

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Produção de biodiesel a partir da cultura de
microalga *Chlorella* sp.**

Ana Catarina Figueira Nunes

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Sara Raposo

2014

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Produção de biodiesel a partir da cultura de
microalga *Chlorella* sp.**

Ana Catarina Figueira Nunes

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Sara Raposo

2014

Produção de biodiesel a partir da cultura de microalga *Chlorella* sp.

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da lista de referências incluída.

(Ana Catarina Figueira Nunes)

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria Emília Costa pela oportunidade concedida na realização deste trabalho no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental.

À Professora Doutora Sara Raposo agradeço por ter aceite ser minha orientadora, pelo apoio, pela paciência, pelo conhecimento e pelo interesse demonstrados ao longo deste tempo.

A todos os colegas do laboratório pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram e em especial ao Fábio Guerreiro pela paciência e apoio prestados.

À Ana Caramelo, Ana Matos, Jaqueline, Catarina, Carla e Dulce pela amizade e por estarem sempre presentes quando precisei.

Em especial à minha grande amiga Carina por todos estes anos de amizade e cumplicidade. Por todos os momentos de estudo, gargalhadas, palavras de incentivo, pelo apoio durante todo este percurso académico e principalmente pela paciência nos momentos em que as dificuldades surgiram. Obrigada!

Ao meu namorado, André Maximiano, pela paciência e carinho nas fases mais difíceis.

Ao meu irmão pela amizade e preocupação.

E por último, agradeço aos meus pais, pelo amor, apoio e incentivo que sempre me deram e por toda a paciência que tiveram.

RESUMO

O biodiesel tem atraído cada vez mais atenção como uma energia limpa para substituir o combustível convencional. Em Portugal é produzido principalmente a partir de óleos virgens, o que faz com que o país dependa de fornecimento de matéria-prima importada e da variação dos seus preços no mercado internacional, elevando os custos da produção deste biocombustível. Com o interesse de reduzir esses custos, as microalgas têm sido consideradas como alternativa aos produtos agrícolas para a produção de óleos.

Neste trabalho, procedeu-se ao crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*, em Erlenmeyer, em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas, utilizando como fonte de carbono a glucose e um resíduo agroindustrial, o resíduo de polpa de alfarroba, de forma a avaliar o rendimento lipídico. Os resultados obtidos revelaram que em sistema mixotrófico, a microalga tem a capacidade de acumular maior quantidade de lípidos, relativamente às restantes condições autotróficas e heterotróficas, utilizando glucose como fonte de carbono. O crescimento em mixotrofia com a microalga *C. sorokiniana*, atingiu um rendimento de 0,239 g lípidos/g biomassa (24 % p/p) e uma concentração máxima de lípidos de 391 mg/L.

O crescimento desta microalga em meio com limitação de azoto, em que se aumentou o rácio C/N 35 para 70, apresentou um aumento do conteúdo lipídico relativamente ao ensaio sem limitação de azoto, tanto em heterotrofia como em mixotrofia. Obteve-se um aumento no rendimento de lípidos de 24 para 49 % (p/p) em mixotrofia e em heterotrofia de 21 % para 42 % (p/p), utilizando glucose como fonte de carbono. Com um rácio C/N 70, meio com limitação de azoto, observou-se igualmente uma diminuição no tempo de cultura em que se atingiu a concentração máxima de lípidos, cerca de 564 mg/L, com um rendimento de 0,491 g lípidos/g biomassa, em mixotrofia, utilizando glucose como fonte de carbono.

Os ácidos gordos maioritários são os ácidos oleico e linoleico, seguindo-se dos ácidos esteárico e palmítico. O perfil lipídico dos óleos produzidos pela microalga *Chlorella sorokiniana* apresenta semelhanças aos óleos vegetais, sugerindo a produção de óleos a partir de cultura de microalgas para utilização na produção de biodiesel.

Palavras-chave: Biodiesel; microalgas, *Chlorella sorokiniana*, mixotrofia, lípidos, limitação de azoto

ABSTRACT

Biodiesel has been attracting increased attention as a clean energy to replace conventional fuels. In Portugal it is mainly produced from virgin vegetable oils, which makes the country too dependent on the supply of imported raw materials and their price variations in the international market, leading to increased costs on biofuel production. With the goal of reducing these costs, microalgae have been considered an alternative to crop-based fuels.

In this work, microalgae *Chlorella sorokiniana* cultures were grown in Erlenmeyer, under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions using glucose and an agroindustrial residue, carob pulp, as carbon sources, in order to evaluate the lipid yield. The results showed that in mixotrophic system, the microalgae is capable of accumulating higher lipid contents, when compared to the remaining autotrophic and heterotrophic conditions, using glucose as the carbon source. The growth of the microalgae *C. sorokiniana* in mixotrophy reached a yield of 0.239 g_{lipid}/g biomass (24% w/w) and a maximum lipid concentration of 391 mg/L.

The growth of this microalgae in a medium with nitrogen limitation, where the C/N ratio is increased from 35 to 70, shows an increase in lipid content when compared to the assay without nitrogen limitations, both in heterotrophy and mixotrophy. The lipidic yield increased from 24 to 49% (w/w) under mixotrophic conditions, while in heterotrophy, using glucose as carbon source, the yield of lipids increased in from 21% to 42% (w/w). In a medium with nitrogen limitation, using glucose as the carbon source with a C/N ratio of 70, it was also observed a decrease in the time needed to reach a maximum lipid concentration of about 564 mg/L, with a yield of 0.491g_{lipids}/g_{biomass}, in mixotrophy.

Oleic and linoleic acids represent the majority of the fatty acids, followed by stearic and palmitic acids. The lipidic profile of the oils produced by the microalgae *Chlorella sorokinina* show similarities to vegetable oils, suggesting that the oil produced by cultivation of microalgae is suitable to use in biodiesel production.

Palavras-chave: Biodiesel, microalgae, *Chlorella sorokiniana*, mixotrophy, lipids, nitrogen limitation

LISTA DE ABREVIACÕES

ACCCase – Acetil CoA carboxilase
ADP – Adenosina difosfato
AG – Ácidos gordos
AGL – Ácidos gordos livres
ATP – Adenosina Trifosfato
C_a – Clorofila a
C_b – Clorofila
C_c – Carotenoides
C_T – Clorofila total
C/N – Rácio de carbono azoto
CoA – Coenzima A
DGAT – acil-CoA:diacilglicerol acil-transferase
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico
FAME – Éster metílico de ácido gordo
FAT – ACP-tioesterease
FAZ – sintase de ácidos gordos
G3P – Gliceraldeído 3-fosfato
GPAT – acil-CoA:glicerol-sn-3-fosfato acil-transferase
HPLC – Cromatografia Líquida de elevada eficiência
KAS – cetoacil-ACP sintase
LEBA – Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental
LPA - lisofosfatidato
MAT – malonil-CoA:ACP trasacetilase
NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PA – lisofosfatidato
PAP – fosfatase
PBS – Tampão fosfato
PGA – Ácido fosfoglicérico
rpm – Rotações por minuto
RuBP – Ribulose 1,5-difosfato
Ru5P – Ribulose 5-fosfato

TAG - Triglicéridos

UF – Unidades de fluorescência

$Y_{L/S}$ – Rendimento de lípidos relativamente ao substrato

$Y_{L/X}$ – Rendimento de lípidos relativamente à biomassa

$Y_{X/S}$ – Rendimento de biomassa relativamente ao substrato

$\mu_{\text{máx}}$ – Taxa específica de crescimento máxima

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ASPETOS GERAIS	1
1.1.1. Biodiesel.....	2
1.1.2. Impacto económico-ambiental.....	3
1.2. MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	4
1.2.1. Microalgas	6
1.2.2. Fotossíntese.....	8
1.2.3. Pigmentos: Clorofilas e Carotenoides	10
1.2.4. Biossíntese de lípidos	11
1.2.4.1. Síntese de Triglicéridos	12
1.2.5. Fatores que condicionam a acumulação de TAG.....	13
1.2.5.1. Limitação de nutrientes e rácio carbono-azoto (C/N)	14
1.3. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	16
1.3.1. Alfarroba	17
1.3.2. Citrinos	17
1.4. OBJETIVOS.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. MATÉRIA-PRIMA.....	19
2.1.1. Tratamento da matéria-prima – extração dos açúcares solúveis da alfarroba	19
2.2. MICRORGANISMOS	20
2.3. MEIOS DE CULTURA	20
2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DAS MICROALGAS.....	21
2.4.1. Manutenção da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	21
2.5. ENSAIOS EXPERIMENTAIS COM A MICROALGA <i>Chlorella sorokiniana</i>	22
2.5.1. Crescimento da <i>C. sorokiniana</i> em condições autotróficas.....	22
2.5.1.1. Preparação do pré-inóculo.....	22
2.5.1.2. Ensaio experimental em condições autotróficas	23
2.5.2. Crescimento da <i>C. sorokiniana</i> em condições heterotróficas e mixotróficas.....	25
2.5.2.1. Preparação dos pré-inóculos.....	25
2.5.2.2. Ensaio experimental em condições heterotróficas e mixotróficas	25
2.5.3. Crescimento da <i>C. sorokiniana</i> com limitação de azoto em condições heterotróficas e mixotróficas.....	26
2.5.3.1. Preparação dos pré-inóculos.....	27
2.5.3.2. Ensaio experimental em condições heterotróficas e mixotróficas	27

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	27
2.6.1. Determinação da densidade ótica	27
2.6.2. Determinação da biomassa.....	28
2.6.3. Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides	28
2.6.4. Quantificação de azoto	29
2.6.5. Quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS	29
2.6.6. Quantificação dos açúcares por índice de refração.....	30
2.6.7. Quantificação dos lípidos neutros por fluorescência	30
2.6.8. Extração de lípidos intracelulares	31
2.6.9. Quantificação e análise do perfil de ácidos gordos.....	32
2.7. PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO.....	33
2.7.1. Taxa específica de crescimento	33
2.7.2. Rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido	33
2.7.3. Rendimento de lípidos produzidos em função do substrato consumido	34
2.7.4. Rendimento de lípidos produzidos em função da biomassa	34
2.7.5. Produtividade específica máxima de lípidos	34
2.7.6. Produtividade específica máxima de clorofila a	35
2.7.7. Produtividade específica máxima de clorofila b.....	35
2.7.8. Produtividade específica máxima de clorofila total	36
2.7.9. Produtividade específica máxima de carotenoides.....	36
2.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. ESTABELECIMENTO EM PLACA DAS MICROALGAS A DIFERENTES FONTES DE CARBONO	37
3.1.1. <i>Chlorella sorokiniana</i>	37
3.1.2. <i>Picochlorum</i> sp <i>HMI</i>	39
3.2. ENSAIOS DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Chlorella sorokiniana</i>	41
3.2.1. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> em condições autotróficas.....	41
3.2.2. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> em condições heterotróficas e mixotróficas, usando como fonte de carbono glucose.....	44
3.2.3. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> em condições heterotróficas e mixotróficas, utilizando como fonte de carbono o resíduo de polpa de alfarroba	49
3.2.4. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> com limitação de azoto em condições heterotróficas e mixotróficas	54
3.2.4.1. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> em heterotrofia e mixotrofia, usando como fonte de carbono glucose	55
3.2.4.2. Crescimento da microalga <i>C. sorokiniana</i> em heterotrofia e mixotrofia, utilizando resíduo de polpa de alfarroba como substrato	60
3.3. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	64
4. CONCLUSÃO	68
5. PERSPETIVAS FUTURAS	69
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Reação de transesterificação. R1, R2, R3 correspondem às cadeias de ácidos gordos. (Adaptado de Marchetti <i>et al.</i> , 2007).	3
Figura 1.2 - Diagrama de fluxo das diversas potencialidades das microalgas (Adaptado de Costa e Morais, 2011).	7
Figura 2.1 – Montagem do ensaio em autotrofia para <i>Chlorella sorokiniana</i> . (1) Lâmpada luorescente (18 W); (2) Garrafa de dióxido de carbono; (3) Bomba de ar de aquário; (4) Filtro de ar.	24
Figura 2.2 - Ensaio da cultura de <i>Chlorella sorokiniana</i> em condições de heterotrofia e mixotrofia. (A) Heterotrofia; (B1) Mixotrofia com 10 g/L de glucose como fonte de carbono; (B2) Mixotrofia com 10 g/L de extrato da polpa de alfarroba como fonte de carbono.	26
Figura 2.3 - Curva padrão de lípidos neutros. Registou-se o espectro (comprimento de onda de excitação 530 nm) para soluções de trioleína com diferentes concentrações. Retas de regressão linear obtida: Fluorescência (u.f./mL) = 44663 x Concentração de trioleína (g/L) + 5,6753; $R^2 = 0,9976$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.	31
Figura 3.1 - Cultura de <i>Chlorella sorokiniana</i> em placas. (A) Meio Seuoka, em autotrofia; (B) Meio Seuoka com 56 mM de glucose, em mixotrofia; (C) Meio Seuoka com 56 mM glucose, em heterotrofia; (D) Meio Seuoka com 30 mM de sacarose, em mixotrofia; (E) Meio Seuoka com 34 mM de extrato de alfarroba, em mixotrofia; (F) Meio Seuoka com 34 mM de extrato de alfarroba, em heterotrofia.	39
Figura 3.2 - Cultura de <i>Picochlorum</i> sp <i>HMI</i> em placas. (A) Meio F/2, em autotrofia; (B) Meio F/2 com 10 mM de resíduo de alfarroba; (C) Meio F/2 com 50 mM de glucose; (D) Meio F/2 com 10 mM de resíduo de alfarroba e 63 mM de resíduo de citrinos.	40
Figura 3.3 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, pigmentos totais, clorofila a, b e carotenoides, ao longo do ensaio experimental pela <i>Chlorella sorokiniana</i> em Erlenmeyer (312h). Condições de cultura: $28 \pm 1^\circ \text{C}$, 150 rpm e sob luz contínua. (A) CO_2 + Ar + Agitação, (B) Ar + Agitação, (C) Agitação.	42
Figura 3.4 - Perfil de crescimento da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> . (A) Crescimento em condições heterotróficas, (B) crescimento em condições mixotróficas. O crescimento decorreu durante 384, em Erlenmeyer, com 10 g/L de glucose, numa agitadora orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ \text{C}$	45
Figura 3.5 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, e substrato e azoto consumidos, pela microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> ao longo do tempo de cultura em Erlenmeyer (288h) em crescimento heterotrófico (A) e mixotrófico (B) com uma concentração inicial de açúcar de 10 g/L de resíduo de polpa de alfarroba, numa agitadora orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ \text{C}$	50
Figura 3.6 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, substrato (glucose) e azoto (nitrato) consumidos, pela microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> crescida em Erlenmeyer, durante 312h em condições de crescimento heterotrófico (A) e mixotrófico (B), usando como fonte de carbono glucose (10 g/L) e um rácio C/N 70. O ensaio decorreu a $28 \pm 1^\circ \text{C}$, em agitadora orbital a 150 rpm, sob a presença de luz contínua (ensaio mixotrófico) e no escuro (ensaio heterotrófico).	56

Figura 3.7 - Perfil de acumulação de lípidos intracelulares totais, biomassa produzida, substrato e azoto consumidos, pela microalga *Chlorella sorokiniana* crescida em Erlenmeyer (360h) em sistema heterotrófico (A) e mixotrófico (B), com 10 g/L de resíduo de alfarroba e limitação de azoto (C/N 70). O ensaio decorreu ao longo de 360 h, em agitadora orbital a 150 rpm e à temperatura, 28 ± 1 °C..... 61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Conteúdo em óleo de alguns microrganismos (adaptado de Deng <i>et al.</i> , 2009; Meng <i>et al.</i> , 2009; Singh <i>et al.</i> , 2011; Ratledge, 1997).	5
Tabela 1.2 - Composição lipídica de alguns microrganismos (adaptado de Meng <i>et al.</i> , 2009).	6
Tabela 1.3 – Conteúdo lipídico da microalga <i>Chlorella protothecoides</i> , cultivada em diferentes fontes e concentrações de azoto (Shen <i>et al.</i> , 2009).....	16
Tabela 2.1 - Composição do meio Seuoka (adaptado de Seuoka, 1960; Seuoka <i>et al.</i> , 1967).	20
Tabela 2.2 - Composição do meio F/2 (Adaptado de Guillard e Ryther, 1962).	21
Tabela 2.3 - Composição do meio Seuoka para regime heterotrófico e mixotrófico (adaptado de Seuoka, 1960; Seuoka <i>et al.</i> , 1967).	25
Tabela 3.1 - Parâmetros cinéticos determinados para a cultura da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes condições de crescimento em autotrofia, em Erlenmeyers que decorreu numa agitadora orbital a 28 ± 1 °C, 150 rpm durante 312 h, sob luz contínua. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	43
Tabela 3.2 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes metabolismos, heterotrofia e mixotrofia, com 10 g/L de glucose. Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, 28 ± 1 °C, durante 384 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	46
Tabela 3.3 - Concentração máxima de lípidos, rendimento e produtividade de lípidos, produtividades de clorofila total e carotenoides, nos diferentes metabolismos de crescimento autotrofia (CO ₂ +Ar+Agitação), heterotrofia e mixotrofia, utilizando glucose como substrato. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	48
Tabela 3.4 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> crescida em diferentes condições, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de resíduo de polpa de alfarroba. Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, 28 ± 1 °C, durante 288 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	53
Tabela 3.5 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes metabolismos, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de glucose e limitação de azoto (C/N 70). Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, 28 ± 1 °C, durante 312 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	57
Tabela 3.6 – Rendimentos, produtividades e lípidos máximos obtidos no ensaio sem limitação de azoto (C/N 35) e com limitação de azoto (C/N 70), em heterotrofia (H) e mixotrofia (M) utilizando glucose como substrato.	59
Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes metabolismos, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de resíduo de alfarroba e limitação de azoto (C/N 70). Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, 28 ± 1 °C, durante 360 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	62
Tabela 3.8 - Composição de ácidos gordos dos lípidos extraídos de culturas de <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes condições de crescimento em comparação com os ácidos gordos que constituem o óleo de diferentes microalgas, leveduras, e o óleo de colza e de soja.	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPETOS GERAIS

A constante subida do preço dos combustíveis fósseis aliada à preocupação sobre o impacto ambiental devido às emissões gasosas que contribuem para o aquecimento global, levam à procura de recursos renováveis que suportem as necessidades do mercado.

Sabe-se que o setor dos transportes é o maior responsável pelas emissões de dióxido de carbono. Por razões ecológicas, o Conselho Europeu adotou uma estratégia na União Europeia a favor do desenvolvimento sustentável, que consiste num conjunto de medidas, nomeadamente o desenvolvimento dos biocombustíveis, exigindo a diminuição da dependência do petróleo por parte do setor dos transportes, através da utilização da chamada “energia limpa”. Estas imposições fazem parte do pacote de medidas necessárias para dar cumprimento ao Protocolo de Quioto e ao Plano Estratégico de Bali.

O Decreto-Lei nº 39/2013 de 18 de março promove a utilização de combustíveis renováveis ou biocombustíveis nos transportes, estabelecendo que cada Estado-Membro da União Europeia até 2020 deve incorporar 10% de biocombustíveis em toda a gasolina e gasóleo vendidos.

O Decreto-Lei nº 39/2013 de 18 de março e o Decreto-Lei nº141/2010 de 31 de dezembro, definem biocombustível como os combustíveis líquidos (biodiesel e bioetanol) ou gasosos (biogás) para os transportes, produzidos a partir de biomassa, sendo esta a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura, incluindo substâncias de origem vegetal e animal, da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos. Os novos tipos de combustíveis alternativos devem respeitar as normas técnicas que implicam os requisitos relativos às emissões e respetivo controlo.

O incentivo ao uso e à produção de biocombustíveis, de certa forma, pode vir a reduzir as emissões de gases com efeito de estufa e a dependência das importações de energia. Tanto que, a maior parte dos veículos em circulação na União Europeia, possui a capacidade de utilizar os biocombustíveis, em estado puro (biodiesel puro – B100) ou em mistura (BXX), sem qualquer problema. Há países em que já se utiliza misturas com 10 % ou mais de biocombustíveis.

Os principais biocombustíveis produzidos são o bioetanol e o biodiesel. O custo da matéria-prima tradicionalmente usada (óleos vegetais) para a produção de biodiesel representa cerca

de 80 % do custo de produção, sendo este o principal obstáculo à comercialização do produto (Haas *et al.*, 2006; Knothe e Gerpen, 2005).

O biodiesel tem cada vez mais destaque no âmbito da sustentabilidade ambiental, por ser não-tóxico, biodegradável e renovável, permitindo a redução das emissões poluentes, como é o caso dos gases com efeito de estufa, pelo que é uma forte alternativa aos combustíveis de origem petrolífera (Ma e Hanna, 1999; Krawczyk, 1996).

Os biocombustíveis são classificados de acordo com a fonte de matéria-prima utilizada: a primeira geração engloba os biocombustíveis fabricados a partir de matérias vegetais (milho, girassol, colza, cana-de-açúcar, etc.) produzidos pela agricultura e que competem com a alimentação, através do uso extensivo de terrenos agrícolas; os biocombustíveis de segunda geração usam como matéria-prima a celulose e outras fibras vegetais; e por fim os biocombustíveis de terceira geração são aqueles que usam microrganismos, nomeadamente microalgas e fungos (Nigam *et al.*, 2011).

1.1.1. Biodiesel

Em Portugal, o Decreto-Lei nº 39/2013, define biodiesel como éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de gasóleo, para utilização como biocombustível.

O biodiesel comercializado em mistura com o diesel de petróleo possui uma nomenclatura universal que nos permite identificar a concentração de biodiesel na mistura. Essa nomenclatura é conhecida por BXX, onde XX indica a percentagem de biodiesel presente na mistura. Ou seja, B20 significa que se está perante um combustível que tem na sua composição 20 % de biodiesel, e B100 (puro) significa que é unicamente composto por biodiesel.

Para a sua produção podem ser consideradas diversas matérias-primas que contenham ácidos gordos (AG), quer sejam ácidos gordos livres (AGL) ou ligados a outras moléculas. Normalmente são usados os óleos vegetais e gorduras animais ou resíduos de óleos alimentares por terem na sua composição triglicéridos (TAG), que são classificados quimicamente como ésteres de ácidos gordos com glicerol (Haas *et al.*, 2006; Knothe e Gerpen, 2005).

Existem vários processos para a produção de biodiesel: mistura de lípidos com diesel de petróleo, craqueamento térmico de óleos vegetais (pirólise), microemulsão de lípidos de

diesel de petróleo usando co-solventes, e por último, a forma mais comum, a transesterificação (Bournay *et al.*, 2005; Knothe e Gerpen, 2005). A transesterificação (Figura 1.1) consiste na reação dos triglicéridos presentes nos óleos/gorduras com um álcool, normalmente metanol, devido ao seu baixo custo, na presença de um catalisador, que é geralmente uma base. São formados dois produtos, sendo que o principal é o éster metílico de ácidos gordos (FAME – *fatty acid methyl esters*), que é outra designação de biodiesel, e o subproduto é o glicerol, que representa 10 % dos produtos obtidos (Marchetti *et al.*, 2007; Knothe e Gerpen, 2005).

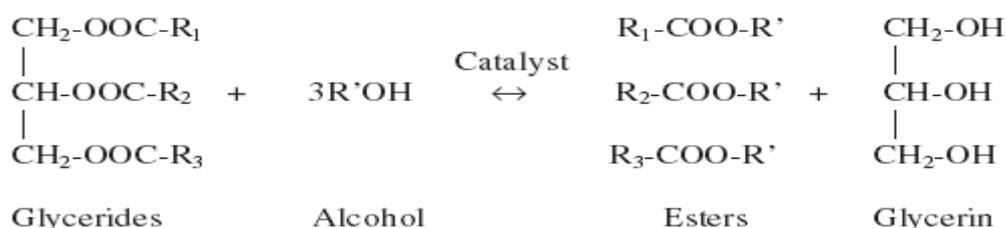


Figura 1.1 - Reação de transesterificação. R1, R2, R3 correspondem às cadeias de ácidos gordos. (Adaptado de Marchetti *et al.*, 2007).

1.1.2. Impacto económico-ambiental

Como já referido anteriormente, o uso contínuo e crescente do petróleo é o principal responsável pela poluição do ar, devido às emissões gasosas, provocando o aquecimento global. Para resolver este problema, foram criados incentivos à produção e ao consumo de biodiesel.

A maior parte da produção deste combustível usa como principal fonte de matéria-prima culturas de plantas oleaginosas, como é o caso do milho, trigo, soja, girassol, colza, etc. O uso destas culturas tem gerado bastante controvérsia, pois são culturas usadas para produção alimentar (Ajanovic, 2011). Para além disso, o uso de culturas agrícolas levanta questões de carácter ético, no que diz respeito à escassez de alimentos e à subida de preços, e também de carácter ambiental, uma vez que a utilização intensiva dos solos promove a libertação de gases de efeito de estufa, supondo um uso excessivo de químicos para controlo de pragas.

Na União Europeia, a Alemanha e França são os grandes produtores de biodiesel, utilizando sobretudo óleo de colza e de soja para a produção de biocombustível (www.ebb-eu.org).

Em 2007, em Portugal, a maioria do óleo utilizado para a produção de biodiesel foi importada, sendo que cerca de 3 % era de culturas nacionais (girassol), 86 % correspondia a

sementes de colza e soja importadas e os restantes 11% a óleos de colza e palma também importados (Ribeiro *et al.* 2013). Uma vez que não há muita produção de soja e colza em Portugal, é necessário importar cerca de 350 milhões de euros de oleaginosas para produção deste biocombustível (www.biodiesel.pt).

Em 2010, os cinco principais produtores de biodiesel em Portugal eram a IBEROL, a Torrejana, Prio-biocombustíveis, a Biovegetal e a Sovena. (www.dgeg.pt; www.appb.pt).

Em 2011, Portugal produziu 287 000 toneladas de biodiesel (www.ebb-eu.org). De acordo com a Direção-Geral de Energia e Geologia (www.dgeg.pt), este biocombustível B10 é comercializado atualmente a um valor médio de 1,394 €/L (valores atualizados em maio de 2014).

Como referido anteriormente, a escolha da matéria-prima é de extrema importância uma vez que pode representar 80% dos custos totais de produção (Haas *et al.*, 2006). Na procura de alternativas viáveis, vários microrganismos, em especial as microalgas, têm demonstrado ser uma fonte de energia promissora, uma vez que apresentam taxas de crescimento mais elevadas, maior rendimento de biomassa, não entram em competitividade com a segurança alimentar e não requerem o uso extensivo de terras para uso de culturas (Singh *et al.*, 2011; Chisti, 2007).

1.2. MICRORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Os microrganismos na sua composição possuem lípidos essenciais, que se encontram integrados em estruturas, sendo responsáveis pelo funcionamento das membranas e estruturas membranosas, mas nem todos podem ser considerados fontes ricas em óleos. Microrganismos oleaginosos são aqueles que têm capacidade de acumular mais de 20 % da sua biomassa seca em lípidos. Os óleos microbianos são muitas vezes designados “*single cell oils*” (SCO) e são produzidos por microalgas, fungos, leveduras e bactérias. O conteúdo (Tabela 1.1) e a composição lipídica (Tabela 1.2) podem variar consoante o microrganismo e as condições de cultura, podendo ser condicionantes alguns parâmetros como o pH, temperatura, composição do meio de cultura, ou a agitação (Meng *et al.*, 2009).

Tabela 1.1 - Conteúdo em óleo de alguns microrganismos (adaptado de Deng *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011; Ratledge, 1997).

Microrganismo	Conteúdo em óleo (% peso seco)	Microrganismo	Conteúdo em óleo (% peso seco)
Microalgas		Leveduras	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66
<i>Chlorella protothecoides</i>	14 - 57	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Dunaliella sp.</i>	17 - 67	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
Fungos		Bactérias	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57	<i>Arthrobacter sp.</i>	>40
<i>Mortierella isabellina</i>	86	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	22-38
<i>Humicola lanuginosa</i>	75		

Na Tabela 1.1 pode observar-se que as microalgas apresentam um conteúdo lipídico superior ao das bactérias. No entanto, as microalgas necessitam de uma área de cultivo maior e de um período de crescimento mais longo do que as bactérias (Meng *et al.*, 2009). Apesar das bactérias apresentaram uma taxa de crescimento superior à das microalgas e um método de cultivo bastante fácil, a maioria não são microrganismos oleaginosos e a extração dos lípidos é complexa, uma vez que estes são produzidos na membrana externa, de modo que atualmente não existe algum significado industrial para a produção de biodiesel a partir de bactérias (Meng *et al.*, 2009).

Os fungos e as leveduras são os microrganismos oleaginosos que apresentam maior conteúdo em lípidos. Algumas espécies, como a *Rhodotorula sp.* e *Rhodospiridium sp.*, acumulam aproximadamente 70 % (p/p) de lípidos intracelulares, e portanto são considerados os microrganismos mais favoráveis para a acumulação de óleos para produção de biocombustíveis (Meng *et al.*, 2009).

Tabela 1.2 - Composição lipídica de alguns microrganismos (adaptado de Meng *et al.*, 2009).

Microrganismo	Composição lipídica (peso/lípidos totais)					
	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3
Microalgas	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Leveduras	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Fungos	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bactérias	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

C16:0 – ácido palmítico; C16:1 – ácido palmitoleico; C 18:0 – ácido esteárico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:3 – ácido linolénico.

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos com uma microalga para produção de lípidos, daí ser dado mais enfoque a este tipo de microrganismo.

1.2.1. Microalgas

Microalgas são microrganismos procariotas (cianobactérias) ou eucariotas (algas verdes e diatomáceas) fotossintéticos com elevadas taxas de crescimento, basicamente em qualquer lugar, e necessitam apenas de três componentes para a produção de biomassa: luz solar, dióxido de carbono e água (Nigam e Singh, 2011; Mata *et al.*, 2010). Estes microrganismos têm capacidade de crescer em sistemas autotróficos, em que utilizam a luz e assimilam o CO₂; em sistemas heterotróficos, em que não necessitam da luz e utilizam os compostos orgânicos para o seu desenvolvimento; e em mixotrofia, onde os dois sistemas anteriores atuam em simultâneo.

Dependendo da espécie, estes microrganismos têm aplicações em diversas áreas industriais (Figura 1.2), podendo ser extraídos deles compostos químicos de elevado valor, como é o caso dos pigmentos, β -carotenos, antioxidantes, vitaminas, polissacarídeos, biomassa, ácidos gordos e triglicéridos (Nigam e Singh, 2011; Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010).

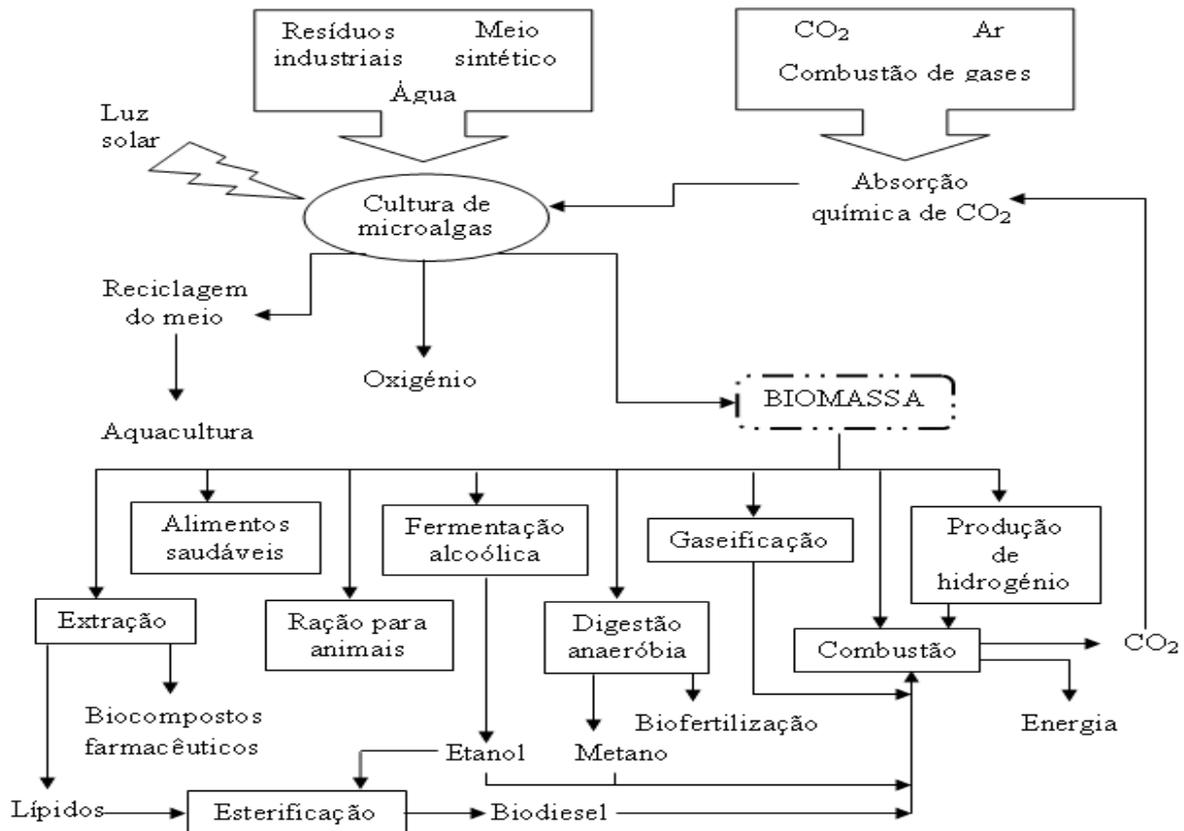


Figura 1.2 - Diagrama de fluxo das diversas potencialidades das microalgas (Adaptado de Costa e Morais, 2011).

Neste trabalho foram estudadas duas espécies diferentes de microalgas: *Chlorella sorokiniana* e *Picochlorum* sp HM1.

Relativamente à microalga *Picochlorum* sp HM1 apenas foram desenvolvidos ensaios de adaptação em meio sólido, em placa, a diferentes substratos, tendo grande parte do trabalho sido desenvolvido com a *Chlorella sorokiniana*.

A microalga *Chlorella sorokiniana* é um microrganismo eucariota, pertencente ao maior grupo de algas verdes (*Chlorophyta*). A morfologia celular pode ser esférica ou oval e reproduz-se assexuadamente por bipartição ou fissão binária (Qiao *et al.*, 2009; Shihira *et al.*, 1965). Produz carotenoides de elevada importância para a indústria farmacêutica, como a luteína, violaxantina e zeaxantina, α -caroteno e β -caroteno (Cordero *et al.*, 2011).

Recentemente, esta microalga tem sido bastante estudada devido ao seu potencial para acumulação de lípidos quando privada de nutrientes, especialmente o azoto (Adams *et al.*, 2013). Qiao e Wang (2009) revelaram que esta microalga, em condições heterotróficas, é

capaz de acumular 4 a 6 vezes mais lípidos do que em condições de autotrofia, obtendo cerca de 16,4 % (p/p) e 28,7 % (p/p) de lípidos quando a fonte de carbono utilizada foi glucose e acetato de sódio como substrato, respetivamente.

Picochlorum sp *HMI* é uma microalga marinha com morfologia ligeiramente oval. É capaz de crescer em condições extremas de salinidade. Embora não existam muitos estudos com esta microalga, a mesma revelou ter potencial biotecnológico por ser capaz de acumular lípidos e de produzir luteína, neoxantina, violaxantina e β -caroteno (Vega *et al.*, 2011). Esta microalga apenas se encontra referenciada como crescendo em condições autotróficas, não existindo estudos com a *Picochlorum* sp. crescida em condições heterotróficas ou mixotróficas. No entanto, já existem estudos que referem que em condições de limitação de azoto o conteúdo lipídico pode aumentar para 58,4 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com as condições de controlo em que o conteúdo lipídico é de 22,4 $\mu\text{g/mL}$ (El-Kassas, 2013).

1.2.2. Fotossíntese

A fotossíntese é o processo a partir do qual os organismos convertem matéria inorgânica em matéria orgânica, utilizando a energia luminosa. Este processo ocorre em duas fases (Figura 1.3), a fase fotoquímica, também conhecida como fase luminosa – dependente da luz, e a fase química, fase escura – independente da luz, que se baseia na seguinte reação global (Carolino, 2011):



A fase fotoquímica está dependente da luz. A molécula de água é dissociada em hidrogénio e oxigénio, quando os fotões da luz são absorvidos diretamente pela clorofila e pigmentos acessórios. Ao mesmo tempo o ADP é fosforilado em ATP e ocorre a redução de NADP^+ em NADPH. Na fase escura, que é dependente da fase luminosa, o hidrogénio libertado na fotólise liga-se ao CO_2 , utilizando o ATP e NADPH sintetizados na fase anterior, para ser convertido em hidratos de carbono e água, através do ciclo de Calvin (Brotosudarmo *et al.*, 2014). Assim, o ciclo de Calvin compreende três etapas: carboxilação, redução do carbono e, por último, a regeneração do substrato da reação de carboxilação. A primeira etapa é catalisada pela enzima Rubisco e consiste na adição do CO_2 a uma pentose difosfatada (RuBP: Ribulose 1,5-difosfato), resultando um composto de 6 carbonos, que é hidrolisado

para formar duas moléculas de um ácido orgânico com 3 carbonos, ácido fosfoglicérico (PGA). A segunda etapa envolve duas reações, no decurso das quais o PGA é convertido em gliceraldeído 3-fosfato (G3P), isto é, um açúcar fosfatado com 3 carbonos, uma triose-fosfato, utilizando NADPH e ATP. A regeneração do substrato envolve nove reações enzimáticas, das quais resultam compostos com 4, 6 e 7 carbonos, que conduzem à formação de uma pentose fosfatada (Ru5P: Ribulose 5-fosfato). Numa outra reação a Ru5P é fosforilada, com consumo de ATP, resultando na regeneração da RuBP. Para a formação de glucose é necessário que este ciclo se repita 6 vezes (Hügler e Sievert, 2011; Michelet *et al.*, 2013; www.newworldencyclopedia.org).

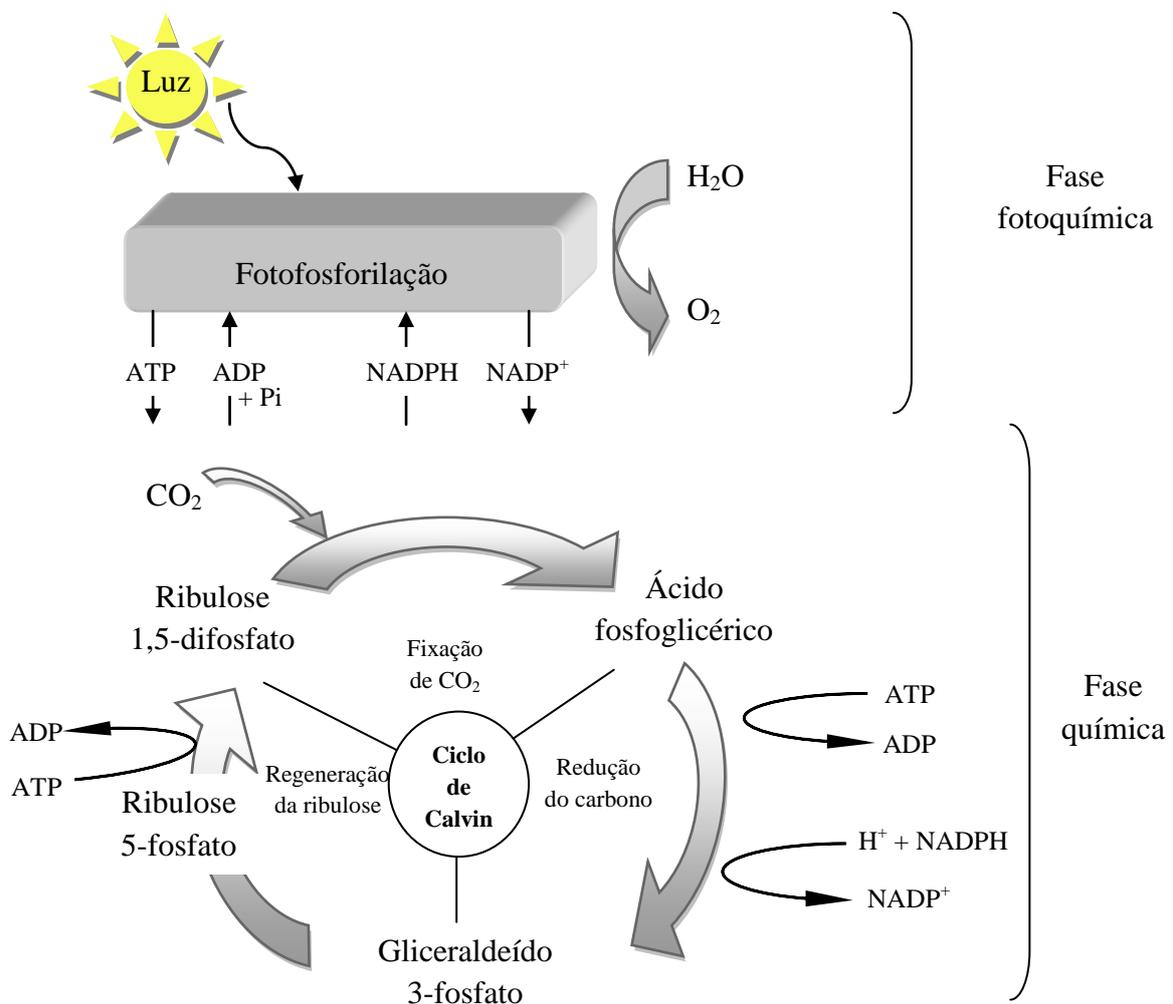


Figura 1.3 – Principais etapas da fotossíntese: fase luminosa (fotoquímica) e fase escura (química). (Adaptado de www.newworldencyclopedia.org).

1.2.3. Pigmentos: Clorofilas e Carotenoides

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são: as clorofilas, denominadas pigmentos fotossintéticos primários, por serem os principais pigmentos fotossintéticos usados na fotossíntese; os carotenoides e as ficobilinas que podem estar envolvidos na captação de energia luminosa na fotossíntese, e que são considerados pigmentos acessórios (Mater, 2001; Santos *et al.*, 2011a).

As clorofilas são pigmentos verdes e existem em diferentes formas na natureza, a clorofila a e b, são as que se encontram em maior quantidade. Além do seu uso como corantes, estes compostos e seus derivados têm sido utilizados a nível medicinal devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Ferruzi e Blakeslee, 2007).

Os carotenoides são pigmentos naturais, encontrados em organismos fotossintéticos ou não-fotossintéticos (fungos e bactérias), responsáveis pelas cores dos frutos, vegetais e plantas. Estes pigmentos são divididos em dois grupos: os carotenos (α -caroteno, β -caroteno, entre outros) e as xantofilas (luteína, zeaxantina, etc.). São conhecidos mais de 600 carotenoides, no entanto, poucos são comercializados, sendo o β -caroteno e astaxantina, os de maior importância, seguidos de luteína, zeaxantina e licopeno (Gouveia *et al.*, 2008). Os principais carotenoides produzidos por microalgas são o β -caroteno a partir de cultura de *Dunaliella salina* e astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis*. (Gouveia *et al.*, 2008). O β -caroteno é usado como corante natural para alimentos e refrigerantes e aditivo para cosméticos, a luteína é considerada a mais importante devido à sua comercialização como produto farmacêutico, e a astaxantina é um corante vermelho usado principalmente na indústria alimentar e na saúde humana tem benefícios a nível dos olhos (Perez-Garcia *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2007).

Os principais carotenoides produzidos pela microalga *Picochlorum* sp HM1 foram a luteína (3,5 mg/g peso seco), neoxantina (1,5 mg/g peso seco), violaxantina (1,0 mg/g peso seco), β -caroteno (0,9 mg/g peso seco) e zeaxantina (0,4 mg/g peso seco). Por produzir uma quantidade considerável de luteína e zeaxantina, esta microalga pode ser considerada uma boa fonte natural de suplementos de vitaminas para os olhos (Vega *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Cordero *et al.* (2011) mostrou que a microalga *Chlorella sorokiniana* também apresentava uma elevada produção de luteína (3 mg/g peso seco), seguida de β -caroteno (0,2 mg/g peso seco), violaxantina (0,11 mg/g peso seco) e zeaxantina (0,05 mg/g peso seco).

Em suma, os pigmentos apresentam aplicabilidade na indústria farmacêutica, cosméticos e alimentar, por serem considerados corantes naturais e possuírem propriedades antioxidantes e anticancerígenas. Uma vez que a produção de forma sintética acarreta custos elevados, a busca por fontes naturais que possam ser utilizadas comercialmente para a produção destes compostos tem ganho maior destaque em termos de investigação.

1.2.4. Biossíntese de lípidos

As microalgas oleaginosas são capazes de produzir diversos tipos de lípidos. Segundo a estrutura química e a polaridade, são divididos em dois grupos: os lípidos polares, que fazem parte da constituição da membrana, constituindo os fosfolípidos e os glicolípidos; e os lípidos neutros, que na maioria são compostos por triglicéridos e ácidos gordos livres.

Considera-se que a biossíntese de lípidos em microalgas é comparável com os microrganismos oleaginosos (Liang e Jiang, 2013). O primeiro passo para a síntese de ácidos gordos ocorre no citoplasma, é catalisado pela enzima acetil CoA carboxilase (ACCase) e consiste na carboxilação de acetil coenzima A (acetil-CoA), originando malonil-CoA e o complexo multienzimático da sintase de ácidos gordos (FAZ, – *fatty acid synthase*), onde acontecem as diversas reações que levam à síntese de ácidos gordos de cadeia longa (Ratledge, 2004; Khozin-Goldberg e Cohen, 2011; Huang *et al.*, 2010). Na Figura 1.4 é apresentado um esquema resumido do metabolismo de produção de ácidos gordos e da síntese dos triglicéridos, que se encontra descrito a seguir, no ponto 1.2.4.1.

As microalgas realizam a fotossíntese e, como acontece em plantas superiores, fixam o CO₂ através do ciclo de Calvin, que ocorre nos cloroplastos, originando gliceraldeído-3-fosfato (G3P). O G3P é transportado até ao citoplasma, onde é oxidado a piruvato pela via glicolítica, e por fim, este é convertido a acetil-CoA por ação do piruvato desidrogenase (Liang e Jiang, 2013; Khozin-Goldberg e Cohen, 2011; Huang *et al.*, 2010). Quando a fonte de carbono é a glucose, no caso de um regime heterotrófico, esta pode ser convertida em piruvato, no citoplasma, depois de passar pela via glicolítica (Liang e Jiang, 2013). Depois de entrar na mitocôndria, o piruvato é convertido em acetil-CoA, que é condensado em oxaloacetato, intermediário do ciclo de Krebs, para formar citrato (Liang e Jiang, 2013). Quando são atingidos níveis elevados de citrato, este é transportado para o citoplasma onde é clivado para formar acetil-CoA e oxaloacetado (Liang e Jiang, 2013).

Na maioria dos microrganismos, o alongamento da cadeia de carbono dos ácidos gordos depende de dois sistemas enzimáticos: ACCase e o complexo multienzimático da sintase de ácidos gordos (FAS, - *fatty acid synthase*). O ACCase é usado na formação de malonil-CoA e no alongamento da cadeia acil a partir de acetil-CoA. Depois de formado, o malonil-CoA é transferido por uma subunidade do FAS, o malonil-CoA:ACP transacetilase (MAT), para formar malonil-ACP (uma proteína transportadora). Este processo ocorre sucessivamente para que se formem cadeias longas de ácidos gordos com 16 e 18 carbonos: ácido palmítico, palmitoleico, esteárico e oleico (Liang e Jiang, 2013; Huang *et al.*, 2010). Em cada ciclo são adicionados dois carbonos, e é iniciado por uma reação catalisada por cetoacil-ACP sintase (KAS, - *ketoacyl-ACP synthase*), passando pela condensação de malonil-ACP com um aceitador do grupo acil. Por fim, ACP-tioesterase (FAT) cliva a cadeia acil libertando o ácido gordo (Liang e Jiang, 2013).

1.2.4.1. Síntese de Triglicéridos

A síntese de triglicéridos (TAG) nas microalgas, microrganismo eucariota, ocorre nos cloroplastos, enquanto que nos seres procariontes esta síntese dá-se no citoplasma. O primeiro passo da síntese de TAG é catalisado por acil-CoA:glicerol-sn-3-fosfato acil-transferase (GPAT), e consiste na acilação do glicerol-3-fosfato (G3P) com acil-CoA para formar lisofosfatidato (LPA). Por sua vez, o LPA é condensado com outro acil-CoA, formando fosfatidato (PA) que é desfosforilado, pela ação de uma fosfatase (PAP), em diacilglicerol. Por fim, a síntese de TAG é catalisada por acil-CoA:diacilglicerol acil-transferase (DGAT), que incorpora o terceiro acil-CoA na molécula de diacilglicerol, completando-se assim a biossíntese de TAG. Após este processo, as moléculas de TAG são geralmente armazenadas em corpos lipídicos (Courchesne *et al.*, 2009; Liang e Jiang, 2013; Huang *et al.*, 2010).

A figura seguinte representa o esquema da biossíntese de lípidos nos microrganismos, demonstrando que as microalgas podem converter tanto o CO₂ inorgânico como o orgânico em lípidos:

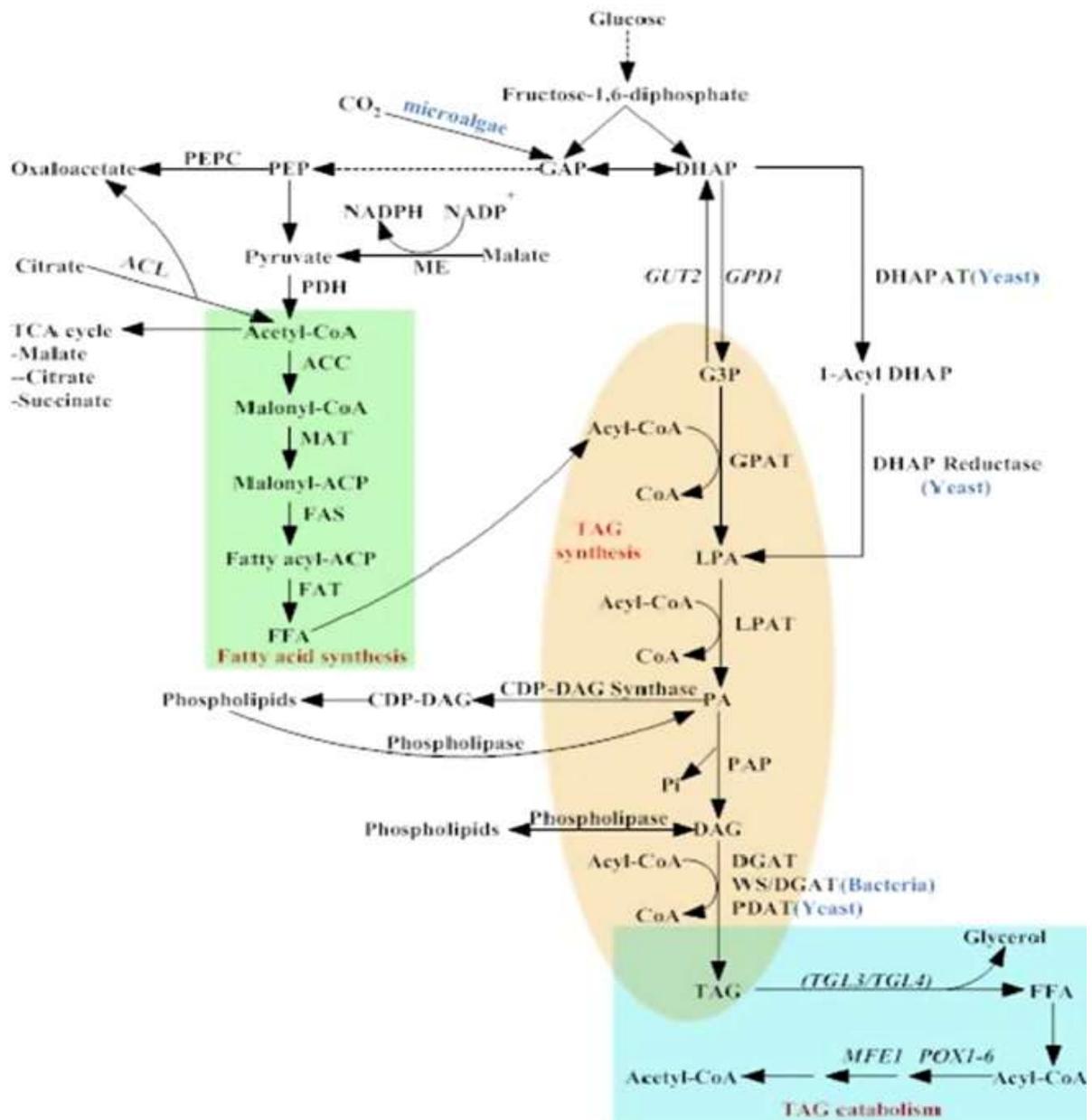


Figura 1.4 - Vias de biossíntese de ácidos gordos e triglicéridos em microrganismos (adaptado de Liang e Jiang, 2013).

1.2.5. Fatores que condicionam a acumulação de TAG

Em condições de stresse, como sendo a limitação de nutrientes, temperatura, pH, salinidade, luz e regime de crescimento autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico, muitas microalgas alteram as suas vias de biossíntese de lípidos para a formação e acumulação de lípidos neutros, podendo representar um aumento de cerca de 20-50% do peso seco, sob a forma de triglicéridos (Sharma *et al.*, 2012; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Em algumas espécies de microalgas, o efeito da temperatura, concentração de sal e variação de pH conduzem a alterações na composição dos ácidos gordos (Sharma *et al.*, 2012). Em microalgas verdes como a *Chlorella vulgaris* e a *Botryococcus braunii*, o aumento da temperatura pode provocar a diminuição de ácidos gordos insaturados e aumentar o conteúdo de ácidos gordos saturados (Sushchik *et al.*, 2003). Patterson (1970), publicou um estudo com a microalga *C. sorokiniana*, onde a variação da temperatura entre 14°C e 38°C promoveu a alteração do tipo de ácidos gordos produzidos, em que a 14°C os ácidos gordos predominantes eram os di-insaturados, a 22°C predominavam os ácidos gordos com três insaturações, e a 38°C os ácidos gordos maioritários eram monoinsaturados. Existem estudos, em que o pH alcalino do meio inibe o crescimento celular, no entanto as células canalizam a energia para a formação de triglicéridos. No caso do crescimento em condições autotróficas, a exposição a uma intensidade luminosa elevada, pode induzir stresse à microalga e conduzir à acumulação de triglicéridos (Sharma *et al.*, 2012).

No entanto, de todas as condições de stresse que podem provocar a acumulação de lípidos, a disponibilidade de nutrientes é a que tem um maior impacto no crescimento e propagação de microalgas, assim como na acumulação lipídica. Quando os nutrientes são limitados a taxa de divisão celular entra em declínio constante, contudo, a via de biossíntese de ácidos gordos continua ativa em algumas espécies de microalgas (Thompson, 1996). Nestes casos, em que o crescimento celular diminui, deixa de existir qualquer necessidade para a síntese de novos compostos de membrana e assim a célula converte os ácidos gordos em triglicéridos (Thompson, 1996; Sharma *et al.*, 2012).

De todas as abordagens de limitação de nutrientes, a limitação de azoto é a abordagem mais estudada e aplicada em quase todas as espécies de microalgas com potencial para a produção de biocombustíveis. Para além de ser o fator mais limitativo para o crescimento de microalgas eucariotas, é relativamente fácil de aplicar e, em quase todas as espécies de microalgas estudadas até á data, parecem aumentar o conteúdo de triglicéridos sob a limitação deste nutriente.

1.2.5.1. Limitação de nutrientes e rácio carbono-azoto (C/N)

A disponibilidade de nutrientes tem um impacto significativo no crescimento e propagação de microalgas e tem efeitos na composição dos ácidos gordos. O azoto é o nutriente que mais afeta o metabolismo lipídico em algas. Shen *et al.* (2009) afirmam que situações de limitação

de azoto no meio de cultura promovem o aumento do conteúdo lipídico. O azoto é o nutriente necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, durante a fase de crescimento. Quando este nutriente é limitante, a taxa de crescimento desacelera e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos tende a cessar. Em espécies oleaginosas, o carbono em excesso é canalizado para a síntese de lípidos, resultando numa acumulação de triglicéridos (Amaretti *et al.*, 2010). Shen *et al.* (2009), concluíram que a microalga *Chlorella protothecoides* aumentava o conteúdo lipídico sempre que cultivada num meio com baixas concentrações de azoto, quer a fonte de azoto fosse nitrato, ureia ou extrato de levedura, como se pode observar na Tabela 1.3. Um outro estudo realizado por Adams *et al.* (2013) mostra que algumas espécies oleaginosas de microalgas verdes em autotrofia, como a *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *Neochloris oleofaciens*, *Scenedesmus dimorphus*, aumentam a percentagem de lípidos acumulados por biomassa produzida, quando cultivadas em meio com limitação na fonte de azoto. Neste estudo, a *C. sorokiniana* acumula de 21 % (p/p) de lípidos, quando crescida num meio suplementado com 15 mM de azoto, e 47 % (p/p), quando sujeita ao stresse provocado pela baixa concentração de azoto disponível no meio de cultura, 4 mM de azoto. No mesmo estudo, a microalga *N. oleofaciens* que produz 29 % (p/p) de lípidos quando cresce num meio suplementado com 11 mM de azoto, acumula 58 % (p/p) de lípidos quando crescida num meio com 4 mM de azoto disponível. Também Converti *et al.* (2009) verificaram que a microalga *Nannochloropsis oculata* acumula 15,86 % (p/p) de lípidos num meio com baixa concentração da fonte de azoto (0,075 g/L de nitrato de sódio), enquanto que em concentrações elevadas de azoto (0,3 g/L de nitrato de sódio), produz apenas 7,88 % (p/p) de lípidos.

Tabela 1.3 – Conteúdo lipídico da microalga *Chlorella protothecoides*, cultivada em diferentes fontes e concentrações de azoto (Shen *et al.*, 2009).

Fonte de azoto	Concentração de azoto	Lípidos (g/L)
Nitrato	Baixa – 2,4 g/L	5,89
	Média – 4,2 g/L	4,57
	Alta – 6 g/L	4,46
Ureia	Baixa – 1,8 g/L	2,90
	Média – 2,7 g/L	0,60
	Alta – 3,6 g/L	1,66
Extrato de levedura	Baixa – 2,4 g/L	4,27
	Média – 4,2 g/L	3,56
	Alta – 6 g/L	1,07

As características de crescimento, quantidade de lípidos e a sua composição são alterados consoante o rácio carbono-azoto, C/N (Isleten-Hosoglu *et al.*, 2012). Em espécies oleaginosas, quando o principal nutriente, responsável pela proliferação celular se esgota, o crescimento celular é interrompido. Por outro lado, esses organismos são capazes de continuar a assimilar o carbono desencadeando as reações de síntese de lípidos, provavelmente como uma forma de sobrevivência ao stress provocado. Existem estudos realizados com *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Nannochloropsis oculata* que comprovam esta teoria, demonstrando que culturas com limitação de azoto apresentam maiores rendimentos de lípidos (Shen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Converti *et al.*, 2009).

Portanto, o rácio C/N torna-se um fator determinante na acumulação de lípidos e no perfil lipídico (Ratledge, 2004; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

1.3. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os açúcares na sua forma pura, principalmente a sacarose e a glucose, são os mais utilizados no estudo do desempenho de um microrganismo para produção de biocombustíveis. No entanto, são nutrientes dispendiosos, representando um elevado custo em matérias-primas, sendo um impedimento quando se pretende produzir a uma escala comercial. Para contornar este aspeto, os óleos alimentares usados e os resíduos agroindustriais, provenientes das

indústrias transformadoras, como é o caso do melaço de beterraba, dos citrinos e da polpa de alfarroba têm vindo a ganhar destaque para a produção de biocombustíveis, devido ao seu baixo custo e acessibilidade (Pardão *et al.*, 2008; Alzate e Toro, 2006; Raposo *et al.*, 2009; Lima-Costa *et al.*, 2012). Neste trabalho utilizaram-se, além das fontes de carbono tradicionais, glucose e sacarose, resíduos provenientes da indústria transformadora da polpa de alfarroba e resíduos de citrinos, resultantes da indústria de sumos.

1.3.1. Alfarroba

A alfarroba é fruto de uma árvore de origem mediterrânica e de folha perene, a alfarrobeira (*Ceratonia siliqua L.*). Esta árvore é capaz de sobreviver em climas secos, requer pouca manutenção e os frutos são utilizados como alimentos nas rações de animais, xaropes, produtos alimentares (bolos, condimentos, gelados, etc.) e produtos farmacêuticos.

A produção mundial deste fruto é 400 000 ton/ano, e em Portugal, só no Algarve são produzidas cerca de 50 000 ton/ano, tornando a região a terceira maior produtora do mundo (Lima-Costa *et al.*, 2012; Manso *et al.*, 2010).

O aproveitamento da alfarroba baseia-se na produção de gomas a partir das sementes. As sementes representam 10% do peso do fruto e o restante constitui a polpa. A semente é processada em Portugal e os produtos obtidos são exportados para o Japão, Holanda, Dinamarca e EUA, praticamente na totalidade.

A polpa da alfarroba tem uma elevada quantidade de açúcares na sua composição (sacarose, glucose e frutose) que representam cerca de 50% do seu peso. Por esta razão, é bastante utilizada na confeção de doçaria regional (principalmente como alternativa ao cacau) e na alimentação animal. É também uma excelente alternativa como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, uma vez que é pouco dispendiosa, rica em açúcares e o processo de extração é relativamente simples e acarretando baixos custos (Lima-Costa *et al.*, 2012).

1.3.2. Citrinos

Os citrinos são constituídos por laranjas, tangerinas, limões, limas, clementinas, toranjas, entre outras. As frutas cítricas são processadas por unidades industriais para produção de compotas, e pela indústria química, para extração de flavonoides e óleos essenciais (Marín *et*

al., 2007). No entanto, cerca de 33 % destes frutos são processados industrialmente para a produção de sumos, onde aproximadamente metade dos citrinos processados, incluindo as cascas, sementes e segmentos membranares, acabam como resíduos, estimando-se uma produção mundial anual destes resíduos de 15 milhões de toneladas (Wilkins *et al.*, 2007a; Marín *et al.*, 2007). Parte da casca e da polpa dos citrinos, obtidas como um subproduto da indústria dos sumos, são utilizadas para a ração animal, e outra parte é descartada em aterros sanitários, constituindo um problema ambiental (Tripodo *et al.*, 2004; Montgomery, 2004).

Existem estudos que indicam que esta matéria-prima tem potencial para a produção de biocombustíveis, como etanol e biogás, por ter na sua composição hidratos de carbono solúveis e não solúveis, sendo facilmente convertida biologicamente em biocombustíveis (Raposo *et al.*, 2009; Wilkins *et al.*, 2007 b). Contudo, o resíduo de citrinos apresenta na sua composição D-limoneno, um forte inibidor do crescimento microbiano, que encontra-se principalmente nas cascas de laranja e limão, sendo necessário um pré-tratamento para a sua remoção (Wilkins *et al.*, 2007b).

O resíduo de citrinos é um xarope rico em açúcares, composto maioritariamente por sacarose, 50% (p/p), frutose, 25 % (p/p), e glucose, 25% (p/p) (Raposo *et al.*, 2009). O reaproveitamento deste resíduo resultante da indústria de sumos, e por apresentar uma elevada carga poluente, é uma mais-valia em termos ambientais.

1.4. OBJETIVOS

Esta tese de mestrado foi realizada no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), pertencente ao Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Algarve (CIMA), e teve como principais objetivos:

- Adaptação em meio sólido das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Picochlorum* sp *HMI* a várias fontes de carbono orgânicas;
- Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* e da produção e acumulação lipídica, em condições de autotrofia, heterotrofia e mixotrofia, utilizando fontes de carbono comerciais, como a glucose, e fontes de baixo custo, o resíduo da polpa de alfarroba;
- Avaliação da influência da limitação de azoto, rácio C/N 70, no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* e na produção e acumulação de lípidos, igualmente em diferentes condições e utilizando diferentes fontes de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATÉRIA-PRIMA

Neste trabalho, as matérias-primas utilizadas, além das fontes de carbono comerciais, glucose e sacarose, foram os resíduos de polpa de alfarroba e resíduos da indústria de citrinos.

Os resíduos de polpa de alfarroba são um subproduto agroalimentar da indústria transformadora de alfarroba sob a forma de *kibbles*, fornecida pela indústria Victus Industrial Fareense do Algarve, pela sua colaboração no projeto AlfaEtílico, financiado pelo QREN, PO Algarve 21. Os açúcares solúveis foram extraídos pelo método otimizado no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), que se encontra descrito em Manso *et al.* (2010) e otimizado em Lima-Costa *et al.* (2012). Os açúcares totais desta matéria-prima são constituídos por 70 % (p/p) de sacarose, 15,5 % (p/p) de glucose e 14,5 % (p/p) de frutose.

Os resíduos de citrinos são o efluente, rico em açúcares, que resultam da indústria de transformação de sumos de citrinos, gentilmente fornecidos pela Citripor – Cooperativa de Citrinos de Portugal C.R.L., sediada em Silves. Esta matéria-prima apresenta na sua constituição como açúcares totais: 50% (p/p) de sacarose, 25 % (p/p) frutose e 25% (p/p) glucose.

2.1.1. Tratamento da matéria-prima – extração dos açúcares solúveis da alfarroba

O método de extração dos açúcares solúveis de alfarroba já se encontra otimizado pelo LEBA (Manso *et al.*, 2010; Lima-Costa *et al.*, 2012). O primeiro passo consiste em colocar os *kibbles* numa estufa (Binder FD53) durante a noite a 50 °C para reduzir a humidade. Depois de secos são triturados por um moinho (IKA-MF10B), ficando reduzidos a farinha. A extração é feita num Erlenmeyer de 3 L, com 300 g de farinha de polpa de alfarroba e 1 L de água destilada, colocado numa agitadora orbital (IKA-KS4000i) a 150 rpm durante 1h a 25 °C. O extrato aquoso obtido é centrifugado, numa centrífuga (Avanti J-14, Beckman Coulter), a 12 000 rpm durante 20 min a 4°C, e o sobrenadante resultante é depois filtrado a vácuo, usando filtros com porosidade de 0,45 µm. O filtrado é depois sujeito a uma concentração, utilizando um evaporador rotativo (Heidolph, 94200) a 70 °C. Por fim, o extrato de alfarroba concentrado é armazenado a - 20 °C.

2.2. MICRORGANISMOS

As duas estirpes de microalgas usadas neste trabalho foram a *Chlorella sorokiniana* e a *Picochlorum* sp *HMI*, ambas gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia de Microalgas da Universidade de Huelva, Espanha, no âmbito de uma colaboração entre estes dois laboratórios destas duas instituições.

2.3. MEIOS DE CULTURA

Para a microalga *Chlorella sorokiniana* foi usado o meio Seuoka em condições de autotrofia. A tabela seguinte descreve a composição deste meio:

Tabela 2.1 - Composição do meio Seuoka (adaptado de Seuoka, 1960; Seuoka *et al.*, 1967).

Nutriente	Quantidade
KPO₄H₂	0,72 g/L
K₂PO₄H	1,44 g/L
MgSO₄.7H₂O	0,061 g/L
CaCl₂.2H₂O	0,02 g/L
<i>Hutner Elements</i> ^(a)	5 mL
KNO₃	0,95 g/L

^(a) Preparação da solução de *Hutner Elements* (Anexo I).

Para os sistemas heterotróficos e mixotróficos, estudou-se a adaptação do microrganismo a diferentes fontes de carbono em separado, as quais foram adicionadas ao meio Seuoka:

- 10 g/L glucose (56 mM)
- 10 g/L sacarose (29 mM)
- 10 g/L resíduo de polpa de alfarroba (34 mM)
- 10 g/L resíduo de citrinos (38 mM)

O pH foi ajustado para 6,5-6,9. Para meio sólido adicionou-se 2% de agar (p/v).

A microalga *Picochlorum* sp *HMI* foi cultivada no meio F/2, cuja composição está descrita na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição do meio F/2 (Adaptado de Guillard e Ryther, 1962).

Nutriente	Quantidade
NaNO ₃	0,5 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,00565 g/L
<i>Trace Elements</i> ^(b)	1 mL
Mix de Vitaminas ^(c)	1 mL
Água do mar filtrada	250 mL

^(b) Preparação da solução *Trace Elements* (Anexo II).

^(c) Preparação da solução Mix de Vitaminas (Anexo II).

A água do mar foi filtrada a vácuo com um filtro de membrana com porosidade de 0,2 µm.

Para os sistemas heterotróficos e mixotróficos, estudou-se a adaptação a diferentes fontes de carbono em separado, as quais foram adicionadas ao meio F/2:

- 9 g/L glucose (50 mM)
- 10 g/L sacarose (29 mM)
- 14,7 g/L resíduo de alfarroba (50 mM)
- 3,0 g/L resíduo de alfarroba (10 mM)
- 13,0 g/L resíduo de citrinos (50 mM)
- Mistura: 16,43 g/L resíduo de citrinos (63 mM) + 3,0 g/L resíduo de alfarroba (10 mM)

O pH foi ajustado para 8. Para meio sólido adicionou-se 1% de agar (p/v).

Os meios foram previamente esterilizados numa autoclave (Uniclave 87) por calor húmido a 121 °C durante 20 minutos.

2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DAS MICROALGAS

2.4.1. Manutenção da microalga *Chlorella sorokiniana*

As culturas de *Chlorella sorokiniana* vieram da Universidade de Huelva em meio sólido, em placas de Petri com meio Seuoka em condições autotróficas. As placas foram mantidas à luz durante uma semana, num fitoclima (Aralab 750E) a 25°C, após a qual foram mantidas em

bancada, em local seco à temperatura ambiente, sendo repicadas de 3 em 3 semanas. A microalga adaptada a condições de mixotrofia, foi conservada igualmente em meio Seuoka com as diferentes fontes de carbono, em idênticas condições às descritas para a autotrofia. A cultura em condições de heterotrofia foi também conservada em meio Seuoka com as diferentes fontes de carbono, sendo mantida uma semana no escuro a 25°C, após a qual passou para a bancada, em local seco a 25°C, e repicada de 3 em 3 semanas.

2.4.2. Manutenção da microalga *Picochlorum* sp *HMI*

A microalga *Picochlorum* sp *HMI* veio da Universidade de Huelva mantida em meio sólido F/2, em condições autotróficas. O procedimento foi idêntico ao efetuado para a *C. sorokiniana*, mas em meio F/2, nas diferentes condições de autotrofia, mixotrofia e heterotrofia, sendo também repicada de 3 em 3 semanas.

2.5. ENSAIOS EXPERIMENTAIS COM A MICROALGA *Chlorella sorokiniana*

O procedimento de preparação dos pré-inóculos e respetivos ensaios experimentais, realizados com a microalga *C. sorokiniana*, foram diferentes dependendo se o ensaio decorria em condições autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas.

2.5.1. Crescimento da *C. sorokiniana* em condições autotróficas

2.5.1.1. Preparação do pré-inóculo

O meio do pré-inóculo em autotrofia foi preparado em duplicado, em balões Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio Seuoka (Tabela 2.1) com pH aferido a 6,5-6,9. O meio foi esterilizado numa autoclave por calor húmido, a 121°C, durante 20 min. Depois de arrefecerem, os meios foram inoculados com colónias crescidas em placas de Petri com meio Seuoka, e colocados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ numa agitadora orbital (Cassel) a 150 rpm, com exposição contínua à luz, usando para esse efeito uma lâmpada fluorescente de 18 watts, durante 7 dias. Passado este tempo, procedeu-se à contagem das células numa câmara de Neubauer (Blau Brand) de forma a determinar o volume de inóculo necessário para iniciar a cultura com uma concentração celular de 1×10^7 células/mL.

2.5.1.2. Ensaio experimental em condições autotróficas

O crescimento celular da *C. sorokiniana* foi avaliado em três condições experimentais: arejamento com ar e agitação; arejamento com ar, CO₂ (95:5 %, v/v) e agitação; e somente agitação. Foi montado um sistema com pipetas volumétricas de 5 mL, conectadas a tubagens que faziam a ligação com bombas de ar de aquário e a garrafa de CO₂ (Figura 2.1). Os fluxos passavam por um filtro de ar (Millipore) antes de entrarem nos balões Erlenmeyers, através das pipetas. Cada uma das condições foi realizada em triplicado e em condições de esterilidade, recorrendo ao uso de material estéril e ao manuseamento dos balões Erlenmeyer numa câmara de fluxo laminar horizontal (Faster). Os triplicados foram efetuados em balões Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio. Após inoculação com uma concentração de células de 1×10^7 células/mL, os balões foram colocados numa agitadora orbital (Cassel), a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, a 150 rpm e com exposição contínua à luz.



Figura 2.1 – Montagem do ensaio em autotrofia para *Chlorella sorokiniana*. (1) Lâmpada fluorescente (18 W); (2) Garrafa de dióxido de carbono; (3) Bomba de ar de aquário; (4) Filtro de ar.

Este ensaio durou 312 horas, procedendo-se à recolha de amostras diariamente. De todos os Erlenmeyers retiraram-se cerca de 5 mL de amostra para determinação da densidade celular por leitura da absorvância, quantificação dos pigmentos totais, clorofila e carotenoides, da biomassa formada e lípidos produzidos, segundo a metodologia descrita no ponto 2.7.

2.5.2. Crescimento da *C. sorokiniana* em condições heterotróficas e mixotróficas

2.5.2.1. Preparação dos pré-inóculos

Para os estudos em heterotrofia e mixotrofia utilizaram-se duas fontes de carbono, a glucose e o extrato do resíduo da polpa de alfarroba. O meio do pré-inóculo em heterotrofia e mixotrofia foi preparado em duplicado, em balões Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Seuoka e respectivas fontes de carbono, conforme apresentadas na Tabela 2.3, com pH ajustado a 6,5-6,9. O meio de cultura estéril foi inoculado com colônias crescidas em placas de Petri com meio Seuoka e respectiva fonte de carbono, e colocados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ numa agitadora orbital (Cassel) a 150 rpm, durante 4 dias. No caso da cultura mixotrófica, a cultura foi colocada sob luz contínua. Após este período, procedeu-se à contagem das células numa câmara de Neubauer (Blau Brand) de forma a determinar o volume de inóculo necessário para iniciar o ensaio experimental com uma concentração celular de 1×10^7 células/mL.

Tabela 2.3 - Composição do meio Seuoka para regime heterotrófico e mixotrófico (adaptado de Seuoka, 1960; Seuoka *et al.*, 1967).

Nutriente	Quantidade
KPO_4H_2	0,72 g/L
$\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$	1,44 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,061 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
<i>Hutner Elements</i>	5 mL
KNO_3	0,95 g/L

Fonte de Carbono	Concentração (g/L)
Glucose	10
Resíduo da polpa de alfarroba	10

2.5.2.2. Ensaio experimental em condições heterotróficas e mixotróficas

Os ensaios experimentais com a *C. sorokiniana*, realizados em condições heterotróficas e em condições mixotróficas foram realizados em triplicado e em condições de esterilidade, recorrendo ao uso de material estéril e ao manuseamento dos balões Erlenmeyer numa câmara de fluxo laminar horizontal (Faster). Os triplicados foram efetuados em balões Erlenmeyer de

500 mL, contendo 200 mL de meio com as diferentes fontes de carbono, referidas na tabela 2.3. Após inoculação, os Erlenmeyers foram colocados numa agitadora orbital a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, a 150 rpm e com exposição à luz, no caso do ensaio em condições de mixotrofia e no escuro, no caso da heterotrofia, os quais foram forrados com papel de alumínio de forma a evitar a exposição à luz (Figura 2.2). Nestes ensaios experimentais, de acordo com as respetivas concentrações de fonte de carbono, glucose e alfarroba, e com a concentração da fonte de azoto, nitrato de potássio, utilizadas, o rácio molar C/N foi de 35.

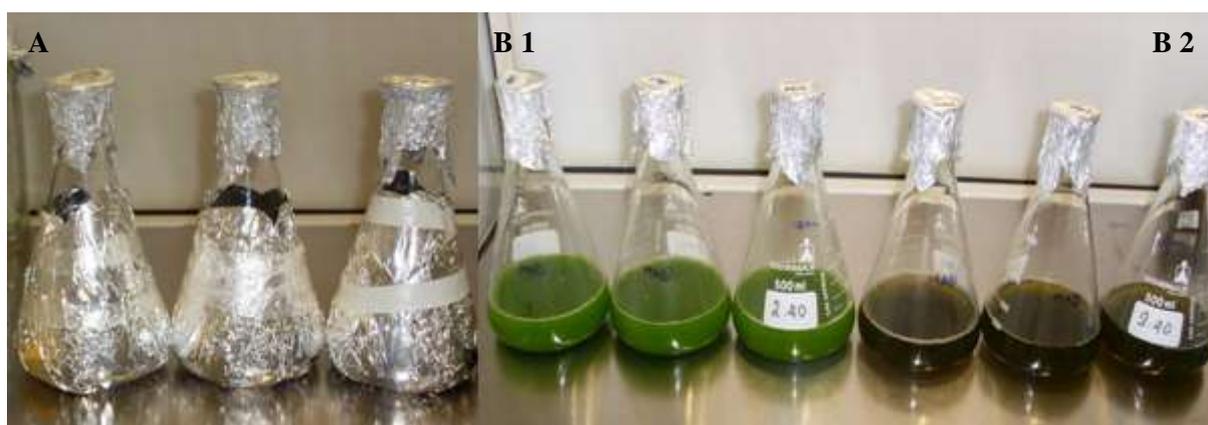


Figura 2.2 - Ensaio da cultura de *Chlorella sorokiniana* em condições de heterotrofia e mixotrofia. (A) Heterotrofia; (B1) Mixotrofia com 10 g/L de glucose como fonte de carbono; (B2) Mixotrofia com 10 g/L de extrato da polpa de alfarroba como fonte de carbono.

Os ensaios em que a fonte de carbono foi glucose tiveram a duração de 384 horas de cultura, enquanto com alfarroba tiveram a duração de 288 horas de cultura, sendo recolhidas 5 mL de amostra diariamente para determinação da densidade celular, quantificação dos pigmentos totais, clorofila e carotenoides, azoto consumido, substrato consumido, biomassa formada e lípidos produzidos, conforme descritos no ponto 2.7.

2.5.3. Crescimento da *C. sorokiniana* com limitação de azoto em condições heterotróficas e mixotróficas

Um dos parâmetros que influencia a acumulação de lípidos nos diferentes microrganismos oleaginosos é o rácio C/N. Com este intuito, procedeu-se à variação do rácio molar C/N para 70 (Adams *et al.*, 2013, Guerreiro, 2013) de forma a avaliar o seu efeito na acumulação de lípidos pela microalga *Chlorella sorokiniana*. Este estudo foi efetuado em condições

heterotróficas e mixotróficas, em que as fontes de carbono usadas foram a glucose e o resíduo de polpa de alfarroba.

2.5.3.1. Preparação dos pré-inóculos

Os pré-inóculos foram preparados como descrito no ponto 2.5.2.1.

2.5.3.2. Ensaio experimental em condições heterotróficas e mixotróficas

O meio para o crescimento da microalga encontra-se descrito na Tabela 2.3, em que a concentração da fonte de azoto, nitrato de potássio, foi alterada de 0,95 g/L para 0,47 g/L, de forma a obter-se um rácio molar C/N de 70 (Adams *et al.*, 2013). As concentrações das diferentes fontes de carbono mantiveram-se constantes, sendo as referidas na tabela 2.3. O ensaio foi realizado em heterotrofia e mixotrofia, nas mesmas condições referidas no ponto 2.5.2.2.

Os ensaios em que a fonte de carbono foi glucose tiveram a duração de 312 horas de cultura, enquanto com alfarroba tiveram a duração de 360 horas de cultura, sendo recolhidas 5 mL de amostra diariamente para determinação da densidade celular, quantificação dos pigmentos totais, clorofila e carotenoides, azoto consumido, substrato consumido, biomassa formada e lípidos produzidos, conforme descritos no ponto 2.7.

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao longo dos diferentes ensaios realizados, o crescimento das microalgas foi acompanhado com a recolha de amostras que foram analisadas com base nos métodos abaixo apresentados.

2.6.1. Determinação da densidade ótica

O crescimento celular foi medido por espectroscopia, medindo a absorvância da suspensão celular, em triplicado, num espectrofotómetro (GBC, Cintra 202) ao comprimento de onda 750 nm para a *Chlorella sorokiniana*, utilizando *cuvettes* de 1cm de percurso ótico. Sempre

que necessário, de modo a obter leituras dentro da gama de linearidade de absorvância (0,1 a 0,9 unidades de absorvância) as amostras foram diluídas e o branco utilizado foi o meio de cultura antes da inoculação, com a mesma diluição que as amostras. Foram obtidas as seguintes correlações para determinar o peso seco (PS, g/L) dos ensaios em condições autotróficas (equação 1), e em condições heterotróficas e mixotróficas, sem limitação de azoto e com limitação de azoto (equação 2).

$$A_{750 \text{ nm}} = 3,4011 \times \text{PS}; R^2 = 0,9034 \quad \text{Equação 1}$$

$$A_{750 \text{ nm}} = 4,9265 \times \text{PS}; R^2 = 0,9061 \quad \text{Equação 2}$$

2.6.2. Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi obtida através dos pesos secos da suspensão celular. Para tal, foram retiradas amostras em duplicado de cada Erlenmeyer, ao longo da fermentação, com um volume de 1 mL para *ependorfs* previamente pesados. As amostras foram colocadas numa centrífuga (Eppendorf, 5415D) a 12 000 rpm, durante 10 minutos. e o sobrenadante foi retirado para posterior quantificação de açúcares e de azoto. Os *ependorfs* com o *pellet* foram secos numa estufa (Binder, FD53) durante 48 horas a 60 °C. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente, em exsiccador, foram pesados numa balança analítica de precisão (Precisa XB, 120A). Este peso foi depois subtraído ao peso do *ependorf*, resultando no peso da biomassa em peso seco (g/L).

2.6.3. Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

A extração e quantificação dos pigmentos totais, de clorofila a e b, assim como os carotenoides foi efetuada por espectroscopia, utilizando para tal um espectrofotómetro (GBC Cintra 202), baseado no método descrito por Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987). Centrifugou-se 1,5 mL de suspensão celular, numa centrífuga (Hettich, Universal 320), e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi dissolvido em 4 mL de acetona (100%) e colocado num banho de ultrassons durante 1h. Centrifugou-se novamente e descartou-se o *pellet*. Efetuou-se a leitura da absorvância a vários comprimentos de onda 662, 645 e 470 nm. Os valores registados foram substituídos nas seguintes equações, desenvolvidas por Lichtenthaler

(1987), obtendo-se assim o valor em mg/mL de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c):

$$C_a = 11,24 \times A_{662\text{nm}} - 2,04 \times A_{645\text{nm}} \quad \text{Equação 3}$$

$$C_b = 20,13 \times A_{645\text{nm}} - 4,19 \times A_{662\text{nm}} \quad \text{Equação 4}$$

$$C_T = 7,05 \times A_{662\text{nm}} + 18,09 \times A_{645\text{nm}} \quad \text{Equação 5}$$

$$C_c = \frac{1000 \times A_{470\text{nm}} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b}{214} \quad \text{Equação 6}$$

2.6.4. Quantificação de azoto

A quantificação do nitrato foi baseada num método espectrofotométrico descrito por Collos *et al.* (1999) que consiste na medição da absorvância das amostras a um comprimento de onda de 220 nm, utilizando uma *cuvette* de quartzo. O branco utilizado foi água desionizada. O sobrenadante resultante do peso seco foi utilizado para a determinação do nitrato presente em cada amostra. De forma a eliminar possíveis interferências na quantificação, as amostras foram também lidas ao comprimento de onda de 275 nm, que foi subtraído ao valor obtido a 220 nm. Verificou-se que não havia interferências, sendo os valores de absorvância a 275 nm praticamente nulos.

Fez-se uma curva de calibração (Anexo V) para quantificar os nitratos totais presentes no meio, usando concentrações conhecidas de uma solução de nitrato de potássio (KNO_3), 0 – 1,2 g/L, preparada em água desionizada, obtendo-se como a equação da reta $\text{Abs}_{220\text{ nm}} = 39,6087 \times \text{Concentração de } \text{KNO}_3 \text{ (g/L)} + 3,6861$, $R^2 = 0,9855$

2.6.5. Quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS

O consumo da glucose foi determinado pelo método de DNS, descrito por Miller (1959). A quantificação dos açúcares redutores por este método, consiste na oxidação do grupo aldeído dos açúcares redutores e simultânea redução do ácido 3,5 – dinitrossalicílico (DNS) em ácido 3-amino, 5-nitrossalicílico. A cor alaranjada resultante da oxidação permite a quantificação dos açúcares redutores por espectroscopia.

Para determinar-se a quantidade de açúcares presentes na amostra utilizou-se o sobrenadante resultante do peso seco, em que a 1 mL de amostra adicionou-se 1 mL de reagente DNS (Anexo III). Depois de agitar, aqueceu-se em banho-maria fervente durante 5 minutos,

deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionaram-se 10 mL de água destilada, efetuando-se de seguida a leitura da absorvância a 540 nm. O branco foi realizado da mesma forma, mas utilizou-se água destilada em vez de amostra. As leituras foram realizadas em triplicado.

Para se determinar a concentração de açúcares redutores presentes nas amostras, foi necessário fazer uma curva de calibração (Anexo V), usando concentrações conhecidas de glucose, 0 – 1 g/L. A reta obtida foi $Ab_{540\text{ nm}} = 0,6124 \times \text{Concentração de glucose (g/L)} - 0,0111$; $R^2 = 0,9986$.

2.6.6. Quantificação dos açúcares por índice de refração

Nos ensaios em que a fonte de carbono utilizada foi o extrato de alfarroba, para a quantificação do substrato consumido utilizou-se o refratómetro. Este aparelho indica o índice de refração da substância em análise. O índice de refração, também conhecido como índice de Brix (%), é proporcional à concentração de açúcares em percentagem dissolvidos em soluções aquosas.

2.6.7. Quantificação dos lípidos neutros por fluorescência

A quantificação de lípidos neutros, importantes na acumulação lipídica nos microrganismos oleaginosos, foi efetuada por espectroscopia de fluorescência, baseada no método descrito por Chen *et al.* (2009), sendo introduzidas algumas alterações. Este método requer o uso de um corante solúvel em lípidos, o Vermelho de Nilo (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one), que tem sido frequentemente utilizado para avaliar o teor de lípidos em diversos microrganismos (bactérias, leveduras, microalgas, entre outros).

Este método consiste na leitura da fluorescência medida por um espectralfluorímetro (F-4500, Hitachi), cujo comprimento de onda de excitação foi 530 nm e o comprimento de onda de emissão variou entre os 400 e 700 nm, utilizando para tal o *software FL Solutions v2.0*. Numa *cuvette* de fluorescência, *cuvette* de quartzo com quatro faces polidas, colocaram-se 200 μL de amostra, 1850 μL de tampão PBS (Anexo IV) e 50 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido) e registou-se o espectro após 10 minutos de agitação a 40 °C. De seguida, adicionou-se 10 μL da solução de Vermelho de Nilo (0,1 mg de Vermelho de Nilo em 1 mL de acetona) e registou-se novamente o espectro após 10 minutos de agitação a 40 °C. O valor da fluorescência

corresponde à diferença do espectro com corante e sem corante, entre os comprimentos de onda 570 e 600 nm, sendo os resultados expressos em unidades de fluorescência (UF).

Com base nos métodos descritos por Chen *et al.* (2009) e Isleten – Hosoglu *et al.* (2012), otimizou-se uma curva padrão que relaciona as unidades de fluorescência com a quantidade de lípidos presentes na amostra. Esta curva foi feita com diferentes concentrações conhecidas de um lípido neutro padrão, a trioleína, que é um triacilglicerol, constituído por moléculas de ácido oleico. As concentrações de trioleína variaram entre 0 a 1 g/L, preparada em 2-propanol, em triplicado e nas mesmas condições que a leitura das amostras. A figura seguinte representa a reta obtida:

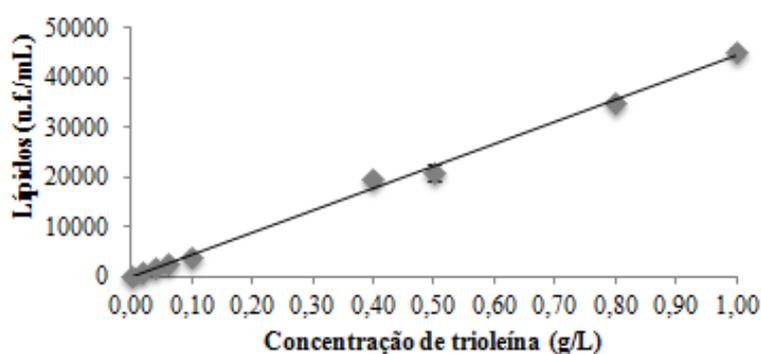


Figura 2.3 - Curva padrão de lípidos neutros. Registou-se o espectro (comprimento de onda de excitação 530 nm) para soluções de trioleína com diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: Fluorescência (UF/mL) = 44663 x Concentração de trioleína (g/L) + 5,6753; $R^2 = 0,9976$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.

2.6.8. Extração de lípidos intracelulares

A extração de lípidos intracelulares efetuou-se no fim da cultura e foi baseada no método de Folch *et al.* (1957), com algumas modificações. De forma a garantir uma rutura celular completa, com libertação total de lípidos, a amostra foi sujeita a diversos choques térmicos, que consistiu em congelar e descongelar a mesma 3 vezes, e de seguida colocou-se na autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a amostra numa centrífuga (Hettich, Universal 320), durante 10 minutos a 5000 rpm, descartando-se no fim o sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se uma mistura de clorofórmio/metanol, na proporção 2:1 (v/v), na relação de 1 g de amostra e 20 mL da mistura e colocou-se em agitação durante a noite. A amostra foi centrifugada novamente a 5000 rpm durante 10 minutos, descartando-se desta vez o *pellet*. Ao sobrenadante adicionou-se 0,2 volumes de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,1 % e agitou-se no vortex durante 2 minutos. Voltou-se a centrifugar (5000 rpm,

5min) para separar as duas fases, e a fase superior foi rejeitada, pois a fase inferior contém os lípidos dissolvidos no clorofórmio. A amostra foi depois filtrada a vácuo e no filtro colocou-se um pouco de sulfato de sódio anidro, de forma a absorver as partículas de água presentes na amostra. Por fim, a amostra filtrada foi transferida para um balão de recolha previamente pesado e colocada no evaporador rotativo (Heidolph, 94200), a 50°C, para evaporar o clorofórmio. Após evaporação do clorofórmio, os lípidos extraídos foram secos com uma corrente de azoto, pesando-se posteriormente o balão de recolha. A massa lipídica corresponde à diferença do balão com a amostra e o balão sem amostra. Através da equação 7 obteve-se a percentagem (p/p) de lípidos intracelulares extraídos em função do peso seco.

$$\%_{\text{lípidos}} = \frac{\text{massa de lípidos extraídos (g)}}{\text{massa de células utilizada (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 7}$$

2.6.9. Quantificação e análise do perfil de ácidos gordos

A quantificação e análise do perfil de ácidos gordos foram efetuadas pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

De acordo com o método adaptado de DGF-Einheitsmethoden, descrito por Hein e Isengard (1997), procedeu-se à hidrólise dos triglicéridos obtidos na extração dos lípidos. Para tal, levou-se à ebulição em sistema de aquecimento por refluxo, durante uma 1h, 2 g de massa lipídica dissolvida em 50 mL de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5 M. A solução ainda quente foi transferida para um funil de extração de 500 mL e lavada com 50 mL de água destilada, adicionando-se ácido sulfúrico, 5 M, até ser atingido um pH 5. A amostra foi transferida para uma ampola de decantação e adicionou-se 40 mL de clorofórmio. Agitou-se suavemente e aguardou-se a separação das fases. A fase inferior, que contém os ácidos gordos, foi recolhida para análise por HPLC. Nas análises do perfil em ácidos gordos utilizou-se uma coluna Alltima Altech Hi-Load C18 (Grace) acoplada ao HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) constituído por um forno (L-2300), um auto injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490) e uma bomba (L-2130). As amostras foram previamente filtradas com filtros de seringa de 0,2 µm (Milipor) para um *vial*. A fase móvel consistiu numa mistura de água:acetonitrilo (1:99), a um fluxo de 1,2 mL/min e o detetor usado foi de índice de refração (IR) (RI Detector L-2490, Hitachi) a 30°C.

Para elaborar uma curva de calibração (ANEXO V) para cada ácido gordo, usaram-se quatro padrões em diferentes concentrações: ácido oleico, 0 – 40 g/L; ácido palmítico, 2 – 10 g/L; ácido linoleico, 3 – 15 g/L; e ácido esteárico, 2 – 10 g/L.

As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir das retas obtidas:

$$Y = 526\,158 X - 2\,000\,000, R^2 = 0,9619 \text{ (ácido oleico);}$$

$$Y = 853\,174 X - 153\,135, R^2 = 0,9886 \text{ (ácido palmítico);}$$

$$Y = 776\,771 X + 24\,638, R^2 = 0,9991 \text{ (ácido linoleico);}$$

$$Y = 548\,513 x + 734\,660, R^2 = 0,9688 \text{ (ácido esteárico),}$$

onde Y representa as unidades de detecção e X a concentração do ácido gordo (g/L).

2.7. PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO

2.7.1. Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento, μ , foi determinada através do programa de modelação *on-line* DMFit (<http://modelling.combase.cc>) para cada crescimento celular efetuado. Este programa baseia-se em modelos de aproximação, em que a determinação da taxa específica de crescimento é o logaritmo do peso seco em função do tempo de cultura. A taxa específica de crescimento é expressa em h^{-1} .

2.7.2. Rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido

O rendimento da biomassa produzida em função do substrato consumido ($Y_{X/S}$) corresponde ao declive obtido por regressão linear dos valores de biomassa produzida em relação aos açúcares totais consumidos em função do tempo e é expresso em g biomassa produzida / g substrato consumido. É expresso pela seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad \text{Equação 8}$$

Onde X_0 e S_0 representam a concentração de biomassa e de substrato iniciais, respetivamente, e X e S , a concentração de biomassa e substrato presente no meio de cultura no fim do crescimento celular.

2.7.3. Rendimento de lípidos produzidos em função do substrato consumido

O rendimento de lípidos produzidos em função do substrato consumido ($Y_{L/S}$) corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de lípidos produzidos em relação aos açúcares totais consumidos em função do tempo e é expresso em g lípidos produzidos / g substrato consumido. Pode ser calculado, usando a seguinte equação:

$$Y_{L/S} = \frac{(L-L_0)}{(S_0-S)} \quad \text{Equação 9}$$

Onde L_0 e S_0 correspondem às concentrações iniciais de lípidos produzidos e de substrato, respetivamente. L e S correspondem aos lípidos produzidos e substrato consumido no final do crescimento celular.

2.7.4. Rendimento de lípidos produzidos em função da biomassa

Este rendimento ($Y_{L/X}$) corresponde ao declive calculado por regressão linear dos valores de lípidos produzidos em relação à biomassa produzida em função do tempo e é expresso em g lípidos produzidos / g biomassa. Pode ser calculado, usando a seguinte equação:

$$Y_{L/X} = \frac{(L-L_0)}{(X-X_0)} \quad \text{Equação 10}$$

Em que, X_0 e L_0 representam a concentração inicial de biomassa e de lípidos produzidos, respetivamente, e X e L , a concentração de biomassa e de lípidos no final do crescimento celular.

2.7.5. Produtividade específica máxima de lípidos

A produtividade específica máxima de lípidos é definida como a quantidade máxima de lípidos obtidos ($\text{lípidos}_{\text{máx}}$) por unidade de biomassa produzida, por unidade de tempo em que se registou esse máximo ($\text{tempo}_{\text{lípidos máx}}$) e foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade lípidos} = \frac{\text{lípidos}_{\text{máx}}}{\text{biomassa} \times \text{tempo}_{\text{lípidos máx}}} \quad \text{Equação 11}$$

A quantidade de lípidos_{máx} é expressa em mg/L, a biomassa produzida é expressa em g/L e o tempo_{lípidos máx} em h, sendo que a produtividade específica máxima de lípidos é expressa em mg/(g.h).

2.7.6. Produtividade específica máxima de clorofila a

Define-se a produtividade específica máxima de clorofila a como a quantidade máxima de clorofila a obtida ($C_{a \text{ máx}}$), expressa em mg/mL, por unidade de biomassa produzida, expressa em g/L, por unidade de tempo em que se registou esse máximo (tempo _{$C_{a \text{ máx}}$}), em h. Pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade } C_a = \frac{C_{a \text{ máx}}}{\text{biomassa} \times \text{tempo}_{C_{a \text{ máx}}}} \quad \text{Equação 12}$$

A produtividade específica máxima de clorofila a é expressa em mg/(mg.h).

2.7.7. Produtividade específica máxima de clorofila b

A produtividade específica máxima de clorofila b é definida como a quantidade máxima de clorofila b obtida ($C_{b \text{ máx}}$), expressa em mg/mL, por unidade de biomassa produzida, expressa em g/L, por unidade de tempo em que se registou esse máximo (tempo _{$C_{b \text{ máx}}$}), em h. Pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade } C_b = \frac{C_{b \text{ máx}}}{\text{biomassa} \times \text{tempo}_{C_{b \text{ máx}}}} \quad \text{Equação 13}$$

A produtividade específica máxima de clorofila b é expressa em mg/(mg.h).

2.7.8. Produtividade específica máxima de clorofila total

A produtividade específica máxima de clorofila total é definida como a quantidade máxima de clorofila total obtida ($C_{T \text{ máx}}$), por unidade de biomassa produzida, por unidade de tempo em que se registou esse máximo ($\text{tempo}_{CT \text{ máx}}$) e foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade } C_T = \frac{C_{T \text{ máx}}}{\text{biomassa} \times \text{tempo}_{CT \text{ máx}}} \quad \text{Equação 14}$$

A produtividade específica máxima de clorofila total é expressa em mg/(mg.h).

2.7.9. Produtividade específica máxima de carotenoides

Define-se a produtividade específica máxima de carotenoides como a quantidade máxima de carotenoides obtida ($C_C \text{ máx}$), expressa em mg/mL, por unidade de biomassa produzida, expressa em g/L, por unidade de tempo em que se registou esse máximo ($\text{tempo}_{CC \text{ máx}}$), em h. Pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade } C_C = \frac{C_C \text{ máx}}{\text{biomassa} \times \text{tempo}_{CC \text{ máx}}} \quad \text{Equação 15}$$

A produtividade específica máxima de carotenoides é expressa em mg/(mg.h).

2.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os dados calculados em cada ensaio foram submetidos a análise estatística, as regressões lineares foram efetuadas no Microsoft Office Excel 2010 e as análises de variância foram efetuadas pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) no *software* SigmaPlot versão 12.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESTABELECIMENTO EM PLACA DAS MICROALGAS A DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Sabe-se que muitas das microalgas, em condições de heterotrofia ou mixotrofia, acumulam maiores quantidades de lípidos do que quando crescem em condições de autotrofia (Wan *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012; Cheirsilp e Torpee, 2012). Nesse sentido, e uma vez que o substrato representa grande parte do custo de produção de microalgas, surge a necessidade de encontrar fontes de carbono alternativas que acarretem menos custos. Existem já vários estudos indicando a capacidade da microalga *Chlorella sorokiniana* de crescer em condições heterotróficas e mixotróficas, especialmente com glucose como substrato (Qiao e Wang, 2009; Yang *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2011; Cheirsilp e Torpee, 2012). A utilização de açúcares convencionais num processo industrial é o que mais encarece todo o processo e, portanto, a procura de uma fonte rica em açúcares e de baixo custo tornou-se um desafio. Dessa forma, foram estudados dois resíduos, o resíduo da polpa de alfarroba e o resíduo de citrinos, com o intuito de tornar a cultura de microalgas sustentável.

Esta primeira fase do trabalho consistiu em adaptar duas espécies de microalgas, *Chlorella sorokiniana* e *Picochlorum* sp *HMI*, a diferentes fontes de carbono em meio sólido e posteriormente realizaram-se ensaios em meio líquido.

3.1.1. *Chlorella sorokiniana*

Este estudo consistiu no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em meio sólido, onde se testou inicialmente uma fonte de carbono comercial, glucose, na concentração molar de 56 mM, e dois resíduos, um proveniente da indústria da transformação da alfarroba e outro da indústria dos citrinos, nas concentrações molares de 34 mM e 38 mM, respetivamente. Em termos de concentrações mássicas, estas fontes de carbono testadas correspondem a uma concentração no meio de 10 g/L. O estudo foi realizado em heterotrofia e em mixotrofia, sendo apresentados na Figura 3.1 imagens do crescimento em meio sólido, em placa, das culturas de *C. sorokiniana* crescidas nas diferentes fontes de carbono orgânico.

Verificou-se que a microalga *C. sorokiniana* tem capacidade de se adaptar, tanto em heterotrofia como em mixotrofia, a todas as fontes de carbono orgânicas testadas, exceto ao resíduo de citrinos, onde não se verificou crescimento. Uma das razões para o sucedido poderá ser a concentração do extrato de citrinos ser inibitória ao crescimento da microalga. Devido a este resultado, surgiu a necessidade de fazer o estudo com a sacarose, na concentração de 29 mM, equivalente a 10 g/L, para ver se o crescimento da microalga era inibido na presença deste açúcar. Tal não se verificou, uma vez que houve crescimento celular nas placas com sacarose e nas placas contendo extrato aquoso do resíduo de alfarroba, em que este resíduo contém o mesmo tipo de açúcares que o resíduo de citrinos, glucose, sacarose e frutose, sendo a sacarose o açúcar maioritário, em ambos os resíduos. Os resultados obtidos, em que se verificou ausência de crescimento, sugere que a concentração de resíduo de citrinos utilizada possa ter sido inibitória para o crescimento celular. Outra possível razão, poderá ser o facto de se utilizar um extrato bruto, em que o resíduo, após a extração do sumo, é composto essencialmente por cascas, segmentos membranares e sementes (Wilkins *et al.*, 2007b). O d-limoneno é dos terpenos mais comuns na natureza e é dos principais constituintes dos óleos cítricos (laranja, limão, tangerina, lima e uva), estando presente na casca destes frutos, representando mais de 95 % do conteúdo total e, portanto, no resíduo (Sun, 2007; Maróstica e Pastore, 2007; Pourbafrani *et al.*, 2007). O d-limoneno é extremamente tóxico para os microrganismos e é conhecido por inibir o crescimento de leveduras, podendo este composto inibir o crescimento da microalga quando exposta ao meio com esta fonte de carbono orgânica, o resíduo de citrinos (Pourbafrani *et al.*, 2007).

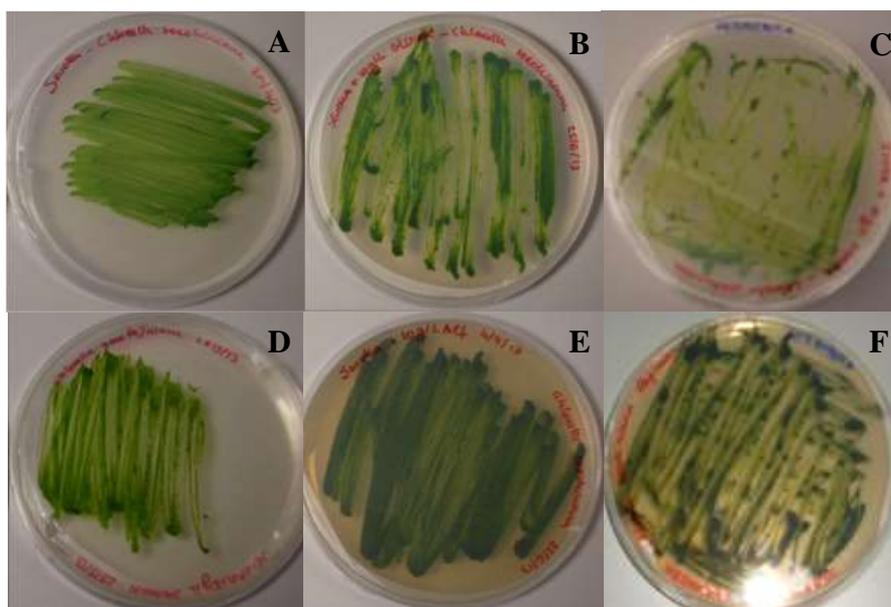


Figura 3.1 - Culturas de *Chlorella sorokiniana* em meio sólido, crescidas em placas. (A) Meio Seuoka, em autotrofia; (B) Meio Seuoka com 56 mM de glicose, em mixotrofia; (C) Meio Seuoka com 56 mM glicose, em heterotrofia; (D) Meio Seuoka com 29 mM de sacarose, em mixotrofia; (E) Meio Seuoka com 34 mM de extrato de alfafa, em mixotrofia; (F) Meio Seuoka com 34 mM de extrato de alfafa, em heterotrofia.

Com o presente estudo, destaca-se a capacidade de adaptação da microalga *Chlorella sorokiniana* para crescer em condições de heterotrofia e mixotrofia em meio sólido, utilizando fontes de carbono orgânicas tradicionais, como sendo a glicose e a sacarose, e o resíduo agroindustrial da polpa de alfafa, proveniente da indústria transformadora da alfafa, sugerindo uma possível alternativa ao uso das fontes de carbono convencionais como substrato. A adaptação em meio líquido com este resíduo é discutida no ponto 3.2.3.

3.1.2. *Picochlorum* sp *HMI*

A microalga *Picochlorum* sp *HMI*, também foi adaptada ao meio F/2 sólido, em condições de heterotrofia e mixotrofia, com diferentes fontes de carbono orgânicas: 50 mM de glicose (9,0 g/L), 50 mM de citrinos (13,0 g/L), 50 mM de resíduo de alfafa (14,7 g/L), 29 mM de sacarose (10 g/L), 10 mM de resíduo de extrato de alfafa (3,0 g/L), e mistura dos dois resíduos, resíduo de polpa de alfafa e resíduo de citrinos, com as concentrações 10 mM e 63 mM, respectivamente.

Na Figura 3.2 são apresentadas placas com crescimento da microalga *Picochlorum* sp *HMI*, crescida em diferentes fontes orgânicas, glucose, alfarroba e citrinos, comparativamente com o crescimento em condições de autotrofia. Verificou-se crescimento celular nas placas com meio F/2 sólido contendo 50 mM de glucose e 29 mM de sacarose. O meio sólido com resíduo de alfarroba foi testado inicialmente com uma concentração de açúcares totais de 50 mM, em heterotrofia e mixotrofia, e em ambas as condições não se registou crescimento celular. Contudo, reduzindo-se a concentração deste resíduo para 10 mM foi possível observar crescimento celular tanto em heterotrofia como em mixotrofia, indicando que a concentração inicial testada foi inibitória para o crescimento desta microalga. Tal como aconteceu com a microalga *C. sorokiniana*, a *Picochlorum* sp *HMI* conseguiu adaptar-se ao meio com resíduo de alfarroba, embora não o tenha feito no meio suplementado com resíduo de citrinos. Mais uma vez, pensa-se que o facto de o resíduo de citrinos se tratar de um extrato bruto, que não sofreu qualquer tratamento, e sabendo que na sua composição existe d-limoneno, conhecido por inibir o crescimento de leveduras, sejam as causas prováveis para a inibição do crescimento destas duas microalgas. No entanto, como se pode verificar na Figura 3.2, observou-se uma excelente adaptação ao meio contendo a mistura dos dois resíduos agroindustriais, encontrando-se o resíduo de citrinos (63 mM) numa concentração superior à do resíduo de alfarroba (10 mM). Neste caso, os açúcares presentes no resíduo de alfarroba poderão ter sido suficientes ao crescimento da microalga. Contudo, com o mesmo tempo de cultura, verificou-se que a microalga crescida na mistura dos dois resíduos, alfarroba e citrinos, aparentava maior crescimento do que apenas com o resíduo de alfarroba, sendo este facto de difícil explicação.

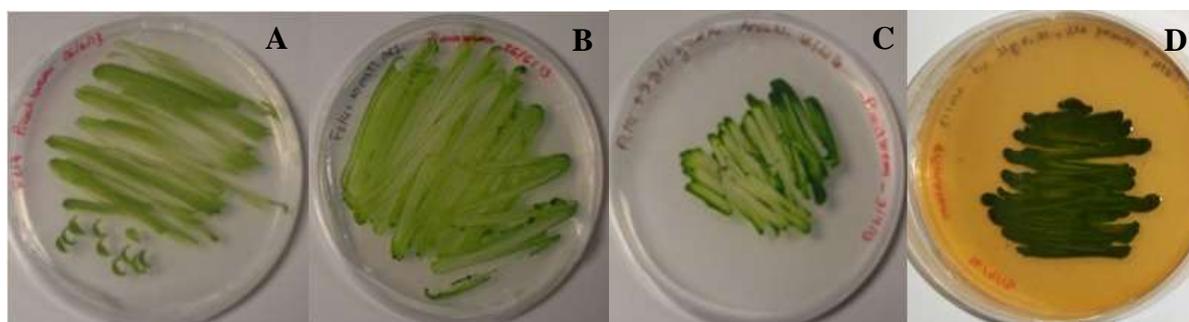


Figura 3.2 - Culturas de *Picochlorum* sp *HMI* em meio sólido, em placas. (A) Meio F/2, em autotrofia; (B) Meio F/2 com 10 mM de resíduo de alfarroba; (C) Meio F/2 com 50 mM de glucose; (D) Meio F/2 com 10 mM de resíduo de alfarroba e 63 mM de resíduo de citrinos.

Os resultados do crescimento da microalga *Picochlorum* sp *HMI* em placa são promissores e indicativos de que esta cultura poderá crescer em condições de heterotrofia ou mixotrofia, adaptando-se a diferentes tipos de resíduos agroindustriais. Este cenário poderá ser uma mais-valia, uma alternativa válida na produção de microalgas para a acumulação de óleos.

3.2. ENSAIOS DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*

Foram realizados ensaios com a microalga *Chlorella sorokiniana*, crescida em Erlenmeyer, com o objetivo de se avaliar a produção e acumulação de lípidos, assim como a acumulação de pigmentos totais, clorofila a, clorofila b e carotenoides. Esta microalga foi cultivada em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas, sendo os diferentes metabolismos comparados entre si. Nos crescimentos em condições heterotróficas e mixotróficas, foram usadas como fontes de carbono, a glucose e o resíduo de polpa de alfarroba, nas concentrações de 10 g/L. Sabendo-se que em condições limitativas de azoto, o metabolismo lipídico é favorecido, procedeu-se ainda a estudos em condições heterotróficas e mixotróficas, em que se diminuiu a concentração da fonte de azoto de 0,95 g/L para 0,47 g/L, usando como fonte de carbono a glucose e o resíduo de alfarroba.

3.2.1. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* em condições autotróficas

Os ensaios em autotrofia foram iniciados com um inóculo inicial de 1×10^7 células/mL em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio Seuoka e decorreram à temperatura de 28 ± 1 °C e uma agitação de 150 rpm. Neste ensaio testaram-se três condições: arejamento com ar e agitação; arejamento com ar, CO₂ (95:5 %, v/v) e agitação; e apenas agitação. No decorrer do ensaio efetuaram-se análises para a quantificação do crescimento celular, lípidos produzidos e pigmentos totais, clorofilas e carotenoides, de forma a caracterizar o perfil de crescimento e a produção de metabolitos. Este ensaio teve a duração de 312 h.

Na Figura 3.3 e na Tabela 3.1 estão representados os perfis de crescimento, biomassa, pigmentos e os valores dos parâmetros cinéticos para a microalga *Chlorella sorokiniana* crescida nas diferentes condições de autotrofia estudadas.

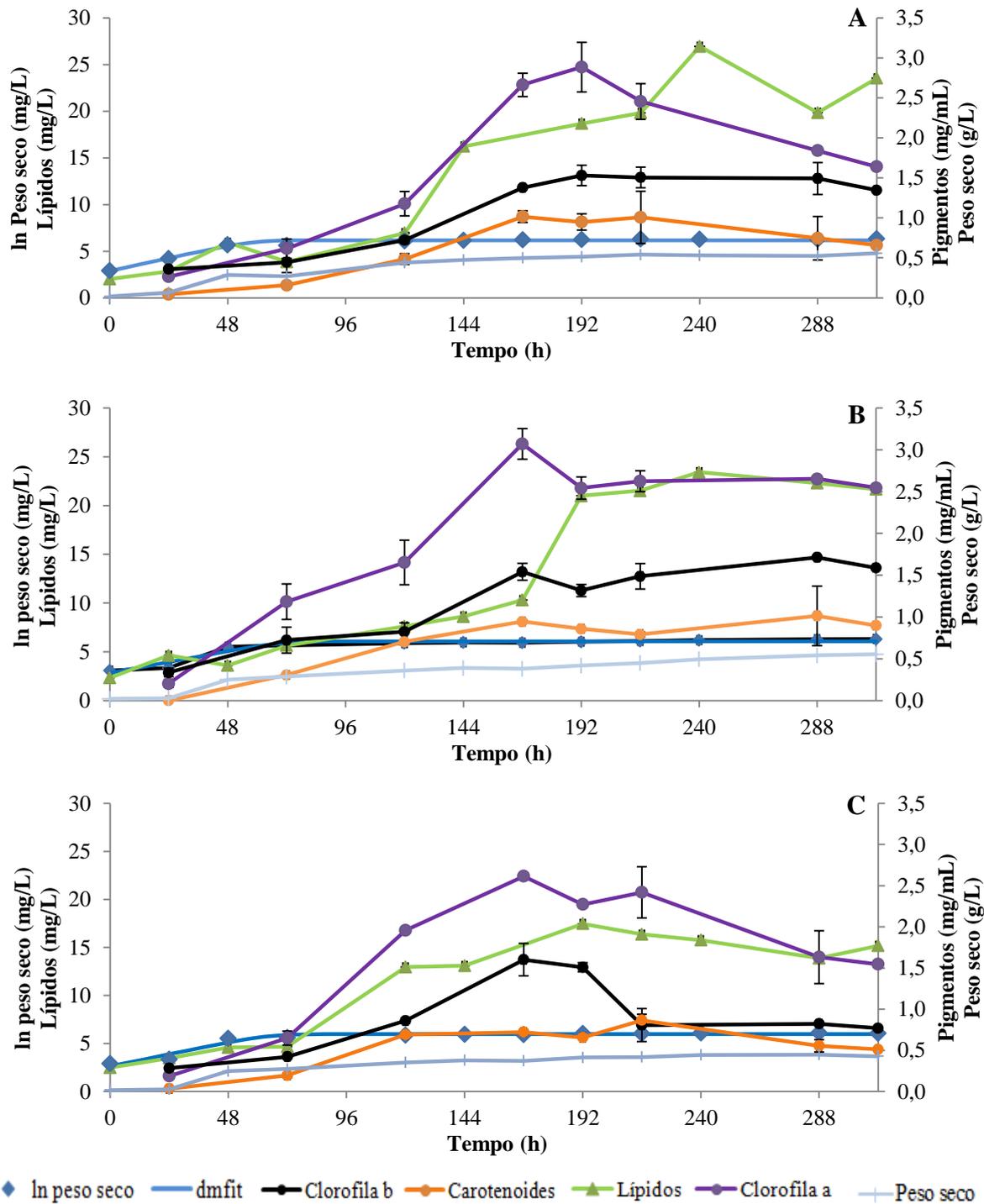


Figura 3.3 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, pigmentos totais, clorofila a, b e carotenoides, ao longo do ensaio experimental pela *Chlorella sorokiniana* em Erlenmeyer (312h). Condições de cultura: $28 \pm 1^\circ \text{C}$, 150 rpm e sob luz contínua. (A) $\text{CO}_2 + \text{Ar} + \text{Agitação}$, (B) $\text{Ar} + \text{Agitação}$, (C) Agitação .

Tabela 3.1 - Parâmetros cinéticos determinados para a cultura da microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes condições de crescimento em autotrofia, em Erlenmeyers que decorreu numa agitadora orbital a 28 ± 1 °C, 150 rpm durante 312 h, sob luz contínua. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Parâmetros cinéticos	Condições		
	CO ₂ + Ar + Agitação	Ar + Agitação	Agitação
μ (h ⁻¹)	0,057 \pm 0,007 ^a	0,047 \pm 0,009 ^a	0,052 \pm 0,008 ^a
Y _{L/X} (g/g)	0,039 \pm 0,005 ^a	0,038 \pm 0,003 ^a	0,031 \pm 0,003 ^a
Lípidos máx (mg/L)	26,930 \pm 0,003 ^a	23,421 \pm 0,001 ^b	17,472 \pm 0,001 ^c
t lípidos máx (h)	240	240	192
Produtividade lípidos (mg/g.h)	0,211 \pm 0,003 ^a	0,215 \pm 0,001 ^a	0,220 \pm 0,002 ^a
Produtividade C _a (mg/mg.h)	0,029 \pm 0,003 ^b	0,048 \pm 0,007 ^a	0,042 \pm 0,001 ^a
Produtividade C _b (mg/mg.h)	0,016 \pm 0,001 ^b	0,011 \pm 0,002 ^b	0,026 \pm 0,003 ^a
Produtividade C _T (mg/mg.h)	0,045 \pm 0,004 ^a	0,072 \pm 0,010 ^a	0,067 \pm 0,004 ^a
Produtividade C _c (mg/mL.h)	0,013 \pm 0,001 ^a	0,007 \pm 0,002 ^b	0,010 \pm 0,002 ^a

Valores de taxa específica de crescimento (μ), rendimento de lípidos em relação à biomassa (Y_{L/X}), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos máx), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos máx), produtividade de lípidos acumulados, clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_C). Numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Em análise à Figura 3.3, verifica-se que os crescimentos celulares são semelhantes em qualquer uma das condições estudadas, não existindo praticamente fase de latência e, atingindo a fase estacionária ao fim de 72 h de crescimento. A adição de uma corrente de dióxido de carbono aparenta proporcionar um crescimento ligeiramente mais rápido, como se pode observar pelos valores apresentados de taxa específica de crescimento na Tabela 3.1, no entanto, não existe diferenças estatísticas entre as três condições de autotrofia estudadas, uma vez que os valores obtidos são idênticos. Hsieh e Wu (2009), realizaram um estudo com a microalga *Chlorella* sp. em condições de autotrofia, utilizando fotobiorreatores e fornecendo uma corrente de dióxido de carbono à cultura, em que obtiveram taxas específicas de crescimento muito próximas das apresentadas no presente estudo, variando os valores entre 0,0358 h⁻¹ e 0,0576 h⁻¹. Num outro estudo efetuado por Morais (2011) com a microalga *Phaeodactylum tricorutum* em Erlenmeyer de 2 L, a taxa específica de crescimento em condições de autotróficas foi de 0,0350 h⁻¹. Na condição com dióxido de carbono e ar obteve-se uma maior concentração de biomassa em relação às outras condições estudadas, indicando que a alimentação com uma corrente gasosa de CO₂ e ar favorecem o crescimento celular como seria espectável, uma vez que no metabolismo autotrófico, sob a ação da luz há a fixação do CO₂ para ser transformado em energia.

Em relação à produção de lípidos por esta microalga, é possível observar na Figura 3.3 que a acumulação ocorre na fase estacionária de crescimento. O valor mais elevado em termos de concentração de lípidos foi obtido no ensaio em que era fornecido ar e dióxido de carbono, com 26,93 mg/L às 240 h de cultura (Tabela 3.1). Contudo, os valores de produtividade de lípidos foram idênticos nas três condições estudadas, assim como o rendimento $Y_{L/X}$, sendo este bastante baixo para espécies oleaginosas.

Observando a Figura 3.3, é possível verificar que, em qualquer condição estudada, a clorofila a está sempre em maior proporção relativamente à clorofila b. Estudos realizados por Mohsenpour *et al.* (2012) e Mohsenpour *et al.* (2013), mostram que a clorofila a encontra-se em maior proporção em relação à clorofila b. Borrmann (2009) afirma que a clorofila a representa cerca de 75 % dos pigmentos verdes totais. Os valores das produtividades em relação aos pigmentos não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito às clorofilas totais, mas em termos de carotenoides o valor mais elevado foi obtido no ensaio com fornecimento de corrente gasosa de dióxido de carbono e ar.

O crescimento da microalga com agitação, ar e CO₂ será considerado como ensaio de comparação com os crescimentos em condições heterotróficas e mixotróficas apresentados nos capítulos seguintes.

3.2.2. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* em condições heterotróficas e mixotróficas, usando como fonte de carbono glucose

Sabe-se que os metabolismos heterotróficos e mixotróficos são muito importante quando se pretende aumentar a produção de biomassa e de lípidos num curto espaço de tempo. Embora a autotrofia seja o metabolismo principal, algumas microalgas com características oleaginosas revelaram-se capazes de crescer e acumular lípidos na presença de fontes de carbono orgânicas, em condições de heterotrofia e mixotrofia. Este estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade de crescimento e acumulação de lípidos utilizando como fonte de carbono um açúcar comercial, a glucose, em condições heterotróficas e mixotróficas.

O ensaio foi iniciado com um inóculo inicial de 1×10^7 células/mL em Erlenmeyer com 200 mL de meio Seuoka, cuja composição está descrita no capítulo 2.3 em Material e Métodos, com glucose como fonte de carbono na concentração de 10 g/L, à temperatura de 28 ± 1 °C, agitação de 150 rpm, sem a presença de luz, no caso da heterotrofia, e sob luz contínua, no ensaio mixotrófico. No decorrer do ensaio efetuaram-se análises para a quantificação do

crescimento celular, azoto consumido, substrato consumido, lípidos produzidos e pigmentos totais. O ensaio teve a duração de 384 horas de cultura.

Na Figura 3.4 pode observar-se o perfil de crescimento e a acumulação de lípidos da microalga *Chlorella sorokiniana*, assim como o consumo do substrato e de azoto ao longo do tempo de cultura em condições de heterotrofia e mixotrofia. Igualmente, na Tabela 3.2 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos da microalga crescida nos diferentes metabolismos.

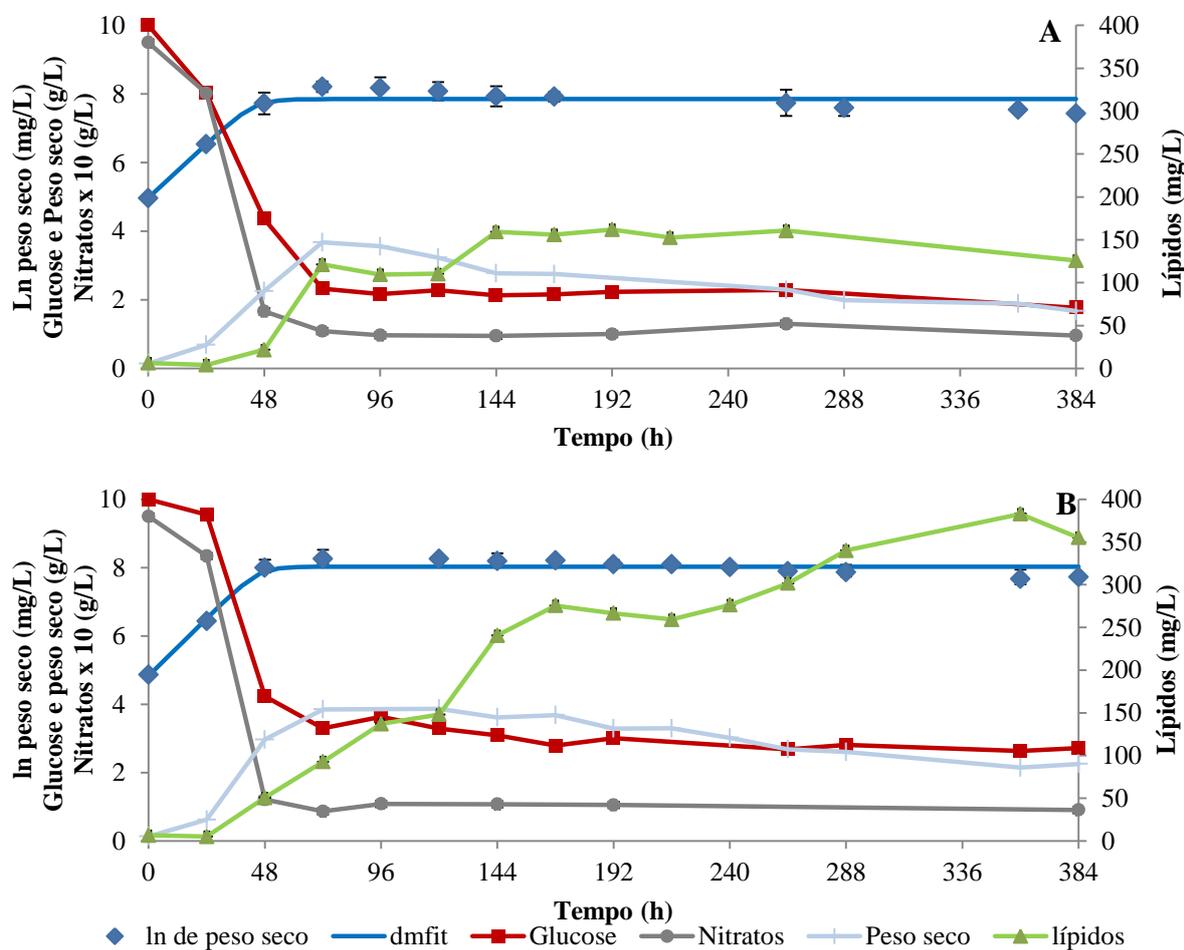


Figura 3.4 - Perfil de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana*. (A) Crescimento em condições heterotróficas, (B) crescimento em condições mixotróficas. O crescimento decorreu durante 384, em Erlenmeyer, com 10 g/L de glucose, numa agitadora orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Analisando a Figura 3.4 verifica-se que o perfil de crescimento é idêntico, atingindo a fase estacionária às 48 h em ambas as condições de cultura estudadas, heterotrofia e mixotrofia. O consumo de nitratos pela microalga também é idêntico nas duas situações, sendo praticamente esgotado durante a fase exponencial de crescimento, ao fim de 48 h de cultura. É possível constatar que, quando a cultura entra em fase estacionária e encontrando-se em condições de limitação de azoto (nitrato), a concentração de lípidos começa a aumentar drasticamente. Embora em condições de crescimento heterotrófico, a concentração máxima de lípidos tenha sido alcançada mais cedo, às 144 h, com aproximadamente 175 mg/L, em mixotrofia, apenas foi atingida às 360 h, com 390 mg/L, ou seja, a quantidade de lípidos acumulados em condições heterotróficas foi praticamente metade da obtida em mixotrofia.

Em condições de heterotrofia, a microalga é crescida no escuro, onde a única fonte de carbono adicionada no meio de cultura é a glucose, sendo esta consumida rapidamente, nas primeiras 72 h do crescimento. A este tempo de cultura, a quantidade de glucose presente é praticamente residual, cerca de 2 g/L. No crescimento mixotrófico, a microalga cresceu na presença de luz e de glucose no meio de cultura, podendo a microalga ter os dois sistemas metabólicos ativos, o autotrófico e o heterotrófico, verificando-se um consumo de glucose mais lento em relação à cultura crescida apenas em condições heterotróficas.

Tabela 3.2 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes metabolismos, heterotrofia e mixotrofia, com 10 g/L de glucose. Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 384 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Parâmetros cinéticos	GLUCOSE	
	Heterotrofia	Mixotrofia
μ (h^{-1})	$0,065 \pm 0,014^a$	$0,070 \pm 0,010^a$
$Y_{X/S}$ (g/g)	$0,404 \pm 0,046^a$	$0,524 \pm 0,032^a$
$Y_{L/S}$ (g/g)	$0,019 \pm 0,002^b$	$0,044 \pm 0,006^a$
$Y_{L/X}$ (g/g)	$0,212 \pm 0,004^b$	$0,239 \pm 0,018^a$
Lípidos máx (mg/L)	$174,610 \pm 0,006^b$	$390,858 \pm 0,003^a$
t lípidos máx (h)	144	360
Produtividade lípidos (mg/g.h)	$0,437 \pm 0,001^b$	$0,506 \pm 0,001^a$
Produtividade C_a (mg/mg.h)	$0,018 \pm 0,001^a$	$0,019 \pm 0,002^a$
Produtividade C_b (mg/mg.h)	$0,009 \pm 0,001^a$	$0,008 \pm 0,001^a$
Produtividade C_T (mg/mg.h)	$0,026 \pm 0,001^a$	$0,027 \pm 0,003^a$
Produtividade C_c (mg/mg.h)	$0,010 \pm 0,001^a$	$0,009 \pm 0,001^a$

Valores de taxa específica de crescimento (μ), rendimento de biomassa produzida em relação ao substrato consumido ($Y_{X/S}$), rendimento de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/S}$), rendimento de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/X}$), concentração

máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), produtividade de lípidos, clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_C). Numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Analisando o rendimento da quantidade de lípidos produzidos por unidade de biomassa, $Y_{L/X}$ (Tabela 3.2), verifica-se que o crescimento em condições mixotróficas destaca-se em relação à microalga crescida em condições heterotróficas, com um valor de praticamente 24 % (p/p) de lípidos acumulados, correspondendo a cerca de 391 mg/L. Verifica-se igualmente que a produtividade lipídica é também superior no crescimento mixotrófico, obtendo-se 0,506 mg/(g.h). Wan *et al.* (2011), num estudo com a microalga *Chlorella sorokiniana* em que foram testadas várias concentrações iniciais de glucose, verificaram que a acumulação lipídica era maximizada com a concentração inicial de 10 g/L de glucose, onde alcançaram uma concentração de lípidos de 672 mg/L, correspondendo a um rendimento lipídico de 50 % (p/p). Os resultados obtidos neste trabalho experimental vão de encontro com o estudo publicado por Qiao e Wang (2009), em que a microalga *C. sorokiniana*, crescida num meio líquido com rácio C/N 35 e utilizando glucose como fonte de carbono orgânico, atingiu os 23,7 % (p/p) de conteúdo lipídico em condições heterotróficas. Um outro estudo realizado por Cheirsilp e Torpee (2012), com as microalgas *Chlorella sp.* de água doce e *Chlorella sp.* de água salgada, mostra que a microalga de água doce crescida em condições de heterotrofia e de mixotrofia, com adição de 2 g/L de glucose, acumula apenas 15 % (p/p) de lípidos em ambas as condições, mas a mesma microalga de água salgada acumula cerca de 30 % de lípidos em mixotrofia e em heterotrofia acumula perto dos 20 % (p/p), verificando-se assim, uma maior aptidão desta espécie para acumulação de lípidos em mixotrofia. Quando a microalga assimila glucose como fonte de carbono, o azoto é consumido mais rapidamente do que em condições autotróficas. E em condições mixotróficas, para além da assimilação do carbono orgânico, a microalga também assimila o carbono inorgânico, estimulando assim a acumulação de lípidos (Yeh e Chang, 2012).

Verificou-se um aumento de 4 vezes na biomassa em condições heterotróficas e mixotróficas, em relação ao sistema autotrófico, sendo que o melhor resultado foi registado em mixotrofia com aproximadamente 4 g/L de peso seco, sugerindo o funcionamento em simultâneo dos metabolismos respiratório e fotossintético, na presença do substrato orgânico. O crescimento celular não foi estritamente dependente da fotossíntese (Cheirsilp e Torpee, 2012; Andrade e Costa, 2007), tendo sido estimulado através da metabolização do substrato orgânico (Santos *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2013). Estes resultados vão de encontro com o que já tinha sido

reportado por Qiao *et al.* (2009) onde verificaram um melhor crescimento da microalga *C. sorokiniana* em condições mixotróficas com glucose, em relação ao crescimento heterotrófico e autotrófico. Na presença de luz, as microalgas utilizam a glucose de forma mais eficiente, facilitando a assimilação do açúcar (Richmond, 2004). Chandra *et al.* (2014) afirmam que em condições mixotróficas, as microalgas são capazes de utilizar tanto as fontes de carbono orgânico como inorgânico, produzindo maior quantidade de biomassa na fase de crescimento. Observando os valores das produtividades dos pigmentos totais, clorofilas e carotenoides, nos dois metabolismos apresentados, Tabela 3.2, é possível verificar que não existem diferenças significativas entre eles. Estes resultados indicam-nos que mesmo na ausência de luz, em heterotrofia, esta microalga é capaz de sintetizar clorofilas e carotenoides. Esta afirmação é corroborada por Thompson (1996) e Perez-Garcia *et al.* (2011), os quais referem que, apesar dos pigmentos serem produzidos naturalmente em condições de crescimento autotróficas, certas espécies de microalgas são capazes de produzir pigmentos na ausência de luz, no caso de existir fonte de carbono disponível no meio para o crescimento heterotrófico.

Na Tabela 3.3 são apresentados os parâmetros mais relevantes dos diferentes metabolismos estudados, autotrofia, heterotrofia e mixotrofia. Para esta comparação foi escolhido o metabolismo autotrófico com arejamento com ar e CO₂, porque de todas as condições autotróficas estudadas foi o que apresentou melhores resultados e é a que se assemelha às condições naturais de crescimento da microalga.

Tabela 3.3 - Concentração máxima de lípidos, rendimento e produtividade de lípidos, produtividades de clorofila total e carotenoides, nos diferentes metabolismos de crescimento autotrofia (CO₂+Ar+Agitação), heterotrofia e mixotrofia, utilizando 10 g/L de glucose como substrato. São apresentados os valores médios ± erro padrão.

Metabolismo	Y _{L/X} (g/g)	Lípidos _{máx} (mg/L)	Produtividade lípidos (mg/g.h)	Produtividade C _T (mg/mg.h)	Produtividade C _c (mg/mg.h)
Autotrófico	0,039±0,005 ^b	26,930±0,003 ^c	0,211±0,001 ^c	0,045±0,004 ^a	0,013±0,001 ^a
Heterotrófico	0,212±0,004 ^a	174,610±0,007 ^b	0,437±0,001 ^b	0,026±0,001 ^b	0,010±0,001 ^{a,b}
Mixotrófico	0,239±0,018 ^a	390,858±0,003 ^a	0,506±0,001 ^a	0,027±0,003 ^b	0,009±0,001 ^b

Valores de rendimento de lípidos em relação à biomassa (Y_{L/X}), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), produtividade de lípidos, clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c). Numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0,05).

Pela análise da Tabela 3.3 é possível constatar que o rendimento lipídico por unidade de biomassa ($Y_{L/X}$) é superior nos metabolismos heterotrófico e mixotrófico em relação ao crescimento autotrófico, indicando que a presença de uma fonte de carbono orgânico estimula a acumulação lipídica. No entanto, como já foi referido anteriormente, observou-se uma maior acumulação de lípidos no crescimento em condições de mixotrofia, e portanto a produtividade lipídica também foi superior sob condições de cultura mixotrófica.

Em relação às produtividades de clorofila total e carotenoides, verificou-se que são idênticas nas condições de cultura com glucose no meio, mas são inferiores em relação ao metabolismo autotrófico. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Battah *et al.* (2013), os quais afirmam que na presença de glucose, tanto em condições heterotróficas como mixotróficas, os rácios clorofila/biomassa são menores em relação aos rácios estudados nas culturas autotróficas. Tanoi *et al.* (2011) sugerem que a diminuição do teor de clorofila pode ser causada pela inibição do desenvolvimento de cloroplastos na presença de glucose ou por um aumento relativo de outras substâncias que não sejam clorofilas. El-Sheekh e Fathy (2009) também observaram uma diminuição do conteúdo de carotenoides em heterotrofia em relação ao metabolismo autotrófico, sugerindo que em condições heterotróficas o metabolismo de síntese de carotenoides e clorofila a são bloqueados.

Neste estudo, o crescimento da *Chlorella sorokiniana* em condições de heterotrofia e mixotrofia proporcionam maior produção de biomassa e maior quantidade de lípidos, destacando-se o crescimento mixotrófico para produção de maior concentração lipídica.

3.2.3. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* em condições heterotróficas e mixotróficas, utilizando como fonte de carbono o resíduo de polpa de alfarroba

Como já foi referido, um dos maiores encargos financeiros em culturas heterotróficas e mixotróficas são as fontes de carbono, geralmente glucose, que pode chegar a 45% do custo total do processo (Li *et al.*, 2007). Como tal, para tornar o processo economicamente viável estudam-se matérias-primas alternativas que possam diminuir as despesas de produção. Neste estudo, a matéria-prima alternativa é um resíduo agroindustrial proveniente da indústria transformadora de alfarroba, o resíduo de polpa de alfarroba. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento e acumulação de lípidos, em condições heterotróficas e mixotróficas, utilizando uma fonte de carbono de baixo custo.

O ensaio foi iniciado com um inóculo inicial de 1×10^7 células/mL em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio Seuoka, com a adição de resíduo de polpa alfarroba como substrato à concentração de 10 g/L de açúcares totais. O ensaio decorreu à temperatura de 28 ± 1 °C, numa incubadora com agitação de 150 rpm, na ausência de luz, no caso da heterotrofia, ou sob luz contínua, no ensaio mixotrófico. No decorrer do ensaio efetuaram-se análises para a quantificação do crescimento celular, fonte de azoto (nitrato) consumido, substrato consumido, lípidos produzidos e pigmentos totais. O ensaio teve a duração de 288 horas de cultura.

Na Figura 3.5 e Tabela 3.4 são apresentados os perfis de crescimento e acumulação lipídica, assim como os parâmetros cinéticos da microalga *Chlorella sorokiniana*, em crescimento heterotrófico e mixotrófico, com resíduo de alfarroba como fonte de carbono.

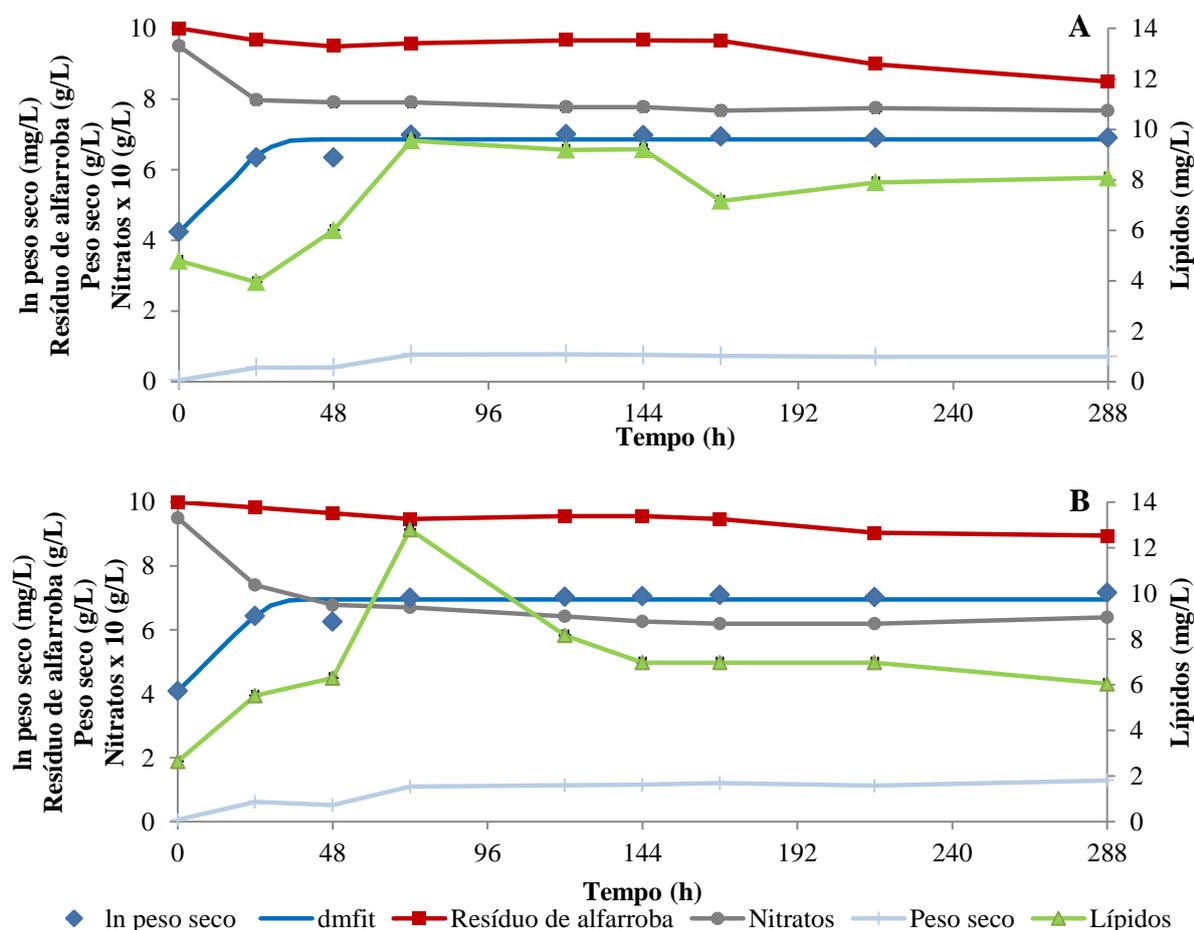


Figura 3.5 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, e substrato e azoto consumidos, pela microalga *Chlorella sorokiniana* ao longo do tempo de cultura em Erlenmeyer (288h) em crescimento heterotrófico (A) e mixotrófico (B) com uma concentração inicial de açúcar de 10 g/L de resíduo de polpa de alfarroba, numa agitadora orbital a 150 rpm, 28 ± 1 °C.

Pela análise da Figura 3.5, verifica-se que o comportamento da *C. sorokiniana* é muito semelhante em todos os parâmetros apresentados, quer em heterotrofia como em mixotrofia, observando-se uma fase exponencial com a duração de 24h em ambos os metabolismos estudados. Comparativamente com o estudo realizado com glucose, apresentado no ponto anterior, a cultura crescida em resíduo de alfarroba atingiu a fase estacionária mais cedo.

Neste estudo, praticamente não houve crescimento, sendo este justificado pelo baixo consumo da fonte de carbono e da fonte de azoto.

Pela análise dos açúcares consumidos, quer em condições heterotróficas como mixotróficas, pensa-se que apenas a glucose presente no extrato de alfarroba foi consumida pela microalga, uma vez que se trata de um açúcar simples e que é facilmente degradado por este microrganismo, como se observou no ensaio anterior. No presente ensaio, com extrato de alfarroba, a concentração dos açúcares totais consumidos foi muito baixa, cerca de 2 g/L, o que é aproximadamente a quantidade de glucose presente neste resíduo na concentração adicionada ao meio de cultura. O resíduo de alfarroba tem na sua composição em termos de açúcares totais, frutose (14,5 % p/p), glucose (15,5 % p/p) e maioritariamente sacarose, representado cerca de 70 % (p/p) dos açúcares totais. Este facto pode explicar a baixa concentração de biomassa produzida, pela baixa disponibilidade de açúcar metabolizável pela cultura.

Como foi sugerido no ponto 3.2.2., a *Chlorella sorokiniana* em condições mixotróficas apresentou capacidade de utilizar tanto as fontes de carbono orgânico como inorgânico, gerando por isso uma concentração de biomassa ligeiramente superior em relação às condições de crescimento heterotróficas. Utilizando o resíduo de extrato de alfarroba, que é composto por diferentes açúcares, o comportamento da microalga em mixotrofia, não foi semelhante ao analisado anteriormente, com a glucose como fonte de carbono. Em meio sólido, a microalga cresceu com o resíduo de alfarroba, tanto em condições de heterotrofia como em mixotrofia. Os resultados obtidos aparentam que houve um consumo preferencial da glucose presente no meio por parte da microalga *C. sorokiniana*, não acontecendo o mesmo com a frutose, igualmente presente no extrato de alfarroba. Embora estes açúcares, glucose e frutose, tenham o mesmo número de carbonos, são degradados por enzimas diferentes. Enquanto a glucose é degradada diretamente em glucose-6-fosfato, a frutose não, podendo significar que este microrganismo não tem capacidade de transformar diretamente a frutose em glucose-6-fosfato (Qiao e Wang, 2009). Porém, um estudo realizado por Qiao e Wang (2009) revela que a microalga *Chlorella sorokiniana* tem capacidade de produzir biomassa e lípidos na presença de frutose, embora com rendimentos bastante inferiores em relação à

glucose, cerca de 4 vezes menor. Por outro lado, existem estudos que revelam o oposto, como é o caso de Shihira e Krauss (1965) que afirmam que a microalga *Chlorella sorokiniana* apresenta um bom crescimento quando se utiliza glucose e acetato como fonte orgânica, tanto em mixotrofia como em heterotrofia, mas com frutose, em metabolismo heterotrófico, esta microalga não consegue reproduzir-se.

Para degradar a sacarose, composta por 12 carbonos, em frutose e glucose é necessária a presença da enzima invertase. Pela adaptação em meio sólido, pensa-se que a microalga possa ter capacidade para crescer em sacarose. Estudos publicados revelaram que as microalgas, *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris*, cresciam e acumulavam lípidos com este substrato, no entanto, em alguns casos a sacarose era previamente hidrolisada (Ngangkham, *et al.* 2012; Mitra *et al.*, 2012). Acosta *et al.* (2012) efetuaram estudos com a microalga *Chlorella vulgaris* com sacarose hidrolisada e sacarose não hidrolisada e constataram que esta microalga não assimila a sacarose sem estar hidrolisada, verificando-se crescimento apenas quando esta fonte de carbono é hidrolisada, e que somente a glucose era consumida e a frutose não.

A investigação realizada em culturas de microalgas em condições de heterotrofia e/ou mixotrofia utilizando resíduos agroindustriais ou coprodutos revela que estes são geralmente hidrolisados. (Cheng *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2012; Abreu *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos deste estudo, sugerem que a presença destes dois açúcares, frutose e sacarose, podem afetar negativamente o crescimento da microalga, por esta não apresentar capacidade para os consumir. A baixa concentração de açúcar e passível de ser consumida pela microalga poderá ser responsável pelo baixo crescimento e fraca acumulação lipídica pela microalga.

A acumulação de lípidos ocorreu durante a fase estacionária da cultura, com valores bastante baixos, relativamente ao ensaio com a glucose como fonte de carbono. Observou-se um baixo consumo de nitratos ao longo de todo o ciclo de crescimento, tendo este consumo sido mais acentuado nas primeiras 24h de cultura, no caso do crescimento heterotrófico (cerca de 0,2 g/L). No crescimento mixotrófico, o consumo de nitratos ocorreu nas primeiras 72h de cultura, com cerca de 0,3 g/L. Em ambos os metabolismos, foi atingido o pico máximo de lípidos às 72 h, seguido de um decréscimo dos mesmos. Pensa-se que o baixo crescimento promoveu este baixo consumo de nitratos, que conseqüentemente contribuiu para uma fraca acumulação de lípidos, não se podendo afirmar que houve qualquer acumulação lipídica.

Tabela 3.4 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga *Chlorella sorokiniana* crescida em diferentes condições, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de resíduo de polpa de alfarroba. Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 288 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Parâmetros cinéticos	RESÍDUO DE ALFARROBA	
	Heterotrofia	Mixotrofia
μ (h^{-1})	$0,089 \pm 0,015^a$	$0,100 \pm 0,021^a$
$Y_{X/S}$ (g/g)	$0,656 \pm 0,218^a$	$0,829 \pm 0,145^a$
$Y_{L/S}$ (g/g)	$0,012 \pm 0,002^a$	$0,009 \pm 0,002^a$
$Y_{L/X}$ (g/g)	$0,005 \pm 0,001^a$	$0,004 \pm 0,001^a$
Lípidos máx (mg/L)	$9,558 \pm 0,001^b$	$12,790 \pm 0,001^a$
t lípidos máx (h)	72	72
Produtividade lípidos (mg/g.h)	$0,121 \pm 0,001^b$	$0,161 \pm 0,001^a$
Produtividade C_a (mg/mg.h)	$0,015 \pm 0,001^b$	$0,062 \pm 0,003^a$
Produtividade C_b (mg/mg.h)	$0,013 \pm 0,001^b$	$0,027 \pm 0,001^a$
Produtividade C_T (mg/mg.h)	$0,033 \pm 0,003^b$	$0,089 \pm 0,004^a$
Produtividade C_c (mg/mg.h)	$0,005 \pm 0,002^a$	$0,013 \pm 0,001^a$

Valores de taxa específica de crescimento (μ), rendimento de biomassa produzida em relação ao substrato consumido ($Y_{X/S}$), rendimento de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/S}$), rendimento de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/X}$), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos máx), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos máx), produtividade de lípidos, clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c). Numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Analisando a Tabela 3.4, observa-se que as taxas específicas de crescimento são semelhantes em ambos os metabolismos, aproximadamente $0,1 \text{ h}^{-1}$.

É possível verificar que a quantidade de lípidos produzida nestes dois sistemas é muito baixa, menos de 1 % (p/p), valores inferiores aos verificados em autotrofia, aproximadamente 10 % (p/p), podendo afirmar-se que não houve acumulação lipídica. Estudos realizados por Agwa *et al.* (2012), revelam que o conteúdo lipídico obtido pela microalga *Chlorella* sp., cultivada em diferentes resíduos de excremento de animais foi muito baixo, apresentado valores de 2,60 % (p/p) de conteúdo lipídico quando utilizaram resíduo de excremento de cabra e 3,38 % (p/p) com excremento de porco. Estes resíduos têm uma cor mais escura e uma composição complexa, podendo limitar a formação de lípidos e biomassa, uma vez que a cor escura do meio diminui a intensidade da luz que incide na cultura, quando cultivadas na presença de luz (Habib *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010).

Em relação aos pigmentos, é possível verificar que em heterotrofia a quantidade de clorofila a e b são praticamente idênticas, mas em condições mixotróficas a microalga apresenta maior quantidade de clorofila a do que b, isto porque neste metabolismo a microalga está exposta à luz. No entanto, em termos de produtividade, quer em relação a clorofila total como

carotenoides, não existem diferenças significativas. Este facto também já tinha sido constatado no estudo realizado com glucose, no qual obteve-se, uma produtividade de clorofila total e de carotenoides, aproximadamente 0,03 mg/(mg.h) e 0,01 mg/(mg.h), respetivamente.

3.2.4. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* com limitação de azoto em condições heterotróficas e mixotróficas

A limitação de azoto é a condição mais eficiente para induzir a lipogénese. Durante a fase de crescimento, o azoto é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto o fluxo de carbono é distribuído entre processos energéticos e anabolizantes produzindo hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos e proteínas. Quando o azoto é limitante, a taxa de crescimento desacelera e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos tende a cessar (Amaretti *et al.*, 2010). Nas fases iniciais da limitação de azoto, antes da capacidade fotossintética diminuir significativamente, ocorre a assimilação do azoto e o excesso de carbono é desviado para a síntese de compostos de armazenamento, como lípidos e hidratos de carbono (Adams *et al.*, 2013). A produção de lípidos ocorre quando há o desvio da via metabólica, em que a concentração de azoto, nutriente essencial à proliferação das células, se esgota e a fonte de carbono que se encontra em excesso é canalizada para a síntese de lípidos. Sabe-se que a definição do rácio C/N é um dos parâmetros essenciais que influencia fortemente a produção de lípidos. Assim, neste estudo procedeu-se à alteração deste parâmetro de modo a verificar o efeito na acumulação lipídica, aumentando-se o rácio C/N no meio de 35 para 70, por limitação da quantidade de azoto disponível no meio. O ensaio foi realizado em condições de heterotrofia e em condições de mixotrofia.

Os ensaios experimentais, realizados em heterotrofia e mixotrofia, foram iniciados com um inóculo inicial de 1×10^7 células/mL em Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio Seuoka, cuja composição está descrita no capítulo 2.3 em Material e Métodos. Nestes ensaios, de forma a aumentar o rácio C/N de 35 para 70, mantiveram-se as concentrações de glucose e de resíduo de polpa de alfarroba, 10 g/L, e a concentração de nitrato de potássio foi reduzida de 0,95 g/L para 0,47 g/L. As culturas decorreram à temperatura de 28 ± 1 °C, em agitadora orbital com uma agitação de 150 rpm e sob luz contínua, mixotrofia, ou no escuro, heterotrofia. No decorrer dos ensaios efetuaram-se análises para a quantificação do

crescimento celular, azoto consumido, substrato consumido, lípidos produzidos e pigmentos totais. Os ensaios em que a fonte de carbono foi glucose tiveram a duração de 312 horas de cultura, enquanto com o resíduo de alfarroba tiveram a duração de 360 horas de cultura.

3.2.4.1. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* em heterotrofia e mixotrofia, usando como fonte de carbono glucose

Este ensaio foi realizado com um rácio C/N 70, obtido pela redução da concentração de azoto presente no meio, sob a forma de nitrato, e usando como fonte de carbono orgânico a glucose. O ensaio teve a duração de 312 h.

Na Figura 3.6 pode observar-se os perfiz de crescimento, lípidos acumulados e substrato e fonte de azoto consumidos pela microalga *Chlorella sorokiniana*, em crescimento heterotrófico e mixotrófico com limitação da fonte de azoto.

Na Tabela 3.5 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a cultura crescida em heterotrofia e mixotrofia.

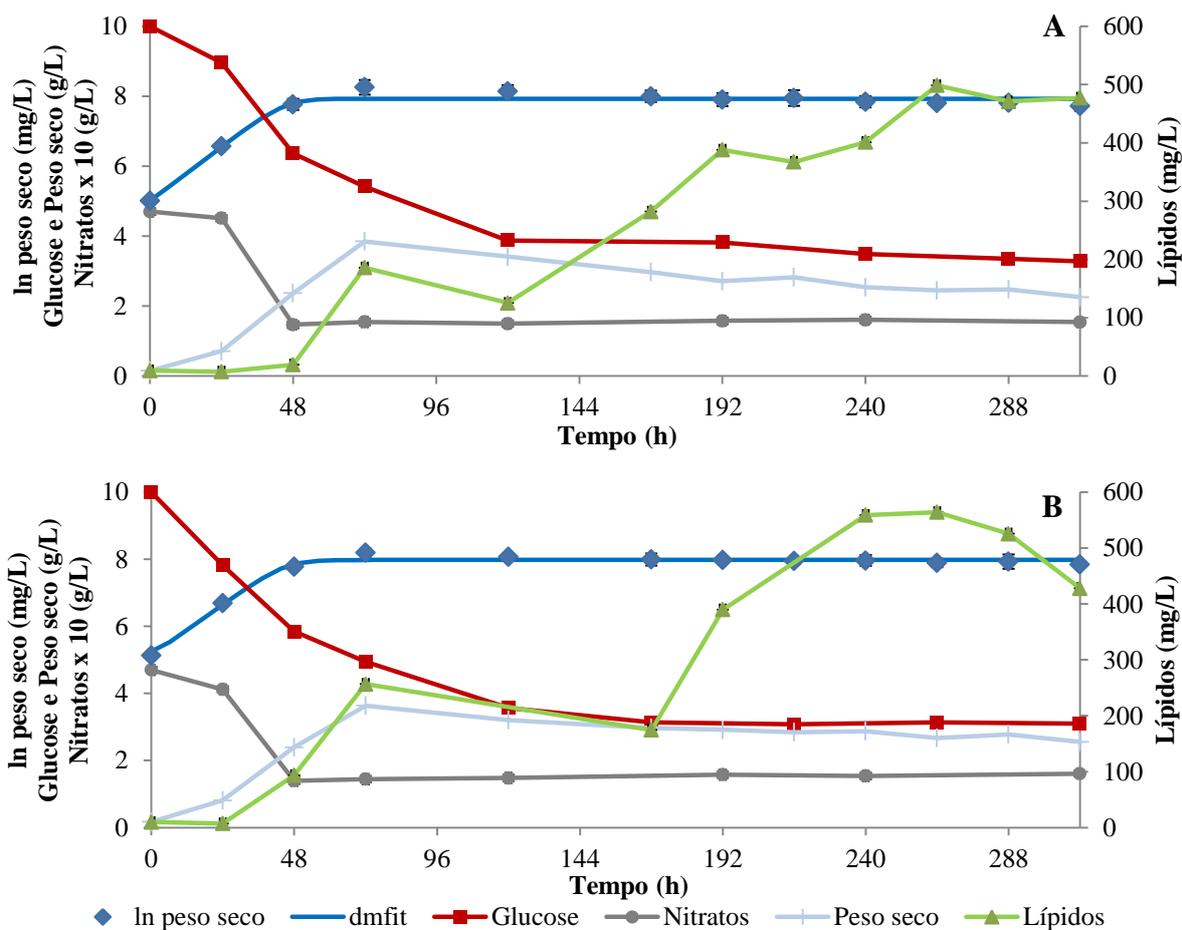


Figura 3.6 - Perfil de acumulação de lípidos, biomassa produzida, substrato (glucose) e azoto (nitrato) consumidos, pela microalga *Chlorella sorokiniana* crescida em Erlenmeyer, durante 312h em condições de crescimento heterotrófico (A) e mixotrófico (B), usando como fonte de carbono glucose (10 g/L) e um rácio C/N 70. O ensaio decorreu a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, em agitadora orbital a 150 rpm, sob a presença de luz contínua (ensaio mixotrófico) e no escuro (ensaio heterotrófico).

Através do perfil de crescimento, apresentado na Figura 3.6, é possível observar que o crescimento da *C. sorokiniana* é idêntico nos dois metabolismos estudados, sendo os valores de biomassa produzida idêntica em ambos os casos e com uma fase exponencial com a duração de 48 h. A quantidade de biomassa produzida em condições de limitação de azoto não variou muito em relação ao estudo em que não houve limitação de azoto. Este resultado vai de encontro ao estudo realizado por Hamed e Klöck (2014), onde verificaram que a microalga *Chlorella sorokiniana*, crescida em mixotrofia, produzia aproximadamente a mesma quantidade de biomassa quer em condições de limitação de azoto, cerca de 0,5 g/L de KNO_3 , como em condições sem limitação de azoto, 1 g/L de KNO_3 . No entanto, Adams *et al.*

(2013), concluíram que para a mesma microalga, a baixa concentração de azoto presente no meio, limita o crescimento deste microrganismo, resultando numa concentração de biomassa inferior do que quando crescida em condições sem limitação deste nutriente.

O consumo de substrato e de azoto também foi idêntico nos dois metabolismos, verificando-se que às 48h de crescimento é iniciada a acumulação de lípidos, ocorrendo com o esgotamento do azoto, na forma de nitrato, no meio de cultura, e correspondendo à fase estacionária de crescimento. Mais uma vez esta ocorrência é idêntica ao que já tinha sido discutido no ensaio sem limitação de azoto e com glucose como substrato. Estes resultados vão de encontro com o estudo de Wang *et al.* (2013), onde constataram uma maior produção de lípidos depois de se esgotar o azoto do meio de cultura, verificando que a maioria dos lípidos acumulados ocorria no curto espaço de tempo entre o esgotamento do azoto e da glucose presentes no meio de cultura.

O pico máximo de lípidos foi obtido em ambos os metabolismos às 264 h de cultura, cerca de 100 h mais cedo em relação ao ensaio com rácio C/N 35, em que não há limitação de azoto, em mixotrofia. No entanto, tal como já referido, em condições mixotróficas a concentração de lípidos obtida foi superior, com 564 mg/L, em relação ao crescimento heterotrófico, onde se obteve 499 mg/L.

Tabela 3.5 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes metabolismos, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de glucose e limitação de azoto (C/N 70). Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 312 h. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Parâmetros cinéticos	GLUCOSE	
	Heterotrofia	Mixotrofia
μ (h^{-1})	$0,064 \pm 0,008^a$	$0,063 \pm 0,005^a$
$Y_{X/S}$ (g/g)	$0,613 \pm 0,115^a$	$0,529 \pm 0,125^a$
$Y_{L/S}$ (g/g)	$0,071 \pm 0,008^a$	$0,071 \pm 0,018^a$
$Y_{L/X}$ (g/g)	$0,422 \pm 0,023^a$	$0,491 \pm 0,021^a$
Lípidos máx (mg/L)	$498,702 \pm 0,008^b$	$564,292 \pm 0,006^a$
t lípidos máx (h)	264	264
Produtividade lípidos (mg/g.h)	$0,772 \pm 0,001^b$	$0,799 \pm 0,001^a$
Produtividade C_a (mg/mg.h)	$0,005 \pm 0,001^a$	$0,006 \pm 0,001^a$
Produtividade C_b (mg/mg.h)	$0,003 \pm 0,001^a$	$0,004 \pm 0,001^a$
Produtividade C_T (mg/mg.h)	$0,008 \pm 0,001^a$	$0,010 \pm 0,001^a$
Produtividade C_c (mg/mg.h)	$0,003 \pm 0,001^a$	$0,003 \pm 0,001^a$

Valores de taxa específica de crescimento (μ), rendimento de biomassa produzida em relação ao substrato consumido ($Y_{X/S}$), rendimento de lípidos em relação ao substrato ($Y_{L/S}$), rendimento de lípidos em relação à biomassa ($Y_{L/X}$), concentração

máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), produtividade de lípidos, clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_C). Numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

É possível verificar, na Tabela 3.6, que os rendimentos $Y_{X/S}$, $Y_{L/S}$ e $Y_{L/X}$ e a taxa específica de crescimento não apresentam diferenças significativas entre os metabolismos, mixotrófico e heterotrófico. Em heterotrofia, obteve-se uma concentração máxima de lípidos de 499 mg/L. No entanto, a concentração máxima de lípidos é significativamente superior em mixotrofia, com o valor de 564 mg/L e por consequência, a produtividade de lípidos também, com 0,799 mg de lípidos/(g de biomassa.h). O mesmo foi verificado no ensaio sem limitação de azoto, o que sustenta a afirmação de que a microalga *Chlorella sorokiniana* em condições de cultura mixotróficas possui a capacidade de acumular uma maior quantidade de lípidos quando comparada com culturas heterotróficas.

Em condições de limitação de azoto foi possível atingir praticamente o dobro do conteúdo lipídico em relação ao ensaio sem limitação deste nutriente, tanto na cultura heterotrófica como na mixotrófica, obtendo-se praticamente 50 % (p/p) de lípidos acumulados em mixotrofia. Um estudo realizado por Adams *et al.* (2013), mostra que em condições de limitação de azoto a microalga *Chlorella sorokiniana* acumula mais lípidos do que em condições normais de crescimento, chegando a atingir um conteúdo lipídico de 47 % (p/p). Shen *et al.* (2009), também concluíram que a microalga *C. protothecoides*, em condições heterotróficas e crescida num meio com baixa concentração de nitratos, acumulava aproximadamente 50 % (p/p) de lípidos. Wang *et al.* (2013) verificaram que a microalga *Chlorella protothecoides* cultivada em contínuo, com rácio C/N 90, em biorreator é capaz de acumular 57 % (p/p) de lípidos.

No entanto, em termos de produtividade lipídica, em condições de limitação de azoto, os valores publicados por alguns investigadores são superiores, sendo de 85 mg.L⁻¹.d⁻¹ (Adams *et al.*, 2013), enquanto que os resultados obtidos neste estudo foram de 45 e 51 mg.L⁻¹.d⁻¹, em heterotrofia e mixotrofia, respetivamente. Esta diferença na produtividade lipídica pode ser explicada pelo facto da biomassa obtida no estudo destes autores ser bastante inferior, 1 g/L, à obtida neste ensaio, cerca de 4 g/L.

Em relação à produção de pigmentos, clorofilas e carotenoides, verificaram-se resultados idênticos entre os metabolismos estudados. No entanto, se for feita a comparação com o ensaio com rácio C/N 35, é possível observar que neste ensaio com limitação de azoto, as produtividades específicas para os pigmentos diminuíram bastante. A limitação de azoto

induz diversas alterações fisiológicas em algas, alterando profundamente a composição intracelular e a cinética de crescimento. O crescimento para progressivamente e é induzida a acumulação de lípidos, acompanhada por uma diminuição acentuada de pigmentos (Pruvost *et al.*, 2011). Richardson *et al.* (1969) afirmam que depois do esgotamento do azoto, todo o azoto celular é aparentemente utilizado em enzimas e estruturas celulares essenciais e que qualquer dióxido de carbono fixado posteriormente é, por sua vez, convertido em hidratos de carbono ou gorduras, em vez de ser convertido em proteínas. Contudo, Encarnação *et al.* (2010) concluíram que a microalga *Nannochloropsis* sp. apresenta uma redução no teor de clorofila a, quando a concentração de nitratos é reduzida, mas o teor de carotenoides não é alterado.

Existem diversos estudos que comprovam que em baixas concentrações de azoto o género *Chlorella* tem aptidão para acumular mais lípidos (Adams *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Converti *et al.*, 2009).

Na Tabela 3.6 são apresentados os parâmetros cinéticos em termos de acumulação de lípidos e produção de clorofilas totais e carotenoides, nos dois rácios estudados C/N 35, sem limitação de azoto, C/N e 70, com limitação de azoto, em heterotrofia e mixotrofia, com glucose como fonte de carbono.

Tabela 3.6 – Rendimentos, produtividades e lípidos máximos obtidos no ensaio sem limitação de azoto (C/N 35) e com limitação de azoto (C/N 70), em heterotrofia (H) e mixotrofia (M) utilizando glucose como substrato.

		$Y_{L/X}$ (g/g)	Lípidos _{máx} (mg/L)	Produtividade lípidos (mg/g.h)	Produtividade C _T (mg/mL.h)	Produtividade C _c (mg/mL.h)
C/N	H	0,212±0,004 ^c	174,610±0,006 ^d	0,437±0,001 ^d	0,026±0,001 ^a	0,010±0,001 ^a
	M	0,239±0,018 ^c	390,858±0,003 ^c	0,506±0,001 ^c	0,027±0,003 ^a	0,009±0,001 ^a
C/N	H	0,422±0,023 ^b	498,702±0,008 ^b	0,772±0,001 ^b	0,008±0,001 ^b	0,003±0,001 ^b
	M	0,491±0,021 ^a	564,292±0,006 ^a	0,799±0,001 ^a	0,010±0,001 ^b	0,003±0,001 ^b

Valores de rendimento de lípidos por biomassa produzida ($Y_{L/X}$), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), produtividade de lípidos, clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c). Numa coluna valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Analisando os resultados apresentados na tabela 3.7, com base nos dois rácios C/N estudados, 35 e 70, verifica-se que a limita o de azoto promove a acumula o de lípidos, destacando-se os resultados obtidos em mixotrofia. Estes resultados são de acordo com os estudos desenvolvidos por Shen *et al.*, (2009), em que verificaram, num estudo realizado com a microalga *Chlorella protothecoides* em condi es heterotróficas, uma maior produ o de lípidos no meio de cultura com concentra es baixas de azoto. Também Converti *et al.*, (2009), afirmam que a microalga *Chlorella vulgaris*, em condi es autotróficas, aumenta o conteúdo lipídico quando cresce num meio de cultura com limita o de azoto. Neste estudo, verificou-se que com o rácio C/N 70 a *Chlorella sorokiniana* produz quase o dobro de lípidos em menos tempo do que o obtido com o rácio C/N 35.

A nível de pigmentos produzidos, verifica-se que a limita o de azoto provoca uma redu o na produ o dos pigmentos, uma vez que quase toda a energia passa a ser canalizada para a acumula o de lípidos.

3.2.4.2. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* em heterotrofia e mixotrofia, utilizando resíduo de polpa de alfarroba como substrato

Procedeu-se também ao cultivo da *Chlorella sorokiniana* em meio de cultura com limita o em azoto, rácio C/N 70, e em que a fonte de carbono foi o resíduo de polpa de alfarroba, na concentra o de 10 g/L de a u ares totais.

No ensaio sem limita o de azoto, C/N 35, com o resíduo de alfarroba não houve acumula o de lípidos e o crescimento foi bastante limitado. No entanto, no ponto discutido anteriormente, utilizando glucose como fonte de carbono orgânico, verificou-se que em condi es de limita o de azoto esta microalga   capaz de acumular praticamente o dobro de lípidos. Sendo assim, procedeu-se a um ensaio com limita o de azoto, rácio C/N 70, e utilizando o resíduo de polpa de alfarroba como substrato. Este ensaio teve a dura o de 360 horas.

A Figura 3.7 mostra o perfil de crescimento e acumula o de lípidos e na Tabela 3.7 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a cultura em heterotrofia e mixotrofia, utilizando o resíduo agroindustrial como fonte de carbono.

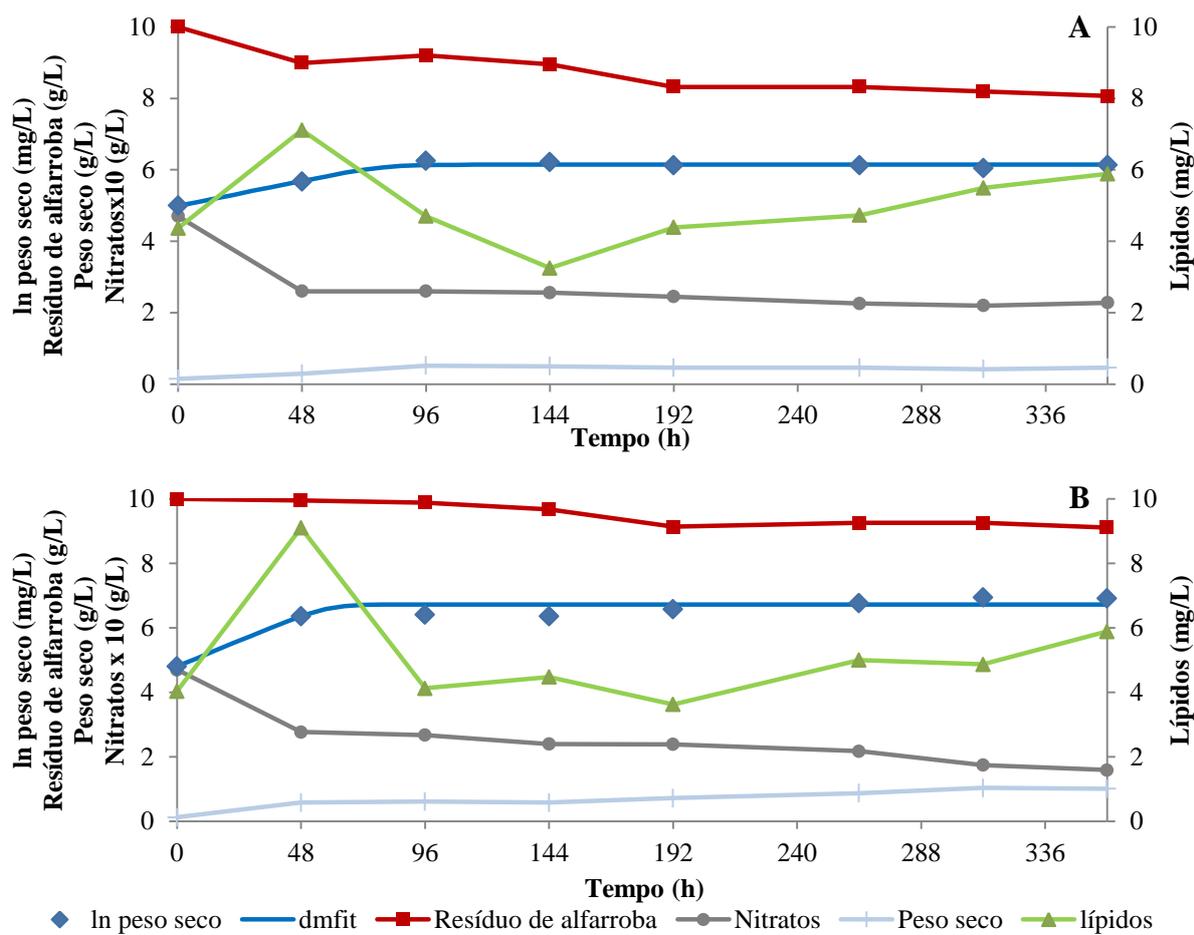


Figura 3.7 - Perfil de acumulação de lípidos intracelulares totais, biomassa produzida, substrato e azoto consumidos, pela microalga *Chlorella sorokiniana* crescida em Erlenmeyer em sistema heterotrófico (A) e mixotrófico (B), com 10 g/L de resíduo de alfarroba e limitação de azoto (C/N 70). O ensaio decorreu ao longo de 360 h, em agitadora orbital a 150 rpm e à temperatura, $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Analisando a Figura 3.7 é possível observar que praticamente não houve crescimento. Contudo, o baixo crescimento que se verificou em condições heterotróficas foi mais lento do que em mixotrofia, atingindo a fase estacionária às 96 h e 48 h, respetivamente. No entanto, o sistema heterotrófico apresentou um maior consumo da fonte de carbono orgânica suplementada no meio de cultura, sendo consumidos cerca de 2 g/L de açúcares totais presentes no meio, enquanto que em mixotrofia, apenas 1 g/L dos açúcares foram consumidos. Tanto em heterotrofia como em mixotrofia, verificou-se um maior consumo de nitrato, fonte de azoto adicionada ao meio, nas primeiras 48 h de crescimento, sendo esse o ponto onde se registou o máximo de lípidos acumulados. Contudo, em condições mixotróficas, a microalga continuou a assimilar o nitrato, embora em pouca quantidade. Em

ambos os crescimentos, não houve esgotamento da fonte de azoto. A concentração máxima de lípidos foi obtida em mixotrofia, o que pode estar relacionado também com a maior concentração de biomassa obtida nesta condição de crescimento.

Se for feita a comparação com o estudo sem limitação de azoto, utilizando este resíduo agroindustrial como fonte de carbono, também se verifica um baixo consumo do substrato e de nitrato, influenciando portanto o metabolismo lipídico.

Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos determinados para a microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes metabolismos, heterotrofia (escuro) e mixotrofia (sob luz contínua), com 10 g/L de resíduo de alfarroba e limitação de azoto (C/N 70). Ensaio em Erlenmeyers, com agitação orbital a 150 rpm, 28 ± 1°C, durante 360 h. São apresentados os valores médios ± erro padrão.

Parâmetros cinéticos	RESÍDUO DE ALFARROBA	
	Heterotrofia	Mixotrofia
μ (h ⁻¹)	0,015 ± 0,002 ^a	0,033 ± 0,008 ^a
Y _{X/S} (g/g)	0,166 ± 0,019 ^b	0,528 ± 0,084 ^a
Y _{L/S} (g/g)	0,003 ± 0,001 ^a	0,002 ± 0,001 ^a
Y _{L/X} (g/g)	0,001 ± 0,001 ^a	0,002 ± 0,001 ^a
Lípidos _{máx} (mg/L)	7,108 ± 0,025 ^b	9,101 ± 0,036 ^a
t lípidos _{máx} (h)	48	48
Produtividade lípidos (mg/L.h)	0,148 ± 0,005 ^b	0,190 ± 0,007 ^a
Produtividade C _a (mg/mL.h)	0,035 ± 0,008 ^a	0,069 ± 0,012 ^a
Produtividade C _b (mg/mL.h)	0,017 ± 0,004 ^a	0,031 ± 0,008 ^a
Produtividade C _T (mg/mL.h)	0,052 ± 0,011 ^a	0,100 ± 0,020 ^a
Produtividade C _c (mg/mL.h)	0,010 ± 0,002 ^a	0,014 ± 0,006 ^a

Valores de taxa específica de crescimento (μ), rendimento de biomassa produzida em relação ao substrato consumido (Y_{X/S}), rendimento de lípidos em relação ao substrato (Y_{L/S}), rendimento de lípidos em relação à biomassa (Y_{L/X}), concentração máxima de lípidos acumulados (Lípidos_{máx}), tempo de obtenção do máximo de lípidos acumulados (t lípidos_{máx}), produtividade de lípidos, clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c). Numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Como já foi referido, no ensaio sem limitação de azoto, C/N 35, com o resíduo de polpa de alfarroba não houve acumulação de lípidos e o crescimento foi bastante limitado.

Neste ensaio, as taxas específicas de crescimento são menores que as determinadas em autotrofia e a concentração máxima de lípidos é inferior em ambos os metabolismos quando comparada com os resultados obtidos no ensaio sem limitação de azoto. A biomassa produzida em heterotrofia e C/N 70 é metade da biomassa produzida no ensaio sem limitação de azoto. Embora o consumo de açúcares totais tenha sido praticamente o mesmo, cerca de 2

g/L, em heterotrofia e nos dois rácios estudados, o crescimento foi bastante limitado. Isto é possível, uma vez que o azoto, sob a forma de nitrato, não foi totalmente consumido, observando-se que não houve acumulação lipídica.

No ensaio sem limitação de azoto sugeriu-se que o crescimento da microalga e o seu metabolismo lipídico poderiam estar a ser afetados pela concentração inicial do substrato, pela presença de dois açúcares, frutose e sacarose, que aparentemente não foram consumidos pela microalga ou ainda pelo facto de se usar um resíduo com uma composição variada, um extrato aquoso complexo. Ao reduzir-se a fonte de azoto, parece que o metabolismo lipídico da microalga *Chlorella sorokiniana* é inibido, conseguindo produzir menos quantidade do que em condições normais de concentração de nutrientes. Cheng *et al.* (2009) realizaram um estudo com a microalga *Chlorella protothecoides* e afirmam que a sacarose e sumo de cana-de-açúcar não podem ser usados no meio de cultura sem serem previamente hidrolisados. O estudo revela que estes dois substratos hidrolisados são assimilados pela microalga obtendo-se conteúdos lipídicos muito semelhantes aos obtidos com glucose, verificando-se um conteúdo de lípidos de 46,7 % (p/p), 44,4 % (p/p) e 43,1 % (p/p), nos ensaios com glucose, sacarose hidrolisada e sumo de cana-de-açúcar hidrolisada, respetivamente. Também os rendimentos de $Y_{L/S}$ foram bastante superiores no estudo publicado por estes investigadores, 0,126 g de lípidos/ g de substrato consumido e 0,146 g de lípidos/ g de substrato consumido, nos ensaios utilizando sacarose hidrolisada e sumo de cana-de-açúcar hidrolisado, respetivamente.

Em ambas as condições de crescimento, heterotrofia e mixotrofia, não se verificou diferenças significativas nas produtividades dos pigmentos, clorofilas totais e carotenoides. Uma vez que o crescimento foi bastante limitado, sugere-se que os metabolitos secundários também tenham sido afetados por esta fonte de carbono. Este resíduo agroindustrial associado a uma limitação da fonte de azoto no meio de cultura de crescimento desta microalga, inibe a produção de metabolitos, pigmentos e lípidos.

Este ensaio com rácio C/N 70, comparativamente com o ensaio com rácio C/N 35, e a mesma fonte de carbono, não apresentou praticamente crescimento nem acumulação lipídica, sendo insignificantes os valores de rendimentos e de lípidos produzidos.

3.3. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS

Procedeu-se à determinação dos lípidos totais por gravimetria através do método de Folsh (1957), e a análise do perfil lipídico, em ácidos gordos, foi efetuada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Esta análise foi efetuada apenas para as culturas crescidas em glucose. Nas culturas crescidas com o extrato aquoso do resíduo de alfarroba, a acumulação foi muito baixa, assim como a quantidade de biomassa produzida, não se justificando proceder à extração dos lípidos e posterior análise do perfil de ácidos gordos.

Nos crescimentos celulares efetuados com rácio C/N 35 em condições heterotróficas e mixotróficas, utilizando glucose como fonte de carbono, obteve-se um teor de lípidos após a extração de 21,15 e 23,93 % (p/p), respetivamente. Há que ter em conta que as extrações de lípidos foram efetuadas no fim dos ensaios experimentais, às 384 h, e não quando se obteve a concentração máxima de lípidos, que ocorreu às 144 h, no crescimento em condições de heterotrofia, com 174,61 mg/L de acumulação lipídica, e às 360 h, no crescimento em mixotrofia, com 390,86 mg/L de lípidos acumulados.

Nos ensaios com rácio C/N 70 obteve-se um conteúdo de lípidos intracelulares após a extração de 42,22 % (p/p) nas culturas em condições heterotróficas e de 49,08 % (p/p) nos crescimentos em mixotrofia. Tal como aconteceu no ensaio referido acima, efetuaram-se as extrações de lípidos quando os ensaios terminaram, às 312h, e não no momento em que se observou produção e acumulação máxima de lípidos, os quais ocorreram às 264 h, em heterotrofia (498,70 mg/L) e mixotrofia (564,29 mg/L).

Observou-se que com o aumento do rácio C/N, limitação em azoto, a acumulação lipídica aumentou praticamente para o dobro, tanto no crescimento em condições de heterotrofia como em mixotrofia. Estes resultados são concordantes com os descritos na bibliografia, em que a limitação em azoto promove a acumulação lipídica.

Zheng *et al.* (2013) conseguiram obter 38,7 % (p/p) de lípidos a partir de uma cultura de *Chlorella sorokiniana* crescida em condições heterotróficas, em que a fonte de carbono foi glucose e com um rácio C/N 29. Num outro estudo realizado por Qiao e Wang (2009) foram obtidos 23,7 % (p/p) de conteúdo lipídico pela *Chlorella sorokiniana*, crescida também com glucose como fonte de carbono orgânico e em condições de heterotrofia, com um rácio C/N 35. Em estudos desenvolvidos com a microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando glucose como substrato, Liang *et al.* (2009) obtiveram 23 e 21 % de lípidos em cultura heterotrófica e mixotrófica, respetivamente. Outro estudo realizado por Cheng *et al.* (2009) revelam que o aumento do rácio C/N de 9 para 21, de uma cultura de *Chlorella protothecoides* em

heterotrofia, utilizando sumo de cana-de-açúcar hidrolisada, conduz ao aumento do conteúdo lipídico de 42 para 53 % (p/p), respetivamente. Como se pode verificar, dependendo do meio em que se encontra a crescer e as condições de stresse a que é sujeita, a microalga pode acumular mais ou menos lípidos. Já foi referido que o azoto é o nutriente que mais influencia a acumulação de lípidos em microrganismos oleaginosos e como se pode verificar no estudo realizado com limitação de azoto com rácio C/N 70 a microalga apresentou capacidade de produzir e acumular maior quantidade de lípidos do que no estudo sem limitação de azoto, rácio C/N 35. Os resultados obtidos são bastante semelhantes aos registados na literatura, no entanto, mais uma vez, há que ter em conta que a extração dos lípidos não foi realizada na altura em que se observou o pico máximo e naturalmente os valores poderiam ser ligeiramente superiores.

De forma a conhecer a composição de ácidos gordos dos óleos produzidos pela microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes condições de cultura, estes foram extraídos e analisados por HPLC. Na Tabela 3.8 são apresentados os ácidos gordos que constituem os lípidos em termos de composição percentual (p/p) obtidos neste trabalho e por outros autores com espécies oleaginosas.

Tabela 3.8 - Composição de ácidos gordos dos lípidos extraídos de culturas de *Chlorella sorokiniana* em diferentes condições de crescimento em comparação com os ácidos gordos que constituem o óleo de diferentes microalgas, leveduras, e o óleo de colza e de soja.

		Quantidade relativa de ácidos gordos (% p/p)				
		Ácido palmítico C16:0	Ácido esteárico C18:0	Ácido oleico C18:1	Ácido linoleico C18:2	Outros
C/N 35	Heterotrofia	1,76	-	67,52	13,25	19,23
	Mixotrofia	1,71	3,91	64,14	28,07	2,17
C/N 70	Heterotrofia	1,22	-	45,77	14,69	38,32
	Mixotrofia	1,22	7,75	45,62	38,86	6,55
Óleo de colza ^(a)		3,5	0,9	64,1	22,3	9,2
Óleo de soja ^(a)		13,9	2,1	23,2	56,2	4,6
<i>Chlorella vulgaris</i> ^(b)		25,07	0,63	12,64	7,19	54,47
<i>Spirulina maxima</i> ^(b)		40,16	1,18	5,43	17,89	35,34
<i>Nannochloropsis sp.</i> ^(b)		23,35	0,45	13,20	1,21	61,79
<i>Picochlorum sp.</i> ^(c)		26,16	3,22	21,96	23,76	24,9
<i>Desmochloris sp.</i> ^(c)		33,63	1,94	28,17	28,55	7,71
<i>Rhodospiridium toruloides</i> ^(d)		-	7,09	63,89	21,78	7,24
<i>Rhodospiridium toruloides</i> ^(e)		-	8,07	58,73	21,34	11,85

(a) Dermibas, 2003; (b) Gouveia e Oliveira, 2008; (c) Pereira *et al.*, 2013; (d) Teresa, 2012; (e) Guerreiro, 2013.

Analisando a composição dos ácidos gordos obtidos nos crescimentos celulares (Tabela 3.9), verifica-se que os ácidos gordos maioritários, em qualquer condição estudada, são os ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), seguindo-se do ácido esteárico (C18:0) e por último o palmítico (C16:0). O ácido esteárico, em condições de heterotrofia, é produzido em pequena quantidade, pelo que não foi possível quantificar, enquanto o ácido linoleico é cerca de metade da quantidade produzida em mixotrofia, em ambos os rácios. Santos *et al.* (2011b), num estudo realizado com a microalga *Chlorella protothecoides* num meio de cultura com glucose, também observaram que as quantidades de ácido esteárico (C18:0) e de ácido linoleico (C18:2) foram menores em cultura heterotrófica em relação à mixotrófica, e concluíram que o óleo produzido pela microalga em condições de heterotrofia é composto maioritariamente por ácido oleico (57%), ácido linoleico (22%) e ácido palmítico (14%). O teor de ácido linoleico (C18:2) e de ácido oleico (C18:1), obtido neste estudo, é semelhante aos resultados obtidos pelos autores acima referidos, no entanto, como se pode verificar ao analisar a Tabela 3.9, o teor de ácido palmítico é bastante inferior. É possível constar que os óleos maioritários produzidos por esta microalga são também os que estão em maior quantidade nos óleos vegetais mais utilizados para produção de biodiesel, como sendo o óleo de colza na Europa e o de soja no Brasil. Comparando os resultados dos ensaios sem limitação de azoto e com limitação de azoto, verifica-se que a quantidade de ácido oleico diminui e a de ácido linoleico e de outros ácidos gordos aumentam ligeiramente, no entanto os ácidos oleico e linoleico continuam a ser os maioritários. Os resultados obtidos vão de encontro ao que Chader *et al.* (2011) haviam referido, que os principais ácidos gordos produzidos pela *Chlorella sorokiniana* são os ácidos gordos insaturados, ácido oleico e ácido linoleico, e que os ácidos gordos saturados são produzidos em baixa quantidade, ácido palmítico e ácido esteárico. Contudo, Dimalaluan *et al.* (2013) afirmam o contrário, sendo que os ácidos gordos maioritários produzidos pela microalga *Chlorella sorokiniana* são o ácido palmítico e ácido esteárico e os minoritários o ácido oleico e ácido linoleico.

Nem todos os ácidos gordos produzidos por microrganismos oleaginosos são indicados para a produção de biodiesel, pois as quantidades de ácidos gordos saturados e insaturados influenciam bastante a qualidade do biodiesel. Duarte *et al.* (2010) afirmam que o teor elevado de ácido oleico é favorável do ponto de vista da estabilidade oxidativa do óleo para produção de biodiesel.

Ramos *et al.* (2009) realizaram um estudo com diferentes óleos vegetais refinados com o objetivo de avaliar a influência da composição da matéria-prima na qualidade de biodiesel,

utilizando uma reação de transesterificação. Estes investigadores descobriram que as propriedades críticas do biodiesel correspondem ao número de cetano do combustível, estabilidade oxidativa e índice de iodo dependem da natureza do óleo, e concluíram que os óleos com mais de 50 % de ácidos gordos monoinsaturados, 20% ou menos de ácidos gordos saturados e 30% de ácidos gordos polinsaturados, são indicados para produzir biodiesel de qualidade de acordo com a Norma Europeia EN 14214. No estudo referido acima, realizado por Santos *et al.* (2011b), os autores concluíram que o óleo produzido pela microalga *Chlorella protothecoides* era semelhante, em termos de composição de ácidos gordos, ao óleo de colza. O biodiesel produzido pelo óleo de colza obedece à Norma Europeia EN 14214 (Ramos *et al.*, 2009).

Neste estudo, analisaram-se apenas quatro ácidos gordos presentes no óleo produzido pela microalga *C. sorokiniana*, e como já foi referido a composição em termos de ácidos gordos maioritários, ácido oleico e ácido linoleico, é muito semelhante ao estudo efetuado por Santos *et al.* (2011b). Os 50 % de ácidos gordos insaturados são conferidos pela elevada quantidade de ácido oleico, o que neste estudo está presente em cerca de 67% e 45%, nos rácios C/N 35 e C/N 70, respetivamente, e portanto este óleo também poderá ser indicado para a produção de biodiesel de acordo com as normas de qualidade.

Com este estudo foi possível verificar que a composição de ácidos gordos produzidos pela microalga é idêntica aos principais óleos vegetais, colza e soja, utilizados pelas indústrias na produção de biodiesel.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, a microalga *Chlorella sorokiniana* cresceu em diferentes condições, em sistema autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, onde se testaram duas fontes de carbono, a glucose e um resíduo agroindustrial, o extrato aquoso de alfarroba. Este estudo permitiu selecionar o metabolismo em que a microalga apresentou melhor crescimento e maior capacidade de acumulação lipídica. A microalga *C. sorokiniana* apresentou elevada capacidade de produção e acumulação de lípidos, tanto em heterotrofia como em mixotrofia, usando glucose como fonte de carbono. Em qualquer das condições ensaiadas, o crescimento da microalga *C. sorokiniana* em condições mixotróficas, apresentou sempre uma maior performance na acumulação de lípidos, sendo os valores de rendimento lipídico ($Y_{L/X}$) superiores aos obtidos em heterotrofia, e claramente em relação à autotrofia.

A limitação de azoto demonstrou ser um fator preponderante na acumulação de lípidos intracelulares, obtendo-se um aumento no rendimento lipídico de 24 % para 49 % (p/p) em mixotrofia e de 21 % para 42 % (p/p) em heterotrofia. Com o aumento do rácio C/N conseguiu-se o dobro do conteúdo em lípidos relativamente ao meio sem limitação de azoto, utilizando glucose como fonte de carbono orgânico.

Foi testada igualmente a capacidade de crescimento e acumulação de lípidos da microalga *C. sorokiniana* na presença de um resíduo agroindustrial, o extrato aquoso de alfarroba, em condições heterotróficas e mixotróficas. Contudo, neste resíduo o crescimento da microalga foi bastante limitado em ambos os metabolismos, contribuindo para que não houvesse acumulação de lípidos. O consumo de açúcar foi muito baixo, pensando-se que esta microalga poderá não ter capacidade para hidrolisar e metabolizar a sacarose, açúcar maioritário no extrato de alfarroba, justificando-se o baixo consumo de substrato.

Os ácidos gordos maioritários produzidos pela microalga *Chlorella sorokiniana* são os ácidos oleico e linoleico, seguindo-se dos ácidos esteárico e palmítico, apresentado um perfil lipídico semelhante aos óleos vegetais, sugerindo que esta cultura poderá ser indicada para a produção de biodiesel.

Em termos de resultados globais deste trabalho, pode concluir-se que a microalga *Chlorella sorokiniana* produz e acumula lípidos em condições de limitação de azoto, revelando-se o metabolismo mixotrófico o mais eficaz. O uso de resíduos agroindustriais na produção de biodiesel era de grande importância, uma vez que iria reduzir os custos de produção, no entanto sem qualquer tratamento prévio, a microalga não se adaptou para crescer e acumular lípidos.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

De modo a complementar o trabalho efetuado, seria importante aprofundar e completar alguns aspetos deste estudo:

- Realizar mais ensaios fazendo variar o rácio C/N, aumentando-o, uma vez que com limitação de azoto obtiveram-se resultados promissores.
- Realizar ensaios de crescimento da *C. sorokiniana* em reator biológico, com o rácio C/N 70 ou outro que se mostre promissor, usando a glucose como fonte de carbono, em condições de mixotrofia.
- Identificar os carotenoides produzidos através de cromatografia gasosa, uma vez que se trata de produtos de elevado valor.
- Proceder à hidrólise do extrato de alfarroba e avaliar o crescimento e acumulação de lípidos da microalga *C. sorokiniana* neste extrato hidrolisado.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, A., Fernandes, B., Vicente, A., Teixeira, J., Dragone, G. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118 : 61 – 66.
- Acosta, L. F., Honorato, T., Franco T. (2012). Cultivo heterotrófico de microalga *Chlorella vulgaris* CPCC90 utilizando sacarose hidrolisada como fonte de carbono orgânico.
- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., Bugbee, B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource technology*, 131 : 188 – 94.
- Agwa, O., Ibe, S., Abu, G. (2012). Economically Effective Potential of *Chlorella sp.* For Biomass and Lipid Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (1) : 35 - 45.
- Ajanovic, A. (2011). Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy*, 36 : 2070 – 2076
- Alzate, C. A. C., Toro, O. J. S. (2006). Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy*, 31: 2447-2459.
- Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, M. d., Leonardi, A., Rossi, M. (2010). Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial Cell Factories* 9 : 73.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolation chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24 : 1 - 16.
- Andrade, M., Costa, J. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264 : 130 - 134
- Battah, M. G., El-Sayed, A. B., El-Sayed, E. W. (2013). Growth of the green alga *Chlorella vulgaris* as affected by different carbon sources. *Life Science Journal*, 10 (1) : 2075 - 2081.
- Borrmann, D. (2009). Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase na formação de metabólitos incolores. *Tese de Douturamento, Universidade de São Paulo*.
- Bournay, L., Casanave, D., Delfort, B., Hillion, G., Chodorge, J. A. (2005). New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. *Catalysis Today*, 106 : 190–192.
- Brotosudarmo, T., Prihastyanti, M., Gardiner, A., Carey, A., Cogdell, R. (2014). The Light Reactions of Photosynthesis as a Paradigm for Solar Fuel Production. *Energy Procedia*, 47 : 283 – 289.
- Carolino, L. (2011). “Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono”. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa, Portugal.

- Carrapato, R. M. G. (2010). "Produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados por via alcalina: o caso de estudo da FCT-UNL". Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K., Mignolet, E. (2011). Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana* a green microalga. *Reveu des Energies Renouvelables*. 14 (1) : 21-26.
- Chandra, R., Rohit, M., Swamy, Y., Venkata Mohan, S. (2014). Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77 : 41-47.
- Cheng, Y., Lu, Y., Gao, C., Wu, Q. (2009). Alga-Based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. *Energy and Fuels*, 23 (8) : 4166 – 4173.
- Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110 : 510 – 516.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25 : 294–306.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P. J. (1999). An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology*, 11 : 179 - 184.
- Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 1 - 6.
- Cordero, B.F., Obraztsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A., Rodriguez, H. (2011). Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine drugs*, 9 : 1607 – 1624.
- Costa, J. A. V., Morais, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*. 102 : 2 - 9.
- Courchesne, N.M.D., Parisien, A., Wang, B., Lan, C. Q. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of biotechnology*, 141: 31 – 41.
- Deng, X., Li, Y., Fei, X. (2009). Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African Journal of Microbiology Research* 3 (13) : 1008 – 1014.
- Dermibas, A. (2003). A biodiesel fuels from vegetable oil via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Convers Manage*, 44 : 2093 - 2109.

Dimalaluan, A. K., Manalo, M. J., Perez, D. R., Persincula, M. R. (2013). Characterization of oil extracted from *Chlorella sorokiniana*. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 4: 1 - 5.

Direção-Geral de Energia e Geologia (www.dgeg.pt), Setembro 2013.

DMFit, <http://modelling.combase.cc>, Julho 2013.

Duarte, I. D., Rogério, J. B., Antoniassi, R., Bizzo, H. R., Junqueira, N. T. (2010). 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel: Variação da composição de ácido graxos dos óleos de polpa e maêndoa de macaúba.

El-Kassas, H. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* Sp. growth under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39 (4) : 233 – 239.

El-Sheekh, M., Fathy, A. (2009). Variation of some nutritional constituents and fatty acid profiles of *Chlorella vulgaris* Beijerinck grown under auto and heterotrophic conditions. *International Journal of Botany*, 5 : 153 - 159.

Encarnação, T., Burrows, H., Pais, A. C., Campos, M. (201) A microalga marinha *Nannochloropsis* sp. Aumento da produtividade de interesse. NOVOS PRODUTOS DO MAR: Inovação e Valorização dos Produtos da Pesca e Aquicultura, Aveiro (Poster).

European Biodiesel Board, www.ebb-eu.org, Agosto de 2013.

Ferruzi, M. G., Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27 : 1 - 12.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497 - 509.

Guerreiro, F. (2013). Influência da transferência de massa de oxigénio na acumulação de lípidos pela levedura *Rhodosporidium toruloides*. *Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica, Universidade do Algarve*.

Guillard, R., Ryther, J. (1962). Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Denotula confervaceae* (Cleve). *Gran Can J Microbiol.*, 8 : 229 – 239.

Gouveia, L., Oliveira, A. (2008). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 : 269 - 274.

Haas, M.J., McAloon, A. J., Yee, W. C., Foglia, T. A. (2006). A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource technology*, 97 : 671 – 678.

Habib, M., Yusoff, F., Phang, S., Mohamed, S., Kamarudin, M. (2004). Growth and Nutritional Value of a Tropical Green Alga, *Ankistrodesmus convolutus* Corda, in Agro-industrial Effluents. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 27 (2) : 79 – 89.

- Hamed, S. M., Klöck, G. (2014). Improvement of Medium Composition and utilization of Mixotrophic Cultivation for green and blue green microalgae towards biodiesel production. *Advances in microbiology*, 4 (3) : 167 - 174
- Hein, M., Isengard, H.-D. (1997). Determination of underivatized fatty acids by HPLC. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 204 : 420 - 424.
- Hsieh, C.; Wu, W. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 100 : 3921 – 3926.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87 : 38 – 46.
- Hügler, M., Sievert, S. (2011). Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 3 : 261 – 289.
- Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A., Haskins, C. P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.*, 94 : 152 - 170.
- Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., Elibol, M. (2012). Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, 61 : 11 – 19.
- Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. *Biochimie*, 93 : 91 – 100.
- Kim, S., Park, J., Cho, Y., Hwang, S. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144 : 8 – 13.
- Knothe, G., Gerpen, J. V., Krahl, J. (2005). *The Biodiesel Handbook* Editors. AOCs PRESS.
- Krawczyk, T. (1996). Biodiesel – Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM*, 7 : 801 – 829.
- Li, X., Xu, H., Wu, Q. (2007) Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 98 (4) : 764 – 771.
- Liang, M.-H., Jiang, J.-G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, 52 : 395 – 408.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 1043 - 1049.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes In *Methods in enzymology*. Academic Press, 148 : 350 - 382.

- Lima-Costa, M., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B., Peinado, J. M. (2012). Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39 (5) : 789 – 797.
- Ma, F., Hanna, M. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70 : 1-15.
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S., Lima-Costa, M. E. (2010). Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *J. Ind Microbiol Biotechnol*, 37 : 1145 – 1155.
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11 : 1300 – 1311.
- Marín, F., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Perez-Alvarez, J. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chem.*, 100 (2) : 736 – 741.
- Maróstica Jr., M., Pastore, G. (2007) Production of R-(+)- α -terpinol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste as medium. *Food Chemistry*, 101 (1) : 345 – 350.
- Martínez, M. E., Camacho, F., Jiménez, J. M., Espínola, J. B., (1997). Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochem.*, 32 (3) : 93 - 98.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 : 217 – 232.
- Mater, L. (2001). Análise de biomarcadores lipídicos presentes em amostras de sedimento e material particulado do manguezal de ratões, sc. *Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.*
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34 : 1 – 5.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P., Lemaire, S. (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci*, 4 : 470.
- Mitra, D., Leeuwen, J., Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1 : 40 - 48.
- Mohsenpour, S., Richards, B., Willoughby, N. (2012). Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, 125 : 75 – 81.
- Mohsenpour, S., Willoughby, N. (2013). Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresource Technology*, 142 : 147 – 153.

- Montgomery, R. (2004). Development of biobased products. *Bioresource Technology*, 91 : 1-29.
- Morais, K. (2011). “Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornerutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobioreatores compactos”. Dissertação de mestrado. Universidade do Paraná, Curitiba, Brasil.
- New World Encyclopedia, www.newworldencyclopedia.org, Fevereiro 2014.
- Ngangkham, M., Ratha, S. K., Prasanna, R., Saxena, A. K., Dhar, D. W., Sarika, C., Prasad, R. B. (2012). Biochemical modulation of growth, lipid quality and productivity in mixotrophic cultures of *Chlorella sorokiniana*. *Springer Plus*, 1 : 33.
- Nigam, P. S., Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37 : 52 – 68.
- Pardão, J. M., Díaz, I., Raposo, S., Manso, T., Lima-Costa, M. E. (2008). Sustainable bioethanol production using agro-industrial by-products.
- Patterson, G. W. (1970). Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. *Lipids*, 5 (7) : 597 – 600.
- Pereira, H., Barreira, L., Custódio, L., Alrokayan, S., Mouffouk, F., Varela, J., Abu-Salah, K. M., Ben-Hamadou, R. (2013). Isolation and fatty acid profile of selected microalgae strains from the Red Sea for biodiesel production. *Energies*, 6 : 2773 – 2783.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45 : 11 – 36.
- Pourbafrani, M., Talebnia, F., Niklasson, C., Takerzadeh, M. J. (2007). Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolysate. *Int. J. Mol. Sci.*, 8 : 777 – 787.
- Pruvost, J., Vooren, G. V., Gouic, B. L., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J. (2011) Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 102 : 150 – 158.
- Qiao, H., Wang, G. (2009). Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27 (4) : 762 - 768.
- Qiao, H., Wang, G., Zhang, X. (2009). Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *J. Phycol.*, 45 : 1153 - 1162.
- Raman, R., Mohamad, S., (2012). Astaxanthin production by freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* and marine microalgae *Tetraselmis sp.* *Journal of biological sciences*, 15 : 1182 - 1186.

- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casa, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, 261 - 268.
- Raposo, S., Pardão, J. M., Díaz, I., Lima-Costa, M. E. (2009). Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products. *International Journal of energy and environment*.
- Ratledge, C. (1997). Microbial Lipids, in *Biotechnology*, volume 7 : Products of secondary metabolism. A Wiley Company
- Ratledge, C., (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 86 : 807 – 815.
- Ribeiro, I., Martins, H., Monteiro, A., Lopes, M., Miranda, A. I., Borrego C. (2013). *1º Congresso Internacional de Bioenergia* (Portalegre, Portugal).
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. A., Wickline, H. E. (1969). Effects of nitrogen limitation on growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl Microbiol.*, 18 (2) : 245 – 250.
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. *Blackwell Science*.
- Santos, F., Mazur, N., Garbisu, C., Becerril, O. (2011a). Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e compositão de pigmentos fotoprotectores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Quim. Nova*, 34 (1) : 16 – 20.
- Santos, C. A., Ferreira, M. E., Lopes da Silva, T., Gouveia, L., Novais, J. M., Reis, A. (2011b). A symbiotic gas exchange between bioreactors enhances microalgal biomass and lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes. *J. Ind Microbiol Biotechnol*, 38 (8) : 909 – 917.
- Seuoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl.Acad. Sci.*, 46 : 83 - 91.
- Seuoka, N., Chiang, K. S., Kates, J. R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol.Biol.* 25 : 47 - 66.
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., Schenk, P. M. (2012). High Lipid Induction in Microalgae for *Biodiesel Production*. *Energies*, 5 : 1532 – 1553.
- Shen, Y., Pei, Z., Yuan, W., Mao, E. (2009). Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. *Int J Agric & Biol Eng*, 2 : 51 - 57.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z., Mao, E. (2010). Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Appl Biochem Biotechnol*, 160 : 1674 – 1684.

- Shihira, I., Krauss, R. W. (1965). *Chlorella: Physiology and taxonomy on forty-one isolates*. University of Maryland, College Park.
- Singh, A., Nigam, P. S., Murphy, J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, 102: 10 - 16.
- Sun, J. (2007). D-limonene: Safety and Clinical Applications. *Alternative medicine review*, 12 (3) : 259-264.
- Sushchick, N. N., Kalacheva, G. S., Zhila, N. O., Gladyshev, M. I., Volova, T. G. (2003). A Temperature Dependence of the Intra-an Extracellular Fatty-Acid Composition of Green Algae and Cyanobacterium. *Russian Journal o Plant Physiology*, 3 : 374 - 380.
- Tanoi, T., Kawachi, M., Watanabe, M. (2011). Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*. *J Appl Phycol*, 23 : 25 – 33.
- Teresa, A. M. (2012). Leveduras oleaginosas para a produção de biodiesel, a partir de resíduos agroindustriais. Otimização das condições de crescimento e de produção lipídica. *Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica, Universidade do Algarve*.
- Thompson Jr, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica at Biophysica Acta* 1302, 17 - 45.
- Tripodo, M., Lanuzza, F., Micali, G., Coppolino, R., Nucita, F. (2004). Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology*, 91 (2) : 111 – 115.
- Vega, M., Díaz, E., Vila, M., León, R. (2011). Isolation of a new strain of *Picochlorum sp* and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnol. Prog.*
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J., Oyler, G., Betenbaugh, M., Nie, Z., Qiu, G. (2011). The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91 : 835 – 844.
- Wan, M., Wang, R., Xia, J., Rosenberg, J., Nie, Z., Kobayashi, N., Oyler, G., Betenbaugh, M. (2012). Physiological Evaluation of a New *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 109 : 1958 – 1964.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., Ruan, R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp*. *Bioresource Technology*, 101 (8) : 2623 – 2628.
- Wang, Y., Rischer, H., Eriksen, N., Wiebe, M. (2013). Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids. *Bioresource Technology*, 144 : 608 – 614.
- Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K., Cameron, R. G. (2007a). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98 (8) : 1596 – 1601.

Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K. (2007b). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, 42 : 1614–1619.

Work, V. H., D'Adamo, S., Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Posewitz, M. C. (2012). Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels. *Current opinion in biotechnology*, 23 : 290–297.

www.biodiesel.pt, Agosto 2013.

Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. (2000). Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6 : 87 – 102.

Yeh, K., Chang, J. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105 : 120 – 127.

Zheng, Y., Li, T., Yu, X., Bates, P. D., Dong, T., Chen, S. (2013). High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Applied Energy*, 108 : 281–287.

ANEXOS

I. COMPLEMENTO AO MEIO DE CULTURA SEUOKA

Preparação da solução de Hutner Elements (adaptado de Hutner *et al.*, 1950)

Para 1 litro de solução é necessário preparar as soluções seguintes:

Solução I: Dissolver 10 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em 250 mL de água.

Solução II: Dissolver cada componente no volume de água indicada e adicionar todos os um a um, pela ordem indicada.

Composto	(g)	Água (mL)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,40	100
H ₃ BO ₃	2,28	200
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,02	50
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,32	50
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,32	50
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,22	50
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,00	50

Depois de dissolver todos os reagentes, misturar as soluções 1 e 2, e ferver até aos 100 °C. Quando estiver tudo dissolvido (apresenta uma cor verde), deixar arrefecer até aos 80 – 90 °C e ajustar o pH a 6,8 com KOH a 20 % (p/v). Prefazer o volume com água destilada até completar 1L. Guardar no escuro durante dois dias, agitando duas vezes ao dia. Ao fim de dois dias deve apresentar uma coloração rosa e está pronta a ser utilizada.

II. COMPLEMENTO AO MEIO DE CULTURA F/2

1. Preparação da solução Trace Elements

Para 1 litro de solução pesar os seguintes reagentes e prefazer o volume com água destilada: 4,16 g de Na₂EDTA; 3,15 g de FeCl₃.6H₂O; 0,01 g de CuSO₄.5H₂O; 0,022 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,01 g de CoCl₂.4H₂O; 0,18 g de MnCl₂.4H₂O e 0,006 g de Na₂MoO₄.2H₂O.

2. Preparação da solução Mix de Vitaminas

Para 1 litro de solução pesar os seguintes reagentes e prefazer o volume com água destilada: 0,0005 g de Cianocobalamina (Vitamina B12); 0,1 g de Tiamina-HCl (Vitamina B1) e 0,0005 g de Biotina.

III. MÉTODO DE DNS

Para fazer o reagente DNS, preparou-se as soluções seguintes:

Solução I: para 100 mL de solução de hidróxido de sódio adicionar, a quente, 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico.

Solução II (solução de tartarato duplo de sódio e potássio – 660 g/L): adicionar a quente 250 mL da solução II à solução I e fazer o volume para 500 mL.

IV. PREPARAÇÃO DO TAMPÃO PBS (TAMPÃO FOSFATO SALINO)

Tampão fosfato a 0,1 M (pH 7): Para um 1L de água destilada, adicionar 10,71 g/L de fosfato de dipotássio (K_2HPO_4) e 5,24 g/L de hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4).

Solução PBS (tampão fosfato de potássio a 10 mM com 0,15 M de cloreto de potássio): Para 1L de solução, adicionar 11,18 g de KCl (cloreto de potássio) e 100 mL da solução tampão fosfato a 0,1 M em 1L de água destilada.

V. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS PADRÃO

Quantificação de azoto (nitrato)

Para calcular a concentração de nitrato presente em cada amostra foi necessário obter uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de nitrato de potássio (0 – 1,2 g/L). As amostras foram efetuadas em triplicado em foi necessário diluir (1:60) de modo a que a leitura fosse dentro da gama de linearidade. A figura seguinte representa a curva padrão obtida:

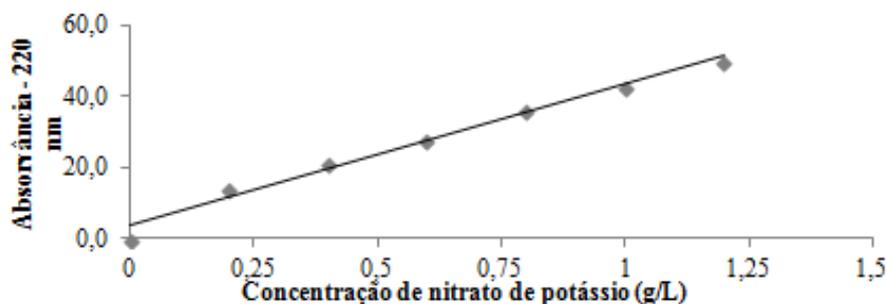


Figura 0.1 - Curva padrão para quantificação de nitrato. Absorvância a 220 nm para diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y = 39,6087 x + 3,6861$, $R^2 = 0,9855$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.

Quantificação de açúcares (glucose) – método de DNS

Para calcular a concentração de açúcares presentes em cada amostra foi necessário obter uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de glucose (0 – 1 g/L). As amostras foram efetuadas em triplicado e a curva padrão obtida está representada na seguinte figura:

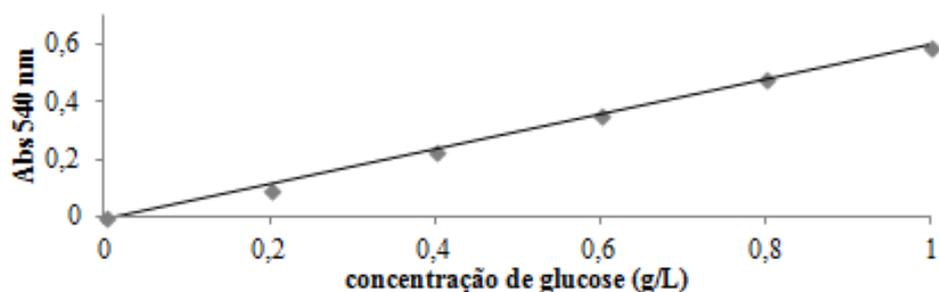


Figura 0.2 - Curva padrão de DNS. Absorvância a 540 nm para soluções de glucose com diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y=0,6124 X - 0,0111$; $R^2 = 0,9986$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.

Quantificação de lípidos neutros

Para calcular a concentração de lípidos neutros acumulados ao longo do crescimento celular foi necessário obter uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de um lípido padrão, a trioleína (0 – 1 g/L). Numa cuvette de quartzo colocou-se 200 μ L da amostra, 1850 μ L de PBS e 50 μ L de DMSO, registrando-se o espectro (530 nm). De seguida adicionou-se 10 μ L da solução de Vermelho de Nilo e registou-se novamente o espectro. As amostras foram efetuadas em triplicado. A figura seguinte representa a curva padrão obtida:

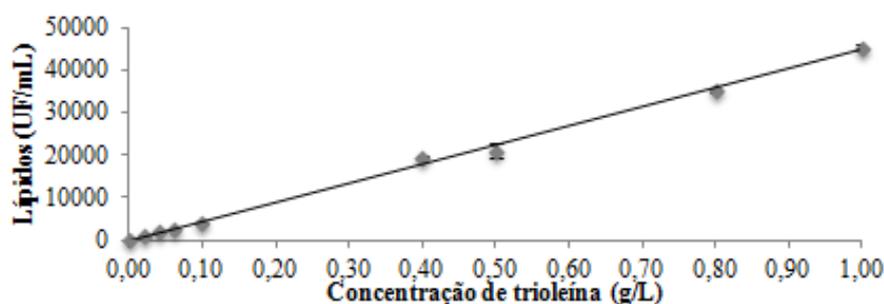


Figura 0.3 – Curva padrão de lípidos neutros. Registou-se o espectro (comprimento de onda de excitação 530 nm) para soluções de trioleína com diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y=44663 x + 5,6753$; $R^2 = 0,9976$. Apresentados valores médios \pm desvio padrão.