

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Cultivo de microalgas do género  
*Botryococcus* visando a produção de  
biodiesel

**João Evandro Brandão Tavares**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Cultivo de microalgas do género  
*Botryococcus* visando a produção de  
biodiesel

**João Evandro Brandão Tavares**

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Ricardo Alexandre Perdiz de Melo  
e co-orientada pelo Engenheiro Tiago Pardal

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2009

## Resumo

O mundo encontra-se presentemente confrontado com dupla crise, a escassez das limitadas fontes de combustíveis fósseis e a degradação ambiental. Enquanto a economia mundial demanda cada vez mais por combustíveis a baixo custo para os sistemas industriais e de transportes, existe uma tremenda necessidade de combater as causas e os já existentes efeitos das alterações climáticas por estes causados. Todavia, quando parecia imprescindível o desenvolvimento de combustíveis renováveis neutras em emissões nocivas, tornou-se claro que a primeira geração de biocombustíveis não atinge os limites da demanda e tampouco contribui para a mitigação das alterações climáticas. Daí o interesse no desenvolvimento de uma segunda geração de biocombustíveis produzidos de fontes não alimentares, tais como as microalgas, as quais apresentam grandes perspectivas a longo prazo. Ao contrário das plantas terrestres, as microalgas crescem extremamente rápido em qualquer lado e algumas espécies são ricas em óleo, potencial que representa uma grande vantagem. A microalga verde *Botryococcus braunii*, com vasta distribuição por todos os continentes, é caracterizada pela sua organização colonial e pela sua espantosa habilidade de produzir lípidos e hidrocarbonetos de cadeia longa que podem atingir de 15% a 75% do peso seco o que tem atraído cada vez maior atenção nas últimas duas décadas no sentido de exploração desta espécie visando a produção de biodiesel. Esta tese foi desenvolvida no sentido de investigar a potencialidade do uso de estirpes locais (portuguesas) desta espécie como substrato para o biodiesel. Pelos resultados obtidos nas experiências realizadas, a taxa máxima de crescimento conseguida durante a fase exponencial foi de 61 mg/L\*dia (peso seco). Constatou-se que crescimento e a produção lipídica das estirpes cultivadas são influenciados pelas condições de cultura daí a necessidade de optimizá-las. Todavia, estas estirpes mostram-se capazes de crescer, produzir óleos e absorver nutrientes em culturas em águas residuais. A percentagem máxima obtida para o extracto lipídico foi de 36% da biomassa seca o que está de acordo com vários resultados que permitiram considerar esta espécie como potencial substrato para o biodiesel. Este facto é também apoiado pela predominância do ácido oleico (C18:1, 42% a 66%) e do ácido palmítico (C16:0, 8% a 18%) no extracto lipídico dado que os metil ésteres desses ácidos gordos (FAME) são os ideais para a produção de biodiesel. Em suma, apesar de estas estirpes de *B. braunii* apresentarem crescimento relativamente lento, produzem conteúdo e constituição lipídica considerável que no mínimo justifica mais investimento num melhor estudo da sua biologia.

**Palavras-chave:** Renováveis, Microalga, *Botryococcus braunii*, FAME, Hidrocarbonetos e Biodiesel.

## Abstract

The world is presently confronted with twin crises, depletion of the finite reserves of fossil fuel and environmental degradation. While the global economy increasingly demands for low-cost fuels for industrial and transportation systems, there is a tremendous need to combat the causes and effects of existing climate change caused by them. However, when it seemed essential to develop renewable fuels neutral in harmful emissions, it became clear that the first generation of biofuels does not reach the limits of demand, nor contribute to the climate change mitigation. Hence the interest in developing a second generation biofuels produced from non-food feedstocks such as microalgae, which potentially offer greatest opportunities in the longer term. Unlike other oil crops, microalgae grow extremely rapidly in any anywhere and many are exceedingly rich in oil, potential that represents a great advantage. The green microalga *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae), which is widely distributed on all continents, is characterized by an original organization of colonies and an unusual capacity to produce unsaturated long-chain hydrocarbons, reaching contents ranging from 15% to 75% of its dry weight. This characteristic has attracted increasingly more attention in the last two decades in attempts to exploit this species for renewable biodiesel. This thesis was developed to investigate the potential of the local strains of this species as a substrate for biodiesel. From the results obtained in experiments carried out the maximum growth rate achieved was 61 mg/L\*day (dry weight). We found that growth and lipid production of cultivated strains are influenced by culture conditions hence the need to optimize them. However, these strains appear to be able to grow, produce oil and absorb nutrients in wastewater cultures. The maximum lipid extract obtained was 36% of dry matter which is in agreement with several results that allow considering this species as a potential substrate for biodiesel. This is also supported by the predominance of oleic acid (C18:1, 42% to 63%) and palmitic acid (C16:0, 8 to 18%) in the lipid extract as the methyl esters of these fatty acids (FAME) are ideal for the production of biodiesel. In short, although these strains of *B. braunii* present relatively slow growth, they produce considerable lipid content that at least warrants further investment in a better study of its biology.

**Keywords:** Microalga, *Botryococcus braunii*, FAME, Hydrocarbons and Biodiesel.

## **Agradecimentos**

Quero aqui prestar o meu reconhecido agradecimento a algumas pessoas e instituições cujo contributo foi muito importante para a realização deste trabalho.

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Alexandre Perdiz de Melo, pela confiança, pela amizade e pela oportunidade de realizar esta dissertação.

Agradeço ao Engenheiro Tiago Pardal, meu co-orientador, e a todo o pessoal da empresa Omnidea, pelo apoio prestado e por toda disponibilidade demonstrada.

Ao IPAD pela concessão da bolsa de estudo sem a qual seria impossível a realização deste mestrado.

Aos estimados Professores, Doutor Luís Manuel Gaspar Pedro e Doutora Ana Cristina da Silva Figueiredo, pelo impecável apoio que me deram durante toda a realização deste mestrado.

A todos os companheiros do laboratório de Botânica Marinha do Instituto de Oceanografia, em especial Tânia, Bernardo, Bruno, Maria João, Ana, Sílvia, Paulo e Lourenço pela companhia, pela ajuda, pelos bons momentos e principalmente pelos mais difíceis de ultrapassar. À Vera Veloso pelo apoio, correcções e “puxões de orelha”.

A todos os meus colegas e amigos da FCUL, em particular, Osvaldo, Fúlu, Adilson, Silvino, Tavi, Sofia, Rúben, Indira, enfim a todos, pelo companheirismo, amizade e camaradagem. Em especial à minha estimada amiga Ana Lina Cabral pela paciência, compreensão e pelas palavras de força mesmo em horas de maior desânimo.

### **Dedicatórias:**

Aos meus adoráveis pais e irmãos e à Fátima por ter sido sempre minha companheira leal em todos os momentos.

## Índice

Resumo.....	i
Abstract .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Lista das Figuras .....	vi
Lista das Tabelas.....	vi
1 – Introdução .....	1
1.1– Objectivos.....	2
2 – Revisão da literatura .....	3
2.1– Problemas com as fontes convencionais de combustíveis .....	3
2.2 – Extinção dos combustíveis fósseis.....	4
2.3 – Degradação ambiental .....	6
2.4 – Fontes renováveis de energia – Biocombustíveis .....	8
2.5 – Etanol <i>versus</i> Biodiesel .....	10
2.6 – Biocombustíveis: benefícios e inconvenientes.....	11
2.7 – Biodiesel como alternativa ao diesel convencional .....	13
2.8 – Microalgas como matéria-prima para o biodiesel .....	16
2.9 – Produção de biomassa de microalgas .....	19
2.10 – Colheita, processamento e conversão da biomassa em biocombustível .....	20
2.11 – <i>Botryococcus braunii</i> .....	21
3 – Materiais e Métodos .....	23
3.1 – Espécie/estirpe.....	23
3.2 – Preparação do inóculo.....	23
3.3 – Condições de cultura .....	23
3.4 – Determinação do crescimento .....	24
3.4.1 – Método do peso seco .....	24
3.4.2 – Método espectrofotométrico .....	24
3.5 – Planeamento experimental .....	25
3.5.1 – Comparação do crescimento e produtividade em biomassa em diferentes meios de cultura .....	25
3.5.2 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico (hidrocarbonetos) em culturas “indoors” .....	25
3.5.3 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa em culturas “outdoors” .....	26

3.5.4 – Análise de nutrientes .....	26
3.6 – Determinação do conteúdo lipídico das culturas.....	26
3.7 – Extracção de lípidos totais.....	27
3.8 – Análise da fracção lipídica .....	28
4. – Resultados .....	29
4.1 – Características da biomassa de <i>Botryococcus braunii</i> .....	29
4.2 – Crescimento da Biomassa .....	29
4.2.1 – Primeira fase de culturas.....	29
4.2.2 – Segunda fase de culturas.....	32
4.2.2.1 – Análise da absorção de nutrientes em águas residuais .....	35
4.2.2.2 – Crescimento do conteúdo lipídico .....	36
4.2.3 – Terceira fase de culturas .....	37
4.4 – Conteúdo em lípidos .....	40
4.5 – Composição do extracto lipídico .....	42
5. – Discussão dos resultados.....	43
5.1 – Crescimento de <i>Botryococcus braunii</i> .....	43
5.1.1 – Comparação do crescimento e produtividade em biomassa em diferentes meios de cultura .....	44
5.1.2 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico (hidrocarbonetos) em culturas “indoors” .....	44
5.1.3 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa em culturas “outdoors” .....	45
5.1.4 – Crescimento e absorção de nitratos e fosfatos nas culturas em água residual pré-tratada.....	46
5.2 – Crescimento do conteúdo lipídico.....	47
5.2.1 – Crescimento de lípidos e hidrocarbonetos em água residual .....	48
5.3 – Extracção do conteúdo lipídico .....	49
5.4 – Análise dos metil ésteres de ácidos gordos (FAME).....	50
6. – Conclusões.....	51
Bibliografia .....	52
Anexos.....	58

## Lista das Figuras

Figura 1: Progressão do consumo energético mundial segundo as fontes (Skov, 2003).....	4
Figura 2: Reservas de petróleo por países (Oil and Gas Journal 2005, 24-45).....	5
Figura 3: Concentração de CO <sub>2</sub> atmosférico vs emissão antropogénica (NEIC, 2009).....	7
Figura 4: Fracção relativa de energias renováveis no consumo global (REN21, 2007).....	8
Figura 5: Esquema representativo da reacção de transesterificação onde R1, R2 e R3 representam as cadeias dos ácidos gordos (adaptado de Ferrari <i>et al.</i> , 2005). .....	14
Figura 11: Análise do crescimento lipídico relativo à segunda fase de culturas das duas estirpes de <i>B. braunii</i> pelo método vermelho do Nilo.....	37
Figura 12: Curvas de crescimento das duas estirpes de <i>B. braunii</i> relativos à terceira fase de culturas.....	39
Figura 13: Produtividade em biomassa (peso seco) das duas estirpes de <i>B. braunii</i> em culturas <i>outdoors</i> .....	39
Figura 14: Estrutura montada <i>outdoors</i> para se efectuar a terceira fase de culturas de <i>B.</i> <i>braunii</i> (as fotos foram tiradas, A, 12 dias, B, 20 dias, C, 28 dias, D, 36 dias e E, 44 dias, F, 52 dias após o início das culturas).....	40
Figura 15: Comparação dos conteúdos em lípidos obtidos das extracções das culturas da segunda fase.....	41
Figura 16: Correlação entre o conteúdo lipídico e a fluorescência do vermelho de Nilo nas culturas <i>indoors</i> das estirpes <i>B. braunii</i> IO 98-01 e IO 98-02.....	42

## Lista das Tabelas

Tabela I: Produtividades de algumas fontes de biodiesel (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009). .....	17
Tabela II: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas (Chisti, 2007). .....	18
Tabela III: Desenho experimental seguido nas experiências para determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico “indoors” e “outdoors” .....	26
Tabela IV: Concentrações iniciais e finais dos nutrientes fosfatos, nitratos e nitritos e amónia e as respectivas percentagens de remoção correspondentes à segunda fase de culturas das duas estirpes de <i>B. braunii</i> em águas residuais (ETAR) .....	36
Tabela V: Comparação dos conteúdos em lípidos relativos às extracções da primeira e da segunda fase de culturas.....	40
Tabela VI: Comparação do conteúdo lipídico determinado pelo método gravimétrico e a respectiva fluorescência relativa referente à segunda fase de culturas.....	41
Tabela VII: Perfil lipídico das estirpes IO 98-01 e IO 98-02 de <i>B. braunii</i> relativo às de culturas da segunda fase (nd, não detectado).....	42

## 1 - Introdução

Há cerca de dois séculos que o petróleo é tido como uma dádiva dos deuses. Actualmente, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento industrial, nos transportes, no sector da agricultura e na satisfação das necessidades básicas do homem (Basha *et al.*, 2009). Contudo, os impactos negativos do aquecimento global, associados à intensificação do uso do petróleo e de outros combustíveis fósseis, são aceites como um sério problema para a humanidade. Este fenómeno, tem vindo a ser observado há várias décadas e parece claramente intensificar-se a cada ano que passa. As necessidades energéticas mundiais aumentam continuamente, impulsionadas tanto pelo aumento da industrialização como também pelo aumento populacional, sendo a grande parte dessas necessidades ainda suprida por combustíveis fósseis derivados de fontes não renováveis e portanto limitados às reservas existentes (Shahid e Jamal, 2008). Na verdade, os combustíveis fósseis constituem 80,3% da energia consumida no mundo sendo que 57,7% desta quantia é usada no sector dos transportes (IEA, 2006). Assim, associados ao uso, cada vez mais intenso, dos combustíveis fósseis estão dois grandes problemas: o primeiro prende-se com as emissões de gases (CO<sub>2</sub>, HC, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>) poluentes e com efeito de estufa que acarretam impactos ambientais incalculáveis, efeitos catastróficos na saúde humana e danos com tendências irreversíveis na biodiversidade, o que pode, em certa medida e a médio ou longo prazo, pôr em risco a própria vida no planeta; o segundo tem a ver com o esgotamento das reservas existentes o que conduz à crise energética e ao aumento dos preços dos combustíveis que têm grande impacto na segurança energética e na vida das sociedades (Amin, 2009). Desta forma, é largamente aceite que é insustentável ambiental e economicamente assegurar o desenvolvimento industrial e social na dependência dos combustíveis fósseis. Portanto, para ser sustentável ambiental e economicamente o processo de produção de combustíveis não só requer fontes renováveis mas também fontes capazes de contribuir para diminuição dos actuais níveis de gases poluentes que contribuem para o aquecimento global (Sheehan *et al.*, 1998a). Isso implica que as novas fontes de produção de combustíveis possuam um potencial de captação de CO<sub>2</sub> atmosférico capaz de neutralizar as emissões resultantes da combustão dos mesmos, ou seja, a solução encontra-se no desenvolvimento de fontes com taxas neutras ou negativas de emissão de CO<sub>2</sub> e outros gases com efeito de estufa. Portanto, numa era de eminente escassez dos

combustíveis e de grandes preocupações ambientais, os biocombustíveis, entre todas as fontes de energias renováveis, têm sido apresentados como a melhor alternativa (Gielen e Unander, 2005; Huber *et al.*, 2006). Os primeiros biocombustíveis obtidos de plantas e cultivares terrestres já são uma realidade e de entre eles, o bioetanol obtido através da fermentação da cana-de-açúcar e do milho, e o biodiesel obtido de sementes oleaginosas, tais como soja e palma, dominam o mercado dos biocombustíveis embora também se encontra em desenvolvimento vários outros tipos de biocombustíveis promissores. A produção desses biocombustíveis da primeira geração tem sido causa de vários inconvenientes pelo que tem-se emergido uma necessidade urgente de desenvolvimento de uma nova geração de biocombustíveis capaz de superá-los. A segunda geração propõe a produção de biocombustíveis a partir de toda a espécie de biomassa e matéria orgânica residual contornando assim a competição pela terra arável e com a produção de bens alimentares (Escobar *et al.*, 2009). No sentido de obter biomassa a custos economicamente sustentáveis, a produção de algas, em especial as microalgas, tem sido proposta, por diversos investigadores, como uma potencial fonte de substrato para a produção de biocombustíveis (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009; Mata *et al.*, 2009). Os custos de produção proibitivos e as limitações a nível de bioprospecção de espécies, sistemas de cultivo e processamento da biomassa, têm desencorajado a produção comercial de biocombustíveis a partir de microalgas (Li *et al.*, 2008). Assim, os principais desafios actuais têm a ver com o isolamento, selecção e caracterização morfo-fisiológica de espécies nativas promissoras por acumularem um conteúdo lipídico significativo; optimização dos parâmetros relevantes para o cultivo de cada espécie ou estirpe; desenvolvimento de sistemas de cultivo e de tecnologias de colheita e processamento que asseguram a viabilidade de produção de biocombustíveis.

### 1.1- Objectivos

Este trabalho de tese de mestrado investiga a hipótese de estirpes portuguesas da espécie de microalgas *Botryococcus braunii* possuir potencial como fonte de biomassa para a produção de biodiesel. Para apurar esta hipótese definiu-se os objectivos no sentido de responder às seguintes questões de investigação:

- Quais as taxas de crescimento das estirpes de *B. braunii* utilizando os parâmetros de cultivo referenciados na literatura como óptimos para a espécie?
- Como varia o crescimento destas estirpes em diferentes meios de cultura?

- Como varia a acumulação de lípidos e qual a percentagem do conteúdo lipídico das duas estirpes nos diferentes meios de cultura utilizados?
- Como varia o crescimento e a acumulação de lípidos nestas microalgas quando cultivadas em águas residuais?
- O crescimento destas estirpes é afectado quando são cultivadas no exterior utilizando a luz solar e sujeitas às variações das condições ambientais?
- O comportamento destas microalgas justifica o seu cultivo visando a produção de biodiesel?

## **2 – Revisão da literatura**

### **2.1- Problemas com as fontes convencionais de combustíveis**

Combustíveis fósseis são o carvão, o petróleo e o gás natural. Durante centena de milhões de anos a biomassa morta de algas, plantas e animais foi sendo soterrada e a sua decomposição foi dando origem aos depósitos de combustíveis fósseis. Esses combustíveis não foram, praticamente, usados pelas sociedades humanas até o século XVIII, quando começou a revolução industrial. Assim, durante milhares de anos as civilizações humanas supriram as suas necessidades energéticas através da energia solar, do vento e da biomassa. Até essa data a força de trabalho foi essencialmente muscular, tanto humana como de animais ao serviço do homem (Veziroglu e Sahin, 2008). Com o início da revolução industrial os combustíveis fósseis passaram a desempenhar uma função essencial no desenvolvimento e no crescimento económico uma vez que as exigências e necessidades humanas a nível de satisfação básica e de fornecimento de bens e serviços foram sendo cada vez maiores. Inicialmente o carvão foi largamente utilizado para esse fim e foi substituindo gradualmente a madeira como o combustível mais comumente usado. Com a invenção do motor de combustão interna deu-se um grande crescimento na utilização de combustíveis líquidos derivados do petróleo que veio a se tornar a maior fonte de energia utilizada até hoje. A melhoria das condições de vida permitiu um grande avanço civilizacional que por sua vez levou a um aumento exponencial do consumo energético. No ano 2000 a população mundial consumiu 5 vezes mais combustíveis que em 1950 e 13 vezes mais que em 1900. A

Figura 1 ilustra o consumo mundial de combustíveis fósseis nos últimos séculos (Skov, 2003).

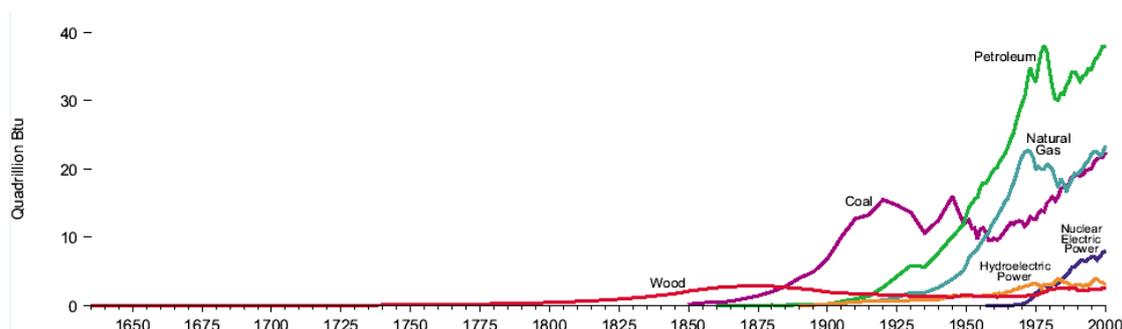


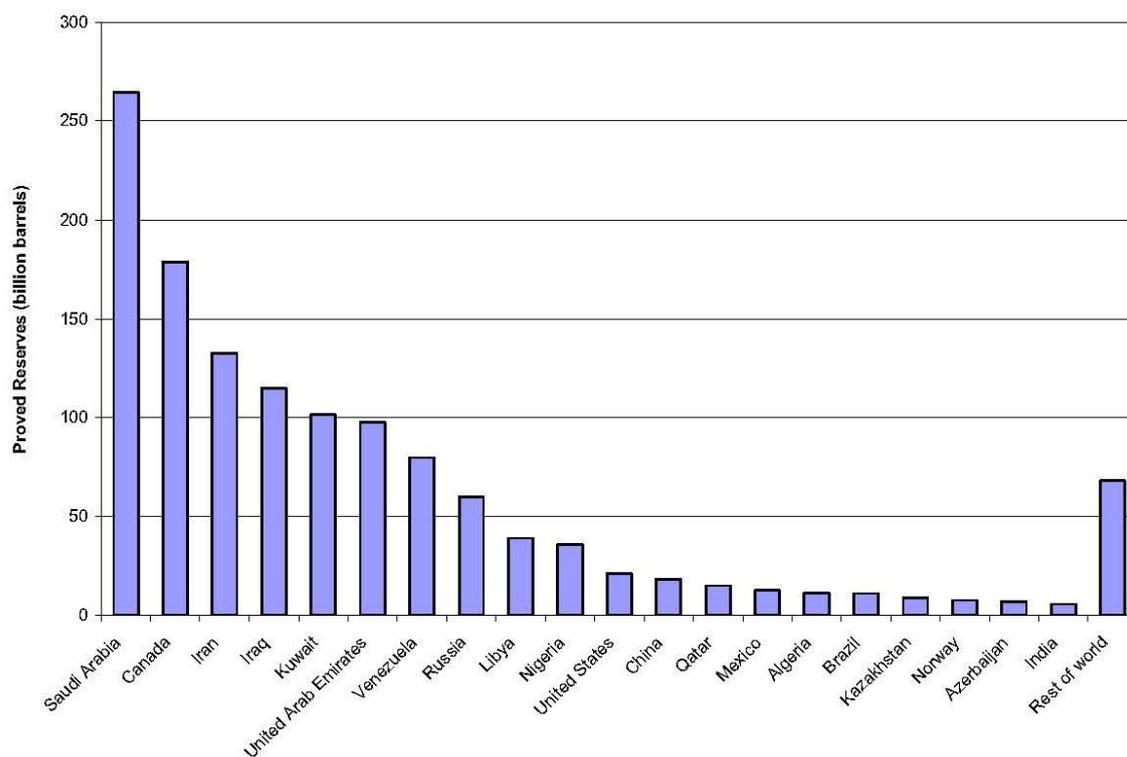
Figura 1: Progressão do consumo energético mundial segundo as fontes (Skov, 2003)

Os combustíveis fósseis, que alimentaram o extraordinário crescimento económico e social dos últimos dois séculos, representaram a cura para a privação humana na sociedade em industrialização, todavia, foi um remédio não testado que se releva hoje entorpecente e que tem levado a uma dependência cada vez maior e com consequências graves. De facto, nunca a humanidade teve um nível de vida tão elevado mas isso conseguiu-se à custa de uma demanda energética cada vez maior e um consumo de combustíveis fósseis cada vez mais desenfreado, ou seja, actualmente usa-se tanto combustível como nunca antes visto (Veziroglu e Sahin, 2008). Assim, o mundo encontra-se presentemente confrontado com um duplo e grande problema: a crise energética derivada da depleção das fontes de combustíveis fósseis e a degradação ambiental causada pelos produtos da combustão desses combustíveis (Agarwal, 2007).

## 2.2 – Extinção dos combustíveis fósseis

As reservas mundiais de combustíveis fósseis são, obviamente, limitadas. De acordo com estimativas, sob o actual cenário mundial, existem reservas de carvão para mais 218 anos, de petróleo para mais 41 anos e de gás natural para mais 63 anos (Puppán, 2002; Agarwal, 2007). Dado que a demanda energética mundial continua a aumentar, apesar de todos os esforços em contrário, essas reservas podem se tornar escassas mais cedo que o previsto. Essa maior demanda e o risco de escassez devem-se essencialmente a dois factores: o contínuo aumento da população mundial e a crescente demanda dos países emergentes pelo aumento do nível de vida (Veziroglu e Sahin, 2008). Por um lado, o enorme crescimento populacional exige desenvolvimento, principalmente a nível dos transportes, a nível industrial e a nível de produção agrícola o que é assegurado por combustíveis fósseis, por outro lado, a globalização cultural e de mercados e a

assimilação de costumes de países ricos pelos emergentes provoca uma forte pressão de consumo energético, que é sentida com maior intensidade nos países emergentes. E é nesses países que continuará a ocorrer o maior crescimento demográfico, ao longo do século XXI e conseqüentemente cada vez maior a demanda energética. O eminente perigo da escassez de fontes de combustíveis fósseis ameaça a economia mundial e a vida tal como a conhecemos, como tal, é de grande importância saber onde residem as reservas. A *Figura 2* ilustra as principais reservas de petróleo actualmente conhecidas.



**Figura 2: Reservas de petróleo por países (Oil and Gas Journal 2005, 24-45)**

Dependência de combustíveis fósseis por parte de países sem reservas significa necessidade de recorrer a países com reservas para se abastecer desses recursos. Isso contribui para uma maior vulnerabilidade económica dado que as principais reservas encontram-se em regiões ou países muitas vezes com elevada instabilidade política ou até em situações de conflito o que cria potencial para o aumento dos preços e escassez em casos de ruptura de abastecimento (Roberts, 2004; Oil and Gas Journal, 2005). O Médio Oriente concentra cerca de 65% das reservas mundiais enquanto a Europa e a Eurásia 11,7%, África 9,5%, América Central e do Sul 8,6% América do Norte 5% e Ásia e Pacífico 3,4% (BP, 2007).

### 2.3 - Degradação ambiental

Para os ambientalistas um dos maiores problemas com que a humanidade se depara actualmente é o impacto dos combustíveis fósseis e dos seus produtos da combustão sobre o meio ambiente. Desses impactos se destacam o aquecimento global e alterações climáticas, a poluição (do ar, da água e da terra) e os efeitos adversos sobre a saúde. A extracção, o transporte, a armazenagem do petróleo, do carvão e do gás natural, o descarte de resíduos e os derrames são as grandes causas de poluição, todavia, os maiores danos ambientais são causados pelo uso final dos combustíveis nos processos de aquecimento, na produção de electricidade e na geração de força motriz das instalações industriais e dos transportes (Veziroglu e Sahin, 2008). O uso intensivo dos combustíveis fósseis leva à emissão de diversos gases ( $\text{CO}_x$ ,  $\text{SO}_x$ ,  $\text{NO}_x$ , CH) e compostos poluentes (fuligem, cinzas, alcatrão e outros compostos orgânicos) com efeitos catastróficos na saúde humana, nos animais, nas florestas, na visibilidade, nos edifícios, etc. Os  $\text{NO}_x$ , CO, HC e as partículas são os poluentes regulados enquanto formaldeído, aldeído, benzeno, tolueno, xileno, metano,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  são os poluentes não regulados. Os regulados são aqueles para os quais as legislações ambientais estabelecem limites enquanto para os não regulados não existem legislação ou quando ela existe não é subscrita por todos os países. Todavia, tanto os regulados como os não regulados contribuem para efeitos prejudiciais de curto a longo prazo. Os poluentes regulados geralmente causam efeitos a curto prazo, por exemplo, o CO é fatal em alta dosagem, agrava problemas cardíacos, afecta o sistema nervoso central; o  $\text{NO}_x$  provoca desordens respiratórias; os HC's causam irritações oculares e cutâneas, fadiga e sonolência. As partículas de fuligem causam efeitos muito graves a longo prazo no sistema respiratório, como a indução de tumores, especialmente quando estão associadas com hidrocarbonetos aromáticos (Hosseinpoor *et al.*, 2005). Alguns dos produtos derivados dos combustíveis fósseis quando emitidos para a atmosfera são sujeitos aos raios solares, à água e a outros compostos atmosféricos ocorrendo reacções químicas que resultam em poluentes secundários como é o caso do ozono, aerossóis e vários ácidos. Os  $\text{SO}_x$  e os  $\text{NO}_x$ , além das desordens respiratórias que lhes estão associadas, formam ácido sulfúrico e nítrico, respectivamente, originando as chuvas ácidas o que tem sido responsável por grande devastação nos ecossistemas (Shahid e Jamal, 2008).

O  $\text{CO}_2$ , que é o principal produto derivado dos combustíveis fósseis, juntamente com outros chamados gases com efeito de estufa, contribui para absorção e aprisionamento

dos raios infravermelhos na atmosfera levando ao aumento da temperatura da terra. Esse aumento da temperatura é responsável pelo degelo das calotes polares, pelo aumento do nível dos oceanos e pelas alterações climáticas o que inclui ondas de calor, longas secas, enormes furacões, chuvas torrenciais, inundações, etc. (Kesse, 2000; Ramanathan e Feng, 2009). A concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> vem aumentando a um ritmo acelerado após a revolução industrial. Os ecossistemas terrestres contribuem para o ciclo natural do carbono, todavia, as actividades humanas produzem mais carbono do que aquilo que o ecossistema terrestre é capaz de sequestrar da atmosfera por meios naturais. Assim, a concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> passou de 280 ppm na era pré-industrial para 385 ppm actualmente (Agarwal, 2007; Hansen *et al.*, 2008). A Figura 3 ilustra o aumento do dióxido de carbono de origem antropogénica *versus* a concentração atmosférica desse gás.

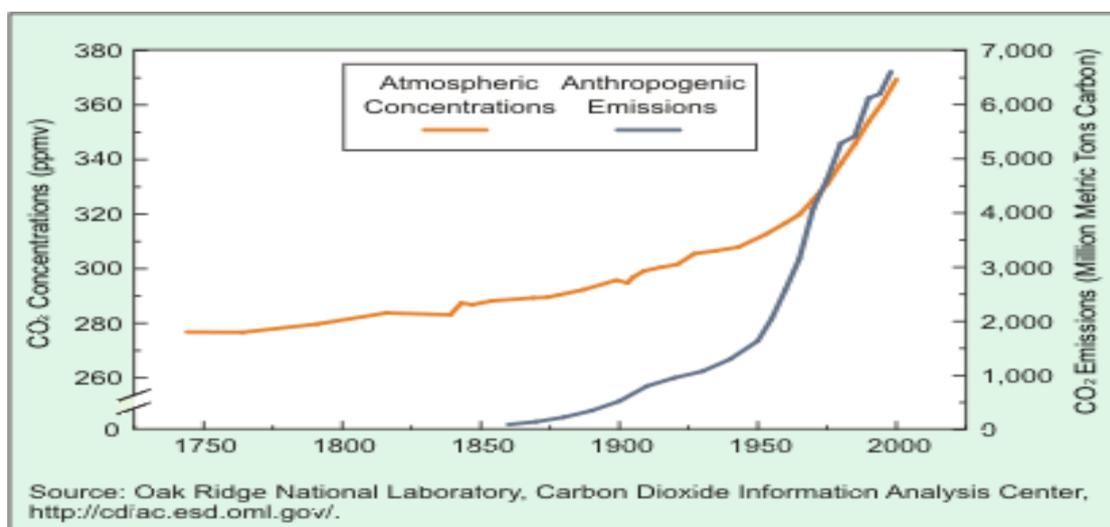


Figura 3: Concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico vs emissão antropogénica (NEIC, 2009)

Muita tecnologia tem vindo a ser desenvolvida para reduzir ou eliminar as emissões prejudiciais para a atmosfera, todavia, tecnologia para a redução de CO<sub>2</sub> são raras. Assim, há uma grande necessidade de desenvolvimento de tecnologias e práticas a fim evitar que as consequências das emissões sejam irreversíveis. As opções para a redução de CO<sub>2</sub> incluem o aumento da eficiência energética, redução da desflorestação, substituição por combustíveis menos poluentes, promoção de energias renováveis e substituição para uma economia não baseada em combustíveis fósseis. Todavia, uma das melhores alternativas é o desenvolvimento de fontes de energias inteiramente renováveis (van Harmelen e Oonk, 2006).

## 2.4 – Fontes renováveis de energia – Biocombustíveis

A eminente escassez de reservas de combustíveis fósseis, a conseqüente diminuição de produção e a crescente necessidade de salvaguardar o meio ambiente para gerações futuras impõe urgência no desenvolvimento de fontes alternativas de energia, nomeadamente solar, eólica, hidroelétrica, geotérmica, hidrogénio e biocombustíveis, para assegurar o ritmo de desenvolvimento global. Todavia, de acordo com o relatório da REN21 (2007), apenas cerca de 18% da energia global consumida é derivada de fontes renováveis, sendo que a tradicional biomassa, utilizada no aquecimento e na cozinha, representa 13% e a outra fatia corresponde à energia hidroelétrica que representa 3% e às novas fontes renováveis (geotérmica, eólica, solar e biocombustíveis) que representam no seu conjunto apenas 2,4% (Figura 4). As energias renováveis podem, de facto, substituir as energias fósseis nos 4 principais sectores, nomeadamente, produção de electricidade, aquecimento, transportes e abastecimento energético das zonas rurais, contudo, a substituição total não acontecerá enquanto houver energia fóssil a preços relativamente acessíveis, dado que isso atrasa os investimentos em energias renováveis. Todavia, a capacidade global de energias renováveis tem aumentado 15-30% ao ano desde o ano 2000. Entre esses aumentos destacam-se os aumentos na produção da energia fotovoltaica (60%) e eólica (28%) e dos biocombustíveis (40%) (REN21, 2007).

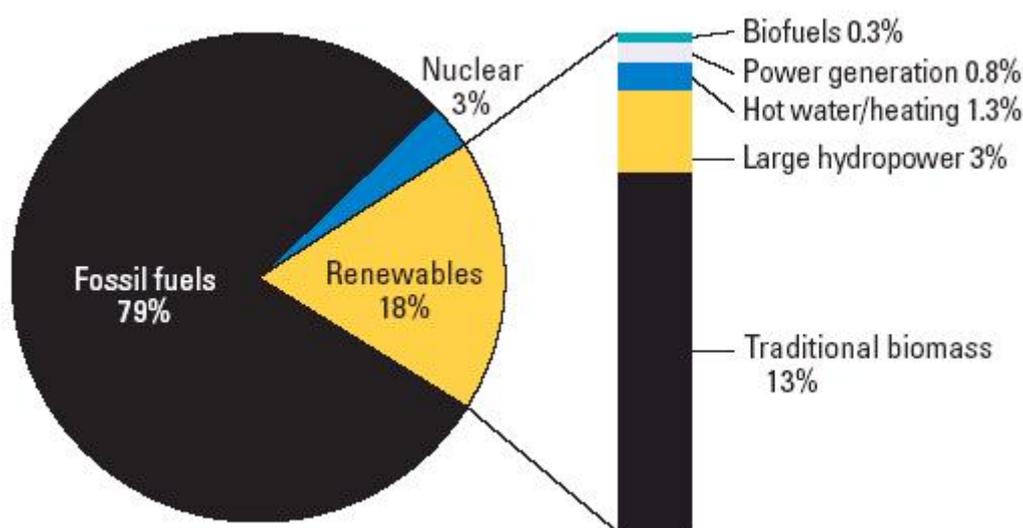


Figura 4: Fracção relativa de energias renováveis no consumo global (REN21, 2007)

De acordo com muitos autores, de todas as alternativas renováveis, o hidrogénio e os biocombustíveis são as que apresentam as maiores potencialidade de substituir os

combustíveis fósseis e ao mesmo tempo cumprir os desafios da era moderna, ou seja, combinar a segurança energética com os objetivos referentes à redução/mitigação das emissões de gases nocivos e com efeito de estufa e preservação da biodiversidade (Gielen e Unander, 2005; Fernando *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2006). O hidrogénio, produzido de fontes renováveis, como combustível é muito eficiente e limpa dado que não produz quaisquer gases que contribuam para o aquecimento global ou nocivo para o ambiente. Veziroglu e Sahin (2008) consideram até que o desenvolvimento deste combustível a partir de fontes renováveis (solar) tem o potencial de resultar num sistema energético permanente que jamais terá necessidade de ser mudado. Contudo, existem grandes barreiras ao desenvolvimento do combustível hidrogénio, isto é, toda a infra-estrutura associada está por ser desenvolvida e muitos desafios técnicos que incluem a produção, a armazenagem e os custos de produção, dificultam a sua efectiva implementação. Assim, a maneira mais realística de satisfazer a crescente procura por combustíveis para assegurar o crescimento e garantir a viabilidade económica e ambiental na era pós combustíveis fósseis é através do desenvolvimento dos biocombustíveis (Puppán, 2002; Fernando *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2006). Contudo, para ser uma alternativa viável os biocombustíveis devem garantir ganho energético, benefícios ambientais, competitividade económica e potencial de ser produzido em grandes quantidades sem ameaçar a produção de bens alimentares (Hill *et al.*, 2006). O termo biocombustível refere-se aos combustíveis líquidos, gasosos ou sólidos, produzido predominantemente a partir de fontes naturais, a biomassa (Demirbas, 2006). A biomassa pode ser convertida através de processos mecânicos, termoquímicos e biológicos originando várias formas de combustíveis, tais como etanol, metanol, biodiesel, metano, hidrogénio, etc. Assim, a biomassa é a mais promissora das fontes renováveis de energia na medida em que está disponível naturalmente, pode ser produzida em grandes quantidades e permite a produção de combustíveis líquidos, gasosos ou sólidos com potencial de abastecer vários sectores. Além disso e acima de tudo, é um recurso capaz de ser inteiramente renovável e ambiental, social e economicamente sustentável (Demirbas, 2008b). Desta forma, dadas as crescentes preocupações quanto ao futuro da oferta global de petróleo e a de outras opções de combustível disponíveis para os sectores dos transportes, agrícolas e industriais, os biocombustíveis representam a melhor das opções de uso da energia de biomassa. O recente interesse na energia da biomassa tem dado maior ênfase em aplicações que produzem combustíveis líquidos para o sector de transportes. Este sector é o que

consome a maior fatia da energia utilizada no mundo. Em 2006, este sector consumiu 51% do total dos combustíveis líquidos utilizados e as estimativas indicam que esta percentagem tende a aumentar (EIA, 2009). Contudo, os combustíveis líquidos desempenham também um papel fundamental nos sectores industriais e agrícolas, cruciais no desenvolvimento económico.

Dos vários biocombustíveis potencialmente disponíveis os mais considerados a nível global são os álcoois (principalmente bioetanol) e o biodiesel (Puppán, 2002; Mata *et al.*, 2009). Estes são conhecidos como biocombustíveis de primeira geração e já são uma realidade, estão presentes em praticamente todos os importantes mercados de combustíveis líquidos. São produzidos geralmente a partir de cultivares terrestres antes dedicados à produção de alimentos. O bioetanol é produzido principalmente a partir de cana-de-açúcar, do milho, da beterraba, da batata, do sorgo e do trigo enquanto o biodiesel é produzido principalmente via transesterificação de óleos vegetais, em especial, óleos de palma, de colza, de soja e de girassol. Outras opções correntes na produção do biodiesel têm sido o uso de óleos vegetais usados e de gordura animal. Actualmente, uma segunda geração de biocombustíveis encontra-se em desenvolvimento e esta difere da primeira geração na medida em que propõe outras fontes de matéria-prima para a produção dos principais biocombustíveis, ou seja, propõe a produção de biocombustíveis a partir de biomassa que não é tradicionalmente usada na alimentação humana ou animal. Esta segunda geração inclui, por um lado, o bioetanol produzido a partir da fermentação de toda a biomassa linho-celulósica constituída pelos subprodutos e resíduos agro-industriais, e por outro lado, outros biocombustíveis derivados da liquefacção ou da gaseificação de toda a espécie de biomassa ou matéria orgânica. Em geral, estes processos envolvem a produção de bio-óleo e de gás sintético, respectivamente, que podem então ser usados para alimentar turbinas de alta eficiência ou como matéria-prima para a produção de uma variedade de combustíveis, tais como biodiesel, biometano e biohidrogénio, e de vários produtos químicos sintéticos (EPEA, 2007; van der Laaka *et al.*, 2007; Hoekman, 2009).

## **2.5 – Etanol versus Biodiesel**

Tem-se emergido no meio científico um debate silencioso constantemente aceso acerca de qual será o combustível do futuro: etanol ou biodiesel? Quais são os reais benefícios de cada um? Estes dois são apontados como os mais prováveis substitutos para os combustíveis líquidos de origem fóssil. Ambos contribuem para diminuir a dependência

dos combustíveis tradicionais e também para redução das emissões nocivas. Até à data, o bioetanol é a maior, senão única, aposta como substituto da gasolina enquanto o biodiesel é apontado como o provável substituto do diesel convencional representando 82% de toda a produção de Biocombustíveis na Europa (Kim e Dale, 2005; Agarwal, 2007; Demirbas, 2007; Bozbas, 2008). O biodiesel contém 87% de energia por litro comparado como diesel enquanto o bioetanol possui apenas 67% comparado com a gasolina (Fulton *et al.*, 2004). O biodiesel, de acordo com um estudo de Hill e colaboradores (2006), consegue prover até 93% mais energia do que é requerida na sua produção enquanto o etanol rende apenas 25% mais energia que a requerida na sua produção, ou seja, os custos de produção são muito mais elevados para o etanol. Quanto às emissões de gases com efeito de estufa e em comparação com os combustíveis convencionais, o biodiesel consegue uma redução de 41% e o etanol uma redução de apenas 12%. O biodiesel produz ainda menos gases poluentes que o etanol por unidade de energia ganha. Sob a perspectiva da eficiência agrícola e eficiência no uso de terra arável o potencial de produção de etanol por unidade de terra cultivada é muito superior ao do biodiesel (Kim e Dale, 2005), principalmente se for considerado o potencial de utilização de toda a biomassa linho-celulósica que aparenta ser mais promissora, tanto em termos de minimização dos potenciais conflitos entre produção de bens alimentares e produção energética como também em termos de maximização dos benefícios ambientais. Apesar dos diferentes benefícios entre estes dois principais biocombustíveis, a maioria dos autores desta área de investigação considera que a corrida contra a dependência de combustíveis fósseis não será certamente vencida por uma simples alternativa. Esta batalha, de certo, requererá a combinação de todas as alternativas viáveis, nomeadamente, etanol, biodiesel, butanol ou qualquer outro que venha a ser desenvolvido.

## **2.6 – Biocombustíveis: benefícios e inconvenientes**

Biocombustíveis têm sido encarados como a forma “limpa” e sustentável de satisfazer as necessidades energéticas, em especial no sector dos transportes. A não toxicidade e biodegradabilidade são as principais características que os tornam como alternativa amiga do ambiente. Os seus benefícios se manifestam especialmente durante o seu uso final em que as emissões de gases poluentes são bastante baixas em relação aos combustíveis convencionais e, sobretudo, as emissões de CO<sub>2</sub> correspondem à quantidade sequestrada através da fotossíntese durante o crescimento da biomassa

resultando num ciclo fechado de carbono. Além dos benefícios ambientais relacionados com a redução dos gases poluentes que propiciam as alterações climáticas, estão também associados aos biocombustíveis outros benefícios tais como desenvolvimento da agricultura tradicional e melhoramento das condições económicas das populações do meio rural, diminuição da dependência em relação aos combustíveis fósseis e segurança energética. Todavia, às vantagens que caracterizam o uso dos biocombustíveis estão ligados sérios impactos ambientais associados à produção tais como consumo de grandes quantidades de água e de fertilizantes, desflorestação e degradação do solo, redução na produção de bens alimentares e, indirectamente, acentuação da pobreza (Puppán, 2002; Escobar *et al.*, 2009).

Embora os biocombustíveis pareçam ser a alternativa mais apropriada e o seu desenvolvimento pareça ser uma necessidade urgente existem muitas questões e controvérsias em relação à retórica “amigo do ambiente” (Henke *et al.*, 2005; Patzek *et al.*, 2005). Em primeiro lugar, não está claro se a energia utilizada na prática agrícola e em todo o processo de produção é superada pela energia do biocombustível final. Além dessa dúvida quanto ao real rendimento energético há que somar todos os outros impactos causados pela produção e aplicação de fertilizantes, pesticidas e herbicidas envolvidos na produção da biomassa. Segundo Patzek *et al.* (2005), estes constrangimentos anulam completamente ou quase por completo as vantagens associadas ao uso final dos biocombustíveis, especialmente para os biocombustíveis da primeira geração. Estes já mostraram que os custos de produção e os recursos requeridos os tornam pouco sustentáveis e quase tão poluentes quanto os combustíveis fósseis (Henke *et al.*, 2005).

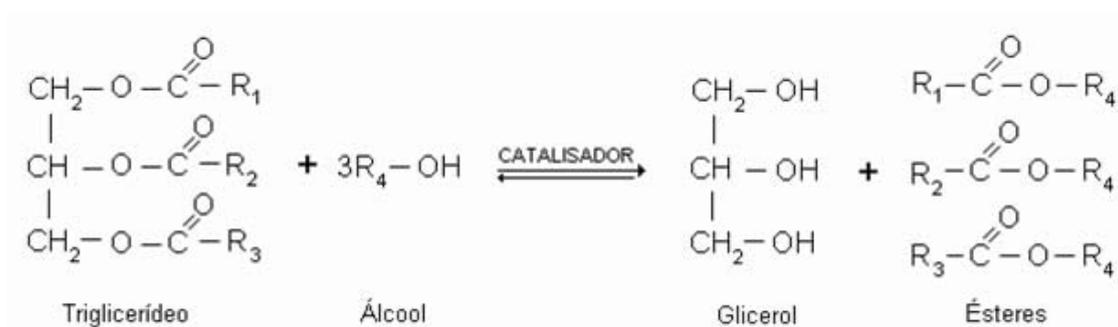
Apesar de alguns benefícios socioeconómicos apontados quanto ao uso dos biocombustíveis (Ryan *et al.*, 2006), o aumento da demanda contribui, em grande medida, para degradação ambiental e acentuação da miséria nos países em vias de desenvolvimento. Maior demanda implica maior necessidade de terreno agrícola para a produção de matéria-prima o que conduz, por um lado, à desflorestação, degradação do solo e erosão e à devastação da biodiversidade, por outro lado, ao agravamento da fome e da pobreza nos países em desenvolvimento, uma vez que, os terrenos aráveis antes dedicados ao cultivo de bens alimentares serão destinados à produção de matéria-prima para a produção de biocombustíveis para alimentar os mercados dos países desenvolvidos (Runge e Senauer, 2007).

## 2.7 – Biodiesel como alternativa ao diesel convencional

Com a escassez das reservas de combustíveis fósseis e o agravamento dos problemas ambientais, o biodiesel vem ganhando cada vez maior importância como uma alternativa atractiva capaz de substituir total ou parcialmente os combustíveis líquidos de origem fóssil, principalmente no sector dos transportes, e contribuir com vários benefícios ambientais e socioeconómicos. Todavia, a história de utilização de óleos vegetais não é nova. Em 1900, o inventor alemão Rudolph Diesel levou à exposição internacional de Paris um motor com novo sistema de funcionamento, chamado de “ciclo Diesel”. O motor era movido com óleo de amendoim e, nas primeiras décadas do séc. XX, foram utilizados óleos de várias outras espécies vegetais para seu funcionamento. Porém, o alto custo de produção de sementes desde aquela época foi uma dificuldade para utilização do motor Diesel. A abundância de petróleo no início do séc. XX e o baixo custo para refino de seu óleo fez com que os óleos vegetais fossem substituídos pelo óleo refinado de petróleo, que então foi chamado de “óleo diesel”. Nas décadas de 30 e 40 do séc. XX, óleos vegetais eram utilizados apenas em caso de emergência (Knothe *et al.*, 1997; Ma e Hanna, 1999; Demirbas, 2003).

Os óleos vegetais, também conhecidos por triglicéridos (98%) (ou triglicerídeos) embora contenham também pequenas percentagens de mono e diglicéridos, possuem a estrutura química representada na *Figura 5* e são constituídos por ésteres de ácidos gordos e glicerol. A estrutura química pode conter oxigénio e duplas ligações em várias proporções, características que diferenciam os vários tipos de óleos vegetais (Balat, 2007). Constatou-se, porém, que a aplicação directa dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, sua baixa volatilidade e seu carácter poliinsaturado, que implicam alguns problemas nos motores, bem como uma combustão incompleta (Knothe *et al.*, 1997; Demirbas, 2003, 2005). Assim, visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reacção de transesterificação com etanol ou metanol. Entre essas alternativas, a transesterificação (*Figura 5*) tem-se apresentado como a melhor opção visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível, denominado biodiesel, cujas propriedades são similares às do diesel convencional (Balat e Balat 2008, Basha *et al.*, 2009). A produção do biodiesel a partir da conversão de diversos tipos de óleos através desse processo de

transesterificação tem sido largamente explorada por um grande número autores, conforme revisto por Basha e colaboradores (2009), sendo que a maioria dos estudos visaram o incremento da eficiência da conversão e da qualidade do biodiesel derivado. O processo de transesterificação (*Figura 5*) em si mantém-se como o mais amplamente utilizado na produção desse biocombustível dado as suas vantagens e envolve a reacção do óleo vegetal com um álcool, usualmente o álcool metílico ou o etílico, utilizando um catalisador que geralmente é a soda cáustica. O produto dessa reacção é um éster, o biodiesel, e o seu principal subproduto é a glicerina ou glicerol. De um modo geral, biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado mono-álquil éster de ácidos gordos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (Knothe *et al.*, 1997). Segundo as normas ambientais internacionais, pode ser utilizado como combustível e como aditivo para combustíveis, isto é, pode ser usado puro a 100% (B100), em mistura com o diesel convencional (B20), ou numa proporção baixa como aditivo de 1 a 5% (Shahid e Jamal, 2008; Balat e Balat 2008).



**Figura 5:** Esquema representativo da reacção de transesterificação onde R1, R2 e R3 representam as cadeias dos ácidos gordos (adaptado de Ferrari *et al.*, 2005).

Sendo biodiesel possuidor de carácter não tóxico, biodegradável e proveniente de fontes renováveis, a sua grande vantagem prende-se com o facto de a sua utilização eliminar ou atenuar várias formas de agressão ao meio ambiente, que são inevitáveis com o uso de combustíveis convencionais. Em primeiro lugar, evita-se utilizar um combustível fóssil, com reservas limitadas. Em segundo lugar, reduz-se a emissão de diversas substâncias prejudiciais, normalmente encontradas nas emissões, como dióxido de carbono, o monóxido de carbono, hidrocarbonetos diversos, óxidos de enxofre e fuligem. Os inconvenientes do biodiesel em relação aos combustíveis convencionais são

a sua maior viscosidade, menor conteúdo energético, alto ponto de inflamação, combustão mais pobre e, conseqüentemente, menores força e velocidade, e o aumento das emissões de NO<sub>x</sub>. Como desvantagens operacionais em motores diesel pode-se citar o problema de arranque a baixas temperaturas, os problemas de injeção devido à viscosidade, e o fraco conteúdo energético que levam a um aumento do consumo em relação ao diesel convencional (Demirbas, 2007; Basha *et al.*, 2009).

De acordo com revisões efectuadas por Demirbas (2006, 2007 e 2009), os estudos da sustentabilidade económica do biodiesel indicam que os principais factores a ter em consideração são os custos de capital associados a cada espécie utilizada, a capacidade operacional de produção, o processo tecnológico requerido e os custos da matéria-prima. Contudo, o mais importante destes factores a considerar é o custo da produção da matéria-prima que ocupa 75 – 80% dos custos operacionais. Os custos de produção do biodiesel derivado do óleo de palma, que é a espécie com o maior rendimento, e do óleo de soja, que é a espécie mais cultivada actualmente para esse fim, são cerca de 1,5 a 3 vezes mais elevados quando comparado com o custo de produção do diesel convencional (Demirbas, 2007), facto que faz com que o preço ao consumidor tenda a ser mais elevado e seja produzida em menor quantidade relativamente a outros renováveis como o etanol.

Recentemente, tem-se verificado uma acentuada taxa de aumento na indústria do biodiesel o que se deve não só ao desenvolvimento de novas espécies de oleaginosas mas também ao aumento das explorações o que se espera vir a reflectir no preço da matéria-prima. Contudo, a sustentabilidade desta indústria tem dependido muito de subsídios ao sector agrícola e dos incentivos fiscais (Henke *et al.*, 2005; European Commission, 2007). A sustentabilidade e a competitividade desta indústria só se conseguem quando o preço de venda do biodiesel cobrir todos os custos de produção e de distribuição sem ultrapassar o preço de venda do diesel convencional ao consumidor final. Nas condições actuais, considera-se que o biodiesel não é competitivo e só o será com fontes de matéria-prima cada vez menos dispendiosas e uma tecnologia de conversão que permita a utilização mais eficaz da biomassa. O maior passo neste sentido envolve o desenvolvimento e a diversificação fontes de matéria-prima capazes de serem produzidas em vasta quantidade a baixo custo e de contornar o problema da sazonalidade (Eriksen, 2008).

## 2.8 – Microalgas como matéria-prima para o biodiesel

A indústria do biodiesel é um dos sectores com uma das mais rápidas taxas de expansão a nível global mas que se depara actualmente com um grande dilema: fonte de matéria-prima capaz de satisfazer a crescente demanda e capaz de ser social, ambiental e economicamente sustentável (Henke *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2008). Ao contrário de todas as fontes de matéria-prima usadas até hoje na produção do biodiesel, as algas são largamente encaradas como a forma mais eficiente de geração desse biocombustível e parecem representar a única fonte verdadeiramente renovável com o potencial de satisfazer a demanda global por combustíveis líquidos sem comprometer a produção de bens alimentares (Schenk *et al.*, 2008, Chisti, 2007, 2008, Dismukes *et al.*, 2008). As algas constituem um grupo muito diverso de organismos fotossintéticos em geral presentes em quase todos os meios aquáticos, doce ou salino. Sob essa designação, embora sem valor taxonómico, estão incluídas as macroalgas e as microalgas. Macroalgas são organismos eucarióticos, multicelulares e macroscópicos que podem atingir dimensões desde poucos milímetros até mais de 60 metros de comprimento em certas espécies. As microalgas, pelo contrário, são organismos microscópicos, unicelulares ou coloniais, que podem ser procarióticos ou eucarióticos (Hoek *et al.* 1995; McHugh, 2003). Comparativamente às plantas terrestres, as algas, em especial as microalgas, apresentam muitas vantagens que se devem a vários aspectos fisiológicos e bioquímicos: eficiência de conversão fotossintética da luz solar (~10%) cerca de 6 a 12 vezes superior que garante maiores rendimentos em termos de produtividade (Falkowski e Raven 1997; Zhu *et al.*, 2008; Packer, 2009); ausência de estrutura de suporte constituída por polímeros como a lenhina o que elimina a necessidade de pré-tratamento ácido, reduz os custos industriais e aumenta a eficiência de conversão da biomassa em biocombustíveis (Lynd *et al.*, 2008); enorme diversidade ecológica, específica, morfológica, genética e metabólica o que permite a selecção de espécimen mais adequados a determinadas condições, locais de cultivo e sistemas de colheita (Dismukes *et al.*, 2008); possibilidade de suas vias biossintéticas serem manipuladas e direccionadas, através da alteração das condições de cultivo e stress ambientais, para a produção e acumulação substancial dos compostos desejáveis para a produção de biocombustíveis (Hu *et al.*, 2008). Ademais, a possibilidade de cultivo da biomassa de algas em ambientes marinhos, costeiros e terrenos desertos não aráveis elimina a competição por áreas correntemente utilizadas para a agricultura e produção de bens alimentares (Patil *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2008).

Não é nova a ideia do cultivo de algas e aproveitamento da biomassa para a produção de biocombustíveis. Uma das primeiras sugestões a esse respeito é encontrada no trabalho de Meier de 1955. No decurso das décadas seguintes do séc. XX inúmeros trabalhos foram levados a cabo no sentido de explorar o potencial e a viabilidade económica do uso da biomassa de algas para a geração de biocombustíveis sendo a maioria desses trabalhos focados na possibilidade de utilização do CO<sub>2</sub> derivados da utilização de combustíveis fósseis para potenciar o crescimento das algas (Packer, 2009). Neste sentido, uma das primeiras culturas de microalgas a larga escala foi realizada no Japão no início da década de 1960 com o género *Chlorella* (Spolaore *et al.*, 2006). Todavia a mais extensa pesquisa foi levada a cabo pela “Aquatic Species Program” (ASP) da “National Renewable Energy Laboratory” (NREL) dos Estados Unidos de América que durou de 1978 a 1996 e colecionou mais de 3000 espécies de microalgas das quais cerca de 300 foram consideradas como potencial fonte de matéria-prima para a produção do biodiesel. Todavia a ASP concluiu no final da sua actuação que o custo de produção torna a ideia de biodiesel a partir da biomassa de microalgas proibitiva a menos que se desenvolva toda a tecnologia associada e se adapte o cultivo de algas integrado ao tratamento de águas residuais ricas em nutrientes tais como nitratos e fosfatos (Sheehan *et al.*, 1998b).

<b>Matéria-prima</b>	<b>Rendimento em óleo (litros/hectare)</b>
Milho	172
Soja	446
Canola	1190
Jatropha	1892
Coco	2689
Palma	5950
Microalgas (70% óleo na biomassa seca)	136900
Microalgas (30% óleo na biomassa seca)	58700

Tabela I: Produtividades de algumas fontes de biodiesel (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009).

As algas microscópicas, microalgas, têm sido apontadas como a mais promissora fonte de biomassa para a produção de biodiesel por serem os mais eficientes organismos fotossintéticos no planeta permitindo produtividades em óleo muito superiores às outras espécies terrestres utilizadas na produção desse biocombustível (Tabela I). A superioridade desses microrganismos em relação às outras fontes de biomassa deve-se à sua natureza unicelular, estrutura simples e ao seu cultivo em meio líquido que permite melhor acesso aos nutrientes (Patil *et al.*, 2008). De facto, muitas pesquisas recentes mostram o forte potencial das microalgas como fonte de biomassa para a produção de

biodiesel. Do ponto de vista prático, as microalgas são relativamente fáceis de cultivar, necessitando de pouca atenção e podendo ser cultivadas em águas residuais impróprias para o consumo humano donde extraem os nutrientes, tais como nitratos e fosfatos, necessários ao crescimento contribuindo para o tratamento dessas águas e minimização da eutrofização (Mata *et al.*, 2009). Para além de poderem crescer em quase qualquer sítio, as microalgas crescem extremamente rápido duplicando habitualmente a biomassa em cerca de 24 horas e em algumas espécies, durante a fase exponencial, a duplicação ocorre em cerca de três horas e meia (Chisti, 2007). A sua alta taxa de crescimento permite uma produtividade estimada 50 vezes maior que a das gramíneas do género *Panicum* que são as plantas terrestres com a maior taxa de crescimento (Demirbas, 2009). Segundo Chisti (2007), com base no conteúdo lipídico (Tabela II) de algumas espécies, as microalgas podem produzir 100 vezes mais óleo que a soja por unidade de terra cultivada.

Microalga	Oil content (% dry wt)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Tabela II: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas (Chisti, 2007).

As microalgas, além do potencial de fornecer substrato para diferentes tipos de combustíveis renováveis, tais como biodiesel, bioetanol, biometano, biohidrogénio, entre outros, podem ao mesmo tempo servir outros propósitos, nomeadamente, a biofixação de CO<sub>2</sub> derivado do funcionamento de instalações industriais contribuindo para a redução das emissões de gases com efeito de estufa, tratamento de águas residuais através da remoção de contaminantes como amónia, nitratos e fosfatos, aproveitamento da biomassa residual para alimentação animal, como fertilizantes orgânicos, na geração de electricidade através da incineração (Wang *et al.*, 2008) ou para a recuperação de

compostos com valor comercial tais como pigmentos, antioxidantes, polissacáridos e certos compostos bioactivos com aplicações nas áreas farmacêutica, nutracêutica e cosmética (Raja *et al.*, 2008).

## 2.9 – Produção de biomassa de microalgas

A produção de biodiesel capaz de suprir a demanda requer grande quantidade de óleo o que por sua vez requer a habilidade de produzir a baixo custo grande quantidade de biomassa. A chave para a produção sustentável de biodiesel a partir de biomassa de microalgas depende de diversos factores que se resumem em três grandes grupos: o cultivo, a colheita e o processamento da biomassa. A produtividade em óleo, que é a massa do óleo produzido por unidade de volume de microalgas por dia, depende da taxa de crescimento e do conteúdo lipídico, pelo que, para a produção de biodiesel, é imprescindível a pesquisa, selecção e optimização de espécies de microalgas com elevada produtividade. O cultivo e produção da biomassa de microalgas requerem luz, dióxido de carbono, água, sais inorgânicos e temperatura entre os 20 e 30°C para a maioria das espécies (Chisti, 2007; Patil *et al.*, 2008). Até a data, os sistemas de cultivo de microalgas praticáveis a larga escala são os “*raceways*” ou lagoas a céu aberto e os fotobiorreactores tubulares fechados embora exista uma série de outros sistemas, conforme revisto por Eriksen (2008), que já foram desenvolvidos, testados e optimizados à escala laboratorial e piloto. Os sistemas (*raceways*) a céu aberto desde 1950 que têm vindo a ser utilizados e são, actualmente, os mais utilizados na produção comercial de microalgas o que se deve ao seu baixo custo de construção e operação em relação aos fotobiorreactores. Todavia, esses sistemas apresentam alguns inconvenientes, tais como, evaporação acentuada, flutuação das condições de cultivo (temperatura, iluminação, salinidade, pH, etc.) com a variação das condições ambientais, baixa eficiência no uso de CO<sub>2</sub>, grande possibilidade de contaminação por microrganismos indesejáveis e agitação deficiente, o que faz com que a produtividade seja muito inferior em relação aos sistemas fechados. Nos fotobiorreactores fechados, ao contrário dos “*raceways*”, é possível controlar as condições de cultivo requeridas por uma variabilidade de espécies, manter uma cultura mono-específica sem contaminações, ajustar, consoante o objectivo, os factores que potenciam o crescimento e acumulação de bioprodutos, o que permite uma maior produtividade em biomassa e uma maior concentração volumétrica. Apesar desta vantagem, os elevados custos de construção, operação e manutenção têm constituído grandes limitações à aplicação destes sistemas a

cultivos em larga escala, sendo utilizado apenas no cultivo de espécies com elevado valor comercial, em geral, destinados aos mercados farmacêutico, nutracêutico e cosmético (Eriksen, 2008; Schenk *et al.*, 2008).

## **2.10 – Colheita, processamento e conversão da biomassa em biocombustível**

A colheita da biomassa do meio de cultura é uma das etapas mais dispendiosas de todo o processo de produção de microalgas e envolve um custo que pode rondar os 20 a 30% de todo o custo produção (Molina Grima *et al.*, 2003). Contudo, o custo de colheita nos fotobiorreatores é apenas uma fracção desse mesmo custo nos “*raceways*” dado que a concentração da biomassa é cerca de 30 vezes superior nos fotobiorreatores (Packer, 2009). Vários métodos de colheita são praticados, conforme revisto por Molina Grima e colaboradores (2003), mas a centrifugação, a filtração e a floculação são os mais aplicados a grande escala embora apresentem algumas limitações e nem sempre sejam os menos dispendiosos. Qualquer que seja a técnica de colheita requer uma elevada relação custo/eficiência na desidratação da biomassa de microalgas que é essencialmente constituída por água. Neste sentido a floculação espontânea ou biofloculação, presente em algumas espécies de microalgas, é a melhor das alternativas e pode ser potenciada com o ajuste do pH (Schenk *et al.*, 2008, Packer, 2009). O processamento subsequente da biomassa de microalgas envolve vários métodos e a produção de diversos biocombustíveis, todavia, o biodiesel, o bioetanol, o biometano e o biohidrogénio são as principais opções considerados pela mais vasta pesquisa do ramo conduzida pela “Aquatic Species Program” (ASP) (Sheehan *et al.*, 1998b). Os métodos de processamento e conversão da biomassa de microalgas, em geral, são bioquímicos e termoquímicos. A conversão bioquímica abarca tanto a fermentação, a digestão anaeróbia e outros processos envolvendo microrganismos como também a transesterificação do óleo obtido através de vários processos de extracção. A conversão termoquímica compreende a gaseificação, a liquefacção, a pirólise e a hidrogenação (Goyal *et al.*, 2008; Amin, 2009; Saxena *et al.*, 2009).

A produção do biodiesel através da transesterificação implica a extracção do óleo da biomassa de microalgas o que é feito através de vários processos, tais como, prensagem mecânica, extracção por solventes, extracção por choque osmótico, extracção por ultrassom, extracção supercrítica com CO<sub>2</sub>, entre outros. Todos estes métodos requerem o

pré-tratamento de desidratação que a nível laboratorial tem sido tradicionalmente a liofilização que é, porém, um processo moroso e muito dispendioso. Contudo, não existe um método completamente estabelecido como o mais eficaz para as microalgas e esta etapa de extracção, devido ao seu custo, pode determinar a sustentabilidade económica de todo processo. (Amin, 2009; Lee *et al.*, 2009). Para a produção de biodiesel, os ensaios de extracção de lípidos têm sido, em geral, efectuados com solventes orgânicos por serem relativamente rápidos e eficazes. Vários solventes tem sido utilizados, em especial hexano, etanol, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas, permitindo eficiências de extracção superiores a 96%. De entre todos os solventes usados, o hexano por ser menos dispendioso, selectivo e biocompatível tem sido o solvente de eleição nas aplicações a grande escala (Mata *et al.*, 2009).

No sentido de eliminar as etapas dispendiosas no processo de conversão da biomassa de microalgas em biocombustíveis e obter um combustível competitivo em relação aos combustíveis fósseis tem-se desenvolvido e testado vários processos de conversão termoquímicos em que não seja necessária a desidratação completa da biomassa. Todavia, esses processos, que incluem a gaseificação, a liquefacção, a pirólise e a hidrogenação da biomassa de microalgas, encontram-se em desenvolvimento e necessitam de maiores avanços tecnológicos no sentido de conseguir um rendimento energético positivo e sustentabilidade económica (Amin, 2009).

### **2.11 – *Botryococcus braunii***

*Botryococcus braunii* é uma espécie de microalgas verdes (Chlorophyceae) que cresce formando colónias irregulares, com 30 a 500µm, constituídas por células elípticas embebidas numa matriz mucilaginosa. No ambiente natural e em águas paradas esta espécie forma colónias flutuantes, devido à acumulação de óleos, apresentando coloração verde, laranja, vermelha ou castanha. Tem uma vasta distribuição em corpos de água continentais e lagos de água doce ou salobra em zonas temperadas, alpinas e tropicais (Wolf, 1983; Li e Qin, 2005; Metzger e Largeau, 2005). Esta espécie apresenta o potencial de sintetizar e armazenar um elevado conteúdo em hidrocarbonetos que pode ultrapassar 80% da sua biomassa seca (Metzger *et al.*, 1985; Sawayama *et al.*, 1994). Devido a esta notável habilidade para produzir hidrocarbonetos, esta espécie tem sido investigada sob diversas condições e tem sido considerada, com base em vários estudos, como uma potencial fonte renovável de combustíveis para o futuro (Casadevall *et al.*, 1985; Metzger e Largeau, 2005; Dayananda *et al.*, 2005, 2007). Dependendo do

tipo de hidrocarbonetos sintetizado, esta espécie pode ser classificada em três raças diferentes: a raça A produz hidrocarbonetos  $C_{23}$  a  $C_{33}$  que podem constituir até 61% da biomassa seca das colônias; a raça L produz apenas hidrocarbonetos tetraterpenoides ( $C_{40}$ ) podendo estes constituir de 2 a 8% da biomassa seca; e a raça B produz hidrocarbonetos polinsaturados ramificados,  $C_{30}$  a  $C_{37}$ , designados correntemente por Botryococenos. Estes últimos compostos são considerados promissores como fontes renováveis de energia dado que são acumulados de 26 a 86% da biomassa seca. Curioso é que para todas as raças foi demonstrada que a produção óptima de hidrocarbonetos acontece durante a fase exponencial pelo que a produção desses compostos parece ser a característica normal da espécie *B. braunii* (Metzger *et al.*, 1985; Metzger e Largeau, 2005; Dayananda *et al.*, 2007). Além dos hidrocarbonetos, *B. braunii* é também conhecido por produzir exopolissacáridos, superior a  $250 \text{ g/m}^3$  nas raças A e B e superior a  $1 \text{ kg/m}^3$  na raça L (Banerjee *et al.*, 2002).

Muitas estirpes de *B. braunii* crescem numa larga variedade de condições e a produção de lípidos varia não só entre as estirpes mas também de acordo com as condições ambientais ou de cultivo (Pal *et al.*, 1998). Os mais importantes factores que influenciam o crescimento e a produção lipídica são a temperatura, a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a salinidade e a concentração de nutrientes como nitratos e fosfatos (Qin, 2005; Li e Qin, 2005; Rao *et al.*, 2007a e b). Nos estudos experimentais clássicos, várias modificações do meio de cultura CHU 13 foram usados a fim de determinar o comportamento de *B. braunii* quanto à produção de hidrocarbonetos e exopolissacáridos (Brown *et al.*, 1969; Casadevall *et al.*, 1985). Todavia, nos dias que correm em que se quer um uso bem sucedido da espécie, a larga escala, como fonte alternativa de energia é imprescindível incrementar alguns parâmetros como a taxa de crescimento em termos de biomassa, a produtividade em termos de hidrocarbonetos e a eficiência do biocombustível resultante. Assim, vários meios e condições de cultura e diversas combinações de factores ambientais têm sido estudados no sentido de determinar as condições óptimas para o cultivo de *B. braunii* e produção de hidrocarbonetos visando a obtenção de biodiesel (Qin, 2005; Li e Qin, 2005; Rao *et al.*, 2007a e b; Dayananda *et al.*, 2005, 2007).

## 3 – Materiais e Métodos

### 3.1 – Espécie/estirpe

Duas estirpes da espécie *Botryococcus braunii* Kützing (Chlorophyta; Chlorophyceae; Botryococcaceae) foram utilizadas neste trabalho. Os inóculos iniciais foram adquiridos à Algoteca do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra (ACOI - Coimbra Collection of Algae - <http://acoi.ci.uc.pt>), sob as designações ACOI 58, oriunda do Porto da Castanheira, Poço dos Basílios, colhida em 1975, e ACOI 1257, colhida em 1997 na barragem da erva da fome, na Serra de Estrela. As estirpes ACOI 58 e ACOI 1257 foram integradas na colecção de microalgas da Algoteca do Instituto de Oceanografia (IO) da FCUL (ALISU) e apelidadas de IO 98-01 e IO 98-02, respectivamente. Doravante neste trabalho será utilizada esta nova designação para identificar cada uma das estirpes, ou simplesmente estirpe 01 e estirpe 02 respectivamente.

### 3.2 – Preparação do inóculo

Culturas das duas estirpes foram mantidas numa câmara de culturas Fitoclima 750 E (Aralab) na Algoteca do IO, em meio artificial BBM (ver Anexo), em erlenmeyers de 100 ml de volume contendo 50 ml de cultura, e foram repicadas mensalmente. Cerca de um terço de cada uma das culturas foi usada para repicar e os volumes restantes foram utilizados para criar culturas inóculo. Assim, foram transferidas para a sala de culturas do Departamento de Biologia Vegetal da FCUL Edif. C2-Piso 1, doravante referida como DBV-FCUL onde foram aclimatadas às condições da cultura experimental. A expansão do inóculo efectuou-se duplicando o volume das culturas a cada 15 dias através da repartição por novos erlenmeyers e adição de meio de cultura BBM. Estas culturas inóculo foram mantidas a uma temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$  e luminosidade constante de 100 a  $110 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , medida com um radiómetro LI-250A equipado com um sensor Li-192S (Li-Cor Biosciences).

### 3.3 – Condições de cultura

Para todos os cultivos experimentais realizados no decurso deste trabalho foram usadas mangas de polietileno transparente com diâmetro de 12,5 cm, contendo 2 litros do meio de cultura. Foi construída na sala de culturas do DBV-FCUL uma estrutura de madeira em que as mangas, contendo as culturas, eram penduradas numa orientação que favorecia a exposição às fontes luminosas. A temperatura na sala de cultivo foi mantida

constante a  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$  e a iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes (Philips TLD 36W/35-535 SLV) com um fotoperíodo de 14/10, luz/escuridão. A intensidade luminosa também foi, ao longo de cada fase de cultivo, mantida constante. O arejamento das mangas foi efectuado utilizando bombas de aquário fornecendo 1,5 l/min através de tubos de polietileno. Foram utilizados dois meios artificiais, BBM e CHU, e água residual pré-tratada (ETAR) (ver Anexo). Todas as culturas foram mantidas uni-algais através do uso de materiais e meios de cultura esterilizados. Os meios de cultura foram autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 bar por 20 minutos (pbi-international). As mangas de polietileno foram sujeitas a radiação UV durante 20 minutos antes de serem usadas numa câmara de fluxo laminar (ESI, FluFrance). Todos os materiais de vidro utilizados nas pré-culturas foram esterilizados com calor seco a  $180^{\circ}\text{C}$  em estufa (Selecta, modelo 209) durante uma hora. Todas as inoculações e preparação das mangas com as culturas foram realizadas numa câmara de fluxo laminar (ESI, FluFrance).

### **3.4 – Determinação do crescimento**

#### **3.4.1 – Método do peso seco**

Foi retirada de cada cultura experimental uma alíquotas de 15 ml, de quatro em quatro dias, aproximadamente no mesmo horário. De cada alíquota, uma sub-amostra de 10 ml foi filtrada a vácuo (usando o kitassato, funil de Buchner e trompa de água) através de filtros de microfibras de vidro (Fisher, 47 mm, poros  $1.2\ \mu\text{m}$ ) previamente secos em estufa ( $80^{\circ}$  por 16 horas) e pesados (Shen *et al.*, 2009). Após a filtração, os filtros foram de novo secos em estufa ( $80^{\circ}$  por 16 horas) e depois mantidos no excicador sob vácuo até peso constante. O peso seco da biomassa foi obtido subtraindo ao peso final o peso do filtro.

#### **3.4.2 – Método espectrofotométrico**

O crescimento foi também estudado pelo método espectrofotométrico através da absorvância a  $680\ \text{nm}$  dado ser relatado por vários autores existir uma correlação directa entre a densidade óptica e o peso seco, a partir de determinados valores (Sim *et al.*, 2001; An *et al.*, 2003). Foi medida a absorvância das culturas a partir de 1 ml da suspensão de algas usando o meio de cultura como branco num espectrofotômetro UV/visível (UV-1603, Shimadzu).

### **3.5 – Planeamento experimental**

No decorrer do período de trabalhos laboratoriais foram efectuados três conjuntos de experiências como a seguir se descreve.

#### **3.5.1 – Comparação do crescimento e produtividade em biomassa em diferentes meios de cultura**

Realizaram-se três culturas, estirpe IO 98-01 em meio BBM e CHU e estirpe IO 98-02 em meio CHU. Pretendia-se também comparar os métodos do peso seco e espectrofotométrico para determinação do crescimento (ver 3.4). Estas primeiras culturas, que tiveram início a 20 de Fevereiro de 2009, foram realizadas na sala de culturas do DBV-FCUL, mantidas a uma temperatura constante de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ , uma intensidade luminosa de  $110\text{-}120 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ , medida com um radiómetro LI-250A equipado com um sensor Li-192S (Li-Cor Biosciences), e um fotoperíodo de 14/10 luz/escuridão, durante 50 dias, sendo as amostragens realizadas de 4 em 4 dias. No final do período de cultivo toda a biomassa foi colhida por centrifugação a 8000 rpm,  $16^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos (Rotina 35R, Hettich) e congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para tratamento posterior (ver 3.7).

#### **3.5.2 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico (hidrocarbonetos) em culturas “indoors”**

Nesta segunda fase de culturas, que teve início a 23 de Abril de 2009, além dos dois meios de cultura artificiais já utilizados, foi também utilizada água residual pré-tratada cedida pela ETAR de Chelas em Lisboa (SIMTEJO, S.A.), daqui em diante designada por ETAR (ver Anexo). Com o uso da água de ETAR pretendia-se estudar o crescimento em biomassa e a acumulação de lípidos como forma de testar a possibilidade do uso dessas águas residuais, com menores custos adicionais, no cultivo das microalgas. Foram feitas 6 culturas das duas estirpes nos meios mencionados, conforme a Tabela III. As condições de cultura foram idênticas às da experiência anterior (ver 3.5.1) com excepção da iluminação que foi na ordem dos  $220 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Foi usada a mesma periodicidade de amostragem, de 4 em 4 dias, e no final dos 50 dias de cultivo toda a biomassa foi colhida por centrifugação a 8000 rpm,  $16^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos (Rotina 35R, Hettich) e congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores (ver 3.7).

Id.	Estirpe	Meio de cultura
1	IO 98-01	CHU
2	IO 98-01	BBM
3	IO 98-01	ETAR
4	IO 98-02	CHU
5	IO 98-02	BBM
6	IO 98-02	ETAR

Tabela III: Desenho experimental seguido nas experiências para determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico “indoors” e “outdoors”

### 3.5.3 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa em culturas

#### “outdoors”

Nesta última fase de culturas, iniciada a 16 de Julho de 2009, usaram-se os mesmos meios de cultura da experiência anterior (ver 3.5.2), na mesma disposição descrita na Tabela III, mas as culturas experimentais foram realizadas no exterior, à luz natural do sol e sem controlo dos factores ambientais. As culturas foram realizadas nas mangas de polietileno já descritas, desta vez suspensas numa estrutura metálica de andaime, adquirida no comércio, conforme se pode ver na Figura 14. A estrutura de suporte das culturas foi disposta numa orientação nascente-poente de modo a permitir a exposição máxima à luz solar das mangas de cultura. As amostragens efectuaram-se de forma similar às outras fases de cultura.

#### 3.5.4 – Análise de nutrientes

Para a quantificação dos nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) as amostras foram filtradas através de filtros de fibra de vidro (Fisher) e de seguida congeladas até as análises que foram realizadas usando um Tecator FIAstar 5020 Analyser equipado com um espectrofotómetro Hitachi U-3200. As concentrações de nitratos e nitritos foram determinadas de acordo com o método de Grasshoff (1976) e o método de Bendschneider e Robison (1952) respectivamente. A quantificação dos fosfatos foi pelo método de Murphy e Riley (1962). A determinação da concentração da amónia foi realizada com amostras filtradas de acordo com o método de Koroleff (1969) usando um espectrofotómetro UV/visível (UV-1603, Shimadzu). Estes testes foram realizados a amostras das culturas em água residuais (ETAR) no início e no fim das culturas com o intuito de analisar a capacidade das duas estirpes de microalgas de remover nutrientes.

### 3.6 – Determinação do conteúdo lipídico das culturas

A determinação da variação do conteúdo lipídico ao longo do período de cultivo experimental das microalgas foi realizada pelo método do vermelho do Nilo (Lee *et al.*,

1998). Para tal, foram retiradas alíquotas de 10 ml de cada cultura, quantidade suficiente para três replicados de 3 ml. A cada replicado foram adicionados 50 µl da solução do corante/fluoróforo vermelho do Nilo em acetona (0,25 µg/ml) (Carman *et al.*, 1991, Elsey *et al.*, 2007). A mistura foi vigorosamente agitada num vortex (Reax 2000, Heidolph) e incubada no escuro. A leitura dos valores de fluorescência foi efectuada cerca de 10 a 15 minutos após a adição do fluoróforo, num leitor de microplacas (SpectraMax Gemini EM Fluorescence Microplate reader, Molecular Device) com os comprimentos de onda de excitação a 490 nm e de emissão a 585 nm. Os valores relativos de fluorescência foram obtidos depois da subtracção das autofluorescências da suspensão de algas e da solução do vermelho do Nilo no meio de cultura.

### **3.7 – Extracção de lípidos totais**

No final das culturas experimentais, a biomassa total de microalgas foi colhida através de centrifugação (Rotina 35R, Hettich) durante 10 minutos, a 8000 rpm e 16°C sendo de seguida congelada a -80°C e liofilizada (Cryodos, Telstar) durante 48h. A fracção lipídica foi obtida por extracção de cada amostra com solventes orgânicos utilizando uma adaptação do método de Bligh e Dyer (1959). Cada amostra foi triturada num almofariz e depois pesada (Mettler AE 160) e transferida para um tubo de centrifuga (Falcon) de 50 ml ao qual foi adicionado, por cada grama de amostra introduzida, 5 ml de clorofórmio e 10 ml de metanol. A mistura foi sujeita a ultra-sons por 10 minutos, de seguida foram adicionados mais 5 ml de clorofórmio e 9 ml de água destilada, seguindo-se ultra-sons por mais 5 minutos. Após serem deixadas a extrair por duas horas as amostras foram agitadas no vortex por 30 segundos e centrifugadas durante 10 minutos, a 5000 rpm e 16°C para separação de fases (orgânica inferior, aquosa superior). A fase orgânica foi cuidadosamente recolhida para um balão de vidro de fundo redondo, previamente seco e tarado, e repetiu-se então o processo de extracção com a adição à amostra de mais 10 ml de clorofórmio. A fracção lipídica recolhida na fase orgânica para o balão foi seca num evaporador rotativo (Yamato Hi Tec RE-51, Water Bath BM-51) para eliminar o solvente e depois pesada. De seguida, cada amostra, i.e., cada um dos extractos secos, foi novamente dissolvida em 3 ml de hexano, transferida para frascos de vidro (*GC vial*) e armazenada no frigorífico até à análise.

### 3.8 – Análise da fracção lipídica

Para determinação dos ácidos gordos presentes nos extractos obtidos em 3.7 foram utilizados os procedimentos descritos por Nyberg (1986) e Indarti *et al.* (2005) com ligeiras adaptações, no laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal do DBV-FCUL. Sumariamente, em tubos de vidro foram introduzidos 3 ml de cada um dos extractos e 5 ml de uma solução de metanol/benzeno/ácido sulfúrico (20/1/1). A mistura foi aquecida a 80°C por duas horas num banho-maria (UNIVEBA, Selecta) para o processo de metanólise. Após o arrefecimento foram adicionados 5 ml de água destilada a cada um dos tubos e a mistura foi vigorosamente agitada no vortex. Os metil-ésteres resultantes da reacção de metanólise foram extraídos 3 vezes com 1 ml de hexano e, após concentração sob fluxo de azoto, submetidos à cromatografia em coluna de sílica sendo os ácidos gordos esterificados eluídos com 5 ml de pentano. A amostra foi concentrada sob um fluxo de azoto para a evaporação do solvente e armazenada para a análise. As análises para a identificação dos ácidos gordos presentes no extracto foram realizadas por cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGL) e cromatografia gás-líquido de alta resolução associada à espectrometria de massa (CGL/EM). As análises de CGL foram realizadas num cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL equipado com dois detectores de ionização de chama, um sistema de tratamento de dados e um injector no qual foram instaladas duas colunas capilares de polaridade diferente: uma coluna DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25µm J & W Scientific Inc.) e a outra DB-17HT de sílica fundida (30m x0,25mm d.i., espessura de filme 0,15µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 50°C a 300°C, com incrementos de 5°C.min<sup>-1</sup>. Atingidos os 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 minutos. Temperatura do injector e dos detectores, 290°C e 300°C, respectivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm.s<sup>-1</sup>. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual dos compostos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Nas análises de CGL/EM utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada como para as análises de CGL; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm.s<sup>-1</sup>; relação de

repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60  $\mu\text{A}$ ; gama de massas, 40-600 u; tempo de varrimento, 1 s. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção e dos seus espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em amostras existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

## 4. – Resultados

### 4.1 – Características da biomassa de *Botryococcus braunii*

Do ponto de vista macroscópico a principal alteração visível nas culturas realizadas é a mudança de coloração. As culturas da primeira e da segunda fase realizadas *indoors* foram gradualmente adquirindo uma coloração verde intensa passando para uma tonalidade verde acastanhada no final das culturas. Quanto às culturas da terceira fase, realizadas *outdoors*, foi muito mais notável a mudança da coloração tornando-se muito evidente a presença de pigmentos com coloração laranja intensa ao longo do período de cultivo.

Pelas observações microscópicas realizadas notou-se que das duas estirpes de *B. braunii* cultivadas, a IO 98-01 forma colónias de pequenas dimensões facilmente desagregadas com a agitação, enquanto a estirpe IO 98-02 forma colónias relativamente maiores e mais consistentes e resistentes à agitação. Para nenhuma das estirpes se verificou flutuabilidade das colónias devido à acumulação de lípidos, algo que apenas se notou em culturas sem agitação. A segunda estirpe ao longo do tempo de cultura foi adquirindo um aspecto viscoso e espesso o que tornou muito demorado o processo de filtração para determinação do peso seco. Ainda para a colheita desta segunda estirpe por centrifugação, foi necessária uma maior velocidade de rotação e mais tempo, apesar do que as células não formaram um *pellet* consistente. A biomassa liofilizada da primeira estirpe aparentava-se como um pó verde ou verde alaranjado e a da segunda estirpe formava uma massa pegajosa verde acastanhada.

### 4.2 – Crescimento da Biomassa

#### 4.2.1 – Primeira fase de culturas

Na primeira cultura dois métodos de análise da biomassa foram usados, o método gravimétrico e o método espectrofotométrico. As figuras 6 A, B e C mostram a relação

linear estabelecida entre o peso seco determinado gravimetricamente e os valores de absorvâncias correspondentes para as estirpes IO 98-01 no meio BBM, IO 98-01 no meio CHU e IO 98-02 no meio CHU, respectivamente. Os valores de  $R^2$  foram 0.9348, 0.967 e 0,8634 para IO 98-01 BBM, IO 98-01 CHU e IO 98-02 CHU, respectivamente. Dado que dentro da amplitude dos valores de peso seco não se verificou uma linearidade robusta, não se aplicou a relação para a estimativa do peso seco e, portanto, para as análises do crescimento em biomassa passou-se a considerar apenas as determinações do peso seco realizadas pelo método gravimétrico.

Na primeira cultura levada a cabo a fim de investigar o crescimento das duas estirpes de *B. braunii* os resultados mostram que embora o crescimento fosse contínuo ao longo do período de cultivo, para ambas as estirpes, o crescimento foi bastante lento (Figura 7A e 7B). A estirpe IO 98-01, que foi, nesta fase, cultivada nos dois meios artificiais (Figura 7A), BBM e CHU, revelou a existência de diferenças apreciáveis no crescimento. No meio BBM o crescimento inicial desta estirpe foi relativamente inferior ao verificado no meio CHU mas a partir do vigésimo dia de cultura o crescimento tornou-se bastante mais rápido no meio BBM e atenuou-se no meio CHU. Em relação à aparência macroscópica, verificou-se que a cultura no meio CHU cedo começou a ficar muito verde mas a cor passou gradualmente a ficar acastanhada ao longo do tempo de cultivo, camuflando a cor verde. Em relação à cultura da estirpe IO 98-01 no meio BBM, ela manteve-se verde até o final do tempo de cultivo em que se efectuou a colheita total. Há a notar também que a densidade em biomassa da cultura desta estirpe no meio BBM ultrapassou o dobro da mesma densidade na cultura no meio CHU sendo as concentrações da biomassa no final do período de cultivo de 1.86 e 0.88 g/L (peso seco), respectivamente.

A estirpe IO 98-02 foi cultivada nesta primeira fase apenas no meio CHU dado à insuficiente quantidade de inóculo. A cultura teve um crescimento contínuo, embora relativamente lento, durante os 36 dias de cultivo e quando foi colhida não tinha ainda atingido a fase estacionária. A concentração da biomassa na altura em que a cultura foi colhida era de 1.1g/L (peso seco), valor este superior à concentração de biomassa da estirpe 01 em meio CHU com os mesmos dias de cultivo (Figura 7 B).

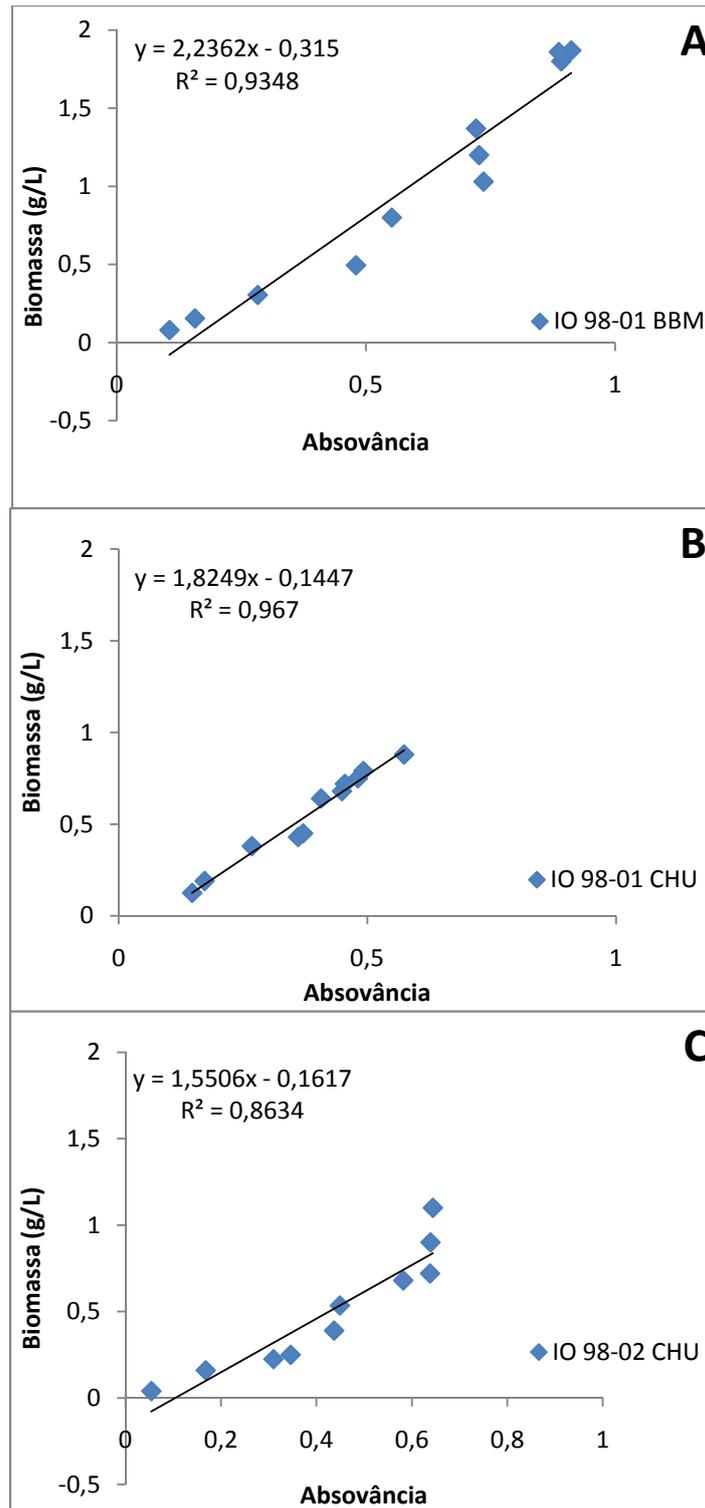


Figura 6: Correlação entre a biomassa (peso seco) e a absorvância a 680 nm

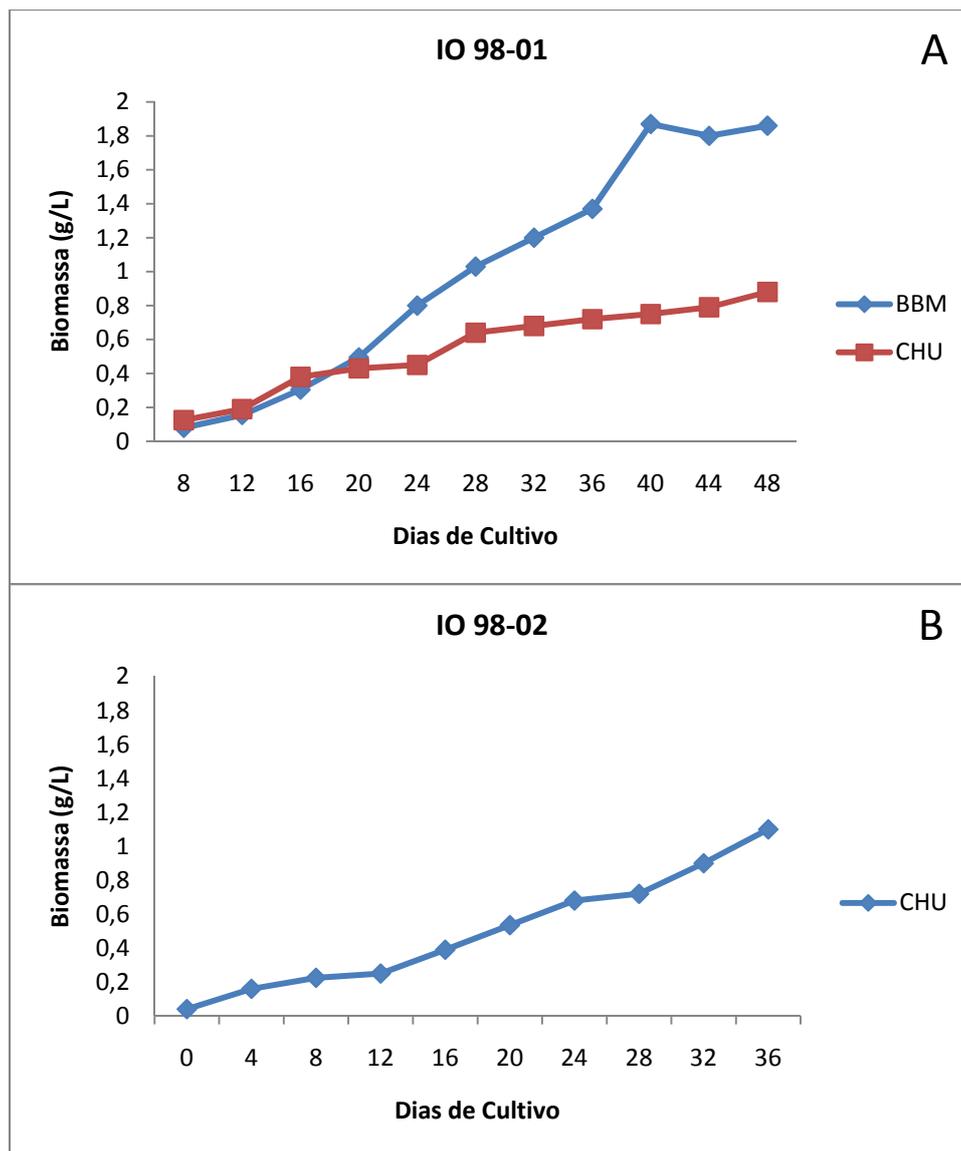


Figura 7: Curvas de crescimento das duas estirpes de *B. braunii* relativos à primeira fase de culturas

#### 4.2.2 – Segunda fase de culturas

Nesta fase, as condições de cultivo das duas estirpes nos diferentes meios de cultura mantiveram-se em relação à primeira fase, com a excepção da iluminação que foi alterada (ver 3.5.2). A estirpe IO 98-01, nestas condições, apresentou um crescimento contínuo ao longo do tempo de cultivo mas com diminuição da taxa de crescimento na parte final indicando a proximidade da fase estacionária (Figura 8A). Apesar de as taxas de crescimento nos dois meios sintéticos terem sido relativamente semelhantes notou-se que a biomassa manteve-se ligeiramente mais elevada no meio CHU durante maior parte do tempo de cultivo. As concentrações de biomassa atingidas para esta estirpe na altura da colheita final foram 0.71, 0.76 e 0.29 g/L (peso seco) nos meios CHU, BBM e ETAR, respectivamente. O crescimento desta estirpe na água residual utilizada como

meio de cultura (ETAR) foi bastante mais lento que nos meios de cultura sintéticos utilizados, atingindo no final uma concentração de biomassa inferior à metade da conseguida nos meios sintéticos.

A estirpe IO 98-02, assim como a IO 98-01, apresentou crescimento contínuo em todos os meios utilizados ao longo do período de cultivo. Todavia, foram notadas significantes diferenças em relação à estirpe 01 principalmente a nível da aparência morfológica. Ao contrário da estirpe 01, a IO 98-02 apresentou-se muito mais espessa e viscosa. Quando observada ao microscópio, as colónias são significativamente maiores, com células gradualmente mais acastanhadas ao longo do período de cultivo. Interessa salientar aqui que o crescimento desta estirpe é diferente nos dois meios sintéticos ao longo do período de cultivo. Conforme se verifica na Figura 8 B, o crescimento inicial é mais acentuado no meio CHU, sendo, porém, atingida a fase estacionária mais cedo do que no meio BBM. Aliás, no meio BBM, o crescimento continua por mais tempo levando a uma maior concentração de biomassa. Para a estirpe IO 98-02 as concentrações de biomassa obtidas no final do período de cultivo foram de 0.76, 0.96 e 0.53 g/L (peso seco) nos meios CHU, BBM e ETAR, respectivamente.

De comum nas culturas é que para o meio ETAR o crescimento de ambas as estirpes no geral é bastante mais lento que nos meios sintéticos (figuras 8A e 8B), embora nas duas primeiras semanas o da estirpe IO 98-02 tenha sido maior que no meio BBM. As tendências de crescimento das duas estirpes no meio ETAR, conforme mostrado na figura 9, são diferentes. A estirpe IO 98-02 cresceu melhor neste meio e atingiu perto do dobro da concentração da biomassa atingida pela estirpe IO 98-01.

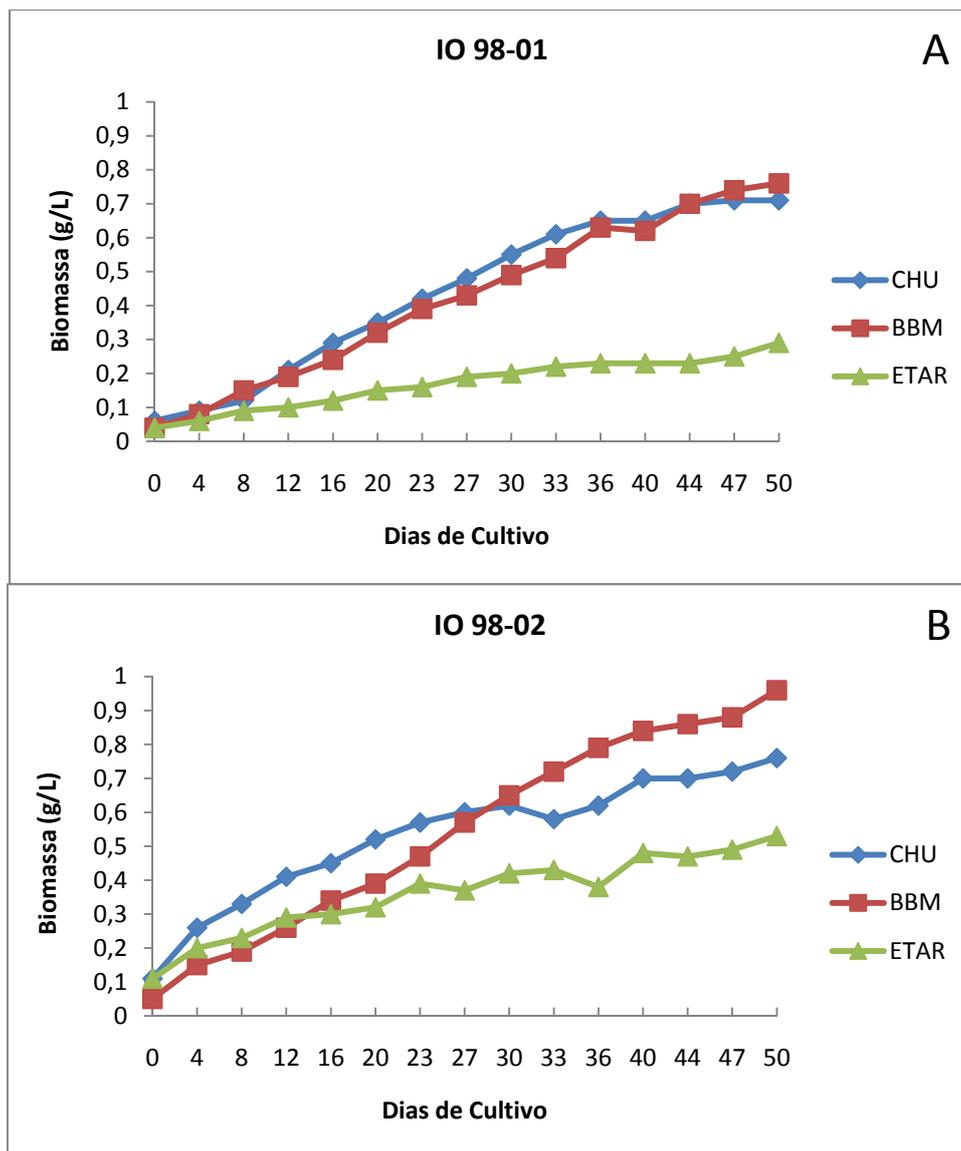


Figura 8: Curvas de crescimento das duas estirpes de *B. braunii* relativos à segunda fase de culturas

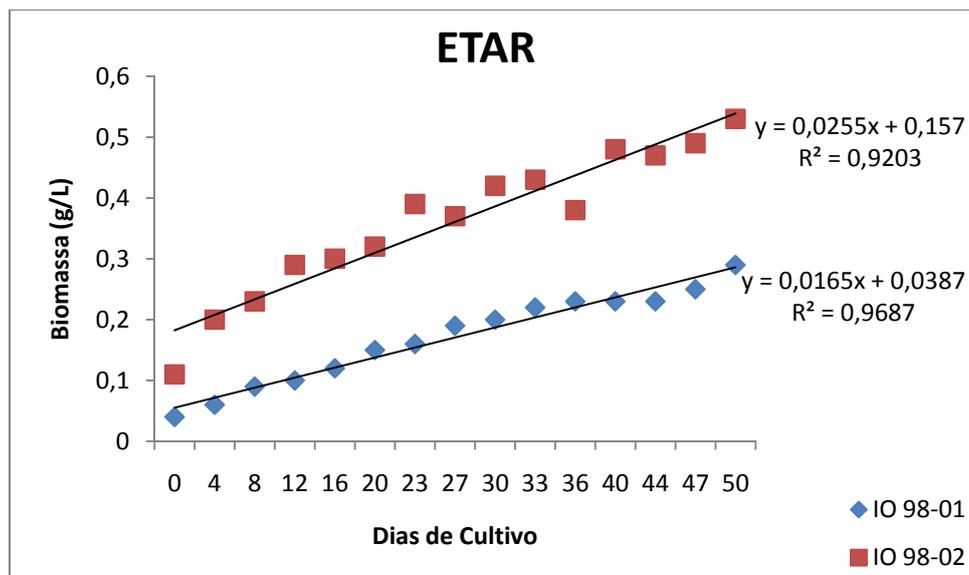


Figura 9: Comparação da dinâmica de crescimento das duas estirpes de *B. braunii* cultivadas em águas residuais

Considerando a produtividade em biomassa conseguida nesta segunda fase de culturas verificou-se que foi superior no meio BBM para ambas as estirpes (Figura 10). A estirpe IO 98-02 foi mais produtiva nos três meios de cultura experimentados. No meio CHU registou-se a menor diferença de produtividade entre as duas estirpes enquanto esta diferença foi maior no meio ETAR.

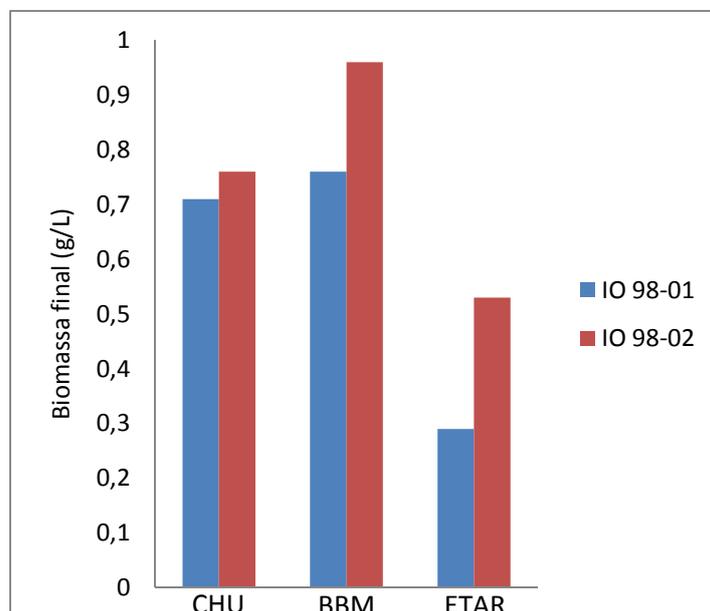


Figura 10: Representação da produtividade em biomassa (peso seco) das duas estirpes de *B. braunii* relativa à segunda fase de culturas

#### 4.2.2.1 - Análise da absorção de nutrientes em águas residuais

A remoção de nutrientes nas culturas de *B. braunii* usando águas residuais pré-tratadas (ETAR) foi determinada através da comparação das concentrações de nitratos e nitritos,

de amónia e de fosfatos no meio de cultura no início e no final das culturas. Os resultados obtidos demonstraram uma absorção quase completa desses nutrientes durante o período de cultura. A absorção de fosfatos foi de 79,8% e 89,1 % para as estirpes IO 98-01 e IO 98-02, respectivamente, enquanto a absorção dos compostos de azoto foi acima de 99% para ambas as estirpes (tabela IV).

	IO 98-01			IO 98-02		
	Inicial	Final	% Remoção	Inicial	Final	% Remoção
Total Fosfatos ( $\mu\text{g/L}$ )	2419,70	488,54	79,8	2419,70	263,51	89,1
Nitratos + Nitritos ( $\mu\text{g/L}$ )	3001,46	9,20	99,7	3001,46	1,83	99,9
Amónia ( $\mu\text{mol/L}$ )	64,05	0,17	99,7	64,05	0,09	99,9

Tabela IV: Concentrações iniciais e finais dos nutrientes fosfatos, nitratos e nitritos e amónia e as respectivas percentagens de remoção correspondentes à segunda fase de culturas das duas estirpes de *B. braunii* em águas residuais (ETAR)

#### 4.2.2.2 – Crescimento do conteúdo lipídico

O crescimento do conteúdo lipídico foi analisado através da fluorescência *in vivo* pelo método do vermelho do Nilo e os resultados foram mostrados nas figuras 11A e 11B. De notar é que ambas as estirpes, quando cultivadas no meio sintético CHU atingiram maior acumulação de lípidos em comparação com as culturas nos outros dois meios, todavia, a tendência de crescimento lipídico é maior na estirpe IO 98-02. No geral, o conteúdo lipídico, nas culturas no meio BBM, não atingiu a metade do equivalente conteúdo obtido nas culturas no meio CHU. As culturas das duas estirpes no meio BBM, embora tenham atingido um crescimento em biomassa relativamente próximo das culturas no meio CHU (Figura 8A e 8B), no que diz respeito ao crescimento lipídico foi bastante inferior. No entanto esse crescimento na estirpe IO 98-02 foi maior que na primeira estirpe no mesmo meio o que, de resto, foi também verificado nos resultados das extracções lipídicas mostrados na tabela V. A acumulação de lípidos nas culturas no meio ETAR difere nas duas estirpes, sendo que para a estirpe IO 98-02 essa acumulação é relativamente semelhante à cultura no meio CHU enquanto para a estirpe IO 98-01 é bastante inferior. De uma forma geral a estirpe IO 98-02 produz mais lípidos que a estirpe IO 98-01.

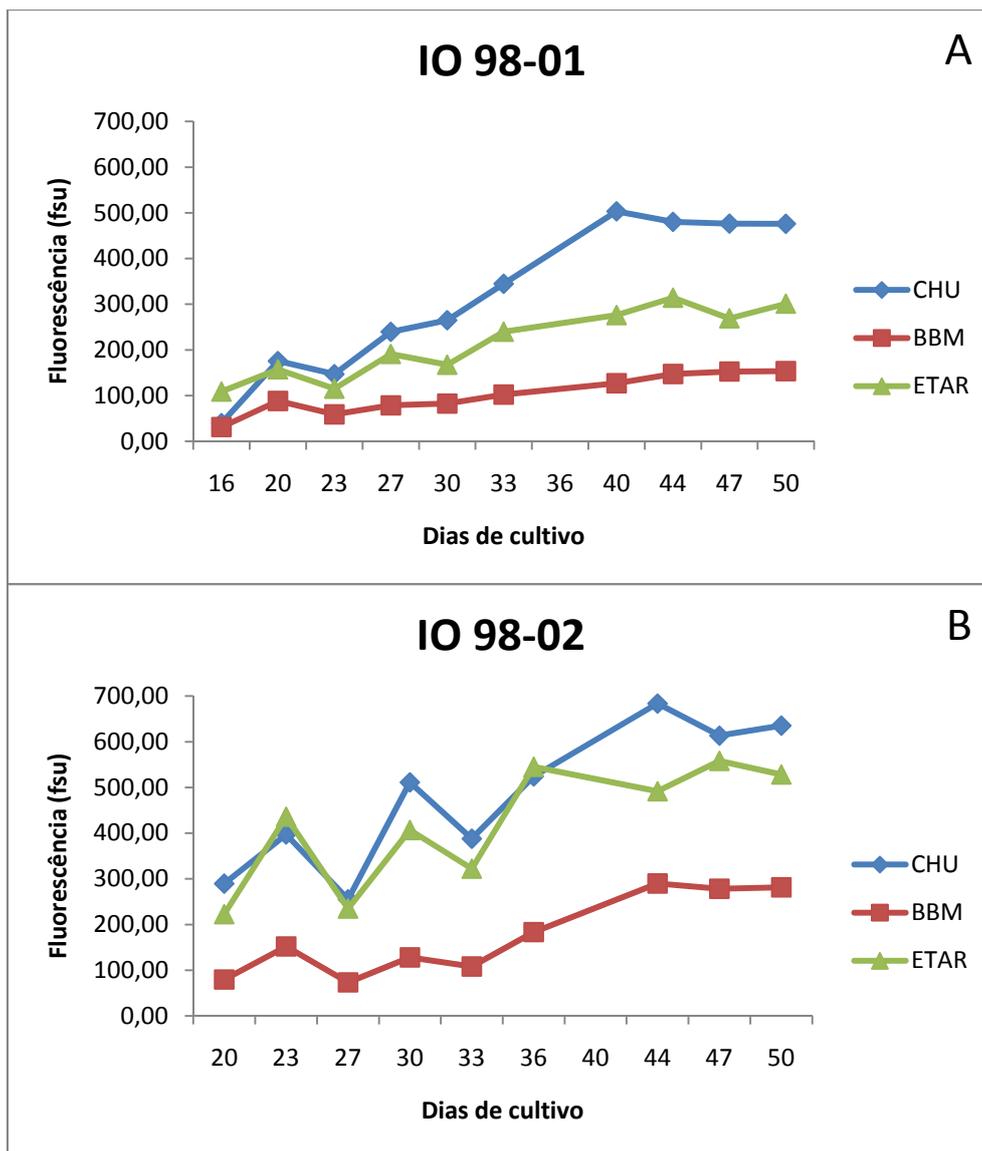


Figura 6: Análise do crescimento lipídico relativo à segunda fase de culturas das duas estirpes de *B. braunii* pelo método vermelho do Nilo

#### 4.2.3 - Terceira fase de culturas

Nesta fase, as duas estirpes, IO 98-01 e IO 98-02, foram cultivadas durante 52 dias nos mesmos meios de cultura usados para as culturas da segunda fase, ou seja, BBM, CHU e ETAR com a diferença que neste caso o cultivo foi feito no exterior com as culturas expostas à luz natural e sujeitas às variações dos factores climáticos. O que se verificou à partida para todas as culturas foi um longo período de adaptação, sendo que a cultura da estirpe IO 98-02 no meio ETAR acabou por se perder totalmente.

Conforme se pode ver na Figura 12 A e B as culturas no meio CHU foram as que melhor se conseguiram adaptar e crescer embora para a estirpe IO 98-02 a adaptação tenha demorado muito mais tempo que para a estirpe IO 98-01. Para esta última todas as

culturas acabaram por se desenvolver. As culturas no meio CHU e ETAR no final do período de cultivo já se encontravam na fase estacionária enquanto a cultura no meio BBM estava ainda a crescer. As concentrações de biomassa atingidas no final do período de cultivo pela estirpe IO 98-01 nos meios CHU, BBM e ETAR foram de 1.0, 0.58 e 0.57 g/L (peso seco), respectivamente.

Para a estirpe IO 98-02 o desenvolvimento foi tardio em todas as culturas. A cultura no meio CHU, contudo, cresceu e atingiu a densidade de 0,8 g/L (peso seco) no final do período de cultivo enquanto a cultura no meio BBM cresceu pouco não ultrapassando a densidade de 0,2 g/L (peso seco) (Figura 13). A cultura desta estirpe no meio ETAR deteriorou-se, facto pelo qual a sua amostragem foi suspensa a partir do 24º dia de cultivo.

Como se pode ver nas fotografias da Figura 14 tiradas de 8 em 8 dias a partir de 12 dias de cultivo, houve uma evidente alteração na coloração das culturas. É de notar pela coloração, o comportamento diferencial das duas estirpes nos três meios de culturas experimentados em cultivos *outdoors*. Pode-se verificar que a cultura da estirpe IO 98-01 no meio CHU foi a primeira a apresentar a coloração verde que indica o início do estado de desenvolvimento exponencial desta microalga. Portanto, vê-se na Figura 14 B que as três primeiras culturas correspondentes à estirpe IO 98-01 iniciaram o desenvolvimento mais cedo que as da estirpe IO 98-02. No geral, a coloração de todas as culturas desenvolveu-se, passando de verde na fase inicial, para um tom vermelho ou alaranjado ao longo do período de cultivo, o que se nota com maior evidência nas culturas de ambas as estirpes no meio CHU, representadas pela primeira e quarta mangas, da esquerda para direita (Figura 14).

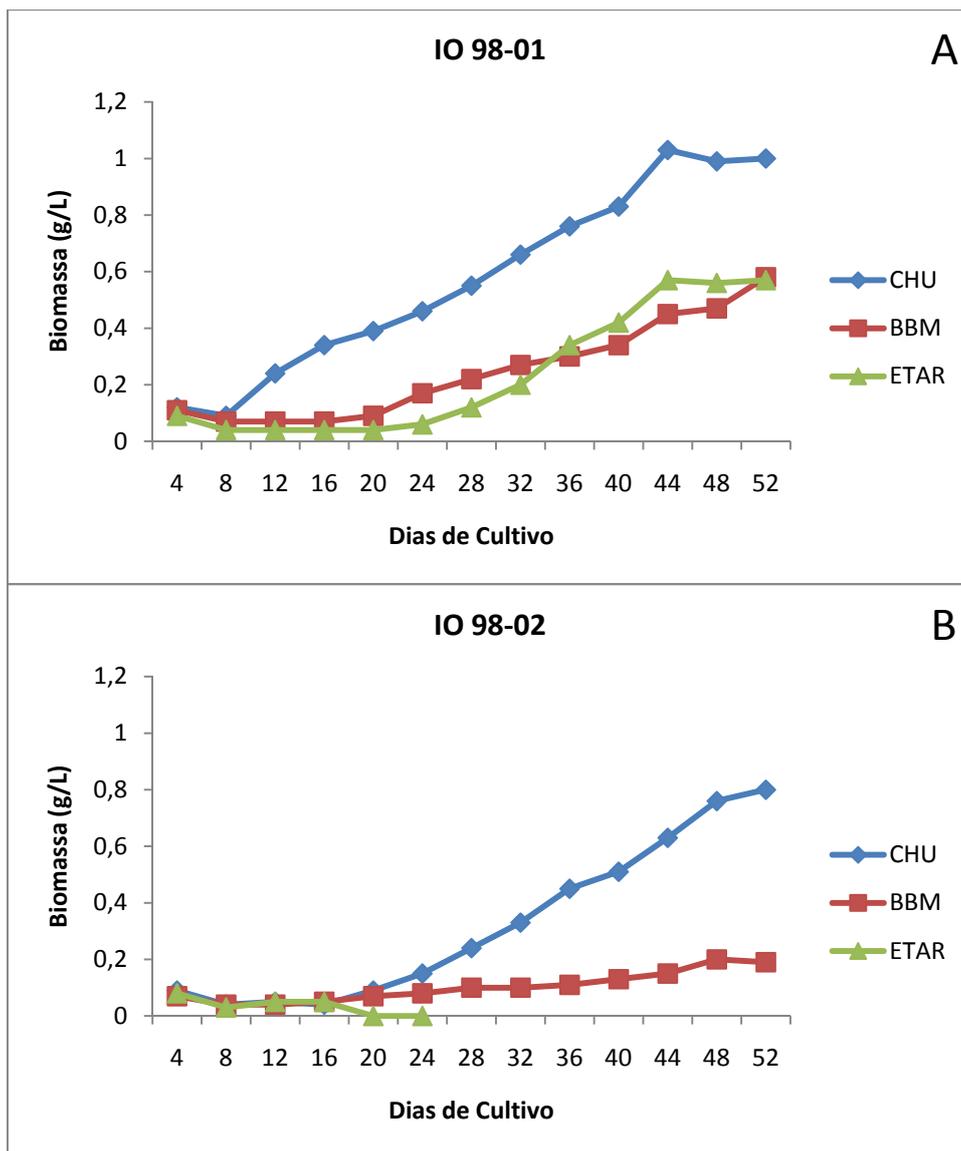


Figura 7: Curvas de crescimento das duas estirpes de *B. braunii* relativos à terceira fase de culturas

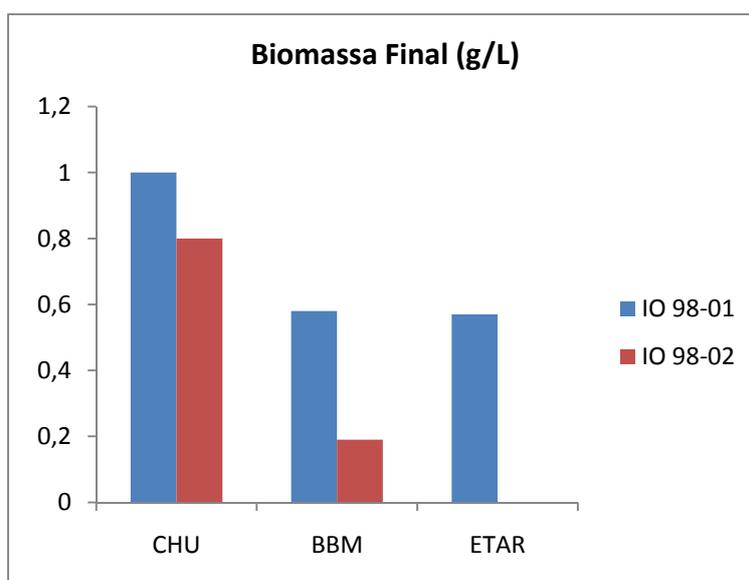


Figura 8: Produtividade em biomassa (peso seco) das duas estirpes de *B. braunii* em culturas *outdoors*



Figura 9: Estrutura montada *outdoors* para se efectuar a terceira fase de culturas de *B. braunii* (as fotos foram tiradas, A, 12 dias, B, 20 dias, C, 28 dias, D, 36 dias e E, 44 dias, F, 52 dias após o início das culturas)

#### 4.4 – Conteúdo em lípidos

A Tabela V mostra os resultados da extracção dos lípidos, utilizando a biomassa seca das culturas da primeira e segunda fase colhida no final do período de cultivo. Os valores de percentagem do extracto lipídico representam a média de três extracções à qual se associa o respectivo desvio padrão. A percentagem máxima do conteúdo lipídico de 36% foi obtida para a cultura da estirpe IO 98-02 no meio CHU. Aliás, ambas as estirpes produzem maior percentagem do conteúdo lipídico quando cultivadas no meio CHU (Figura 15). Todavia, nota-se que a estirpe IO 98-02 em termos de conteúdo lipídico é mais produtiva que a estirpe IO 98-01 em todos os três meios de cultura experimentados. No meio ETAR a estirpe IO 98-02, além de crescer melhor como indicado na Figura 9, produz uma maior percentagem de conteúdo lipídico que a estirpe IO 98-01. As variações de conteúdo lipídico, com a influência dos diferentes meios de cultura, são menos marcantes para a estirpe IO 98-01 (Figura 15). Nota-se ainda que o conteúdo lipídico da estirpe IO 98-01 diminuiu da primeira para a segunda fase de culturas tanto no meio CHU como também no meio BBM (tabela V).

	CHU		BBM		ETAR	
	IO 98-01	IO 98-02	IO 98-01	IO 98-02	IO 98-01	IO 98-02
1ª Cultura (% ext.)	27,94 ±0,4	35,43 ±0,14	25,84 ±0,32			
2ª Cultura (% ext.)	18,38 ±3,66	36,05 ±0,23	13,19 ±2,28	18,71 ±2,31	17,12 ±1,21	28,91 ±0,14

Tabela V: Comparação dos conteúdos em lípidos relativos às extracções da primeira e da segunda fase de culturas

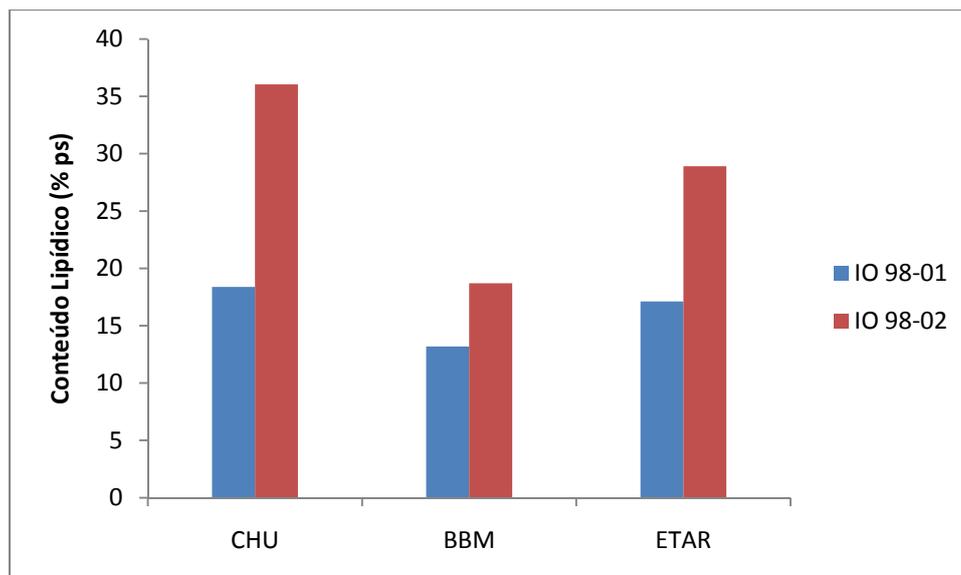


Figura 10: Comparação dos conteúdos em lípidos obtidos das extracções das culturas da segunda fase

Como se pode verificar na Tabela VI, os resultados do conteúdo lipídico obtidos nas extracções relativas às culturas da segunda fase quando comparadas com as respectivas fluorescências relativas revelaram diferenças tais que impossibilitaram o estabelecimento de uma correlação linear usando os resultados das duas estirpes. Contudo, foi possível estabelecer, como se observa na Figura 16, uma relação linear dos resultados obtidos pelos dois métodos dentro da mesma estirpe. Foram utilizados os resultados correspondentes aos três meios de cultura e pode-se notar que embora haja diferenças na produção lipídica de meio para meio, a relação linear indica que para cada uma destas estirpes pode-se usar o método de fluorescência com vermelho do Nilo para estimar o conteúdo lipídico mas não se pode, neste caso, extrapolar a estimativa para o conjunto das duas estirpes.

	Conteúdo lipídico (%)	Fluorescência relativa (fsu)
IO 98-01 CHU	18,38 ±3,66	476,1
IO 98-01 BBM	13,19 ±2,28	153,6
IO 98-01 ETAR	17,12 ±1,21	301,05
IO 98-02 CHU	36,05 ±0,23	635,41
IO 98-02 BBM	18,71 ±2,31	281,56
IO 98-02 ETAR	28,91 ±0,14	528,3

Tabela VI: Comparação do conteúdo lipídico determinado pelo método gravimétrico e a respectiva fluorescência relativa referente à segunda fase de culturas

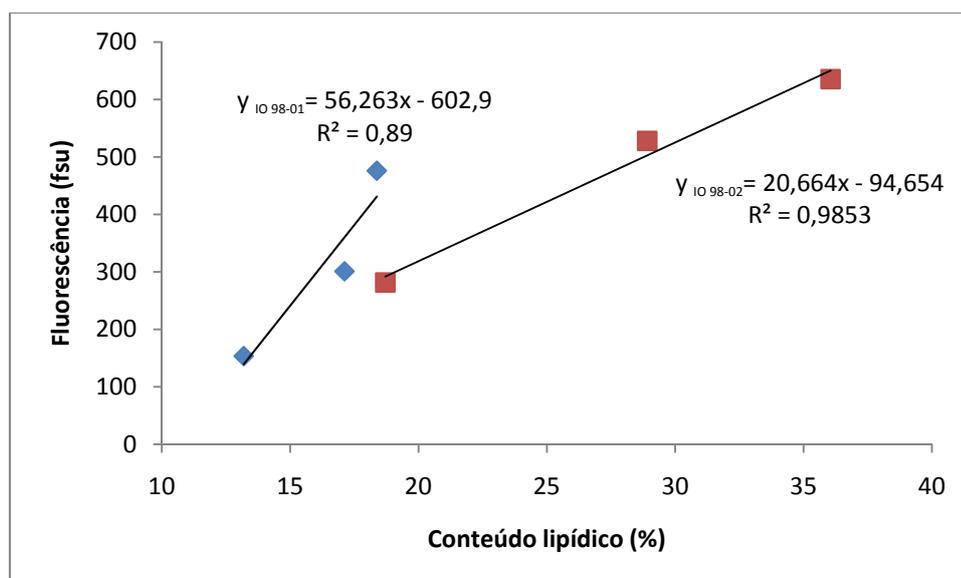


Figura 11: Correlação entre o conteúdo lipídico e a fluorescência do vermelho de Nilo nas culturas *indoors* das estirpes *B. braunii* IO 98-01 e IO 98-02

#### 4.5 – Composição do extracto lipídico

O perfil de ácidos gordos das duas estirpes de *B. braunii* foi estudado em todas as culturas da segunda fase e os resultados estão apresentados na Tabela VII. Para ambas as estirpes e em todos os meios de cultura experimentados o ácido oleico (C18:1) é o maior constituinte dos ácidos gordos apresentando percentagem relativa entre 42% e 66%. O segundo ácido gordo mais dominante é o palmítico (C16:0) com percentagem relativa entre 8% e 18%. Registaram-se algumas variações no perfil de ácidos gordos das duas estirpes sob influência dos diferentes meios de cultura experimentados, especialmente C18:2, C18:1e C28:1.

Metil ésteres de ácidos gordos (% relativa)						
Ác. Gordos	CHU		BBM		ETAR	
	IO 98-01	IO 98-02	IO 98-01	IO 98-02	IO 98-01	IO 98-02
(16:1)	0,5	1,3	4,1	2,8	1,1	2,7
(16:0)	11,8	9,8	11,8	18,1	12,9	8,2
(18:2)	19,8	2,6	7,0	17,8	5,0	1,8
(18:1)	49,8	62,9	43,3	42,3	65,8	43,3
(18:0)	1,9	0,4	2,8	4,0	1,9	nd
(20:1)	3,9	6,7	0,6	2,0	3,4	8,0
(22:1)	2,6	nd	4,2	2,4	2,8	10,9
(24:1)	0,6	0,6	5,7	nd	0,5	nd
(26:1)	nd	2,6	nd	0,6	nd	6,7
(28:1)	2,9	10,2	7,0	1,7	2,8	8,7

Tabela VII: Perfil lipídico das estirpes IO 98-01 e IO 98-02 de *B. braunii* relativo às de culturas da segunda fase (nd, não detectado)

## 5. - Discussão dos resultados

### 5.1 - Crescimento de *Botryococcus braunii*

A microalga *B. braunii* está bastante referenciada como portadora de capacidade de produzir uma elevada percentagem de conteúdo lipídico sendo assim considerada muito promissora como fonte de substrato para a produção de biodiesel (Wolf, 1983; Li e Qin, 2005; Metzger e Largeau, 2005; Chisti, 2007). Contudo, esta espécie tem sido encarada como aberrante a nível de estrutura, comportamento e metabolismo de tal maneira que parece não ter paralelo em qualquer outro grupo de microalgas (Belcher, 1968). O que se verifica pelos resultados apresentados (figuras 8 e 12) é que esta espécie possui um crescimento muitíssimo lento resultando numa baixa produtividade em biomassa (figuras 10 e 13). Esse fraco crescimento tem sido explicado por autores clássicos, que se dedicaram ao estudo desta espécie, como consequência da própria morfologia das colónias formadas pelas microalgas embebidas na matriz extra-celular o que limitada a difusão do CO<sub>2</sub> e sais minerais junto das células. Um outro factor considerado causa do fraco crescimento é a elevada síntese e acumulação de diversos compostos lipídicos e hidrocarbonetos que parecem não estar disponíveis como compostos de reserva e como tal consomem grande parte da energia fotossintética assimilada em detrimento do crescimento (Belcher, 1968; Wolf, 1983).

Os resultados de crescimento apresentados neste trabalho (figuras 8 e 12) dizem respeito a determinações de biomassa seca por unidade de volume. Foi dada preferência a este método por ser extremamente difícil a contagem directa das células devido às formas e tamanhos irregulares das colónias de *B. braunii*. Além disso, para esta espécie, o aumento da biomassa seca não reflecte o aumento linear do número de células. Os trabalhos de Belcher (1968) e Bailliez *et al.* (1985) mostraram bem que o fim a multiplicação algal nesta espécie não coincide com o fim do aumento da biomassa. Estes autores demonstraram que a partir de determinada fase (entre 20 e 30 dias) as culturas de *B. braunii* deixam de aumentar em número de colónias ou de células mas o aumento da biomassa continua até os meios de cultura se esgotarem. Os resultados obtidos neste trabalho indicam bem esta mesma tendência, embora se note atenuação no aumento da biomassa a partir da sexta semana de cultivo (Figura 8).

### 5.1.1 – Comparação do crescimento e produtividade em biomassa em diferentes meios de cultura

A comparação dos resultados relativos ao crescimento e produtividade da estirpe IO 98-01 nos meios de cultura BBM e CHU indicaram diferenças consideráveis como se pode ver na figura 7A. Todavia, a dinâmica de crescimento dessas culturas realizadas em condições controladas (*indoors*), foi muito semelhante a vários resultados anteriormente obtidos para a mesma espécie em condições controladas (Dayananda *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2007b; Órpez *et al.*, 2009). Sendo que foram realizadas culturas *batch* (cultura em descontínuo), o facto de se ter obtido crescimento e produtividades diferentes para a mesma estirpe nos dois meios diferentes está relacionado com um esgotamento mais rápido dos nutrientes minerais no meio CHU que é um meio de cultura mais pobre que o BBM. Nota-se, pelos resultados mostrados na Figura 7 A, que nos primeiros 20 dias o crescimento da cultura no meio CHU foi ligeiramente superior mas com o esgotamento dos nutrientes o crescimento abrandava-se enquanto a cultura no meio BBM continua o crescimento exponencial até 40 dias de cultivo. Não se pode fazer a mesma análise para a estirpe IO 98-02 dado que apenas se efectuou uma cultura em meio CHU (Figura 7 B). Contudo, pelas taxas de crescimento (16 e 29 mg/L.dia para as estirpes IO 98-01 e IO 98-02, respectivamente) e pelas concentrações finais de biomassa (figura 7A e 7B) verificou-se que o crescimento foi maior na estirpe 02 quando ambas são cultivadas no meio CHU o que sugere desde já uma maior habilidade de produção de biomassa.

### 5.1.2 – Determinação do crescimento, produtividade em biomassa e conteúdo lipídico (hidrocarbonetos) em culturas “*indoors*”

Tal como verificado nas primeiras culturas (5.1.1), existe também similaridades entre os resultados obtidos nestas experiências e os resultados anteriormente obtidos por alguns autores (Dayananda *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2007b; Órpez *et al.*, 2009). As culturas realizadas nesta fase foram sujeitas a uma maior intensidade luminosa (ver 3.5.2) da que foi utilizada na primeira fase de culturas e os resultados mostraram que para ambas as estirpes o crescimento e a produtividade foram afectados levando a menor crescimento e produtividade em biomassa (figuras 7 e 8). Aliás, como evidenciado por vários autores (Qin, 2005; Li e Qin, 2005; Rao *et al.*, 2007a e b) a intensidade luminosa, a par da temperatura e dos nutrientes nitratos e fosfatos, é um dos principais factores que afectam o crescimento e a produção lipídica da espécie *B. braunii*. A título de exemplo, pode-se ver nas figuras 7 A e 8 A que a concentração da biomassa para a cultura da

estirpe IO 98-01 no meio BBM foi menor que a metade do que se tinha obtido na primeira fase. Embora menos marcantes, as concentrações de biomassa das culturas das duas estirpes cultivadas no meio CHU também foram inferiores em relação aos resultados da primeira fase de cultivo. De uma forma geral, pode-se dizer que a alteração de um único parâmetro de cultivo foi suficiente para afectar de forma considerável a produtividade de ambas as estirpes de *B. braunii* utilizadas.

Comparando entre si as culturas da segunda fase (Figura 8 A e B) verificou-se que as do meio CHU apresentaram inicialmente um crescimento ligeiramente mais acentuado que as do meio BBM. Porém, a fase estacionária foi antecipada nas culturas do meio CHU resultando numa menor concentração de biomassa no final do período de cultivo. Mais uma vez a explicação poderá ser o esgotamento precoce dos nutrientes dado o meio CHU ser mais pobre que o meio BBM. A confrontação das concentrações de biomassa obtidas para as duas estirpes nesta segunda fase de cultivo (Figura 10) mostra que para ambos os meios de cultura, CHU e BBM, a estirpe IO 98-02 apresenta maior produtividade, o que indica comportamentos diferentes das duas estirpes perante condições similares. Isto confirma mais uma vez o que já foi verificado por vários autores (Belcher, 1968; Li e Qin, 2005), ou seja, estirpes de *B. braunii* de locais diferente comportam-se de formas diferentes perante as mesmas condições de cultura. Belcher (1968) já tinha notado que estirpes de *B. braunii* oriundas de proveniências diferentes quando cultivadas em condições laboratoriais similares apresentam diferentes dinâmicas de crescimento e produção de lípidos e carotenóides pelo que ele considerou indispensável a investigação de novas estirpes no sentido de explorar o potencial desta espécie. Li e Qin (2005) também mostraram esse comportamento ao verificarem que o crescimento da biomassa e a produtividade lipídica são específicos de cada estirpe e variam de estirpe para estirpe independentemente das condições de cultivo.

### **5.1.3 - Determinação do crescimento, produtividade em biomassa em culturas “outdoors”**

Para as culturas da terceira fase a característica macroscópica mais notável foi a alteração da coloração notada principalmente nas culturas no meio CHU de ambas as estirpes. A coloração começou por ser verde no início do desenvolvimento das culturas e foi se tornando cada vez mais vermelha ou alaranjada ao longo do tempo de cultivo conforme se vê na Figura 14. Com base no trabalho de Belcher (1968), a coloração inicial verde é conferida pelas clorofilas *a* e *b* enquanto a cor vermelha ou alaranjada diz

respeito à acumulação de carotenóides, principalmente  $\beta$ -caroteno. A maior parte deste pigmento encontra-se dissolvido nos óleos que estão impregnados na matriz que sustem as colónias camuflando deste modo a cor verde das clorofilas. A referida alteração na coloração verificada nas culturas *outdoors*, o que não se verificou de forma tão evidente nas culturas *indoors* mantidas em condições consideradas ótimas, deve-se certamente às condições climáticas que se fizeram sentir durante o tempo de cultivo, em pleno verão, principalmente a temperatura e a intensidade luminosa elevadas. Estes dois factores foram demonstrados como tendo uma relação directa com a acumulação de carotenóides nas culturas de *B. braunii* (Belcher, 1968). Sendo a acumulação de carotenóides e consequente alteração na coloração uma estratégia de resistência/sobrevivência em condições adversas, as culturas realizadas *outdoors* não ocorreram em condições ótimas para o crescimento de *B. braunii*. Este facto reflectiu claramente no crescimento de todas as culturas da terceira fase (Figura 12) quando comparadas com as culturas realizadas *indoors* (figuras 7 e 8). O que se verificou nas culturas da terceira fase foi um longo período de adaptação que antecedeu o início de desenvolvimento. Embora as culturas tenham acabado por se adaptar e iniciar o desenvolvimento, a concentração da biomassa atingida no final do tempo de cultivo (Figura 13) foi inferior à atingida nas culturas efectuadas *indoors* (Figura 10). O maior crescimento e maior concentração de biomassa no final do período de cultivo obtidos nas culturas de ambas as estirpes no meio CHU parecem indicar que esse meio é o mais apropriado nas condições *outdoors* experimentadas o que pode dever-se à própria constituição mineral desse meio (ver anexo). As culturas de ambas as estirpes no meio BBM, ao contrário do que aconteceu nas culturas *indoors*, tiveram um desenvolvimento sempre inferior às culturas no meio CHU ao longo de todo o período de cultivo, embora se notasse (Figura 12 A) que devido ao longo período de adaptação a cultura da estirpe IO 98-01 no meio BBM não tinha atingido a fase estacionária no final do tempo de cultivo.

#### **5.1.4 - Crescimento e absorção de nitratos e fosfatos nas culturas em água residual pré-tratada**

O crescimento em água residual (meio ETAR) foi claramente afectado em ambas as estirpes tanto nas culturas da segunda fase (*indoors*) como nas da terceira fase (*outdoors*). Todavia, esse efeito negativo sobre o crescimento foi mais pronunciado nas culturas *outdoors* o que está associado também às influências das condições climáticas

que nesse caso foram extremas, abarcando dias muito quentes dos meses de Julho e Agosto com temperaturas máximas em geral superiores a 30°C, o que também afecta o crescimento de *B. braunii* (Li e Qin, 2005). Comparando os resultados da biomassa máxima atingida no final do tempo de cultivo (0,29 g/L para a estirpe IO 98-01 e 0,53 g/L para IO 98-02) para as culturas *indoors* no meio ETAR verificou-se que a produtividade em biomassa foi quase o dobro na estirpe 02. As culturas *outdoors* equivalentes tiveram desenvolvimentos diferentes, começando com um período de adaptação muito longo para ambas as estirpes, ou aliás, umas das estirpes, a IO 98-02, nem chegou a se adaptar às condições acabando por se deteriorar completamente após 16 dias de cultivo. Nessas culturas, a estirpe IO 98-01 atingiu a biomassa máxima de 0,57 g/L, perto do dobro do que a mesma estirpe atingiu nas culturas *indoors*, o que indica uma menor susceptibilidade desta estirpe às condições adversas que se verificaram durante as culturas *outdoors*. Os resultados obtidos nestas experiências estão de acordo com os escassos dados experimentais em que se realiza cultivo da espécie *B. braunii* em águas residuais como é o caso dos trabalhos de Sawayama *et al.* (1992, 1994), An *et al.* (2003) e Órpez *et al.* (2009), ou seja, constata-se a habilidade desta espécie crescer em águas residuais pré-tratadas e atingir uma produtividade considerável. Dado a possibilidade de a água pré-tratada ser obtida sem custos adicionais existe a oportunidade de associar o crescimento desta espécie ao tratamento terciário das águas residuais conseguindo assim, por um lado, a obtenção a baixo custo de biomassa com apreciável conteúdo lipídico e, por outro lado, o tratamento dessas águas, que são ricas em nutrientes como fosfatos e nitratos, que no caso de descargas para os meios aquáticos contribuiriam para a poluição e eutrofização desses ecossistemas.

## 5.2 – Crescimento do conteúdo lipídico

Toda a atenção que a microalga *B. braunii* tem merecido por parte dos investigadores se deve à sua particularidade de produzir elevada percentagem de hidrocarbonetos. De acordo com Sawayama *et al.* (1994) a fracção de hidrocarbonetos (lípidos neutros) pode constituir até 75% da biomassa seca desta microalga. Neste trabalho foi utilizado o método de fluorescência com vermelho do Nilo para seguir a dinâmica de crescimento dos hidrocarbonetos em todas as culturas da segunda fase (*indoors*). Usou-se este método pelo facto de ser muito mais simples, rápido e barato em comparação com os métodos gravimétrico e espectrofotométrico tradicionalmente usados. Além disso,

segundo Cooksey *et al.* (1987), este método possui uma elevada selectividade para os hidrocarbonetos (lípidos neutros) que correspondem à principal constituinte lipídica de *B. braunii*. Pelos resultados obtidos verificou-se que a estirpe IO 98-02 possuía um maior conteúdo lipídico que a estirpe IO 98-01 independentemente do meio em que foram cultivadas o que está de acordo com as conclusões de Li e Qin (2005), de que a produtividade lipídica é mais uma especificidade de cada estirpe de *B. braunii*. Todavia, existiram diferenças importantes de conteúdo em lípidos neutros para a mesma estirpe quando cultivada em meios diferentes. Segundo os resultados obtidos, o meio CHU proporcionou maior conteúdo lipídico para ambas as estirpes. As culturas das duas estirpes no meio BBM, apesar de terem apresentado crescimentos em biomassa relativamente similares às culturas no meio CHU (Figura 8), apresentaram conteúdos lipídicos inferiores. Estes resultados confirmam que é possível potenciar a produção desses lípidos nesta espécie com base na escolha de um meio de cultura apropriado.

Verificou-se com relativa clareza que houve uma tendência de crescimento do conteúdo lipídico para todas as culturas ao longo do tempo de cultivo. Comparando a dinâmica de crescimento em biomassa de todas as culturas (Figura 8) com a respectiva dinâmica de crescimento lipídico (Figura 11) nota-se que o maior crescimento lipídico ocorre durante a fase exponencial de crescimento da biomassa. Este facto está de acordo com os resultados obtidos por Kojima e Zhang (1999) em que o maior crescimento no conteúdo lipídico ocorreu durante a fase exponencial e na parte final do crescimento linear. Outros trabalhos experimentais anteriores já haviam demonstrado este comportamento, para as três raças (A, B e L) desta espécie (Largeau *et al.*, 1980; Metzger *et al.*, 1985). Uma vez que tudo indica que a produção lipídica é proporcional ao crescimento em biomassa, adoptar a utilização de meios e condições de cultura que potenciam o crescimento da biomassa nesta espécie seria fundamental para a produção de lípidos, visando potencialmente a produção de biodiesel.

### 5.2.1 – Crescimento de lípidos e hidrocarbonetos em água residual

Tal como em vários outros trabalhos precedentes (Sawayama *et al.*, 1992; An *et al.*, 2003; Órpez *et al.*, 2009) foi demonstrado nestas experiências que *B. braunii* possui a habilidade de crescer em águas residuais sem adição de nenhum nutriente mineral. Por outro lado, *B. braunii* possui tolerância a uma larga gama de pH (entre 6 e 9) (Dayananda *et al.*, 2006) sem efeitos significativos no crescimento e na produção lipídica o que indica a possibilidade de adaptação e utilização de águas residuais como

meio de cultura, além de se poder aproveitar também dessa característica para aplicações ao cultivo *outdoors*. Todavia, o mais notável foi o facto de o conteúdo lipídico das culturas no meio ETAR (água residual) ter sido consideravelmente superior ao conteúdo lipídico das culturas realizadas no meio sintético BBM o que se pode ver tanto pela dinâmica de crescimento lipídico como pelos resultados da extracção lipídica. Este facto já tinha sido observado no trabalho de Órpez *et al.* (2009). Também no meio ETAR se nota que a estirpe IO 98-02 apresentou maior crescimento e produção lipídica que a estirpe IO 98-01. O conteúdo lipídico da estirpe 02 nesse meio, foi muito similar ao que ocorreu na cultura da mesma estirpe no meio sintético CHU, que é o meio em que ambas as estirpes, 01 e 02, apresentaram melhores resultados. Assim, o facto de se obter níveis de lípidos e hidrocarbonetos nas culturas de *B. braunii* em águas residuais (ETAR) similares aos que foram obtidos nas culturas no meio sintético CHU e consideravelmente superiores aos que foram obtidos nas culturas do meio BBM consolida a hipótese da utilização dessas águas residuais para o cultivo desta espécie a larga escala, acoplado aos sistemas de tratamento primário de águas residuais urbanas, visando a obtenção de substrato para produção de biodiesel, embora seja ainda necessário otimizar as condições para o crescimento da biomassa nesse meio.

### 5.3 – Extracção do conteúdo lipídico

Para a recuperação dos lípidos da biomassa de *B. braunii* tem-se usado em geral extracção por solventes orgânicos. De acordo com Lee *et al.* (1998), de todos os solventes utilizados, a mais efectiva é a combinação de metanol e clorofórmio, sendo o método desenvolvido Bligh e Dyer (1959) o mais popular. Neste trabalho, utilizando uma ligeira modificação deste método, as percentagens do extracto lipídico obtido para todas as culturas *indoors* encontram-se na mesma ordem dos resultados (15 a 38%) obtidos, em condições óptimas, por Wolf *et al.* (1985), Singh e Kumar (1992), Lee *et al.* (1998) e Órpez *et al.* (2009) mas inferior aos resultados (50%) obtidos por Kojima e Zhang (1999) em fotobiorreactores em coluna arejados com 1% CO<sub>2</sub>. Interessa ressaltar aqui que só se podem comparar resultados obtidos pelo mesmo método de extracção porque, como foi demonstrado por Tran *et al.* (2009), métodos diferentes produzem resultados significativamente diferentes. Por outro lado, interessa frisar que os resultados acima mencionados foram obtidos em condições experimentais. Em condições naturais, ou seja, resultados obtidos de biomassa de *B. braunii* recolhida de

florescências em ambientes naturais, indicam que o conteúdo em hidrocarbonetos pode ser de até 86% da biomassa seca (Brown *et al.*, 1969).

A estirpe IO 98-02, em comparação com a estirpe IO 98-01, revelou-se ser mais produtiva em todos os meios de cultura experimentados (Tabela V). Estes resultados são também mostrados pela dinâmica de crescimento lipídico. Todavia, os resultados obtidos mostram apenas o conteúdo lipídico da biomassa seca dado que o meio de cultura foi descartado após a centrifugação e recolha da biomassa. Tendo que grande parte dos hidrocarbonetos produzidos é excretada para o exterior das células, como foi mostrado por Largeau *et al.* (1980), estes resultados representam apenas uma fracção de lípidos e hidrocarbonetos produzidos pelas duas estirpes de *B. braunii*. No sentido de obter uma melhor recuperação dos lípidos e hidrocarbonetos produzidos por estas microalgas, a utilização de um método capaz de ser aplicado a toda a suspensão algal parece ser o mais adequado. Becker (1994) já tinha proposto esta ideia e o conceito desenvolveu-se para um processo de extracção contínua utilizando um solvente orgânico compatível que não afecte o desenvolvimento das microalgas. Embora o método proposto possa ter aplicações à escala laboratorial e na recuperação de produtos de elevado valor comercial, o conceito deste método implica desenvolvimentos biotecnológicos ainda incompatíveis com a produção de biocombustíveis a baixo custo (Hejazi e Wijffels, 2004).

#### **5.4 – Análise dos metil ésteres de ácidos gordos (FAME)**

O ácido oleico e o ácido palmítico foram os constituintes dominantes dos ácidos gordos obtidos de todos os extractos das duas estirpes de *B. braunii* (Tabela VII). Os resultados obtidos mostram que em conjunto estes dois ácidos constituem de 50% a 78% do total de ácidos gordos contidos nos extractos. Dayananda *et al.* (2006) já haviam verificado a predominância destes dois ácidos gordos nos extractos de diferentes estirpes de *B. braunii*. Estes ácidos gordos de cadeia média (C16 e C18) são considerados os ideais para a produção de biodiesel de grande qualidade conforme mencionado nos trabalhos de Canakci e Van Gerpen (2001), Miao e Wu (2006) e Xu *et al.* (2006) e constituem o parâmetro que de forma mais directa e precisa avalia o potencial das microalgas como substrato para a produção de biodiesel, uma vez que nem todos os compostos solúveis nos solventes orgânicos utilizados na extracção podem ser convertidos em biodiesel. Esta espécie, além de produzir estes ácidos gordos ideais para a produção de biodiesel, é especialmente conhecida por produzir hidrocarbonetos de cadeia longa reconhecidos

como excepcionais para a produção de biodiesel (Metzger e Largeau, 2005). Todavia, neste trabalho e derivado do método adoptado não ser dirigido especificamente à recuperação dos hidrocarbonetos, embora tenham de certo entrado no estudo da dinâmica do crescimento lipídico realizado pelo método de fluorescência (Figura 11), não se fez a análise das classes de hidrocarbonetos produzidos pelas duas estirpes. Assim, não se pode, por ora, enquadrar as estirpes estudadas numa das três raças descritas para a espécie *B. braunii*, pelo que, no sentido de melhor compreender a biologia destes organismos se torna necessário mais estudos além deste trabalho no âmbito da tese de mestrado, o qual representa um estudo preliminar e pioneiro envolvendo estas duas estirpes portuguesas de *B. braunii*.

## 6. – Conclusões

Muita esperança tem sido depositada nos biocombustíveis, em especial nos que podem derivar de microalgas com características excepcionais, como potencial substituto dos combustíveis fósseis num futuro próximo. Estirpes portuguesas da microalga *Botryococcus braunii*, espécie detentora de uma excepcional habilidade de produzir hidrocarbonetos, revelaram neste estudo pioneiro possuir um crescimento em biomassa relativamente lento, no que coincidem com a generalidade dos estudos anteriores com outras estirpes. Contudo, produziram um considerável conteúdo lipídico, até 36% da biomassa seca, que também está de acordo com maior parte dos estudos realizados com outras estirpes desta espécie. A análise dos ácidos gordos dos extractos das duas estirpes mostrou a predominância do ácido oleico (C18:1, 42% a 63%) e do ácido palmítico (C16:0, 8% a 18%), considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade. As duas estirpes cultivadas mostraram habilidade para crescer, produzir óleo e remover nutrientes como nitratos, nitritos, amónia e fosfatos em águas residuais pré-tratadas. Pelos resultados deste trabalho é obvio que muito permanece por ser aprendido acerca do crescimento e produção lipídica destas estirpes de *B. braunii*, isto é, toda a influência das condições de cultura que permita maximizar a produtividade em biomassa e em óleo. Se a intenção for valorizar estas duas estirpes da microalga *B. braunii* do ponto de vista económico, muitos aspectos já avaliados e dados disponíveis, não apontam ainda para um potencial de implementação a larga escala e aproveitamento do biodiesel derivado muito elevado, num futuro muito próximo.

## Bibliografia

- Agarwal, A.K., 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33: 233–71.
- Amin, S., 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50: 1834–1840.
- An, J.-Y., Sim, S.-J., Lee, J.S., Kim, B.-W., 2003. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* 15: 185–191.
- Bailliez, C., Largeau, C., Casadevall, E., 1985. Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 23:99-105.
- Balat M., 2007. Production of biodiesel from vegetable oils: a survey. *Energy Sources*, 29:895–913.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol*, 22:245–79.
- Basha, S.A., Gopal, K.R., Jebaraj, S., 2009. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:1628–1634
- Becker, E.W., 1994. Microalgae: biotechnology and microbiology. In: *Baddiley, J. (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, New York*.
- Belcher, J.H., 1968. Notes on the Physiology of *Botryococcus braunii* Kiitzing. *Archiv für Mikrobiologie*, 61, 335–346.
- Bendschneider, K., Robison, N. J., 1952. A new spectrophotometric determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research*, 11: 87–96.
- 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.
- Bozbas, K., 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12:542–52.
- BP, 2007. Statistical Review of World Energy. *Disponível em: <http://www.bp.com>*. Acesso: 14/05/2007.
- Brown, A.C., Knights, B.A., Ellisie, C., 1969. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 8:543–7.
- Canakci, M., Van Gerpen, J., 2001. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the Asae*, 44:1429-1436.
- Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D., Desanti, O., 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell structure, and phosphate nutrition. *Biotechnol Bioeng*, 27:286–295.
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3).
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294–306.
- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Collis, P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journ. Microbiol. Methods*, 6:333-345
- Danielo, O., 2005. An algae-based fuel. *Biofutur*, 255.
- Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S., Ravishankar, G.A., 2005. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry*, 40:3125–3131.
- Dayananda, C., Saradaa, R., Ranib, M.U., Shamalab, T.R., Ravishankara, G.A., 2007. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31:87–93.

- Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2006. Influence of Nitrogen Sources on Growth, Hydrocarbon and Fatty Acid Production by *Botryococcus braunii*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5 (5):799-804.
- Demirbas, A., 2008a. Biodiesel: a realistic fuel alternative for Diesel engines. London: Springer.
- Demirbas, A., 2008b. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49:2106–2116.
- Demirbas, A., 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, 86(1):108-117. doi:10.1016/j.apenergy.2009.04.036
- Demirbas, A., 2006. Global biofuel strategies. *Energy, Education, Science and Technology*, 17, 27–63.
- Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:235–240.
- EIA, Energy Information Administration, International Energy Outlook 2009. DOE/EIA-0484(2009). Disponível em: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/transportation.html>. Acesso: 13/07/2009.
- EPEA, 2007. A Scientific Assessment of Environmental and Social Impacts of First-Generation Biofuels. *EPEA Environmental Protection Encouragement Agency*, Hamburg, Final Report.
- Eriksen, N.T., (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9):1525-1536.
- Escobar, J.C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yáñez, E.E., Castillo, E.F., Almazan, O., (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:1275–1287.
- European Commission, 2007. The impact of a minimum 10% obligation for biofuel use in the EU-27 in 2020 on agricultural markets, impact assessment renewable energy roadmap. *European Commission* (EC), Directorate-General For Agriculture and Rural Development;
- Falkowski, P., Raven, J., 1997. Aquatic Photosynthesis. *Malden: Blackwell*.
- Fernando, S., Hall, C., Jha, S., 2006. NOx reduction from biodiesel fuels. *Energy Fuels*, 20:376–382.
- Ferrari, R.A., Oliveira, V.S., Scabio A., 2005. Biodiesel de Soja - Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Quim. Nova*, 28(1):19-23.
- Fulton, L., Howes, T., Hardy, J., 2004. Biofuels for Transport: An International Perspective. *International Energy Agency*, Paris.
- Gielen, D., Unander, F., 2005. Alternative Fuels: An Energy Technology Perspective. *International Energy Agency*. ETO/2005/012, IEA/ETO Working Paper.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36(2):269-274.
- Goyal, H.B., Seal, D., Saxena, R.C., 2008. Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12:504–517.
- Grasshoff, K., 1976. Methods of Seawater Analysis. *Verlag Chemie*, New York.
- Hansen, J., Sato, M., Kharecha, P., Beerling, D., Berner, R., Masson-Delmotte, V., Pagani, M., Raymo, M., Royer, D.L., Zachos, J.C., 2008. Target Atmospheric CO<sub>2</sub>: Where Should Humanity Aim? *The Open Atmospheric Science Journal*, 2:217-231.
- Hejazi, M.A., Wijffels, R.H., 2004. Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology* 22(4):189-194.
- Henke, J.M., Klepper, G., Schmitz, N., 2005. Tax exemption for biofuels in Germany: is bio-ethanol really an option for climate policy? *Energy*, 30:2617–2635.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS*, 103(30):11206–11210.

- Hoek, C. van den, Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. Algae: an introduction to Phycology. *Cambridge University Press*, Cambridge, 623p.
- Hoekman, S.K., 2009. Biofuels in the U.S. – Challenges and Opportunities. *Renewable Energy*, 34:14–22
- Hosseinpour, A.R., Forouzanfar, M.H., Yunesian, M., Asghari, F., Naieni, K.H., Farhood, D., 2005. Air pollution and hospitalization due to angina pectoris in Tehran. *Environ Res*, 99:126–31.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54:621–639.
- Huber, G.W., Iborra, S., Corma, A., 2006. Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. *American Chemical Society*.
- IEA, International Energy Agency, 2006. Key world energy statistics. Disponível online em: <http://www.iea.org/Textbase/nppdf/free/2006/Key2006.pdf>. Acesso: 13/ 07/2009.
- Indarti, E., Majid, M., Hashim, R., Chong, A., 2005. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:161–170.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 27:31–36
- Kesse, D.G., 2000. Global warming—facts, assessment, countermeasures. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 26:157–68.
- Kim, S., Dale, B.E., 2005. Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel. *Biomass Bioenergy*, 29:426–39.
- Knothe, G., Dunn, R.O., Bagby, M.O., 1997. Biodiesel: The Use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels. *Agricultural Research Service*, U.S Department of Agriculture.
- Kojima, E., Zhang, K., 1999. Growth and hydrocarbon of microalga *B. braunii* in bubble column photobioreactors. *J. Biosci. Bioeng.*, 87:811–815.
- Koroleff, F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Int. Counc. Explor. Sea (ICES) Comm. Meet. Pap.* 1969/C: 9; revised 1970: 19–22.
- Largeau, C., Casadevall, E., Berkaloff, C., Dharnliencourt, P., 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 19:1043–1051.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., 2009. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2009.03.058.
- Lee, S.J., Yoon, B.D., Oh, H.M., 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.*, 12:553–556.
- Li, Y., Qin, J.G., 2005. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *J Appl Phycol*, 17:551–556
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N., 2008. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.*, 24(4):815–820.
- Lynd, L.R., Laser, M.S., Bransby, D., Dale, B.E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M., Keller, M., McMillan, J.D., Sheehan, J. et al., 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*, 26:169–172.
- Ma, F., Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70:1–15
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2009. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry. Rome, FAO. *FAO Fisheries Technical Paper*, 441.
- Meier, R.L., 1955. Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels. In: Daniels, F., Duffie, J.A. (Eds.), Solar Energy Research. *Madison University Wisconsin Press*, Wisconsin, 179–183.

- Metzger, P., Berkaloof, C., Casadevall, E., Coute, A., 1985. Alkadiene- and botryococcene producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry*, 24: 2305-2320.
- Metzger, P., Largeau, C., 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5):486-496.
- Miao, X.L., Wu, Q.Y., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97:841-846.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Ación Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv*, 20:491–515.
- National Biodiesel Board, 1998. In: *Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos*; Instituto de Tecnologia do Paraná, Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Curitiba, PR, 19 a 22 de julho, 1998, p. 42.
- NEIC (National Energy Information Center), 2009. Greenhouse gases, climate change, and energy. *Energy Information Administration*. Disponível online em: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/1605/ggcebro/chapter1.html>. Acesso 10/07/2009.
- Nyberg, H., 1986. GC-MS methods for lower plant glycolipid fatty acids. In *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Linskens, H. F., Jackson, J. F., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 3:67-99.
- Oil and Gas Journal, 2005. Worldwide look at reserves and production. *Oil and Gas Journal* 103:24-25.
- Órpez, R., Martínez, M.E., Hodaifa, G., Yousfi, F., Jbari, N., Sánchez, S., 2009. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Desalination* 246:625–630.
- Packer, M., 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy*, 37(9):3428-3437.
- Pal, D., Prakash, D., Amla, D.V., 1998. Chemical composition of the green alga *Botryococcus braunii*. *Cryptogamie: algologie*, Paris, 19(4):311-317.
- Patil, V., Tran, K.Q., Giselrod, H.R., (2008). Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7):1188-1195.
- Patzek, T.W., Anti, S.-M., Campos, R., Ha, K.W., Lee, J., Li, B., Padnick, J., Yee, S.-A., 2005. Ethanol from corn: clean renewable fuel for the future, or drain on our resources and pockets? *Environment, Development and Sustainability*, 7:319–336.
- Puppán, D., 2002. Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica Series Society Man Science*, 10:95–116.
- Qin, J., 2005. Bio - Hydrocarbons from Algae: impacts of temperature, light and salinity on algal growth. *Rural Industries Research and Development Corporation* (2005). RIRDC Publication No 05/025.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R., 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2):77–88.
- Ramanathan, V., Feng, Y., 2009. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmospheric Environment*, 43: 37–50.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T.R., Ravishankar, G.A., 2007a. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98:560–564.
- Rao, A.R., Sarada, R., Ravishankar, G.A., 2007b. Influence of CO<sub>2</sub> on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(3):414–419.
- Reijnders, L., 2008. Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? *Trends in Biotechnology*, 26(7):349-350.
- REN21 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century), 2007. Global status report on renewable. Disponível online em: [http://www.ren21.net/pdf/RE2007\\_Global\\_Status\\_Report.pdf](http://www.ren21.net/pdf/RE2007_Global_Status_Report.pdf). Acesso: 20/07/2009.

- Roberts, P., 2004. *The End of Oil: On the Edge of a Perilous New World*. Houghton Mifflin. New York, New York.
- Runge, C.F., Senauer, B., 2007. How biofuels could starve the poor. *Foreign Affairs*, 86(3):41–54.
- Ryan, L., Convery, F., Ferreira, S., 2006. Stimulating the use of biofuels in the European Union: implications for climate change policy. *Energy Policy*, 34(17):3184–3194.
- Sawayama, S., Minowa, T., Dote, Y., Yokoyama, S., 1992. Growth of the hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38:135-138.
- Sawayama, S., Inoue, S., Yokoyama, S., 1994. Continuous culture of hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41:729-731.
- Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B., 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:167–178.
- 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. *Bioenerg. Res.*, 1:20 – 43.
- Shahid, E.M., Jamal, Y., 2008. A review of biodiesel as vehicular fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12:2484–2494.
- Sheehan, J., Cambreco, V., Duffield, J., Garboski, M., Shapouri, H., 1998a. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. *A report by US Department of Agriculture and Energy*, 1–35.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998b. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program—biodiesel from Algae. *National Renewable Energy Laboratory (NREL) Report: NREL/TP-580-24190*, Golden, CO.
- Sim, S.-J., An, J.-Y., Kim, B.-W., 2001. Two-phase extraction culture of *Botryococcus braunii* producing long-chain unsaturated hydrocarbons. *Biotechnology Letters* 23:201–205.
- Singh, Y., Kumar, H.D., 1992. Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus* spp. under nitrogen limitation and anaerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:121-124
- Skov, A.M., 2003. World Energy Beyond 2050. SPE, *Journal of Petroleum Technology*, 77506-MS. DOI 10.2118/77506-MS.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87–96.
- Tran, H.-L., Hong, S.-J., Lee, C.-G., 2009. Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from *Botryococcus braunii* LB 572 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14:187-192.
- van der Laaka, W.W.M., Raven, R.P.J.M., Verbong, G.P.J., 2007. Strategic niche management for biofuels: analyzing past experiments for developing new biofuel policies. *Energy Policy*, 35:3213–3225.
- van Harmelen, T., Oonk, H., 2006. Microalgae Biofixation Processes: Applications and Potential Contributions to Greenhouse Gas Mitigation Options. *International Network on Biofixation of CO<sub>2</sub>, International Energy Agency, Greenhouse Gas R&D Program*.
- Veziroglu, T.N., Sahin, S., 2008. 21st Century's energy: Hydrogen energy system. *Energy Conversion and Management*, 49:1820-1831.
- Xu, H., Miao, X.L., Wu, Q.Y., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126:499-507.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5):707–18.
- Wolf, F.R. 1983. *Botryococcus braunii*. An Unusual Hydrocarbon-Producing Alga. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 8:249.

Wolf, F.R., Nonomura, A.M., Bassham, J.A., 1985. Growth and Branched Hydrocarbon Production in a Strain of *Botryococcus braunii* (chlorophyta). *J. Phycol.*, 21:388.

Zhu, X.G., Long, S.P., Ort, D.R., 2008. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr Opin Biotechnol*, 19:153-159.

**Anexos****BOLD'S BASAL MEDIUM  
(BBM) Modified from original**

Reference: Stein, J. (ED.) Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*. 448 pp.

This medium is highly enriched and is used for many of the green algae.

STOCK	STOCK SOLUTION	ml/Litre
1. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.75 g/500 ml	10 ml
2. CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.25 g/500 ml	10 ml
3. MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.75 g/500 ml	10 ml
4. NaNO <sub>3</sub>	12.5 g/500 ml	10 ml
5. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.75 g/500 ml	10 ml
6. NaCl	1.25 g/500 ml	10 ml
7. Na <sub>2</sub> EDTA	10 g/L	1 ml
KOH	6.2 g/L	
8. FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.98 g/L	1 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc.)	1 ml/L	
9. Trace Metal Solution	See below*	1 ml
10. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.75 g/500 ml	0.7 ml

<b>*Trace Metal</b>	<b>Solution:</b>
Substance	g/Litre
1. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
2. MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g
3. ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222 g
4. Na MoO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.390 g
5. CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079 g
6. Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0494 g

Dissolve each of the above substances for the Trace Metal solution separately, prior to adding the next on the list.

Adjust the pH of the medium to 6.8 with NaOH or HCL and autoclave.

OPTIONS: As this is a highly enriched medium it can be diluted to 10% of the above concentrations and used successfully when fast and dense growth is not required. For 10% BBM, use 100 ml of 100% BBM/Litre of distilled water. The addition of 5 ml/L of soil extract is also beneficial to some algae particularly when problems with poor growth or morphology occur.

### CHU-10 (MODIFIED by J. Acreman, UTCC)

**Reference:** Stein, J (ED.) 1973. Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*. 448 pp.

STOCK	STOCK SOLUTION	ml/Litre
1. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	5.8 g/L	10 ml
2. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	57.56 g/L	1 ml
3. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	10 g/L	1 ml
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25 g/L	1 ml
5. Fe-EDTA	see recipe below	0.8 ml
6. $\text{Na}_2\text{CO}_3$	20 g/L	1 ml
7. F/2 Vitamins	see below*	1 ml
8. Trace metal mix	see below**	1 ml

#### \*Fe-EDTA stock solution:

Boil 1 Litre of water to remove the  $\text{CO}_2$ . Dissolve 5.2 of EDTA (**NOT sodium EDTA**) in about 950 ml of distilled water, with 5.4 g of  $\text{KHCO}_3$ . Add 5.0 g of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and make final volume to 1000 ml. Adding 1 ml/L of this stock to the medium gives a final concentration of 1 mg Fe/ml.

Instead of Fe-EDTA, one could also use one of the following:

1.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (3.15 g/L) and  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (4.36 g/L). Add 1ml/L to medium
2. Fe citrate (3.35 g/100 ml) and Citric acid (3.35 g/100 ml). Add 1ml/L to medium

#### \*\* Trace metal mix

Substance	g/Litre
1. $\text{Na}_2\text{EDTA}$	1.00 g
2. $\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86 g
3. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g
4. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222 g
5. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.390 g
6. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g
7. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0494 g

Dissolve each of the above substances separately prior to adding the next.

Adjust pH of the final CHU-10 medium to 6.4 for diatoms and green algae or to 8.5 for cyanobacteria.

#### CHU-10 VARIATIONS

1. CHU-10 Basic, i.e. the recipe above.
2. CHU-10 with Soil Extract, (5-10% soil extract)
3. CHU-10 with agar: add 15 g of Difco Bacto agar/L of medium)

**Água Residual (meio ETAR)**

Variável	Valores
NO <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> (N μg.L <sup>-1</sup> )	3001,46
NH <sub>4</sub> (N μmol.L <sup>-1</sup> )	64,05
PO <sub>4</sub> (P μg.L <sup>-1</sup> )	2419,70
pH	7,85

Características da água residual pré-tratada usada nas culturas