente devido à elevada concentração de fonte de carbono que contou com valores entre os 0,5 e 1,5 g/L de glicose. Adicionalmente, foi também observado decréscimo do crescimento da biomassa microalgal.

Palavras chave:

Biomassa, *Chlorella vulgaris*, clorofila, lípidos, pigmentos, *stress* nutricional.

Abstract

Nowadays, it is fundamental to search for new scenarios and solutions that are more sustainable, new green and innovative ideas, to give priority to what is natural, thus supplying our needs as a human species, obtaining products that do not carry a weight that we cannot afford. In line with this premise, microalgae appear because of their characteristics allow us through their exploitation to obtain products of high energy and commercial value. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of cultivation conditions on bioenergy and biocompounds of value potential of a microalgae. For this purpose, the behavior of the microalgae *Chlorella vulgaris*, selected among three species because of its faster, uniform and stable growth, was evaluated in different stress scenarios and analyzed the way the composition of the culture medium and the cultivation conditions influence the production of biomass and other compounds of interest such as pigments and lipids. *Chlorella vulgaris* was subjected to three stress scenarios with three different concentrations for each one: with addition of glucose (0.5, 1.0 and 1.5 g/L), iron (0.5, 1.0, 10 and 50 mg/L) and nitrate (28.4, 56.9, 170.7, 569 mg/L). It was possible to observe that the use of nitrate rich media from 170.7 mg/L favors a faster growth of the biomass reaching values above 800 mg/L biomass, as well as higher concentrations of pigments with more emphasis for the cultures with a nitrate concentration of 569 mg/L where chlorophyll-*a* and carotenoids reached maximum concentrations of 6 mg/L and 2 mg/L respectively. As regards lipid content, nitrate limitation (<28.4 mg/L) favors the accumulation of lipid content by microalgae (around 42%). The use of media with lower concentrations of iron (0.5 mg/L) was favorable for obtaining biomass with higher concentrations of chlorophyll-*a* at an initial stage, with values varying from 0.2 to 0.6 mg/L. In the tests carried out under mixotrophic conditions (addition of glucose), it was observed that contamination occurred in all the cultures, possibly due to the high concentration of carbon source that had values between 0.5 and 1.5 g/L glucose. In addition, growth decrease was also observed.

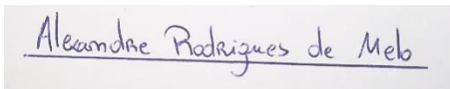
Keywords:

Biomass, *Chlorella vulgaris*, chlorophyll-*a*, lipids, nutritional stress, pigments.

Declaração

Alexandre Rodrigues de Melo declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas, com identificação da fonte.

24 de novembro de 2018



Alexandre Rodrigues de Melo

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
DECLARAÇÃO	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PANORAMA ATUAL	1
1.2. MICROALGAS	2
1.3. PRODUTOS E APLICAÇÕES DAS MICROALGAS	3
1.4. PROCESSOS DE BIORREFINARIA	6
1.5. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	9
1.6. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	9
2. ESTADO DA ARTE	11
2.1. MICROALGAS EM ESTUDO	11
2.1.1. <i>ACUTODESMUS OBLIQUUS</i>	11
2.1.2. <i>CHLORELLA ZOFINGIENSIS</i>	11
2.1.3. <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	12
2.2. CULTIVO	12
2.2.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO	12
2.2.2. TÉCNICAS DE CULTIVO	14
2.3. COLHEITA	15
2.4. EXTRAÇÃO DE LÍPIDOS	16
2.5. TRANSESTERIFICAÇÃO	18
3. DESCRIÇÃO TÉCNICA	21
3.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	21
3.2. MEIO DE CULTURA	21
3.3. INOCULAÇÕES E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS MICROALGAS	22
3.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CULTURAS	25
3.4.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO	26
3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS NA MICROALGA	26

3.6.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LÍPIDOS	27
3.7.	TRANSESTERIFICAÇÃO	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1.	CRESCIMENTO DAS CULTURAS DAS DIFERENTES ESTIRPES	29
4.2.	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> SOB CENÁRIOS DE <i>STRESS</i> POR MACRONUTRIENTES.....	32
4.2.1.	GLICOSE	32
4.2.2.	FERRO.....	34
4.2.3.	NITRATO.....	35
4.3.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS	36
4.3.1.	FERRO.....	37
4.3.2.	NITRATO.....	37
4.4.	QUANTIFICAÇÃO DE LÍPIDOS	38
5.	CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	41
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	49
	ANEXO 1 – PROCEDIMENTOS.....	51
	ANEXO 2-CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	53
	ANEXO 3 - CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS.....	55
	ANEXO 4 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA NA BIOMASSA	57

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama de aplicações das microalgas (Chew et al., 2017; Rizwan et al., 2018; Spolaore et al., 2006).....	4
Figura 2 - Processos de conversão da biomassa em energia (Chew et al., 2017).....	7
Figura 3 - Etapa de processamento a jusante (Dixon and Wilken, 2018)	8
Figura 4. Representação do crescimento da cultura e concentração dos nutrientes (adaptado de Mata et al., 2010; Reißer, 2007)	14
Figura 5. Reação transesterificação de triglicérides (adaptado de Mata et al., 2010).	18
Figura 6. <i>Chlorella vulgaris</i> (a), <i>Acutodesmus obliquus</i> (b), Inoculações em tubos de ensaio (c).	23
Figura 7. Imagens ao microscópio de (a) <i>Acutodesmus obliquus</i> , (b) <i>Chlorella zofingiensis</i> , (c) <i>Chlorella vulgaris</i>	24
Figura 8. Aspeto das amostras após o procedimento	27
Figura 9. Amostras após procedimento com formação de 3 fases	28
Figura 10. Observação microscópica de <i>Acutodesmus obliquus</i> e a forma como esta se agrupa.	29
Figura 11. Curva de crescimento ABS (685 nm) vs Dia para <i>Acutodesmus obliquus</i>	30
Figura 12 Curva de crescimento ABS (680 nm) vs Dia para <i>Chlorella zofingiensis</i>	30
Figura 13 Curva de crescimento ABS (685 nm) vs Dia para <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Figura 14 Curva de crescimento ABS (685 nm) para <i>Chlorella vulgaris</i> em biorreatores de volume superior	32
Figura 15. Observação ao microscópio de contaminações nos ensaios com glicose.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 Compostos produzidos por microalgas.....	3
Tabela 2 - Comparação da produção de Biodiesel entre microalgas e outras matérias primas (Mata et al., 2010)	5
Tabela 3 Comparação entre alguns métodos de colheita (Mathimani and Mallick, 2018) .	16
Tabela 4 Conteúdo lipídico em géneros/espécies diferentes de microalgas (Mata et al., 2010; Tan et al., 2018; Zhu et al., 2015)	18
Tabela 5.Composição do meio de cultura BBM.....	22
Tabela 6. Cenários de <i>stress</i>	25
Tabela 7 Teor lipídico para cada condição.....	39
Tabela A 1. Concentrações e diluições realizadas para a curva de calibração.....	53
Tabela A 2. Biomassa após liofilização	57

1. Introdução

1.1. Panorama atual

Nunca anteriormente na História da humanidade houve um nível de preocupação tão elevado como nos dias de hoje, no que toca a assuntos de sustentabilidade ambiental. Cada vez mais, com o crescimento económico, o desenvolvimento tecnológico e a pressão das grandes corporações em querer produzir e escoar mais produto, o estado dos recursos naturais e qualidade do meio ambiente têm vindo a deteriorar-se em consequência da ação humana.

A forma mais fácil de obtenção de energia são os combustíveis fósseis, porém, é uma das principais causadoras de muitas das problemáticas ambientais, entre as quais, aquecimento global, poluição do ar e acidificação dos oceanos, situação que se começa a tornar contraproducente e cada vez mais vista como um mau meio para atingir um fim. Nunca como nos dias de hoje foi tão imperativa a procura por novas formas, mais eficientes e limpas de produzir energia e materiais, de forma a manter o fluxo das necessidades humanas atuais.

É neste contexto que surgem as energias sustentáveis, energias conscientes ecologicamente que vão de encontro com a definição de um desenvolvimento sustentável, e que procuram obter energia a partir de recursos que não se esgotam ou mesmo até pela procura de formas mais eficientes de produzir e usar energia. Tendo em conta programas e iniciativas como a Agenda 21 e o Portugal2020, com objetivos de aumentar a percentagem de energia

produzida e consumida através de fontes renováveis, assim como o aumento da eficiência energética, esta é a altura indicada para apostar em novas fontes de energia.

Uma das novas formas, e exemplo de um processo desejavelmente sustentável com um grande potencial de produtos e mercado, é a utilização de microalgas em biorrefinarias onde são cultivados os microrganismos e extraído da biomassa todo o tipo de produtos com diferentes aplicações, desde utilizações na cosmética, medicina até à produção de biocombustíveis.

Este tipo de biocombustíveis produzidos através da biomassa de microalgas, chamados de biocombustíveis de terceira geração, representa um substituto sério e promissor face aos outros tipos de biocombustíveis mais utilizados atualmente. Apesar de ser um biocombustível, em comparação com outros ainda recente, apresenta argumentos fortes e válidos na substituição de biocombustíveis de primeira geração.

Estes biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de óleos vegetais como o de soja, colza, girassol e o óleo de palma que não só utilizam matéria prima alimentar, como também exploram solos aráveis ótimos para suprir as dificuldades e necessidade na procura de produtos alimentares, para além de que este tipo de culturas consomem grande quantidade de água e são normalmente instaladas em zonas florestais, acabando assim por contribuir para destruir a fauna e flora e posteriormente acabando com a capacidade dos solos em produzir, tornando-os estéreis.

A produção de óleo para a produção de biocombustíveis, através da biomassa das microalgas, em comparação com fontes convencionais como as plantações de oleaginosas, é 15 a 300 vezes superior por unidade de área, além disso, não necessita de utilizar áreas de solo arável nem quantidades tão elevadas de fertilizantes e nutrientes (Schenk et al., 2008).

1.2. Microalgas

Microalgas são organismos microscópicos unicelulares, presentes tanto em ecossistemas aquáticos como terrestres, apresentando uma grande variedade de espécies que se foram adaptando ao longo dos tempos e podem ser encontradas em diversificados meios ambientes numa larga gama de condições.

Existem mais de 200 000 espécies das quais 20 000 são conhecidas e estima-se que são responsáveis por 50 por cento do oxigénio existente na atmosfera terrestre (Chapman, 2013).

As microalgas, na sua generalidade apenas necessitam primariamente de água, luz e de uma fonte de carbono para serem capazes de produzir compostos orgânicos, são seres muito simples que se dividem binariamente com uma taxa de crescimento elevada, conseguindo duplicar a sua biomassa diariamente (Singh et al., 2014).

As microalgas são organismos capazes de, fotossinteticamente e através da utilização da energia da luz, captar, fixar e transformar dióxido de carbono em compostos orgânicos produzindo assim biomassa que pode ser utilizada como fonte de energia, como forma de alimento, e até mesmo para extrair compostos químicos com um diversificado leque de aplicações. Todas estas características fazem das microalgas o organismo perfeito para a utilização de novas tecnologias e formas de produzir matérias-primas de valor.

Das muitas espécies conhecidas atualmente, as mais exploradas na produção de produtos comerciais são as espécies dos géneros *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Isochrysis* (Lee, 1997). Na Tabela 1 são ilustrados alguns dos compostos produzidos por estes géneros de microalgas:

Tabela 1 Compostos produzidos por microalgas.

Microalga	Composto	Referência
<i>Chlorella</i>	Lípidos Aminoácidos Pigmentos (Carotenoides) Vitaminas	(Vanthoor-Koopmans et al., 2013), (Gouveia et al., 1996; Lemoine and Schoefs, 2010), (Tang, 2011)
<i>Arthrospira</i>	Aminoácidos Vitaminas	(Vanthoor-Koopmans et al., 2013), (Tang, 2011)
<i>Dunaliella</i>	Pigmentos (Carotenoides) Vitaminas	(Gouveia et al., 1996; Lemoine and Schoefs, 2010), (Tang, 2011)
<i>Haematococcus</i>	Pigmentos (Carotenoides)	(Gouveia et al., 1996; Lemoine and Schoefs, 2010), (Boussiba and Vonshak, 1991)
<i>Isochrysis</i>	Ácidos Gordos Polissacarídeos	(Lee, 1997), (Balavigneswaran et al., 2013)

1.3. Produtos e aplicações das microalgas

As microalgas representam um grande potencial como matéria-prima alternativa de vários produtos, obtidos através de processos de biorrefinaria, que encaixam na perfeição com a procura de novas formas naturais de obtenção de energia, recursos alimentares e produtos de elevado valor comercial.

Tendo em conta que a luz solar é um dos tipos de energia mais importantes à nossa disposição, com um *input* elevado de intensidade energética, a utilização da capacidade fotossintética das microalgas permite utilizar esse recurso abundante com taxas de eficiência fotossintéticas elevadas, quando comparadas com os processos de fixação de carbono das plantas terrestres (Zhu et al., 2008).

Sendo assim as microalgas transformam a energia proveniente do sol através dos seus processos biológicos e bioquímicos para se desenvolverem e crescerem até apresentarem suficiente matéria-prima explorável que consiste em biomassa, metabolitos primários e secundários. Estes metabolitos consistem em carboidratos, lípidos, proteínas, antioxidantes, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos, fibras, clorofilas, carotenóides, astaxantina, sais minerais e ácidos gordos (Williams et al., 1989), tendo em conta que os valores variam de acordo com a espécie, condições do meio e processos biológicos, acumulando todos os produtos dentro da célula. Muitos dos produtos produzidos pelas microalgas, assim como as suas capacidades de remover nutrientes de águas residuais podem ser utilizados em inúmeras aplicações como mostra o diagrama da Figura 1.

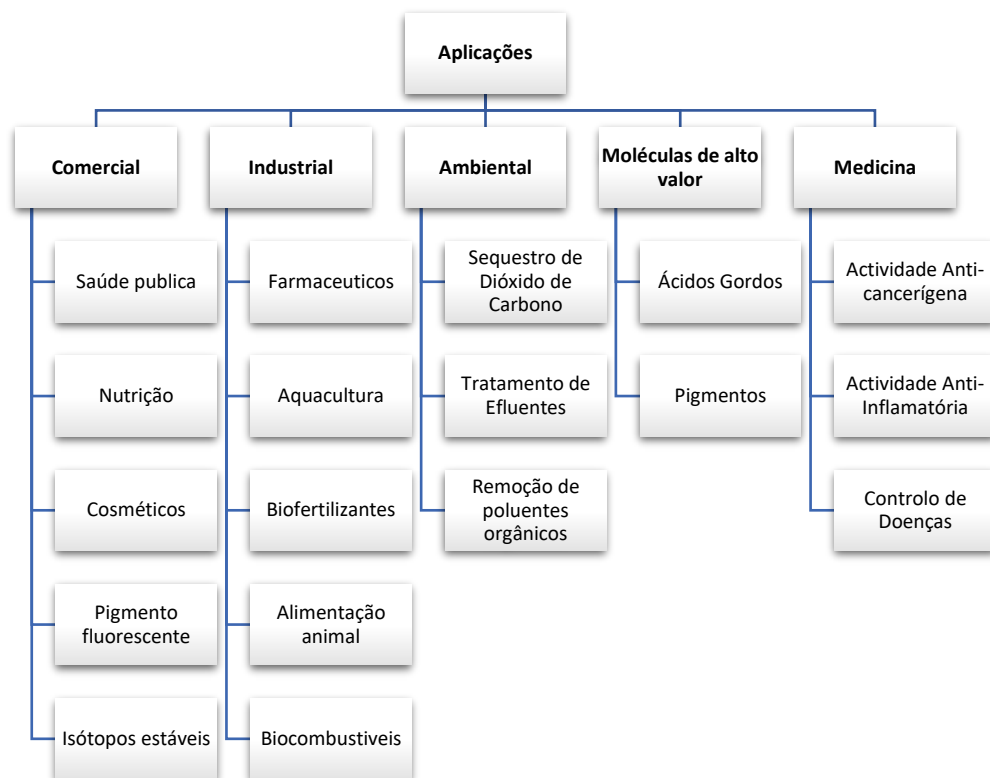


Figura 1 - Diagrama de aplicações das microalgas (Chew et al., 2017; Rizwan et al., 2018; Spolaore et al., 2006).

Das muitas aplicações associadas às microalgas, uma das mais estudadas e onde o seu principal potencial se localiza, é na produção de produtos de valor elevado como pigmentos, suplementos e cosméticos. Inúmeros estudos foram feitos que nos mostram o seu grande potencial e vantagens que passam pela capacidade de produzir quantidades superiores de lípidos numa área muito inferior de terra quando comparadas com plantações de soja e de palma (Mata et al., 2010), o que permite a desocupação de áreas aráveis de solo, oferecendo assim uma proposta de substituição dos atuais grandes produtores de biocombustíveis.

Podemos ver na Tabela que o fator de diferenciação entre estes tipos de culturas tem a ver com a diferença entre a produtividade de biomassa devido ao facto de as microalgas poderem ser recolhidas para processamento apenas passado uns dias devido ao seu rápido ciclo de vida quando comparadas com as outras culturas terrestres que são recolhidas para processamento entre uma a duas vezes por ano (Alam et al., 2012).

Tabela 2 - Comparação da produção de Biodiesel entre microalgas e outras matérias primas

(Mata et al., 2010)

Fonte de Óleo	% Óleo por peso de biomassa	Produção de óleo (Litros de óleo/ha ano)	Área utilizada (m²ano/kg biodiesel)	Biodiesel produzido (kg biodiesel/ha ano)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Colza	41	974	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Óleo de Palma	36	5366	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	30	58 700	0.2	51 927
Microalgas (alto teor de óleo)	70	136 900	0.1	121 104

As microalgas são, de um ponto de vista geral, fáceis de cultivar e têm a opção de, como meio de cultivo poderem ser utilizados efluentes impróprios para consumo humano, tratando assim por exemplo um efluente doméstico, industrial ou agrícola. Ao mesmo tempo que são utilizadas para tratar este tipo de efluentes, removendo nutrientes orgânicos, é produzida biomassa algal que é utilizada na produção de biocombustível.

As microalgas também são capazes de produzir produtos de elevado valor comercial, dos quais se destacam os pigmentos, principalmente os carotenóides responsáveis pela coloração laranja, amarela e de alguns tons de vermelho em algumas plantas, algas e bactérias,

conhecidos como importantes nutracêuticos pelos seus efeitos anti-oxidativos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antidiabéticos entre outros (Zhang et al., 2014).

Por todas estas importantes funções biológicas e impacto na saúde humana este tipo de compostos assumem elevado valor comercial não só por serem um produto de origem natural, mas também devido à atual baixa produtividade das microalgas para cumprir os requisitos para se poderem assumir projetos industriais de grande escala.

1.4. Processos de biorrefinaria

Muito à semelhança das refinarias de petróleo, funciona o conceito de biorrefinaria onde em ambos é convertida a matéria-prima num conjunto diversificado de produtos e, através de equipamento e processos de conversão, a matéria-prima é convertida numa vasta gama de produtos, sendo a principal diferença entre ambos o tipo de matéria-prima utilizada na obtenção dos produtos.

Dependendo do tipo de aplicações ou produtos que se pretende obter, existem inúmeros métodos e tecnologias utilizadas para converter a biomassa e separar os seus principais componentes que posteriormente podem ainda passar por outro tipo de processos de forma a obter produtos de elevado valor específico, tais como pigmentos, polímeros, ácidos gordos, antioxidantes, entre outros.

Os principais métodos de conversão podem ser divididos em quatro categorias: conversão termoquímica, bioquímica, transesterificação e células de combustível microbiano fotossintéticas (González-Delgado and Kafarov, 2011), conforme representado na Figura 2.

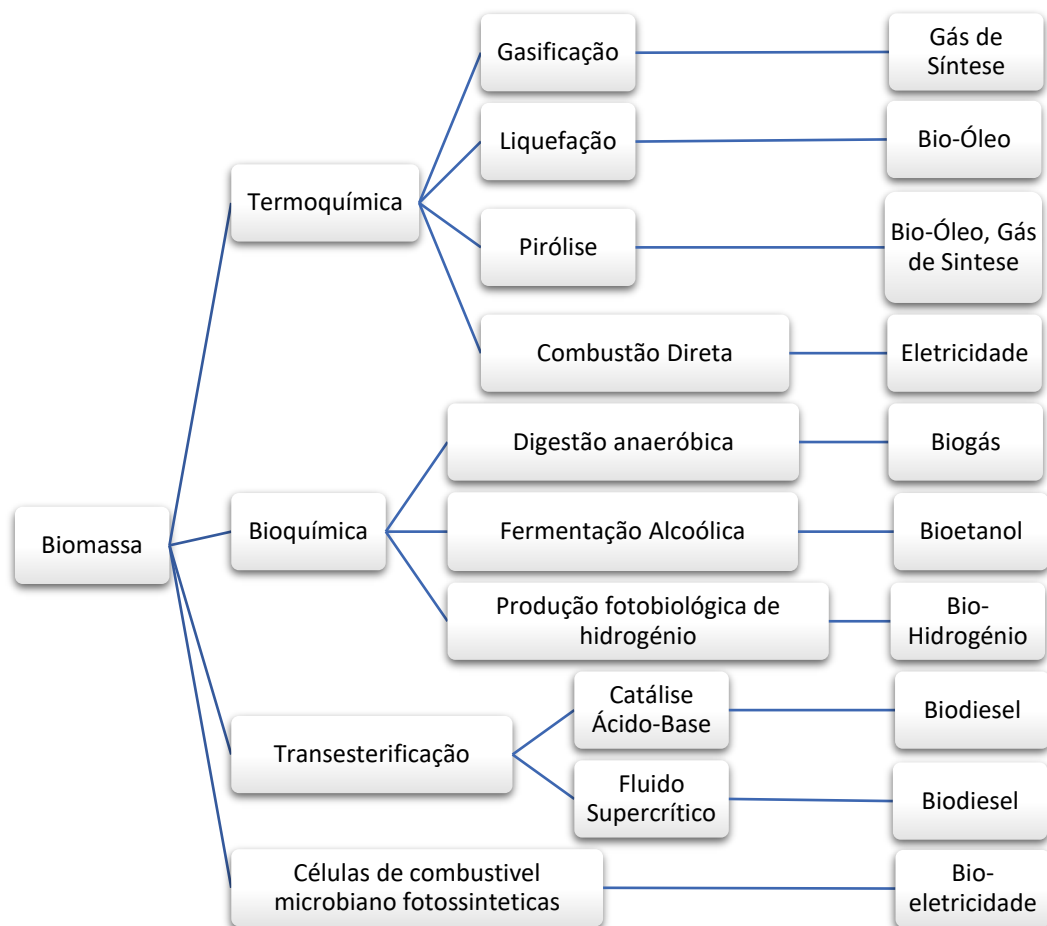


Figura 2 - Processos de conversão da biomassa em energia (Chew et al., 2017)

Uma das problemáticas com alguns destes tipos de processos é não serem economicamente viáveis para a produção dos principais compostos de baixo valor como o biodiesel (Brasil et al., 2017), em comparação com os seus similares que utilizam combustíveis fósseis como matéria-prima e dominam o mercado produzindo um produto muito mais economicamente competitivo.

Uma forma de rentabilizar estes processos é no investimento na produção simultânea de produtos de elevado valor, recuperando-os através de biorrefinaria na obtenção de produtos que paralelamente possam tornar economicamente sustentável a exploração desta matéria-prima, após a extração do óleo a biomassa restante pode ser utilizada para produzir bioetanol, lípidos, pigmentos, nutrientes, proteínas, carboidratos entre outros.

A obtenção de produtos no processamento a jusante passa por quatro etapas compreendendo: ruptura das células/pré-tratamento; extração; conversão bioquímica e/ou fracionamento, purificação; composição do produto final (Dixon and Wilken, 2018) - Figura 3.

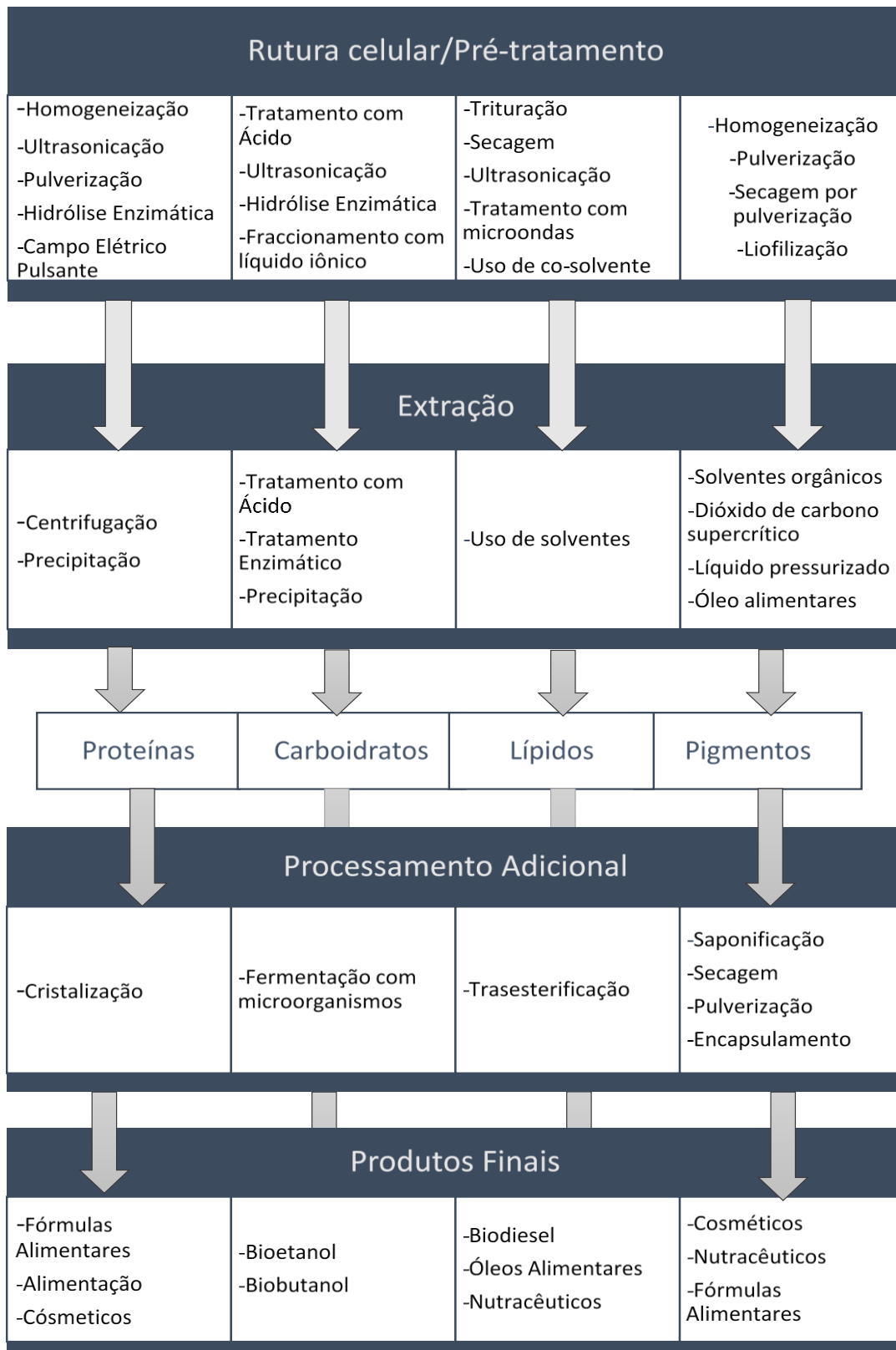


Figura 3 - Etapa de processamento a jusante (Dixon and Wilken, 2018)

1.5. Objetivos da dissertação

Considerando a importância das microalgas e as dificuldades associadas à sustentabilidade da sua utilização como matéria-prima apenas para a produção de energia, revela-se importante identificar quais os produtos de maior valor que podem ser obtidos simultaneamente com os produtos de menor valor (biocombustível), bem como as condições de cultivo conducentes à alteração da composição da biomassa microalgal.

Pretendeu-se assim estudar a influência das condições de cultivo em regime mixotrófico (através da adição de glicose ao meio de cultivo, BBM), bem como o efeito do stress induzido por diferentes adições de nitrato e ferro ao referido meio de cultura de forma a identificar, dependendo das condições do meio, quais os produtos de valor afetados e de que forma, positiva ou negativa. O estudo iniciou-se com a identificação da microalga objeto de estudo, selecionada de entre três espécies distintas, por ser a de crescimento mais rápido e estável.

1.6. Organização da dissertação

A dissertação encontra-se assim organizada do seguinte modo: No primeiro capítulo, faz-se uma breve introdução à problemática das microalgas. No segundo capítulo, faz-se a apresentação do estado da arte referente à produção e utilização de microalgas, particularmente em condições que potenciem a sua utilização em biorrefinarias. No terceiro capítulo apresenta-se a descrição técnica do trabalho realizado. No quarto capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, seguindo-se o capítulo das conclusões e sugestões para trabalhos futuros. Após a listagem das referências bibliográficas, apresentam-se ainda em anexo os elementos auxiliares necessários à execução da dissertação.

2. Estado da arte

2.1. Microalgas em estudo

Foram utilizadas neste trabalho três microalgas da divisão *Chlorophyta* das espécies *Chlorella vulgaris* (SAG 211-12), *Acutodesmus obliquus* (SAG 276-3d) e *Chlorella zofingiensis* (SAG 211-14).

2.1.1. *Acutodesmus obliquus*

Acutodesmus obliquus anteriormente conhecida como *Scenedesmus obliquus*, é uma alga verde de tamanho microscópico pertencente ao filo das clorófitas. É uma microalga que forma colônias de 4 organismos unicelulares conhecida por apresentar polos celulares pontiagudos (Trainor et al, 1976), paredes celulares mais resistentes quando em comparação com outras espécies de microalgas (Takeda, 1993), fator importante em sistemas de cultivo que utilizam agitação ou processamento com gás. A sua conhecida resistência e versatilidade faz com que seja escolhida para a remoção de alguns dos principais nutrientes envolvidos em processos de eutrofização, nomeadamente nitrogénio e fósforo (Martínez et al., 2000; Voltolina et al., 2005) apresentando assim um papel importante em processos de biorremediação.

2.1.2. *Chlorella zofingiensis*

Chlorella zofingiensis conhecida também por *Chromochloris zofingiensis* e anteriormente

chamada *Muriella zofingiensis*, é uma alga verde de tamanho microscópico pertencente ao filo das clorófitas, apresenta células imóveis unicelulares de forma esférica com tamanho a variar entre os 2 e 15 µm de diâmetro. Esta microalga reproduz-se assexuadamente por divisão celular, produzindo células filhas a partir de células parentais imóveis, passando por um processo de crescimento, amadurecimento e divisão (Liu et al., 2014).

Devido a taxas elevadas de crescimento e de acumulação de lípidos, assim como a versatilidade em crescer em meios autotróficos, heterotróficos e mixotróficos (Liu et al., 2011) é uma microalga normalmente procurada para a produção de biodiesel e para a produção do pigmento astaxantina (Hu et al, 2005) um carotenóide de alto valor comercial a nível cosmético, alimentar e farmacêutico.

2.1.3. *Chlorella vulgaris*

Das cerca de 40.000 espécies de microalgas conhecidas e analisadas, esta espécie de microalga *Chlorella vulgaris* é uma das espécies mais notáveis e melhor documentadas. É uma alga verde de tamanho microscópico que pertence ao filo das clorófitas, apresenta células imóveis unicelulares de forma esférica com tamanho a variar entre os 2 a 10 µm de diâmetro. Esta microalga reproduz-se assexuadamente a uma taxa elevada por auto esporulação produzindo quatro células filhas por cada célula-mãe que após maturação são libertadas aquando da rutura da parede celular da célula-mãe (Safi et al., 2014).

É uma microalga polivalente cresce em meios heterotróficos, autotróficos ou mixotróficos, e tem um grande potencial na produtividade de biomassa seca e em acumular lípidos especialmente sob condições mixotróficas (Yeh and Chang, 2012). Apresenta também um perfil de ácidos gordos apropriado para a produção de um biodiesel estável e um conteúdo em amido que prova ser uma boa fonte na produção de bioetanol (Hirano et al., 1997).

2.2. Cultivo

2.2.1. Condições de cultivo

O cultivo de microalgas é a produção e acumulação de biomassa algal, constituída por moléculas alvo com interesse para exploração. Esse crescimento é influenciado pelas condições do meio a que as microalgas estão expostas, que tem em conta a luminosidade utilizada, arejamento, agitação, temperatura, nutrientes, pH, concentração de CO₂ e O₂, competição por parte de outras microalgas e a existência de organismos patogénicos (bactérias, fungos) (Mata et al., 2010).

Existem quatro principais tipos de formas de cultivo que variam nas condições do meio em que as microalgas podem ser cultivadas (Chen et al., 2011; Mata et al., 2010):

- Fotoautotroficamente onde as microalgas utilizam carbono inorgânico como fonte de carbono e a luz como fonte de energia que é convertida bioquimicamente através dos processos de fotossíntese.
- Heterotroficamente as microalgas utilizam carbono orgânico como fonte de carbono e fonte de energia.
- Mixotroficamente as microalgas realizam a fotossíntese assim como utilizam compostos orgânicos e carbono inorgânico como fonte de carbono para o crescimento sendo assim capazes de viver em condições autotróficas, heterotróficas ou as duas em simultâneo.
- Fotoheterotroficamente é necessária a presença de luz para poder utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono, a principal diferença entre o metabolismo mixotrófico e o fotoheterotrófico é que o cultivo mixotrófico consegue utilizar os compostos orgânicos como fonte de energia enquanto que o fotoheterotrófico necessita da luz pra esse fim.

Quando consideramos um cultivo de microalgas em modo *batch*, um método de cultivo que consiste simplesmente em fazer uma inoculação num meio de cultura apropriado num recipiente fechado sem entradas nem saídas de matéria, a cultura de microalgas apresenta um comportamento de crescimento conhecido que consiste num crescimento exponencial da cultura até ao esgotamento de nutrientes no meio onde a partir daí a cultura entra numa fase de morte. Neste tipo de sistema a cultura apresenta um crescimento segundo uma curva sigmoide dividida por seis fases diferentes caracterizadas pelas diferentes taxas de crescimento (Reißer, 2007):

- Fase 1 é a fase após a inoculação da cultura no meio onde as microalgas passam por um processo de adaptação às novas condições e o crescimento é nulo.
- Fase 2 é a fase após a adaptação da cultura às condições do meio onde o crescimento começa.
- Fase 3 é a fase de crescimento exponencial da cultura, as microalgas multiplicam-se ao mesmo tempo que continuam a consumir os nutrientes do meio.
- Fase 4 é a fase de desaceleração do crescimento onde a taxa de crescimento vai diminuindo devido a fatores como a diminuição de nutrientes no meio, dificuldade

na obtenção de luz para realizar eficazmente o processo de fotossíntese devido á densidade da cultura, ou mesmo por uma alteração de ph.

- Fase 5 é a fase estacionária no crescimento da cultura onde o crescimento estagna, é nulo.
- Fase 6 é a fase onde as microalgas começam a morrer por falta de nutrientes e tóxicos existentes no meio de cultivo.

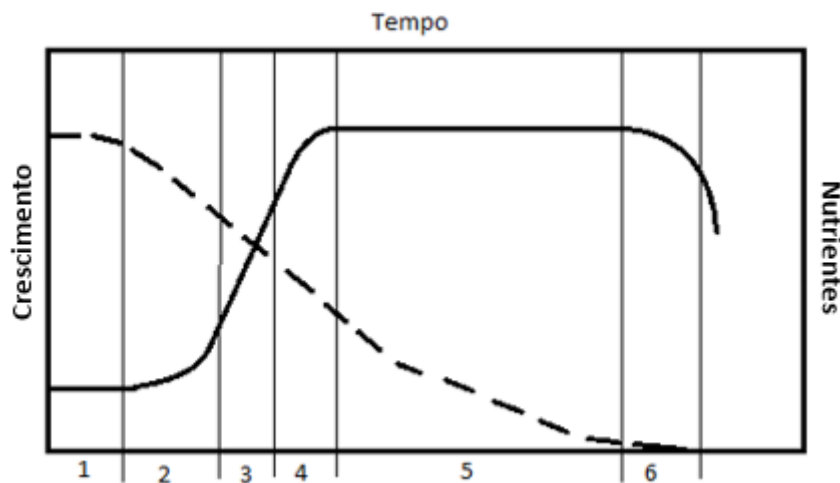


Figura 4. Representação do crescimento da cultura e concentração dos nutrientes (adaptado de Mata et al., 2010; Reißer, 2007)

2.2.2. Técnicas de cultivo

Existem inúmeras técnicas de cultivo de microalgas com uma grande variabilidade entre elas, e o tipo de técnica de cultivo a implementar depende de certos fatores como por exemplo, a biologia da microalga a explorar, o custo de investimento, o tipo de produtos que se querem obter, a fonte de nutrientes a utilizar e a captura de dióxido de carbono (Klinthong et al., 2015).

Os sistemas de cultivo podem ser categorizados em sistemas abertos e sistemas fechados, os sistemas abertos consistem em instalações ao ar livre como lagoas, canais simples, canais de recirculação mecânica, entre outros. Os sistemas fechados normalmente funcionam por tubos de materiais transparentes sob luz natural ou artificial (Razzak et al., 2013).

Os sistemas de cultivo abertos são normalmente utilizados para o cultivo de microalgas em larga escala, são sistemas mais baratos de simples construção e fácil operação, porém para produzir quantidades elevadas de biomassa necessitam de ocupar grandes áreas pois o nível de água deve ser apenas aquele que permita a penetração da luz solar para a cultura poder

crescer. O facto de serem sistemas abertos faz com que estejam expostos e dependentes das condições externas que não permitem controlar fatores como por exemplo temperatura, luz, evaporação da água, contaminações de bactérias e outros microrganismos.

O sistema aberto mais conhecido e utilizado é o chamado “raceway pond”, um canal artificial raso com curvatura com cerca de 15 a 25 cm de profundidade onde a circulação do meio é feita através de pás para manter um movimento do meio e impedir a sedimentação e agregação das células assim como favorecer as trocas entre os seres unicelulares e os nutrientes do meio. Além deste sistema existem outros como as lagoas circulares com circulação ou simplesmente as lagoas sem circulação, a opção mais barata.

Quando se quer cultivar uma monocultura os sistemas fechados são os ideais, são mais flexíveis podendo adaptar-se e otimizar de acordo com as características da espécie de microalga com que se quer trabalhar, é possível controlar as condições do meio como a utilização da luz (natural/artificial, quantidade e qualidade), concentração de dióxido de carbono e nutrientes, área, temperatura, entre outros, porém são sistemas de mais cara construção e operação com dificuldade em operação em largas escalas (Mata et al., 2010).

2.3. Colheita

A colheita da cultura deve ser feita quando esta se encontra na fase estacionária onde o crescimento da cultura estagna e atinge o seu pico, a colheita tem o objetivo de separar o sólido (biomassa) do líquido (meio de cultura).

Esta etapa pode representar cerca de 20-30% dos custos totais (Mata et al., 2010) tornando-se um dos passos mais dispendiosos que muitas vezes põem em causa a sustentabilidade económica da utilização de microalgas, existem diferentes processos para fazer essa separação dos quais centrifugação, floculação, filtração, eletrocoagulação, flotação e utilização de ultrassons (Brennan and Owende, 2010; Tan et al., 2018) - Tabela 3 - ou até mesmo uma combinação entre eles. Entre estas, as técnicas mais utilizadas são a centrifugação a filtração e a floculação.

Tabela 3 Comparação entre alguns métodos de colheita (Mathimani and Mallick, 2018)

Método de Colheita	Vantagens	Desvantagens	Concentração sólidos (%)	Recuperação sólidos (%)
Centrifugação	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido • Independente da estirpe • Alta recuperação de sólidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização intensiva de energia • Custo elevado de operação • Operação longa para cultura volumosa • Não pertinente para produtos de baixo valor 	10-22	> 90
Sedimentação por gravidade	<ul style="list-style-type: none"> • Custo-Eficácia • Simples e fácil 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo demorado, sedimentação lenta • Pouco eficaz • Qualidade de biomassa questionável 	0,5-3,0	10-90
Filtração	<ul style="list-style-type: none"> • Desprovido de suplementos químicos • Baixo consumo de energia • Baixo impacto na qualidade da biomassa • Fácil de adaptar a larga escala • Alta recuperação de biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo elevado de operação • Necessidade de bombeamento e troca de membranas • Tempo de vida de membrana curto • Seletividade baixa de membrana 	5-27	70-90
Flotação	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo curto de operação • Flexibilidade • Possibilidade de utilização á escala industrial • Menor requisito de área 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto investimento • Energia intensiva • Recuperação pode ser prejudicada devido a bolhas mais largas • Incapacidade de utilização para estirpes marinhas 	<7	50-90

2.4. Extração de lípidos

Na utilização da biomassa microalgal para a conversão em combustíveis são utilizados

extratos presentes nas microalgas como os lípidos para a produção de biocombustível. A extração dos lípidos da microalga é crucial para a produção de biodiesel e esta extração é normalmente realizada por métodos químicos através de extração com a utilização de solventes e através de métodos físicos, ou então por uma combinação dos dois (Rawat et al., 2011).

A extração por solventes e a extração com fluido supercrítico são os métodos mais comuns para a extração de lípidos (Halim et al., 2012), esta etapa de extração deve ser rápida, efetiva sem destruir o conteúdo lipídico e com possibilidade de adaptar a larga escala. Uma das formas de poupar energia durante estes processos é utilizar métodos que consigam separar e extrair os lípidos com biomassa húmida, o processo de remover água da biomassa envolve a utilização intensiva de energia (Pragya et al., 2013).

Tendo em conta os requisitos para um método de eleição para a extração e quantificação de lípidos o método modificado de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) descrito é um dos mais utilizados. É um método padrão, simples que consegue determinar os lípidos totais e que permite fazer as análises sem necessidade de pré tratar a biomassa secando-a, embora utilize clorofórmio, um solvente com efeitos adversos para o ambiente (Enamala et al., 2018), este método pode ser utilizado para qualquer tecido que contenha até cerca de 80 % de água, requer a utilização de dois solventes miscíveis, um solvente orgânico e um álcool, respetivamente clorofórmio e metanol.

Este método envolve duas fases, numa primeira fase a extração é feita através de clorofórmio e metanol nas proporções de 1:2, sem a adição de água nesta primeira fase se for utilizada biomassa húmida, ou seja, sem ter passado por processos de secagem como por exemplo secagem ao sol ou liofilização, para biomassa húmida é necessário quebrar as paredes celulares por aplicação de ultrassons de forma a libertar os lípidos das estruturas celulares das microalgas. De seguida é feita a extração uma segunda vez com clorofórmio/metanol/água nas proporções 2:2:1 e após centrifugação são formadas três fases diferenciadas: uma fase superior constituída por metanol e água, uma fase intermédia constituída por biomassa e uma fase inferior constituída por lípidos e clorofórmio. A quantificação dos lípidos é feita após a evaporação do solvente, clorofórmio.

Como já foi apresentado anteriormente, as algas são excelentes produtores de óleo quando em comparação com as fontes convencionais de plantações oleaginosas, e o conteúdo lípido

varia de acordo com a espécie, a forma como é cultivada, a forma como é feita a sua colheita e os processos envolvidos na extração do óleo. Na Tabela 4 podemos ver as diferenças no conteúdo lipídico entre diferentes espécies e géneros de microalgas:

Tabela 4 Conteúdo lipídico em géneros/espécies diferentes de microalgas (Mata et al., 2010; Tan et al., 2018; Zhu et al., 2015)

Género/Espécie	Teor lipídico (% peso seco)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0
<i>Chlorella zofingiensis</i>	26.69
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0
<i>Acutodesmus obliquus</i>	11.0-55.0
<i>Spirulina maxima</i>	4.0-9.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0

2.5. Transesterificação

Transesterificação é o processo químico que faz a conversão dos lípidos extraídos da biomassa das microalgas num combustível renovável, biodegradável e não tóxico, o biodiesel. Essa conversão envolve a utilização de um álcool de baixo peso molecular como por exemplo o metanol ou o etanol sendo o metanol o mais eficiente e utilizado, e um catalisador, convertendo assim os triglicerídeos em ésteres(biodiesel) e glicerol (Rawat et al., 2011; Tan et al., 2018). A reação de transesterificação é representada na Figura 5 , e os radicais representados por R1,R2,R3 representam cadeias longas de hidrocarbonetos conhecidas como ácidos gordos (Mata et al., 2010).

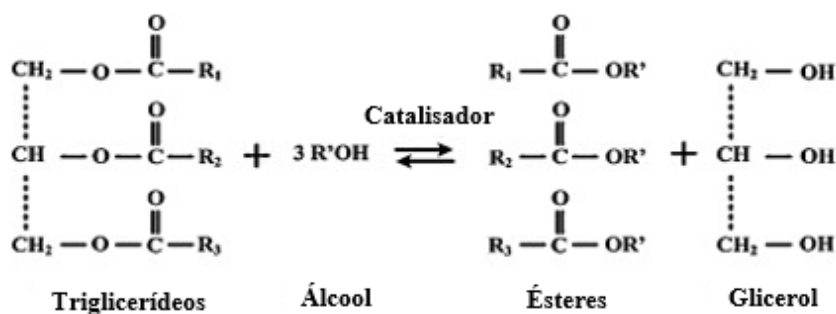


Figura 5. Reação transesterificação de triglicerídeos (adaptado de Mata et al., 2010).

Na reação de transesterificação podem ser utilizados diferentes tipos de catalisadores, a catálise pode ser ácida, alcalina ou através do uso de lipases, enzimas responsáveis por

acelerarem ou inibirem reações químicas sobre lípidos embora não sejam muito utilizadas devido ao seu elevado custo (Murty et al., 2002).

Dos catalisadores alcalinos mais utilizados temos o hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) que podem ser utilizados a uma baixa temperatura e pressão com uma conversão em biodiesel de 98%, mas estes catalisadores serão inibidos se o óleo apresentar um conteúdo alto de ácidos gordos (cerca de 2-5%), nesse caso a reação que ocorrerá será uma saponificação que consumirá o catalisador tornando o processo de recuperação a jusante mais difícil (Rawat et al., 2011; Tan et al., 2018).

Quando comparada com a catálise alcalina a catálise ácida apresenta um tempo de reação mais prolongado e utiliza ácidos como o ácido sulfúrico ou o ácido clorídrico, deve ser utilizada para óleos com conteúdos elevados de ácidos gordos, e para isso, de forma a obter uma boa reação de transesterificação é utilizada alta temperatura e pressão de forma a obter uma produção mais elevada de biodiesel. Estes requisitos tornam esta via de transesterificação não viável para produções em larga escala (Pragya et al., 2013; Rawat et al., 2011; Tan et al., 2018).

Alguns processos de separação de componentes numa solução, através de fluidos supercríticos (metanol e etanol) não necessitam da utilização de catalisadores na reação de separação (Warabi et al., 2004).

3. Descrição Técnica

3.1. Preparação do material

Um dos principais problemas no trabalho e no manuseamento com culturas de microalgas são as contaminações por bactérias, fungos ou mesmo outras espécies de microalgas que possam competir pelo mesmo espaço, e de forma a eliminar essa condicionante, todo o material utilizado para fazer as primeiras inoculações das culturas assim como material utilizado para a preparação do meio de cultura e procedimentos necessários foi esterilizado por autoclavagem (matrizes de diferentes volumes e tubos de ensaio assim como respectivas rolhas de algodão e borracha, tubos de vidro, gobelés, frascos de vidro), material de plástico utilizado foi esterilizado por radiação UV. Todos os procedimentos, repicagens, análise das culturas foram realizados numa câmara de fluxo laminar sob condições estéreis.

3.2. Meio de cultura

Todos os macro e os micronutrientes são de qualidade analítica e foram pesados numa balança analítica (KERN), rotulados e acondicionados em frascos de vidro de 100 ml armazenados num frigorífico para posterior uso na preparação da quantidade necessária de meio de cultura *Bold Basal Medium* (BBM) a usar. Quanto à preparação do reagente sulfato de ferro (II) (FeSO_4) + Ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi preparado numa hotte devido às propriedades químicas destes reagentes.

Após a preparação das soluções mãe de micro e macronutrientes foi preparado o meio de cultura BBM necessário para proceder às inoculações das culturas das microalgas.

A composição do meio de cultura padrão utilizado BBM encontra-se descrita na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**

Tabela 5.Composição do meio de cultura BBM

Reagentes		C _{Mássica} (g/L _{final})	Elemento	mg/L
Macronutrientes	K ₂ HPO ₄	0,075	K	33,7
			P	13,3
	KH ₂ PO ₄	0,175	K	50,3
			P	39,9
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	Mg	7,4
			S	9,8
	NaNO ₃	0,25	N	41,2
			Na	67,6
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025	Ca	6,8
			Cl	12,1
	NaCl	0,025	Na	3,3
		Cl	5,1	
EDTA-Na ₂ + KOH	0,05 + 0,031	C	16,1	
		N	3,7	
		Na	6,2	
		K	21,6	
FeSO ₄ .7H ₂ O + H ₂ SO ₄ *	0,0050 + 0,0010 mL	Fe	1,0	
		S	1,6	
H ₃ BO ₃	0,0114	B	2,0	
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001412	Zn	
			S	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,000232	Mn	
			Cl	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000252	Cu	
			S	
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,00008	Co		
		N		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,000192	Mo		
		Na		
H ₂ O destilada				
* CH ₂ SO ₄ = 1,84 g/mL				

3.3. Inoculações e condições de cultivo das microalgas

Foi feita a inoculação de três espécies diferentes de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Acutodesmus obliquus* e *Chlorella zofingiensis*. As duas primeiras aqui referidas foram

adquiridas à algoteca SAG (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen – Coleção cultura de algas, Universidade de Göttingen Alemanha), e a terceira microalga da espécie *Chlorella zofingiensis* foi obtida a partir de inoculações de culturas já em stock do laboratório de microalgas do Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto (ISEP).

Numa primeira etapa as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Acutodesmus obliquus* foram inoculadas em tubos de ensaio a partir das culturas preservadas em ágar adquiridas da algoteca SAG como se pode ver na Figura 6.



Figura 6. *Chlorella vulgaris* (a), *Acutodesmus obliquus* (b), Inoculações em tubos de ensaio (c).

Foram feitas quatro inoculações em tubos de ensaio por cada uma destas duas espécies de algas, foi feita a raspagem da cultura e inoculada em 12 ml de meio BBM. Os tubos de ensaio foram agitados diariamente de forma a evitar que a cultura se depositasse no fundo dos tubos e assim potenciar o seu crescimento. Ao fim de cerca de duas semanas estas culturas apresentavam densidade suficiente nos tubos de ensaio para proceder á sua transferência para matrizes de 250 ml onde o seu volume foi perfeito com meio BBM. Na Figura 7 encontram-se imagens de visualização ao microscópio das microalgas usadas neste estudo.

As culturas de *Chlorella zofingiensis* foram inoculadas a partir de culturas já em stock em laboratório, foi feita uma análise ao microscópio de forma a ver a presença ou não de contaminações e de seguida foram preparados três matrizes de 250 ml com 80% do volume meio BBM e os restantes 20% do volume com inóculo.

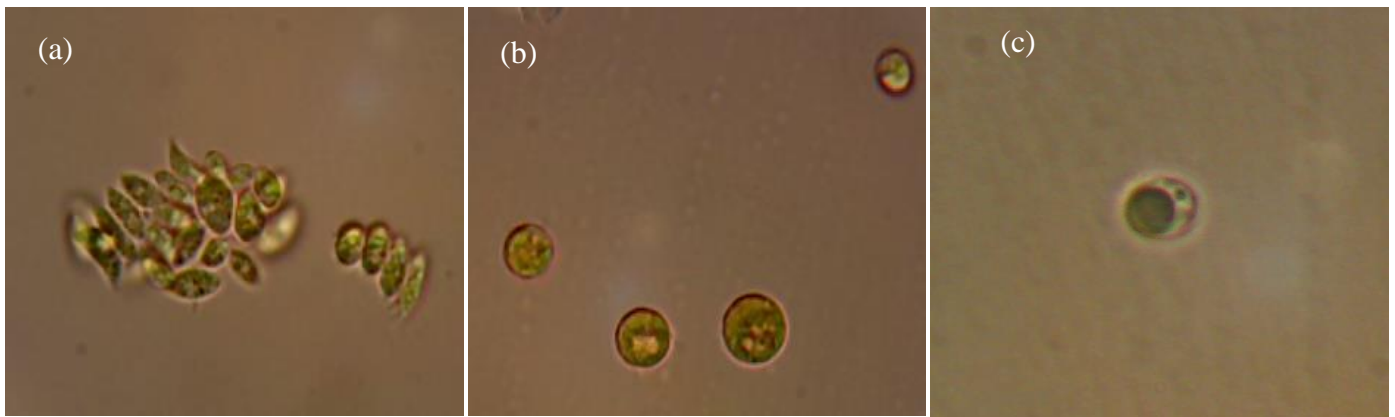


Figura 7. Imagens ao microscópio de (a) *Acutodesmus obliquus*, (b) *Chlorella zofingiensis*, (c) *Chlorella vulgaris*

Todas as culturas foram mantidas sob as mesmas condições, de temperatura num clima controlado com o auxílio de ar condicionado nos $24 \pm 2^\circ\text{C}$, de arejamento com o auxílio de bombas de ar (BOYU-S4000p) e utilização de filtros para filtrar o ar que entra nas culturas, e iluminação com uma intensidade luminosa entre os 3700 lux e os 3900 lux com períodos de 12h/12h de luz artificial. As diferenças nos valores de intensidade luminosa devem-se ao facto de aproveitar o espaço na banca de laboratório e sendo assim intercaladamente os biorreatores foram posicionados uns mais próximos da fonte de luz que outros e essas posições foram mudadas diariamente de forma a todos os biorreatores ficarem expostos às mesmas condições.

O desenvolvimento das culturas das três espécies diferentes de microalgas foi efetuado separadamente, ou seja, monoculturas sem mistura entre as espécies, com a utilização do mesmo meio BBM. Numa fase posterior foi escolhida a microalga que apresentou um crescimento mais adequado e uniforme para continuar o trabalho experimental. Depois de ter volume suficiente de cultura para poder fazer repicagens múltiplas e começar os ensaios, as culturas foram expostas a meios com condições diferentes. A espécie escolhida *Chlorella vulgaris* foi exposta a três cenários diferentes de *stress* nutricional, cada um dos quais com quatro condições distintas incluindo o meio de referência, como se pode ver na Tabela 6.

Cenários de *stress*

Tabela 6. Cenários de *stress*

Referência (Ref)	Cenários de <i>stress</i>		
	Meio de referência (BBM)		
	Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Ferro (1,0 mg/L)	Nitrato (56,9 mg/L)
Condição 1 (C1)	C=0,5 g/l	10 mg/L	170,7 mg/L
Condição 2 (C2)	C=1,0 g/l	50 mg/L	569,0 mg/L
Condição 3 (C3)	C=1,5g/l	0,5 mg/L	28,4 mg/L

Estes cenários foram preparados da mesma forma que a preparação do BBM com algumas mudanças nas concentrações de alguns reagentes. Na preparação da glicose foi preparado o meio BBM e para cada condição (C1, C2, C3) foi adicionado glicose em concentrações diferentes. Na preparação das culturas com *stress* de ferro foi preparado uma condição (C1) com 10 vezes mais ferro na amostra aumentando o volume do reagente FeSO₄ 10 vezes em comparação ao meio BBM original, o mesmo procedimento foi feito para a condição C2 mas desta vez com o aumento em 50 vezes do volume do reagente FeSO₄ e por ultimo a condição C3 que utiliza metade da concentração em FeSO₄ quando comparada com o meio original BBM como é possível observar na Tabela 6. Para a preparação dos meios com *stress* em nitrato foi triplicada a quantidade de NaNO₃ para a condição C1, aumentada em 10 vezes a quantidade do reagente NaNO₃ na condição C2 e diminuída para metade a quantidade de NaNO₃ na condição C3 em comparação com a formulação original do meio BBM como é possível observar na Tabela 6.

Para os meios com adição de ferro foi feito um controlo do pH dos meios com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) de forma a obter o mesmo pH para as 4 condições diferentes e eliminar assim essa variável.

3.4. Avaliação do crescimento das culturas

Ao longo de todo o crescimento das culturas foi sendo feita uma monitorização ao microscópio na procura de possíveis contaminações.

Numa primeira etapa foram cultivadas as três espécies de microalgas e avaliado o seu crescimento de forma a escolher a espécie que apresenta uma maior taxa de crescimento e uniformidade para prosseguir os ensaios. A avaliação do crescimento das culturas das três microalgas foi avaliada através da sua densidade ótica medindo a absorvância por espectrofotometria, para isso foi utilizado o espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec.

Antes de se fazerem as leituras das absorvâncias foram determinados os picos de máxima absorvância para as três culturas que iriam determinar com qual comprimento de onda as culturas iriam ser monitorizadas, sendo assim as espécies *Chlorella vulgaris* e *Acutodesmus obliquus* foram monitorizadas a um comprimento de onda de 685 nm , e a espécie *Chlorella Zofingiensis* a um comprimento de onda de 680 nm.

As absorvâncias foram feitas em triplicado e amostras de 1,5 ml eram colhidas em cuvetes próprias para utilização no espectrofotômetro, antes da recolha das amostras em cuvetes os matrizes eram agitados de forma a homogeneizar as culturas.

Depois de escolhida a microalga *Chlorella vulgaris* para prosseguir os ensaios, estes foram feitos em triplicado para cada uma das condições dos três diferentes cenários.

3.4.1. Curva de calibração

Para proceder à realização da curva de calibração é utilizada biomassa seca (liofilizada), e sendo assim, foi feita a colheita da biomassa de três matrizes com culturas de *chlorella vulgaris*, essa biomassa foi centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm, depois de retirada a água e transferida a biomassa dos três matrizes para um só tubo foi centrifugada novamente durante 15 minutos a 3000 rpm e congelada para armazenamento antes da liofilização.

Para fazer a avaliação do crescimento microalgal foi realizada uma curva de calibração ABS vs Biomassa seca (mg/L), com uma absorvância de 685 nm uma vez que foi esse o pico de absorvância máxima detetada e com a qual foram feitas as medições para a microalga *Chlorella vulgaris*. Foram feitas várias diluições de uma solução padrão e medidas as suas respetivas absorvâncias de forma a poder construir a curva de calibração.

3.5. Determinação da concentração de pigmentos na microalga

Depois de ser escolhida a espécie de microalga mais apropriada para os ensaios foram também analisadas, assim como a absorvância, as concentrações de pigmentos na microalga.

Esta análise de pigmentos foi feita através de espectrofotometria, foram recolhidas amostras de 1,5 ml em tubos de eppendorf, estas amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 1200g numa centrifugadora de eppendorf. A biomassa centrifugada foi então suspensa em 5 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) e agitada durante 30 segundos, após agitação foi aquecida em banho de água a 55 °C durante 30 minutos (Orosa et al., 2005).

Após ser centrifugada novamente a amostra, o sobrenadante (Figura 8) foi analisado em espectrofotómetro a três comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm e através da utilização das equações de Wellburn (Wellburn, 1994) foram determinadas as concentrações de clorofila *a* (Ca), clorofila *b* (Cb) e carotenoides totais (Car):

$$Ca=12.19 \times A_{665} - 3.45 \times A_{649}$$

$$Cb=21.99 \times A_{649} - 5.32 \times A_{665}$$

$$Car = \frac{1000 \times A_{480} - 2.14 \times Ca - 70.16 \times Cb}{220}$$

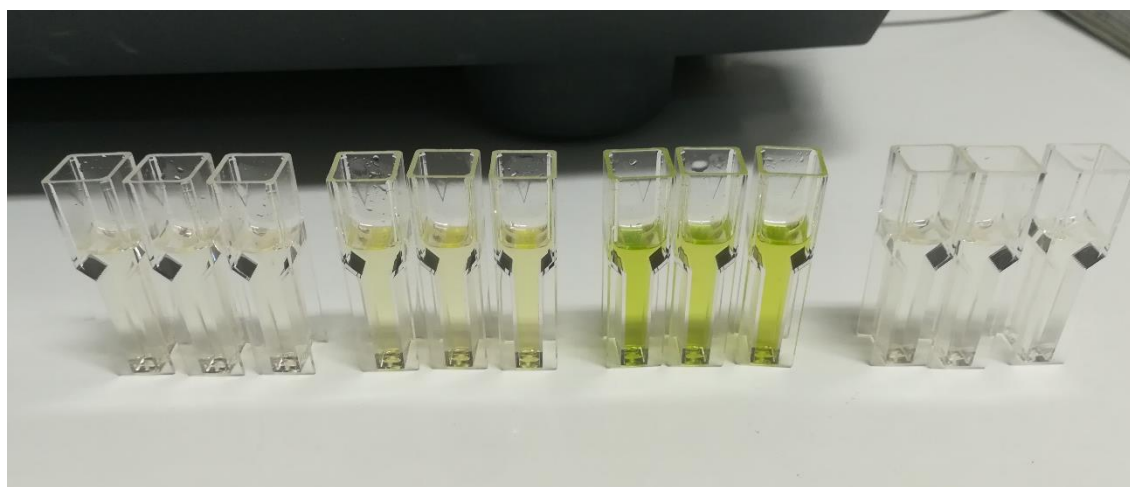


Figura 8. Aspeto das amostras após o procedimento

3.6. Extração e quantificação dos lípidos

Para a extração e quantificação de lípidos o método utilizado foi o de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959)(Anexo 1). Neste método foi pesada a biomassa de cada um dos cenários de *stress* em tubos de vidro e foram então adicionados os solventes clorofórmio e metanol na proporção de 2:1, nesta fase não foi adicionada água uma vez que se trata de biomassa húmida.

De seguida a solução foi levada ao aparelho de ultrassons durante 30 minutos, após esse período foram adicionados clorofórmio/metanol/água nas proporções de 2:2:1 e as soluções são novamente levadas ao aparelho de ultrassons durante 30 minutos. Após a rutura das células e libertação dos lípidos pela utilização dos ultrassons as soluções foram centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm, a centrifugação faz com que se criem 3 fases visíveis, uma fase superior rica em água e metanol, uma fase intermedia constituída por biomassa e uma ultima fase inferior que contem os lípidos e clorofórmio. A última fase é recuperada para um

tubo previamente pesado com a ajuda de uma micropipeta e o clorofórmio evapora ao ar permitindo fazer a quantificação dos lípidos extraídos.

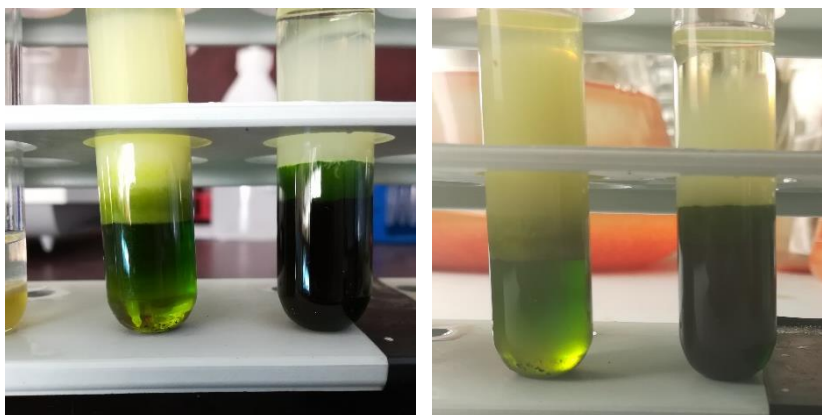


Figura 9. Amostras após procedimento com formação de 3 fases

3.7. Transesterificação

Depois de extraídos os lípidos foi feita a transesterificação dos mesmos através do método de Lepage e Roy (1984) utilizado por Abou-Shanab (Abou-Shanab et al., 2011), ligeiramente modificado (Anexo 1). Os lípidos extraídos anteriormente foram dissolvidos por uma solução com uma mistura de clorofórmio/metanol na razão (2:1), com a adição desta mistura de 2ml por cada 10 mg de óleo. Após esta dissolução foi adicionado ácido sulfúrico 95-97% (catalisador) e metanol (reagente) com a adição por cada 10 mg de óleo de 1ml metanol e 0,3 ml de ácido sulfúrico.

De seguida a mistura foi agitada, pesada e colocada num digestor a 100 °C durante 10 minutos. Após a reação foi adicionada água de forma a criar a formação de duas fases, uma superior rica em água, ácido sulfúrico e metanol e uma inferior rica em clorofórmio e ésteres. A separação das fases com a adição de água foi realizada mais duas vezes descartando a fase superior e após estas separações a fase inferior foi filtrada com a ajuda de uma seringa e foi deixado o clorofórmio evaporar.

4. Resultados e Discussão

4.1. Crescimento das culturas das diferentes estirpes

Foram cultivadas as três estirpes de microalgas e de acordo com o seu crescimento, comportamento e uniformidade visível nos biorreatores foi escolhida a estirpe mais apropriada.

A espécie *Acutodesmus obliquus* apresenta propensão para se agrupar em grupos celulares de quatro a mais células individuais, esta tendência a se agrupar aliada à agitação do meio insuficiente provocada pelo arejamento dos biorreatores fez com que as culturas desta espécie se agrupassem em grupos cada vez maiores conforme o seu crescimento ao longo do tempo, acabando por se depositarem na base dos biorreatores. Esta manifestação faz com que a avaliação do crescimento desta espécie se torne mais difícil e inconclusiva quanto à massa real de biomassa presente nos biorreatores.

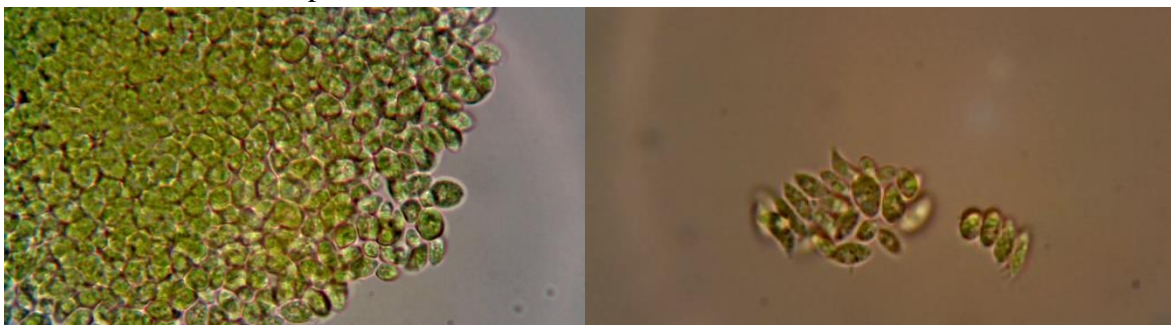


Figura 10. Observação microscópica de *Acutodesmus obliquus* e a forma como esta se agrupa.

Na Figura 11 é possível observar o crescimento desta espécie que de alguma forma retrata a inconsistência dos resultados obtidos do seu crescimento devido á sua deposição, e onde podemos ver a queda na leitura das absorvâncias assim como os baixos valores obtidos.

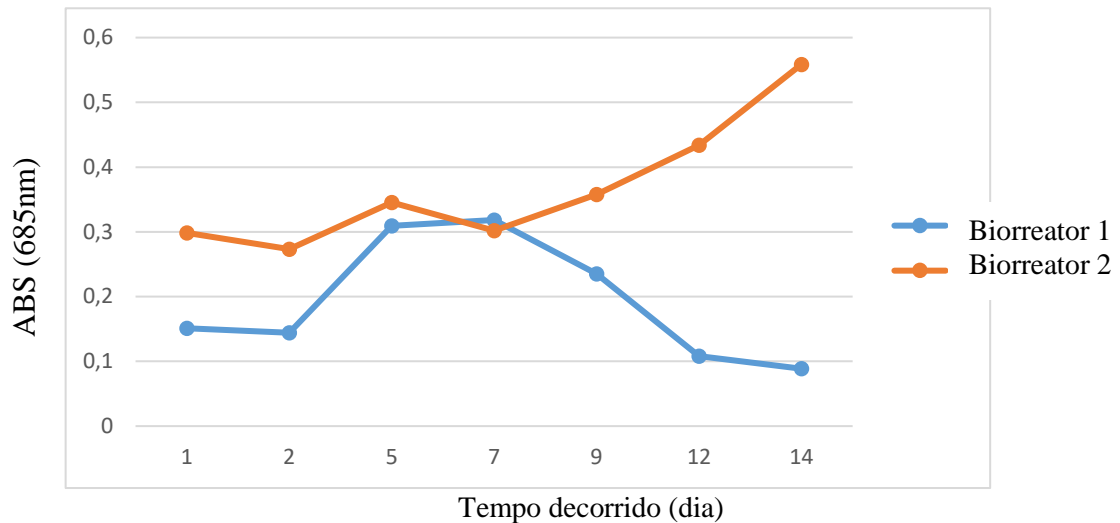


Figura 11. Curva de crescimento ABS (685 nm) vs Dia para *Acutodesmus obliquus*

Na Figura 12 podemos ver as diferentes fases de uma curva de crescimento da *Chlorella zofingiensis*, com o crescimento a atingir um pico aos primeiros 8 a 10 dias para os dois biorreatores seguido de um decréscimo rápido com deposição da biomassa e com algumas formações de grupos de células. No entanto, não apresentava contaminações por outras estirpes ou bactérias, observáveis ao microscópio.

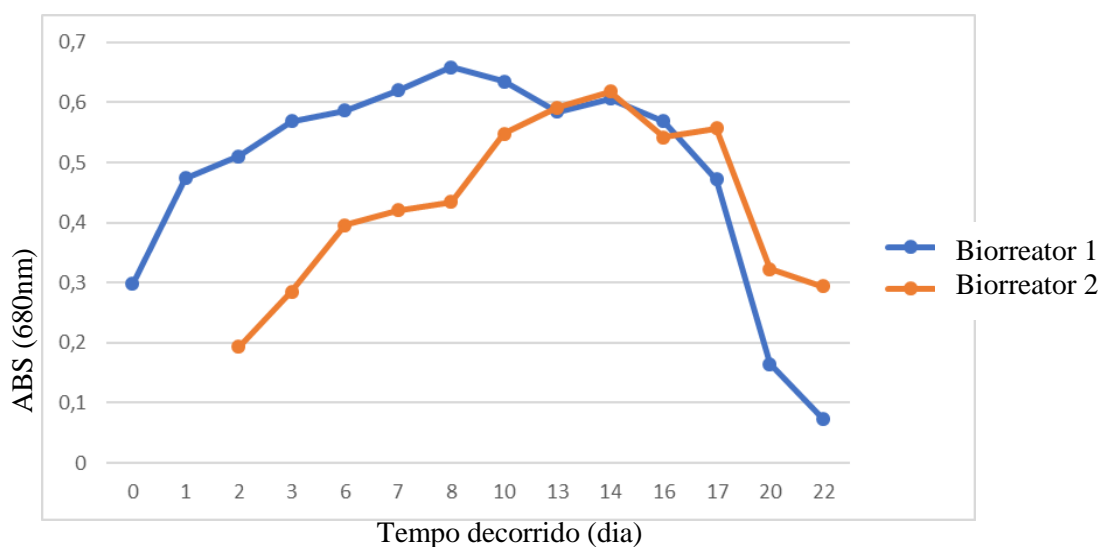


Figura 12 Curva de crescimento ABS (680 nm) vs Dia para *Chlorella zofingiensis*

Quanto às culturas de *Chlorella zofingiensis* e de *Chlorella vulgaris* registaram um crescimento mais característico deste tipo de culturas embora a espécie *Chlorella*

zofingiensis em comparação com a *Chlorella vulgaris* regista um pico de crescimento mais baixo e mais rápido. A *Chlorella zofingiensis* teve uma maior propensão para se depositar nos biorreatores registando assim a espécie *Chlorella vulgaris* um crescimento mais homogéneo, estável e com muito poucas variações na forma como as culturas cresceram em diferentes biorreatores com volumes diferentes como podemos observar nas curvas de crescimento da Figura 13.

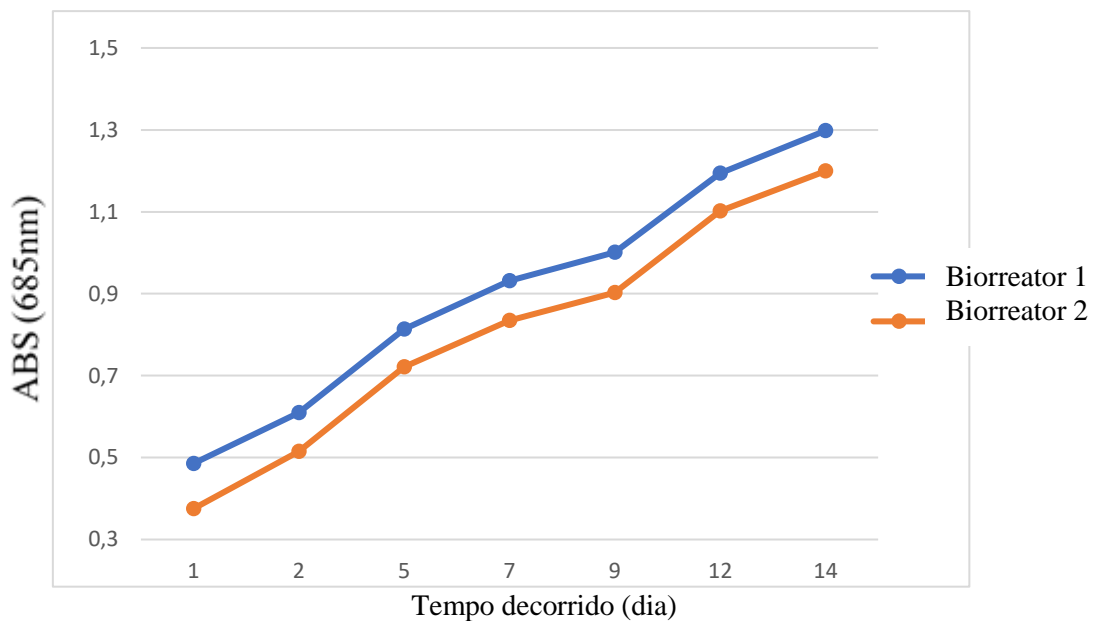


Figura 13 Curva de crescimento ABS (685 nm) vs Dia para *Chlorella vulgaris*

Na Figura 13 podemos ver dois biorreatores com um crescimento quase exatamente paralelo com uma diferença em relação á quantidade inicial de inoculo. Esta diferença pode ser explicada através de uma possível concentração superior de células por volume que foram inoculadas nos dois biorreatores apesar de o volume de inoculação ser o mesmo.

Na Figura 14 podemos ver uma repicagem de uma cultura de *Chlorella vulgaris* para um biorreator de volume superior e o seu crescimento estável sem anomalias ou contaminações, e um paralelismo entre o crescimento dos dois biorreatores o que mostra que se trata de uma microalga com características perfeitas para fazer repicagens múltiplas e de fiável comportamento para usar em ensaios.

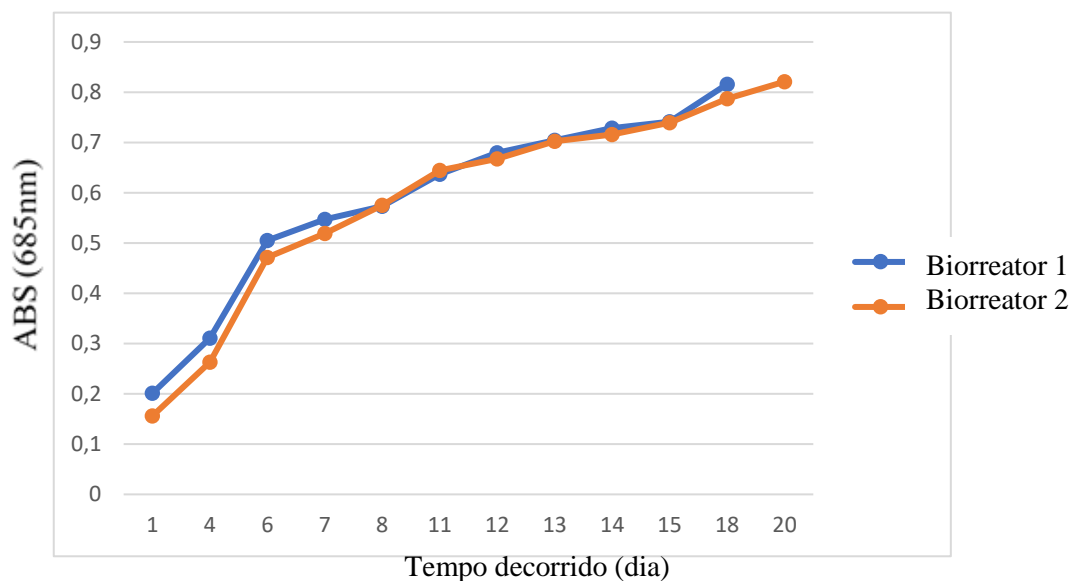


Figura 14 Curva de crescimento ABS (685 nm) para *Chlorella vulgaris* em biorreatores de volume superior

Sendo assim e tendo em conta o comportamento das três diferentes espécies de microalgas quanto ao seu crescimento, contaminações, variações quanto á homogeneidade das culturas e coloração desde as primeiras inoculações até as últimas repicagens, a microalga escolhida para continuar com os ensaios foi a espécie *Chlorella vulgaris*.

4.2. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* sob cenários de stress por macronutrientes

Como já referido no ponto 3.3 da descrição técnica a microalga *Chlorella vulgaris* foi exposta a três cenários de stress com Glicose, Nitrato e Ferro, cada um com quatro condições diferentes (Ref; C1; C2; C3).

4.2.1. Glicose

O primeiro cenário de stress executado foi com a adição de glicose em três concentrações diferentes, uma condição 1 (C1) com uma concentração de glicose em meio BBM de 0,5 g/L, uma condição 2 (C2) com uma concentração de 1,0 g/L e uma terceira condição (C3) com uma concentração de 1,5 g/l.

Os ensaios foram realizados em triplicado para cada concentração que resulta num total de doze matrizes (Biorreatores), todos os matrizes a que foi adicionada glicose, independentemente da concentração, nos primeiros dias foi possível observar a mudança de cor dos biorreatores para uma cor neutra e a formação de agrupamentos das microalgas, anomalia tal que se retrata no crescimento nulo destas culturas devido a contaminação.

Os ensaios realizados com a adição de glicose ao meio foram realizados uma segunda vez observando-se novamente a formação de aglomerados de microalgas apresentando da mesma forma mais uma vez contaminações como apresentado na Figura 15, embora na segunda tentativa tenham apresentado algum crescimento inicial.

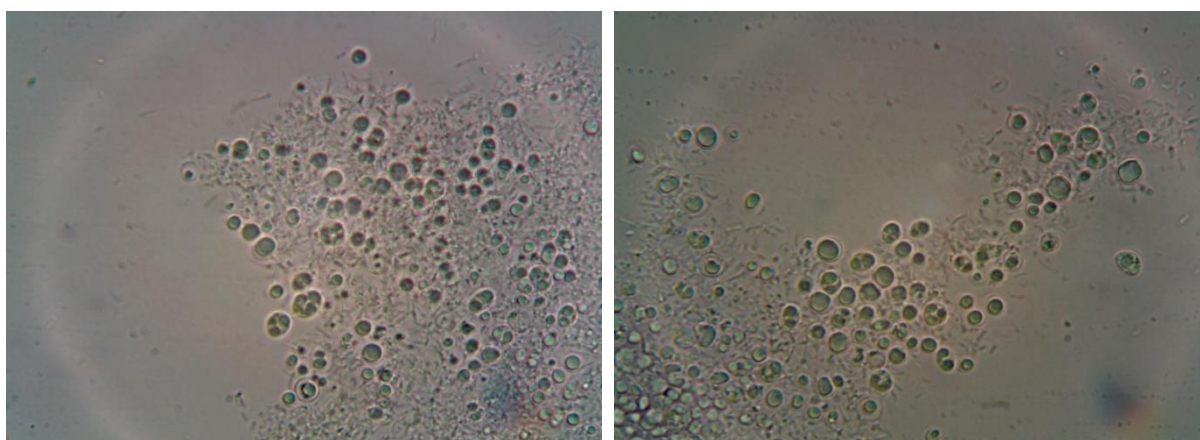


Figura 15. Observação ao microscópio de contaminações nos ensaios com glicose.

Na Figura 16 podemos ver o primeiro ensaio com adição de glicose e a forma como a aglomeração da biomassa devido a contaminações afetou o seu crescimento.

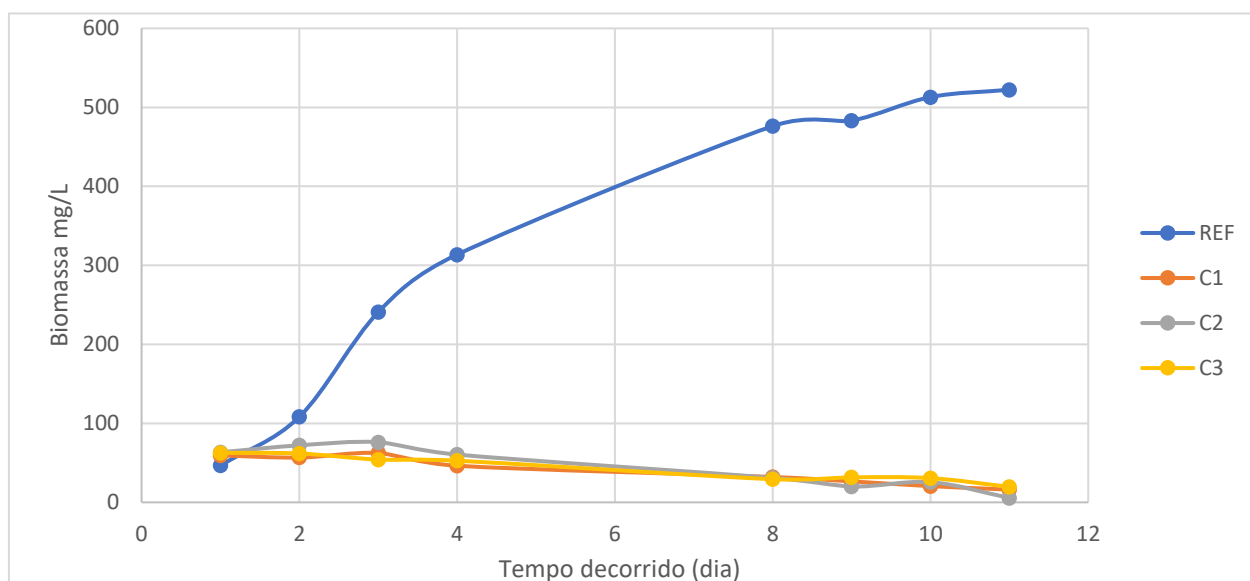


Figura 16 Curva de crescimento Biomassa (mg/L) vs Dia para *Chlorella vulgaris* com a adição de glicose

Na Figura 17 podemos ver os conglomerados de microalgas devido a contaminações que resultam na sua deposição devido ao peso influenciando assim o seu crescimento e no registro da densidade ótica, sendo assim os ensaios com glicose não foram levados em conta nos ensaios seguintes.

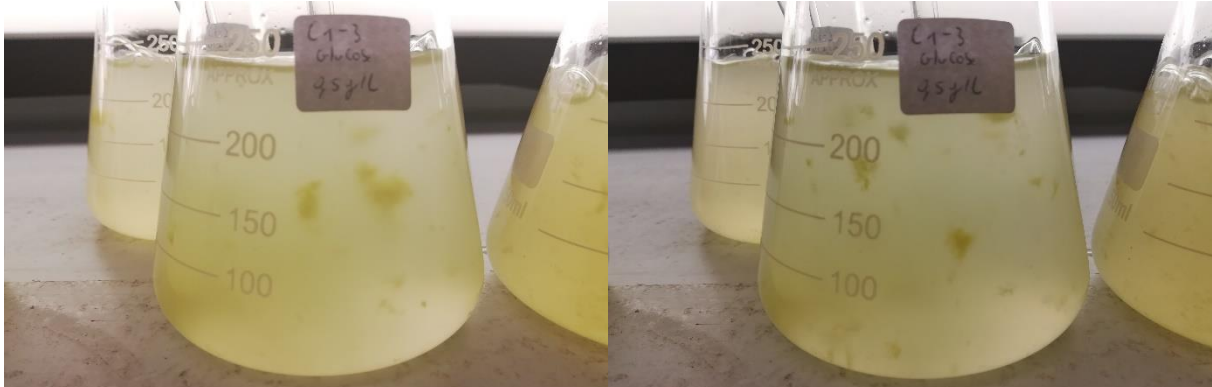


Figura 17 Efeito de conglomeração das microalgas devido a contaminação.

4.2.2. Ferro

O segundo cenário de *stress* efetuado foi com o nutriente ferro em três condições diferentes, uma condição 1 (C1) com 10 vezes mais FeSO_4 (10 mg/L) que o meio referencia BBM (1,0 mg/L), uma condição 2 (C2) com 50 vezes mais FeSO_4 (50 mg/L) e uma condição 3 (C3) com metade da concentração em FeSO_4 (0,5 mg/L).

Na Figura 18 é possível observar que o crescimento inicial das culturas não é muito diferente para a primeira fase de crescimento exponencial, as condições C1 e C3 depois de atingirem o seu pico de crescimento entram em decadência enquanto que a referência e a condição C2, a condição com a maior concentração de ferro, continuam o seu crescimento observando até um maior crescimento para a condição C2.

Após atingir o seu pico de crescimento a condição C2 decresce observando-se então a continuação do crescimento das culturas de referência em meio BBM.

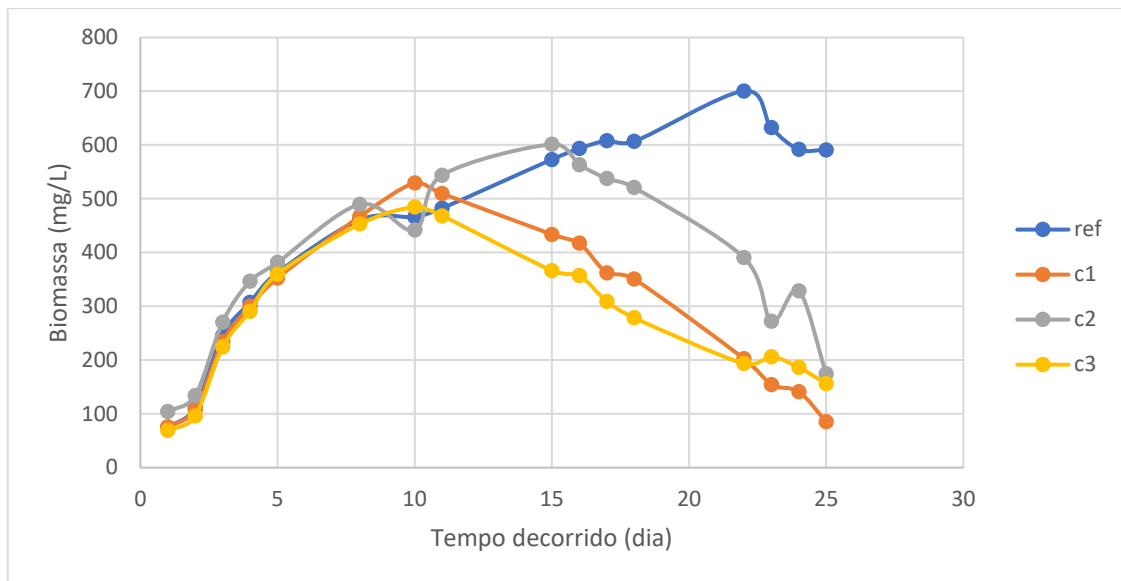


Figura 18 Curva de crescimento Biomassa (mg/L) vs Dia para *Chlorella vulgaris* com stress de ferro.

No geral não é possível dizer que aumentando a concentração de ferro aumenta o crescimento de biomassa, mas por outro lado podemos observar que inibe a continuação do crescimento da microalga ao fim de 10 a 15 dias registrando valores mais elevados de biomassa com o passar do tempo para um meio de cultura “normal” com o meio de referência BBM.

4.2.3. Nitrato

Para os ensaios com stress de nitrato foram preparadas três concentrações, uma condição C1 com três vezes mais quantidade de nitrato (170,7 mg/L) quando comparado com o meio de referência BBM, uma condição C2 com dez vezes mais nitrato (569,0 mg/L) e uma condição C3 com metade da quantidade de nitrato (28,4 mg/L) em comparação com o meio de referência BBM (56,9 mg/L).

Na Figura 19 é notória a diferença no crescimento das culturas em que a concentração de nitrato é maior, é possível observar que para os meios com uma concentração de nitrato C1 e C2 superior á de referência, o crescimento consegue ser duplicado (800 mg/L de biomassa), isto deve-se á assimilação das microalgas do nitrato convertendo-o em biomassa, sendo o nitrato um dos principais macronutrientes para o cultivo de microalgas.

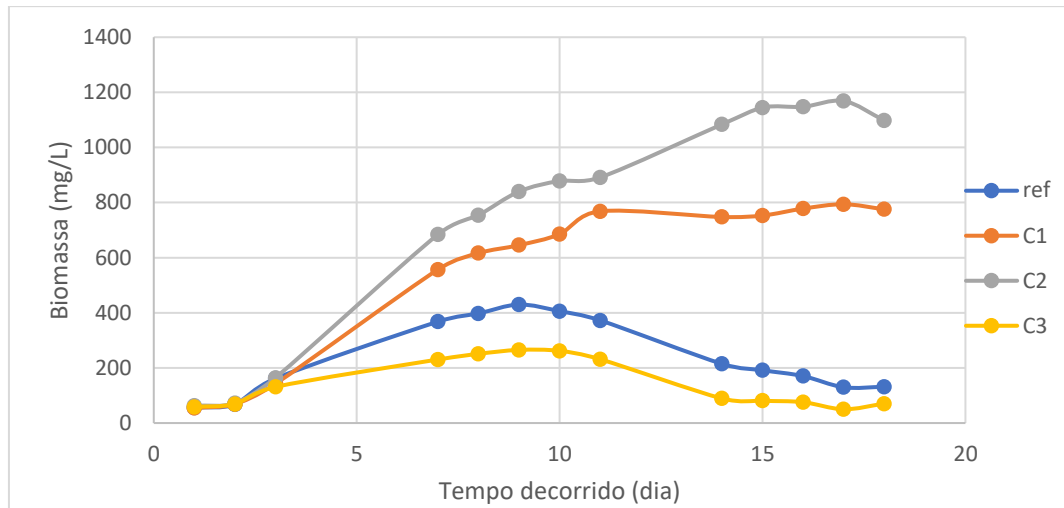


Figura 19 Curva de crescimento Biomassa (mg/L) vs Dia para *Chlorella vulgaris* com *stress* de Nitrato.

Assim como um aumento notório do crescimento para as culturas com maior adição de nitrato foi possível observar uma variação na coloração das culturas registrando uma coloração mais intensa para as culturas com mais nitrato respetivamente para as condições C1 e C2 como podemos observar na Figura 20.



Figura 20. Diferença na coloração das culturas, a) C1-3N, b) C2-10N, c) C3-0,5N.

4.3. Avaliação da produção de pigmentos

Outro parâmetro avaliado assim como o crescimento das culturas foi a concentração de pigmentos nas microalgas, esta avaliação foi sendo feita ao longo dos ensaios para as condições de *stress*, de ferro e nitrato segundo o método já explicado no ponto 3.5 da descrição técnica, o registo das absorvâncias foi feito em triplicado e as concentrações de Clorofila a (Cca), Clorofila b (Ccb) e Carotenoides (Caro) determinadas.

4.3.1. Ferro

Através da Figura 21 podemos observar um grande aumento na concentração dos três pigmentos do dia 2 para o dia 4 que retrata a necessidade de nos primeiros dias ser utilizada a capacidade fotossintética dos pigmentos para o crescimento das microalgas. Ao longo do registo dos pigmentos durante o ensaio a concentração de Clorofila *a* é sempre superior à concentração de clorofila *b* e carotenoides que registam valores semelhantes na totalidade do ensaio.

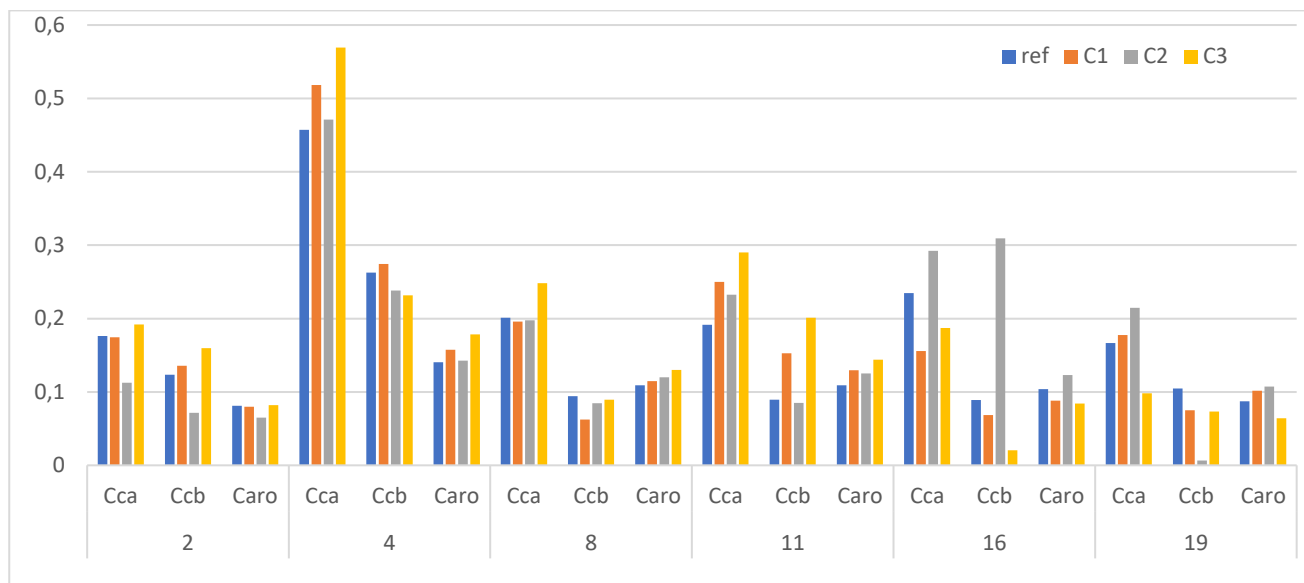


Figura 21 Concentração dos pigmentos (mg/L) vs Dia-Ferro.

É possível também observar que para a clorofila *a* (Cca) em mais de metade do ensaio são registadas maiores concentrações em específico para a cultura C3 que corresponde á cultura com menor quantidade de ferro (0,5 mg/L) atingindo valores entre os 0,2 mg/L e os 0,55 mg/L de clorofila-*a*.

Ao fazer uma comparação entre os meios com mais concentração de ferro respetivamente o meio de referência (ref) e o meio C3 e os meios com maior concentração de ferro respetivamente as condições C2 e C3 é possível concluir que a adição de ferro não impulsiona uma maior concentração de pigmentos por parte das microalgas.

4.3.2. Nitrato

Quanto á concentração dos pigmentos nos ensaios com *stress* de nitrato como podemos observar na Figura 22 é notória a elevada produção de clorofila *a* (Cca) para a condição C2, a condição com a concentração mais elevada de nitrato no meio de cultura.

Quanto às concentrações de clorofila *b* (Ccb) e carotenoides (Caro), apesar de ser em concentrações muito mais baixas que a clorofila *a* (Cca) continua a ser registadas as maiores concentrações para as culturas em meio C2 (meio com maior concentração de nitrato).

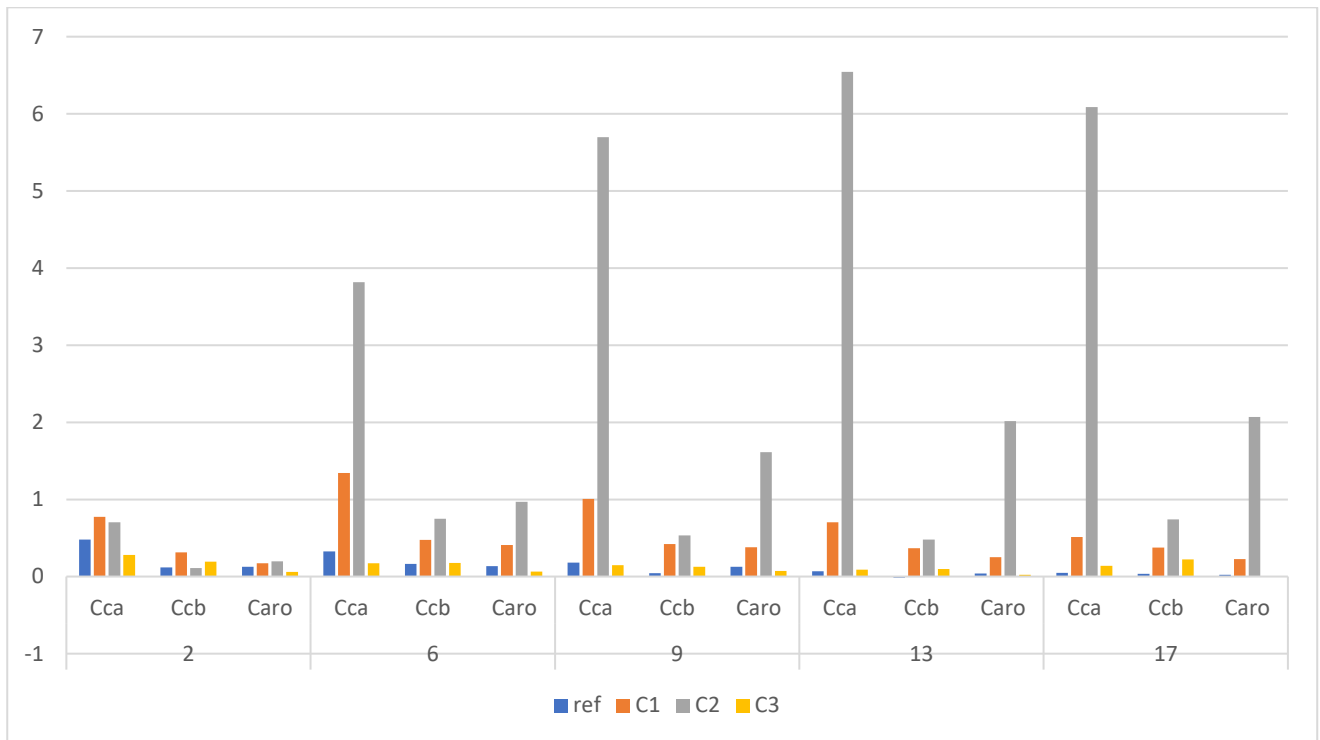


Figura 22. Concentração dos pigmentos (mg/L) vs Dia-Nitrato.

4.4. Quantificação de lípidos

Após ser feita a extração dos lípidos através do método descrito no ponto 3.6 da descrição técnica e após a evaporação do clorofórmio, estes foram quantificados através da pesagem dos tubos onde foram realizadas as extrações e o seu teor lipídico por biomassa seca determinado para as condições sob *stress* de nitrato e ferro.

A quantidade de biomassa seca é determinada sabendo o teor de água que a amostra centrifugada de biomassa húmida contém, esse teor de água foi determinado sabendo a percentagem de biomassa seca que as amostras de biomassa húmida contêm através do processo de secagem por liofilização, a determinação desse teor de água (88,2 %) é especificada no Anexo 5.

Na Tabela 7 podemos observar o teor lipídico para cada condição:

Tabela 7 Teor lipídico para cada condição.

		Biomassa Húmida(g)	Biomassa seca (g)	Massa de lípidos (g)	Teor de lípidos (%)
Nitrato	Ref (56,9 mg/L)	0.339	0.040	0.01	25
	C1 (170,7 mg/L)	1.303	0.154	0.03	19
	C2 (569,0 mg/L)	1.252	0.147	0.024	16
	C3 (28,4 mg/L)	0.222	0.026	0.011	42
Ferro	Ref (1,0 mg/L)	0.426	0.050	0.014	28
	C1 (10 mg/L)	1.115	0.132	0.022	16
	C2 (50 mg/L)	1.987	0.234	0.029	12
	C3 (0,5 mg/L)	0.904	0.107	0.016	15

Sabendo a quantidade de lípidos presente por cada grama de biomassa seca é possível calcular o teor de lípidos para cada amostra ($\text{Massa de lípidos} / \text{Biomassa seca de microalga} \times 100$), e sendo assim podemos observar que para os ensaios com *stress* de nitrato a acumulação lipídica pelas microalgas é acentuada para meios com limitação de nitrato.

Quanto aos ensaios com *stress* de ferro não é possível concluir que a adição ou limitação deste nutriente ao meio influencia a acumulação lipídica pelas microalgas, e como se verifica uma produção superior para o ensaio de referência, este é aceite como o melhor meio com a concentração adequada de FeSO_4 para um crescimento normal a nível lipídico das microalgas.

5. Conclusão e sugestões para trabalhos futuros

Neste estudo foi primeiramente realizado o crescimento de três espécies de microalgas de água doce, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis* e *Acutodesmus obliquus*, cultivadas em meio de cultura BBM. Foi possível observar que a microalga *Chlorella vulgaris* registou um crescimento superior em comparação com as outras espécies, mais estável e fiável para poder replicar e continuar com os ensaios, assim como a menos suscetível a contaminações e aglomeração das microalgas por falta de agitação mecânica.

Os ensaios para os quais foi adicionada glicose (>0,5 g/L) ao meio registaram todas as contaminações o que mostra que é um meio propício à competição pelo espaço e proliferação por parte de fungos e bactérias, estes ensaios não foram então levados em conta neste estudo.

Quanto aos resultados obtidos é possível concluir que para uma maior produção de biomassa por litro de cultura os ensaios com uma maior concentração de nitrato (>170,7 mg/L) registam valores mais elevados (cerca de 800 mg/L biomassa), as microalgas através da fotossíntese e na presença de nitrato assimilam este nutriente nos seus processos biológicos o que resulta num maior crescimento celular enquanto que para os ensaios com *stress* de ferro não é possível dizer que o crescimento é potenciado na limitação ou aumento deste

nutriente, mas sim que na utilização de concentrações maiores de ferro(10 e 50 mg/L) o pico de crescimento das culturas é atingido mais rápido.

Relativamente á influência do *stress* nutricional na concentração de pigmentos é muito mais vantajoso para obter uma maior produção de, nomeadamente, clorofila-*a* e carotenóides, a utilização de meios mais ricos em nitrato (569 mg/L) enquanto que para os ensaios com *stress* de ferro uma concentração inferior de ferro (0,5 mg/L) no meio de cultura regista concentrações de clorofila-*a* mais elevadas o que sugere uma combinação destes dois fatores num meio para poder obter uma maior produção de clorofila-*a*.

Face aos resultados obtidos para o teor de lípidos podemos concluir que uma menor concentração de nitrogénio (28,4 mg/L) no meio de cultura favorece a acumulação de lípidos pelas microalgas atingindo um teor de 42 %. Fator importante para a produção de biodiesel embora uma menor concentração de nitrogénio no meio também registre uma menor taxa de crescimento das microalgas, quanto aos ensaios com *stress* de ferro é possível concluir que o melhor meio se trata do meio de cultivo de referencia (1,0 mg/L) que sugere que uma adição ou limitação deste nutriente não seja vantajosa para uma maior produção de lípidos.

Após a realização deste estudo surgem algumas ideias de alterações que possam ser feitas de forma a obter conclusões mais fiáveis assim como novas conclusões:

- Utilização de agitação mecânica de forma a melhorar o contacto das culturas com o meio assim como através do movimento de agitação evitar o aglomerar das microalgas.
- Realização das culturas com adição de glicose com maior cuidado de forma a evitar contaminações e com concentração abaixo dos 0,5 g/L.
- Realizar os ensaios para volumes de cultura maiores $\geq 5L$, de forma a obter quantidades de biomassa e óleo superiores, que facilitam na realização dos procedimentos e quantificação de massas.
- Realizar o estudo com outras espécies de microalgas.
- Fazer a combinação dos meios de cultura que obtiveram os melhores resultados dependendo do produto que se quer obter (por exemplo: realizar um ensaio com um meio rico em nitrato e limitado em ferro de forma a obter concentrações superiores em clorofila-*a*).

Referências

- About-Shanab, R.A.I., Hwang, J.-H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B.-H., 2011. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy* 88, 3300–3306. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2011.01.060>
- Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., Baqui, A., 2012. Biofuel from algae—Is it a viable alternative? peer-review under responsibility of the International Energy Foundation. *Procedia Engineering* 49, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.10.131>
- Balavigneswaran, C.K., Sujin Jeba Kumar, T., Moses Packiaraj, R., Veeraraj, A., Prakash, S., 2013. Anti-oxidant activity of polysaccharides extracted from *Isocrysis galbana* using RSM optimized conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 100–108. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.05.014>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Boussiba, S., Vonshak, A., 1991. Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and Cell Physiology* 32, 1077–1082. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078171>
- Brasil, B.S.A.F., Silva, F.C.P., Siqueira, F.G., 2017. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnology* 39. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Chapman, R.L., 2013. Algae: the world’s most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18, 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9>
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical

review. *Bioresource Technology* 102, 71–81.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.159>

Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.J., Chang, J.S., 2017. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology* 229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>

Dixon, C., Wilken, L.R., 2018. Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing* 5, 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>

Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T.V., Velpuri, J., Kuppam, C., 2018. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94, 49–68. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.05.012>

González-Delgado, Á.-D., Kafarov, V., 2011. Microalgae based biorefinery: issues to consider, *Tecnología y Futuro*.

Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J., 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 57, 157–163. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00058-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00058-2)

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances* 30, 709–32. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.001>

Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., Ogushi, Y., 1997. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy* 22, 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(96\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(96)00123-5)

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.S., Lee, D.J., 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>

Ip, P., Chen, F., 2005. Production of astaxanthin by the green microalga in the dark. *Process Biochemistry*.

Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., Tan, C.-S., 2015. A review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research*

- 15, 712–742. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>
- Lee, Y.-K., 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology* 9, 403–411. <https://doi.org/10.1023/A:1007900423275>
- Lemoine, Y., Schoefs, B., 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* 106, 155–177. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., Chen, F., 2011. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.017>
- Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Liu, Z., Jiang, Y., Chen, F., Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Liu, Z., Jiang, Y., Chen, F., 2014. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential. *Marine Drugs* 12, 3487–3515. <https://doi.org/10.3390/md12063487>
- Martínez, M., Sánchez, S., Jiménez, J., El Yousfi, F., Muñoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73, 263–272. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00121-2)
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mathimani, T., Mallick, N., 2018. A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel – Key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 91, 1103–1120. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.04.083>
- Murty, V.R., Bhat, J., Muniswaran, P.K.A., 2002. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7, 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF02935881>
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 96, 373–378. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2004.04.006>

- Pragya, N., Pandey, K.K., Sahoo, P.K., 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 24. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88, 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2010.11.025>
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., de Lasa, H., 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 622–653. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2013.05.063>
- Reißer, W., 2007. *Algae—Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, L. Barsanti, P. Gualtieri, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, London (2006), (320pp., USD 119.95, ISBN: 0849314674). *Journal of Plant Physiology* 164, 374. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2006.11.001>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.04.007>
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research* 1, 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Singh, B., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F., 2014. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 29, 216–245. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2013.08.067>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of

- microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96.
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Takeda, H., 1993. Taxonomical assignment of chlorococcal algae from their cell wall composition. *Phytochemistry* 34, 1053–1055. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90712-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90712-X)
- Tan, X.B., Lam, M.K., Uemura, Y., Lim, J.W., Wong, C.Y., Lee, K.T., 2018. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 26, 17–30.
<https://doi.org/10.1016/J.CJCHE.2017.08.010>
- Tang, 2011. Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 1.
<https://doi.org/10.6000/1927-5951.2011.01.02.04>
- Trainor, F.R., Cain, J.R., Shubert, L.E., 1976. Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*: 80 years later. *The Botanical Review* 42, 5–25.
<https://doi.org/10.1007/BF02860860>
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology* 135.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>
- Voltolina, D., Gómez-Villa, H., Correa, G., 2005. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource Technology* 96, 359–362.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2004.04.004>
- Warabi, Y., Kusdiana, D., Saka, S., 2004. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresource Technology* 91, 283–287.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00202-5)
- Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., Rahman, S.K., 1989. Why Are Secondary

- Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *Journal of Natural Products* 52, 1189–1208. <https://doi.org/10.1021/np50066a001>
- Yeh, K.-L., Chang, J.-S., 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., Chen, F., 2014. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & Function* 5, 413. <https://doi.org/10.1039/c3fo60607d>
- Zhu, S., Wang, Y., Shang, C., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z., 2015. Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 120, 205–209. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2014.12.018>
- Zhu, X.-G., Long, S.P., Ort, D.R., 2008. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current Opinion in Biotechnology* 19, 153–159. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2008.02.004>

Anexos

Anexo 1 – Procedimentos

EXTRAÇÃO DE LIPÍDOS

A extração dos lipídeos contidos nas microalgas foi feita usando o método de Bligh and Dyer (1959) modificado:

- 1) Pesagem da biomassa num tubo utilizável na centrífuga
- 2) Adição dos solventes na proporção (1;2;0,8), respetivamente, clorofórmio, metanol e água
(Nota: nesta fase não é necessário adicionar água uma vez que a biomassa é húmida, sendo necessário determinar a quantidade de água).
- 3) Levar ao aparelho de ultrassons durante 30 minutos
- 4) Adição dos solventes na proporção (2;2;1,8), respetivamente, clorofórmio, metanol e água
- 5) Levar ao aparelho de ultrassons durante 30 minutos
- 6) Centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos.
(Nota: a esta altura formam-se 3 fases: a superior rica em água e metanol, a intermediária constituída por biomassa e a inferior rica em clorofórmio e lípidos)
- 7) Descarte da fase superior
- 8) Recuperação da fase inferior para um tubo de vidro previamente pesado
- 9) Evaporação do clorofórmio (ao ar)
- 10) Pesagem do tubo para quantificação os lípidos.

TRANSESTERIFICAÇÃO

Os óleos extraídos são convertidos em ésteres metílicos usando o método descrito por Lepage e Roy (1986), modificado de acordo com a descrição seguinte:

- 1) Redissolução dos lípidos extraídos: para 10 mg de óleo, adição de 2 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) (Adição da quantidade adequada à massa de óleo disponível)
 - 2) Adição de metanol e ácido sulfúrico 95-97%, reagente e catalisador de transesterificação, respetivamente: para 10 mg de óleo adição de 1mL de metanol e 0,3 mL de ácido sulfúrico. (Adição da quantidade adequada à massa de óleo disponível)
 - 3) Roscar a tampa. Agitação vigorosa durante 5 minutos
 - 4) Pesagem do tubo com a mistura
 - 5) Reação durante 10 minutos a 100°C
 - 6) Adição de 1 mL de água para separação de fases
 - 7) Agitação
- (Nota: por adição de água formam-se duas fases, a superior rica em água, metanol e ácido sulfúrico, e a inferior rica em clorofórmio e ésteres).
- 8) Descarte da fase superior
 - 9) Adição de 1 mL de água para lavagem
 - 10) (Separação das fases)
 - 11) Descarte da fase superior
 - 12) Adicionar 1 mL de água para lavagem
 - 13) Filtrar a fase inferior com um filtro com poro 0,26 µm (com o auxílio de uma seringa)
 - 14) Deixar evaporar o clorofórmio, em hotte.

Anexo 2-Curva de calibração

Tabela A 1. Concentrações e diluições realizadas para a curva de calibração.

[Biomassa seca] mg/L	Concentração final (mg/L)	Média ABS (685nm)	Desvio Padrão
30	30,03	0,0967	0,00153
60	60,06	0,1557	0,00153
120	119,91	0,3013	0,00153
240	240,03	0,6117	0,00153
343	342,93	0,8413	0,00115
490	489,93	1,1017	0,00115
700	699,93	1,4777	0,00208
1000	1000,02	1,9020	0,00265
1500	1500,03	2,1937	0,00404

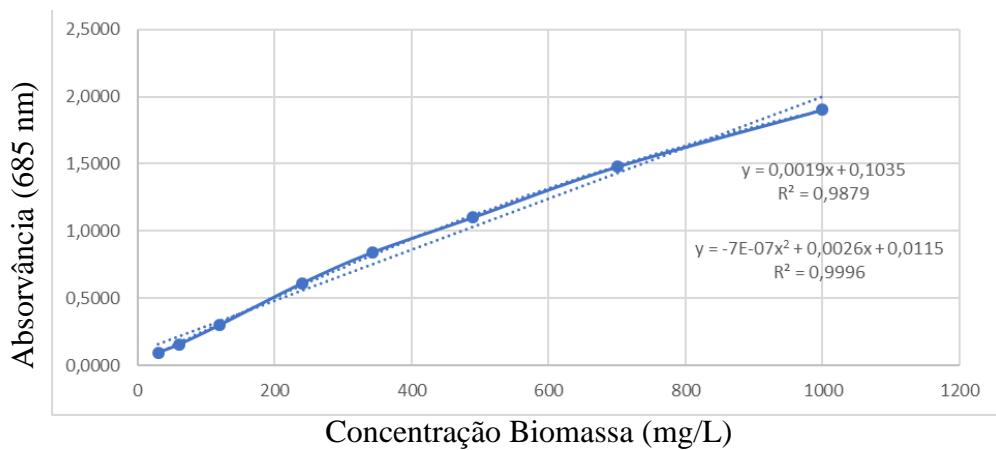


Figura A 1 Curva de calibração para a *Chlorella vulgaris*

Anexo 3 - Concentração de Pigmentos

Para a determinação da concentração de pigmentos as absorvâncias são medidas a três comprimentos de onda, 480, 649 e 665 nm e calculadas através das seguintes equações:

$$Ca = 12.19 \times A_{665} - 3.45 \times A_{649}$$

$$Cb = 21.99 \times A_{649} - 5.32 \times A_{665}$$

$$Car = \frac{1000 \times A_{480} - 2.14 \times Ca - 70.16 \times Cb}{220}$$

Anexo 4 - Determinação do teor de água na biomassa

Através do processo de liofilização realizada para a determinação da curva de calibração é possível saber qual o teor de água nas amostras de biomassa húmida centrifugadas, na seguinte tabela é possível observar a desidratação da biomassa húmida.

Tabela A 2. Biomassa após liofilização

Peso Tubo (g)	Peso tubo + Biomassa húmida (g)	Peso Biomassa húmida (g)	Peso tubo + Biomassa seca (g)	Peso biomassa seca (g)
14,0277	15,2532	1,2255	14,1722	0,1445

$$\% \text{ Biomassa seca} = \frac{0,1445 \times 100}{1,2255} = 11.8\%$$

$$100\% = \% \text{ Biomassa seca} + \% \text{ Água} (=) \% \text{ Água} = 88.2\%$$