

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

RELATÓRIO FINAL DA DISSERTAÇÃO
“PRODUÇÃO DE BIOMASSA AQUÁTICA COMO
FONTE DE LÍPIDOS PARA BIOCOMBUSTÍVEIS”

SANDRA CRISTINA FREITAS DE OLIVEIRA

Mestrado em Engenharia Química

Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental

Julho de 2009

“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento”

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

(Isaac Newton)

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Dr^a Nídia de Sá Caetano todo o tempo generosamente dedicado, à minha orientação, ao longo destes meses de trabalho.

Ao Eng^o Octávio Coelho de Oliveira, a quem não poderia estar mais grata pelo espírito de companheirismo difícil de igualar e pelo apoio ao longo de toda a investigação laboratorial e bibliográfica.

A todos os professores e pessoal auxiliar do Departamento de Engenharia Química, em especial aos do Laboratório de Tecnologia Química (LTQ) pela total disponibilidade e dedicação.

Quero também agradecer a todos os meus amigos a compreensão pelos meus momentos de ausência, pois abdiquei muitas vezes da sua companhia para me dedicar ao Curso.

Agradeço ainda ao meu noivo, Dinis por se ter encarregue, sem queixumes, das tarefas domésticas sempre que a necessidade se impunha. Agradeço o sorriso com que me recebia após (mais) uma noite passada só enquanto eu me encontrava no ISEP.

Resumo

Este trabalho teve como principal objectivo a produção de biomassa aquática como fonte de lípidos para biocombustíveis. O objectivo principal foi subdividido em dois pontos:

- Inoculação e controlo de possíveis contaminações das culturas de microalgas de água doce *Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Botryococcus brauni* e *Haematococcus pluvialis*, seleccionando-se a microalga de crescimento mais rápido (a estirpe que mais rapidamente atingiu 1 L de cultura densa);
- Avaliação do crescimento e optimização das condições de cultivo de uma das estirpes do grupo em estudo, em laboratório, de forma a conseguir maximizar a produtividade lipídica.

Para a *Chlorella vulgaris* (estirpe seleccionada do grupo em estudo, por ser a de crescimento mais rápido) foram efectuados três conjuntos de ensaios, em erlenmeyers de 1 L (fotobioreactores fechados), em que se fizeram variar as fontes nutricionais:

- a) Adição de Carbono (regime mixotrófico);
- b) Redução da concentração de Azoto em regime mixotrófico;
- c) Indução de stress (aumento da salinidade) em regime mixotrófico.

Os resultados experimentais foram tratados de forma a darem resposta aos objectivos propostos. Os melhores resultados de produtividade lipídica máxima resultaram dos ensaios de cultivo em condições mixotróficas com $1,0\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio BBM}}$, redução em 80% de fonte de azoto e com adição de 750% e 1.000% de NaCl, correspondendo a uma taxa de produção de lípidos de $43,9\text{mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$, $44,7\text{mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$, $42,3\text{mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$ e $43,8\text{mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$, respectivamente. Estes resultados foram superiores, em mais de duas vezes, quando comparados com o valor obtido para regime autotrófico, de $18,3\text{mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$.

Deste modo considera-se que as condições do ensaio em regime mixotrófico com adição de $1,0\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio BBM}}$ em conjunção com redução do teor de azoto em 80%, bem como a aplicação de condições de stress salino permitem incrementar substancialmente a produção lipídica para a estirpe de *Chlorella vulgaris* em estudo.

Considerando um fotobioreactor com um volume total de cultivo equivalente ao volume de uma piscina de 1 ha com 15 cm de profundidade ($V = 1.500 \text{ m}^3$), sendo o valor de produtividade lipídica máxima de $44,7 \text{ mg}_{\text{lipidos}}/\text{L.dia}$, estima-se uma produtividade máxima de lípidos de cerca de 27.200 L/ha.ano. Este valor é cerca de 23 e 34 vezes superior quando comparado com a produtividade de óleo em monoculturas de colza e girassol.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*, cultivo autotrófico, cultivo mixotrófico, redução do teor de azoto, stress salino.

Abstract

The main objective of this work was the production of aquatic biomass as a source of lipids for biofuels and was subdivided in two points:

- Inoculation and control of possible contamination of cultures of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Botryococcus brauni* and *Haematococcus pluvialis*, selecting the fastest growing microalgae (the culture that first reached 1 L of dense culture);
- Evaluation of growth and optimization of cultivation conditions in the laboratory in order to achieve maximum lipid productivity.

For *Chlorella vulgaris* (strain selected from the algae working group for being the fastest growing one) three sets of tests were carried out in 1 L Erlenmeyer flasks (closed fotobioreactores), under different nutritional conditions:

- a) Addition of carbon (mixotrophic scheme);
- b) Reduction of nitrogen concentration in the mixotrophic scheme;
- c) Induction of stress (increased salinity) under mixotrophic conditions.

The experimental results were treated so as to meet the proposed objectives. The best results of maximum lipid productivity were obtained for the culture tested in mixotrophic conditions with 1.0 g_{glucose}/L_{BBM medium}, 80% reduction in nitrogen source and with the addition of 750% and 1000% NaCl, corresponding to a lipid production rate of 43.9 mg_{lipids}/L.day, 44.7 mg_{lipids}/L.day, 42.3 mg_{lipids}/L.day and 43.8 mg_{lipids}/L.day, respectively. These results were over twice the values obtained for autotrophic system, 18.3 mg_{lipids}/L.day.

Thus it is considered that the conditions of the test under mixotrophy with addition of 1.0 g_{glucose}/L_{BBM medium} in conjunction with 80% reduction of nitrogen content and the application of salt stress conditions can substantially increase the production of lipids for the strain of *Chlorella vulgaris* under study.

Assuming a photobioreactor with a total volume of culture equivalent to the volume of a pool of 1 ha and 15 cm deep ($V = 1,500 \text{ m}^3$) we expect that a maximum lipid productivity of 44.7 mg_{lipids} / L.day corresponds to a maximum yield of about 27,200 L / ha.year. This value is about 23 and 34 times higher when compared to the productivity of oil from rape and sunflower monocultures.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, autotrophic cultivation, mixotrophic cultivation, reduction of nitrogen content, salt stress.

Índice

I. Introdução	1
I.1. Biomassa aquática	1
I.1.1. Algas	1
I.1.2. Microalgas	1
I.1.3. Microalgas – produtos e aplicações	3
I.2. Avaliação do Crescimento Microalgal	7
I.2.1. Curva de crescimento	7
I.2.2. Parâmetros de Crescimento	8
I.3. Classificação e morfologia da <i>Chlorella vulgaris</i>	11
I.4. Meios de cultura, fontes nutricionais e de stress	13
I.4.1. Fontes nutricionais (carbono, azoto e fósforo)	13
I.5. Processos de cultivo	15
I.5.1. Parâmetros químicos e físicos de cultivo	15
I.5.2. Processos de cultivo de microalgas	15
I.5.3. Fotobioreactores vs sistemas de cultivo a céu aberto	16
I.6. Métodos de colheita de microalgas e de extracção de óleo	19
I.7. Biodiesel	21
I.7.1. Considerações genéricas sobre os óleos para produção de biodiesel	22
I.7.2. Transesterificação	24
I.7.3. Legislação vigente	25
II. Parte Experimental: Materiais, Reagentes e Métodos	27
II.1. Parâmetros físicos fixados	27
II.2. Inoculação das microalgas de água doce <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella emersonii</i> , <i>Botryococcus brauni</i> e <i>Haematococcus pluvialis</i>	29

II.2.1. Identificação das microalgas estudadas	29
II.2.2. Preparação do material utilizado na inoculação / cultivo	29
II.2.3. Condições de Inoculação / Cultivo	30
II.2.4. Meios de Cultura	32
II.3. Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	35
II.3.1. Repicagens	35
II.3.2. Monitorização de possíveis contaminações das culturas	35
II.4. Curvas de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>	37
II.4.1. Metodologia para traçar a curva de calibração	37
II.4.2. Avaliação do crescimento microalgal	37
II.4.3. Cálculo da concentração de biomassa algal produzida	39
II.5. Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria	41
III. Resultados experimentais e sua discussão	43
III.1. Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo	43
III.1.1. Espécie: <i>Chlorella vulgaris</i> , Estirpe: ACOI, 879	43
III.1.2. Espécie: <i>Chlorella emersonii</i> , Estirpe: ACOI, 516	44
III.1.3. Espécie: <i>Botryococcus brauni</i> , Estirpe: ACOI, 1257	44
III.1.4. Espécie: <i>Botryococcus brauni</i> , Estirpe: SAG, 30.81	45
III.1.5. Espécie: <i>Haematococcus pluvialis</i> , Estirpe: SAG, 49.94	45
III.2. Avaliação do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>	47
III.2.1. Cultura em regime autotrófico e nove culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico, sob a forma de glucose	47
III.2.2. Cinco culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de 1,0 g _{glucose} /L com subtração de azoto ao meio de cultura	50
III.2.3. Nove culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g _{glucose} /L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura	53

III.2.4. Determinação das produtividades máximas para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.	54
III.3. Quantificação de óleos por gravimetria	59
IV. Conclusões	63
V. Sugestões para trabalhos futuros	65
VI. Referências bibliográficas	67
VII. Anexos	71
Anexo 1. Calibração - bomba de ar	71
Anexo 2. Calibração - Curvas de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>	73
Anexo 3. Avaliação do crescimento microalgal	75
Anexo 3.1. Cultura em regime autotrófico e nove culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico, com adição de carbono orgânico (glucose)	75
Anexo 3.2. Cinco culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g _{glucose} /L com subtração de azoto ao meio de cultura	83
Anexo 3.3. Nove culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g _{glucose} /L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura	86
Anexo 4. Determinação da massa de água contida na biomassa algal húmida	91
Anexo 5. Determinação das produtividades máximas de biomassa seca	93
Anexo 6. Quantificação de óleos por gravimetria – determinação da produtividade máxima lipídica	97
Anexo 7. Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm), medida no espectrofotómetro UV-visível UV-160A, aquando das leituras de Abs para culturas constantes nas Tabelas A3.1 a A3.24	99

Índice de Figuras

Figura I.1 – Oleaginosas vs Microalgas. Área de terreno cultivado com Colza e com Microalgas para obtenção da mesma quantidade de óleo	5
Figura I.2 – Compostos extraídos a partir de microalgas	6
Figura I.3 – Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor fechado	7
Figura I.4 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Chlorella vulgaris</i>	11
Figura I.5 – sistemas de produção de microalgas a céu aberto do tipo <i>raceway pond</i> (www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854)	17
Figura I.6 – Sistemas de produção de microalgas em fotobioreactores tubulares (http://brae.calpoly.edu/CEAE/biofuels.html)	18
Figura I.7 – Colheita de microalgas (a) http://microalgas-producao.blogspot.com ; b) www.cyanotech.com)	19
Figura I.8 – Reacção de transesterificação	24
Figura II.1 – Inoculação em tubos de ensaio, na câmara de fluxo laminar	30
Figura II.2 – Tubos de ensaio e matrizes inoculados	30
Figura II.3 – Curva de intensidade luminosa à altura média das lâmpadas luz dia	31
Figura II.4 – Homogeneização dos meios de cultura (à esq.) e armazenamento dos meios de cultura concentrados em frio (à dir.)	34
Figura II.5 – Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em erlenmeyers de 250 mL	35
Figura II.6 – Cultivos em triplicado para avaliação do crescimento microalgal	38
Figura II.7 – Avaliação do crescimento das culturas - medição de pH e temperatura	38
Figura II.8 – Quantificação gravimétrica de lípidos presentes na biomassa algal	42
Figura III.1 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Chlorella vulgaris</i>	43
Figura III.2 – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de <i>Chlorella emersonii</i>	44
Figura III.3 – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de <i>Botryococcus brauni</i>	44
Figura III.4 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Botryococcus brauni</i>	45
Figura III.5 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Haematococcus pluvialis</i>	45
Figura III.6 – Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> em regime autotrófico (à esquerda) e em regime mixotrófico com a adição de 4,0 g _{glucose} /L _{meio} (à direita) ao fim de 1 dia de cultivo	47

Figura III.7 – Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> em regime autotrófico (esq.) e em regime mixotrófico com a adição de 4,0 g _{glucose} /L _{meio} (direita) ao fim de 3 dias de cultivo	48
Figura III.8 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia	49
Figura III.9 – Curvas de variação do pH ao longo do período de ensaio	49
Figura III.10 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada em condições mixotróficas com adição de 2,5 g _{glucose} /L _{meio}	50
Figura III.11 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia	51
Figura III.12 – Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> em regime mixotrófico 1,0 g _{glucose} /L _{meio} : com diferentes percentagens de subtracção de azoto (à esq.) e com subtracção da fonte de azoto em 80% (0,2N) (à direita)	52
Figura III.13 – Curvas de pH vs Dia	52
Figura III.14 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia	53
Figura III.15 – Curvas de pH vs Dia	54
Figura III.16 – Produtividade máxima para os ensaios constantes na Tabela III.1	56
Figura III.17 – Produtividade lipídica para os ensaios constantes na Tabela III.2	60
Figura III.18 – Fracções lipídicas e não lipídicas da biomassa algal, para os ensaios constantes na Tabela III.2	61
Figura A1.1 – Curva de calibração da bomba de ar	71
Figura A2.1 – Curva de calibração do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> (rejeitada)	73
Figura A2.2 – Curva de calibração do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>	74
Figura A7.1 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime autotrófico – dia zero (17-02-2009, por engano registado como sendo 18-02-2009)	99
Figura A7.2 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime autotrófico – dia seis	99
Figura A7.3 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime de mixotrófico 0,2 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	100
Figura A7.4 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,2 g _{gluc} /L _{meio} – dia 6	100
Figura A7.5 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,4 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	100
Figura A7.6 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,4 g _{gluc} /L _{meio} – dia 6	101
Figura A7.7 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,6 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	101
Figura A7.8 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,6 g _{gluc} /L _{meio} - dia 6	101
Figura A7.9 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,8 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	102
Figura A7.10 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,8 g _{gluc} /L _{meio} – dia 6	102
Figura A7.11 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	102
Figura A7.12 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 6	103
Figura A7.13 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,5 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	103
Figura A7.14 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,5 g _{gluc} /L _{meio} – dia 4	103

Figura A7.15 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	104
Figura A7.16 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 4	104
Figura A7.17 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,5 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	104
Figura A7.18 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,5 g _{gluc} /L _{meio} – dia 3	105
Figura A7.19 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 3,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 0	105
Figura A7.20 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 3,0 g _{gluc} /L _{meio} – dia 3	105
Figura A7.21 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 20% (0,8N) – dia 0	106
Figura A7.22 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 20% (0,8N) – dia 5	106
Figura A7.23 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 0	106
Figura A7.24 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 5	107
Figura A7.25 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 60% (0,4N) – dia 0	107
Figura A7.26 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 60% (0,4N) – dia 5	107
Figura A7.27 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 0	108
Figura A7.28 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 5	108
Figura A7.29 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x) – dia 0	108
Figura A7.30 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x) – dia 5	109
Figura A7.31 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x) – dia 0	109
Figura A7.32 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x) – dia 5	109
Figura A7.33 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x) – dia 0	110
Figura A7.34 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x) – dia 5	110
Figura A7.35 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10,0x) – dia 0	110

Figura A7.36 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10,0x) – dia 5	111
Figura A7.37 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50,0x) – dia 0	111
Figura A7.38 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50,0x) – dia 4	111
Figura A7.39 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100,0x) – dia 0	112
Figura A7.40 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100,0x) – dia 3	112
Figura A7.41 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150,0x) – dia 0	112
Figura A7.42 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150,0x) – dia 3	113
Figura A7.43 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200,0x) – dia 0	113
Figura A7.44 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200,0x) – dia 3	113

Índice de Tabelas

Tabela I.1 – Pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento nos Filos <i>Cyanophyta</i> , <i>Chlorophyta</i> , <i>Euglenophyta</i> , <i>Rhodophyta</i> e <i>Chromophyta</i>	3
Tabela I.2 – Comparação entre a composição de alimentos convencionais e a de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca) (Adaptado de: Becker, 2004)	5
Tabela I.3 – Vantagens/desvantagens dos sistemas de cultivo (adaptado de: Pulz, 2001)	18
Tabela I.4 – Óleo extraído para diferentes matérias oleaginosas convencionais e microalgas (Pulz, 2001)	22
Tabela I.5 – Composição (% mássica) de ácidos gordos, com cadeias de 16 a 20 átomos de carbono, de três espécies de microalgas, relativamente aos lípidos totais (Adaptado de: Tokusoglu e Ünal, 2003)	23
Tabela II.1 – Parâmetros físicos fixados	27
Tabela II.2 – Identificação das microalgas estudadas	29
Tabela II.3 – Composição do meio BBM, meio de cultura padrão para cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	33
Tabela III.1 – Produtividade máxima de biomassa seca para 24, 48 e 72 h de cultivo	55
Tabela III.2 – Produtividade lipídica para todos os ensaios referidos de III.2.1. a III.2.3.	59
Tabela A1.1 – Valores de Q_{ar} (v.v.m) obtidos na calibração da bomba de ar	71
Tabela A2.1 – Valores de Absorvância obtidos para as oito concentrações padrão	73
Tabela A3.1 – Avaliação do crescimento em regime autotrófico	75
Tabela A3.2 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,2 g _{gluc} /L _{meio}	76
Tabela A3.3 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,4 g _{gluc} /L _{meio}	77
Tabela A3.4 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,6 g _{gluc} /L _{meio}	78
Tabela A3.5 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,8 g _{gluc} /L _{meio}	79
Tabela A3.6 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio}	80
Tabela A3.7 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,5 g _{gluc} /L _{meio}	80
Tabela A3.8 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 2,0 g _{gluc} /L _{meio}	81
Tabela A3.9 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 2,5 g _{gluc} /L _{meio}	81
Tabela A3.10 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 3,0 g _{gluc} /L _{meio}	82
Tabela A3.11 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} (igual à tabela A3.6)	83
Tabela A3.12 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 20% (0,8N)	84
Tabela A3.13 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 40% (0,6N)	84
Tabela A3.14 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio}	

e subtracção da fonte de azoto em 60% (0,4N)	85
Tabela A3.15 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção da fonte de azoto em 80% (0,2N)	85
Tabela A3.16 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} (igual à tabela A3.6 e à Tabela A3.11)	86
Tabela A3.17 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x)	87
Tabela A3.18 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x)	87
Tabela A3.19 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x)	88
Tabela A3.20 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10x)	88
Tabela A3.21 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50x)	90
Tabela A3.22 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100x)	89
Tabela A3.23 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150x)	90
Tabela A3.24 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200x)	90
Tabela A4.1 – Determinação da % de Biomassa algal seca	91
Tabela A5.1 – Produtividade em biomassa seca (mg _{secas} /L.dia) para períodos de 24 h para as cultura em regime autotrófico e culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico	93
Tabela A5.2 – Produtividade em biomassa seca (mg _{secas} /L.dia) para períodos de 48 h para a cultura em regime autotrófico e culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico	94
Tabela A5.3 – Produtividade em biomassa seca (mg _{secas} /L.dia) para períodos de 72 h para a cultura em regime autotrófico e culturas de concentrações distintas em regime mixotrófico	94
Tabela A5.4 – Produtividade em biomassa seca (mg _{secas} /L.dia) para períodos de 24h para as culturas em regime mixotrófico com adição de 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e subtracção de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura	94
Tabela A5.5 – Produtividade em biomassa seca (mg _{secas} /L.dia) para períodos de 48h para as culturas em regime mixotrófico com adição de 1,0 g _{gluc} /L _{meio} e	94

subtracção de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura	
Tabela A5.6 – Produtividade em biomassa seca ($\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$) para períodos de 72h para as culturas em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e subtracção de concentrações distintas da fonte de azoto ao meio de cultura	95
Tabela A5.7 – Produtividade em biomassa seca ($\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$) para períodos de 24h para as culturas em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura	95
Tabela A5.8 – Produtividade em biomassa seca ($\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$) para períodos de 48h para as culturas em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura	95
Tabela A5.9 – Produtividade em biomassa seca ($\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$) para períodos de 72h para as culturas em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e adição de concentrações distintas de cloreto de sódio ao meio de cultura	95
Tabela A6.1 – Teor percentual lipídico e Produtividade lipídica ($\text{mg}/\text{L.dia}$) para todos os ensaios realizados	97

Nomenclatura

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

Siglas

ACOI	Algoteca de Coimbra
Auto	Regime de crescimento autotrófico
BBM	Bold Basal Medium
CV	<i>Chlorella vulgaris</i>
Epp	Eppendorf
GC	Cromatografia gasosa
Gluc.	Glucose
Mix.	Regime de crescimento mixotrófico
N	Azoto
NaCl	Cloreto de sódio
Reagentes p.a.	reagentes pro-análise
SAG	Goettingen University Culture Collection, Alemanha
UTEX	Universidade do Texas
UV	radiação ultravioleta

I. Introdução

I.1. Biomassa aquática

I.1.1. Algas

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

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

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

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

I.1.2. Microalgas

Estima-se que o número de espécies de microalgas esteja compreendido entre 22000 e 26000 (Vonshak, 2002).

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

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

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

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

Filo *Chlorophyta* (algas verdes)

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

Filo *Euglenophyta*

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

Filo *Rhodophyta* (algas vermelhas)

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

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

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

De seguida apresenta-se uma tabela resumo (tabela I.1) onde se faz referência aos pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento dos Filos acima denominados.

Tabela I.1 – Pigmentos fotossintéticos e alguns produtos de armazenamento nos Filos *Cyanophyta*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta* e *Chromophyta*

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

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

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

I.1.3. Microalgas – produtos e aplicações

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

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

No âmbito das microalgas, o género *Arthrospira* constitui uma fonte proteica de boa qualidade, pois contém todos os aminoácidos essenciais, embora quando comparada com outras fontes, tais como carne, ovos ou leite, o teor percentual de metionina, cistina e lisina é inferior. Mediante o tipo de cultura e a estirpe deste género, o teor proteico varia usualmente entre 55-70% (m/m) da biomassa seca (Phang *et al.*, 2000). No cultivo de *Spirulina* sp. em sistemas do tipo *raceway* (sub-capítulo I.5.3.) e na utilização da mesma área de produção, pode-se obter cerca de 20 vezes e 400 vezes mais conteúdo proteico, do que no cultivo de soja e na produção de carne bovina, respectivamente (Henrikson, 1989).

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

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

Na tabela I.2 podem-se observar diferentes teores proteicos e lipídicos de algumas espécies de microalgas e de outros produtos alimentares. Becker (2004) refere que se pode atingir os 71% em teor proteico e 22% em lípidos (% m/m), em massa seca, nas microalgas *Spirulina maxima* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

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

Tabela I.2 – Comparação entre a composição de alimentos convencionais e a de diferentes biomassas de microalgas (% massa seca) (Adaptado de: Becker, 2004)

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

Na figura I.1 representa-se esquematicamente a relação entre as áreas de cultivo necessário para a produção da mesma quantidade de lípidos em culturas de oleaginosas convencionais e em culturas de microalgas.

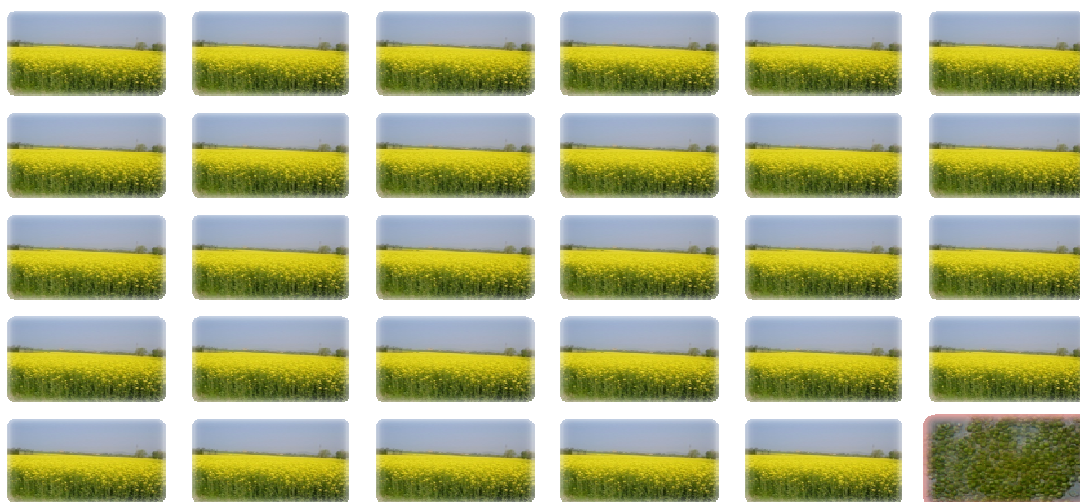


Figura I.1 - Oleaginosas vs Microalgas. Área de terreno cultivado com Colza e com Microalgas para obtenção da mesma quantidade de óleo.

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

De seguida apresenta-se na figura I.2 um resumo com alguns dos compostos de valor acrescentado que podem ser extraídos de microalgas e respectivas aplicações.

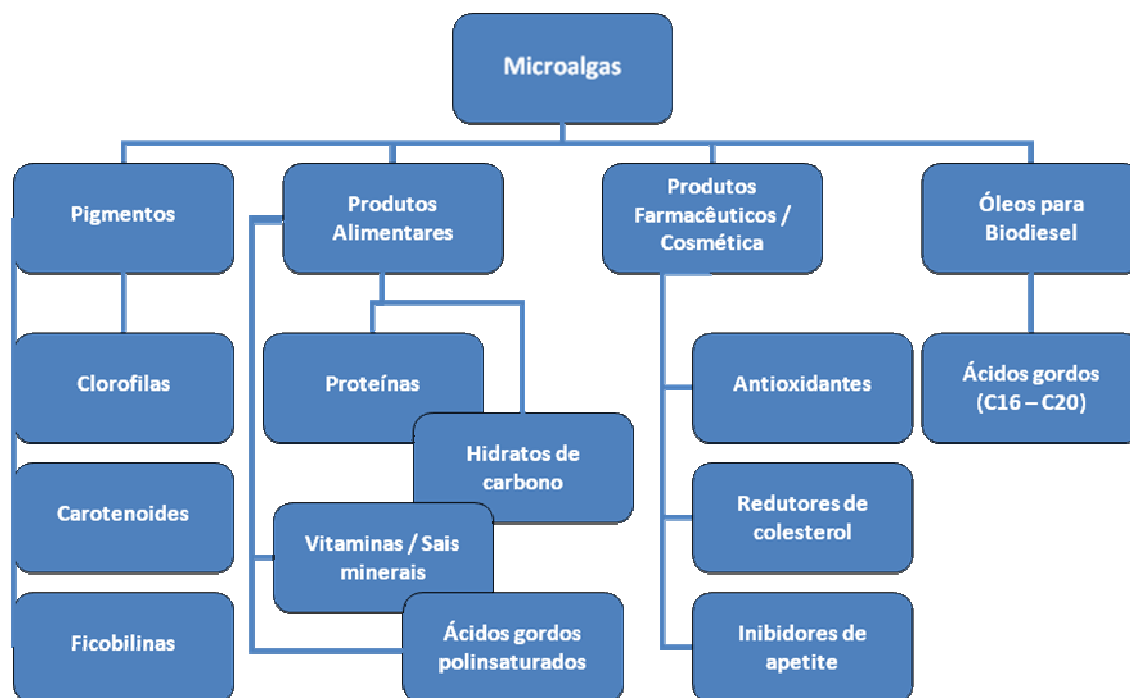


Figura I.2 – Compostos extraídos a partir de microalgas.

I.2. Avaliação do Crescimento Microalgal

O crescimento é definido como um aumento da matéria viva, usualmente o número de células para microrganismos unicelulares ou a biomassa total para organismos multicelulares (Tomaselli, 2004). Em cultivos de microalgas, e de outros microrganismos, podem ser aplicados determinados parâmetros de crescimento (uso de fórmulas) e representações gráficas para ilustrar o desenvolvimento das culturas (Vonshak, 1990).

I.2.1. Curva de crescimento

Um dos métodos utilizados para a avaliação do crescimento de culturas de microalgas é a curva de crescimento. Esta pode ser expressa como sendo a relação entre o incremento da biomassa ou aumento do número de indivíduos em função do tempo. Numa cultura em reactor fechado e em cultivo descontínuo, a curva de crescimento apresenta cinco fases distintas (a terceira não está representada na figura) (Figura I.3).

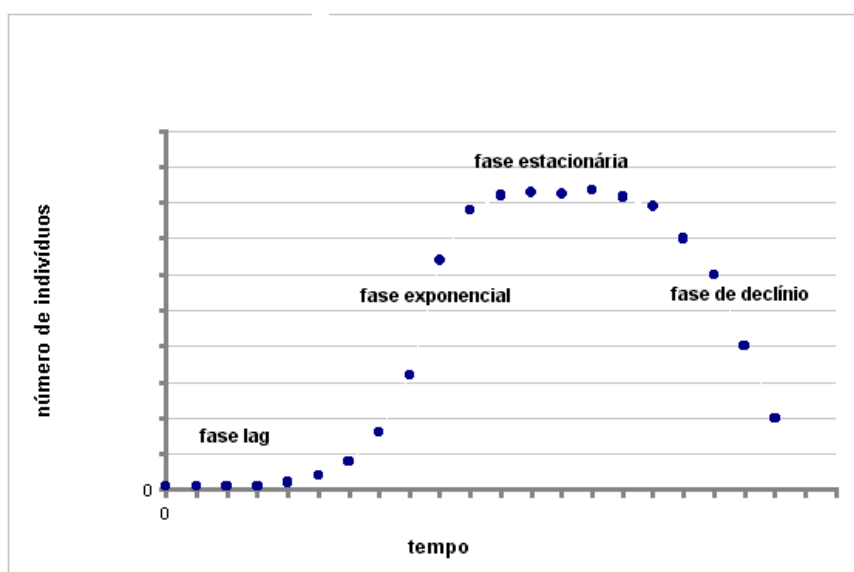


Figura I.3 - Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor fechado.

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

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

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

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

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

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

I.2.2. Parâmetros de Crescimento

O crescimento de uma população microalgal pode ser estimado por recurso a determinados parâmetros, de entre os quais se pode destacar a **densidade celular máxima** obtida, o **tempo de cultivo** e a **velocidade (ou taxa) de crescimento**. A densidade máxima obtida refere-se ao maior valor obtido, expresso em número de células por unidade de volume, e o tempo de cultivo é o período decorrido entre o início da cultura (inóculo) e o momento no qual a cultura alcançou a densidade celular máxima. A velocidade de crescimento (μ) pode ser calculada com base na equação (Guillard, 1972):

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t_f - t_i} \quad (I.2.1)$$

N_i, N_f – densidade celular inicial e final, respectivamente

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

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

$$\text{Duplicações} / \text{dia} = \mu / 0,6931 \quad (1.2.2)$$

em que 0,6931 corresponde a $\ln 2$.

I.3. Classificação e morfologia da *Chlorella vulgaris*

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Chlorophyta* (algas verdes). As microalgas que pertencem ao Filo acima denominado têm como pigmentos fotossintéticos predominantes a clorofila *-a* e *-b*, os quais estão localizados em plastos (Vonshak, 2002). Esta espécie habita em meios de água doce e é uma microalga imóvel (sem flagelos), unicelular (não colonial), sem constrição mediana (sinus) e de forma celular esférica, de 2-10 μm de diâmetro (Guimarães *et al.*, 2009). O processo reprodutivo deste género consiste no crescimento, maturação e divisão. No processo de divisão, a célula mãe reproduz-se assexuadamente pela formação de quatro, oito ou raramente 16 auto-esporos. A figura I.4 representa duas imagens obtidas por microscópio óptico que mostram a estirpe de *Chlorella vulgaris* estudada, em ampliações de 400x (imagem da esquerda) e 1000x (imagem da direita), respectivamente.

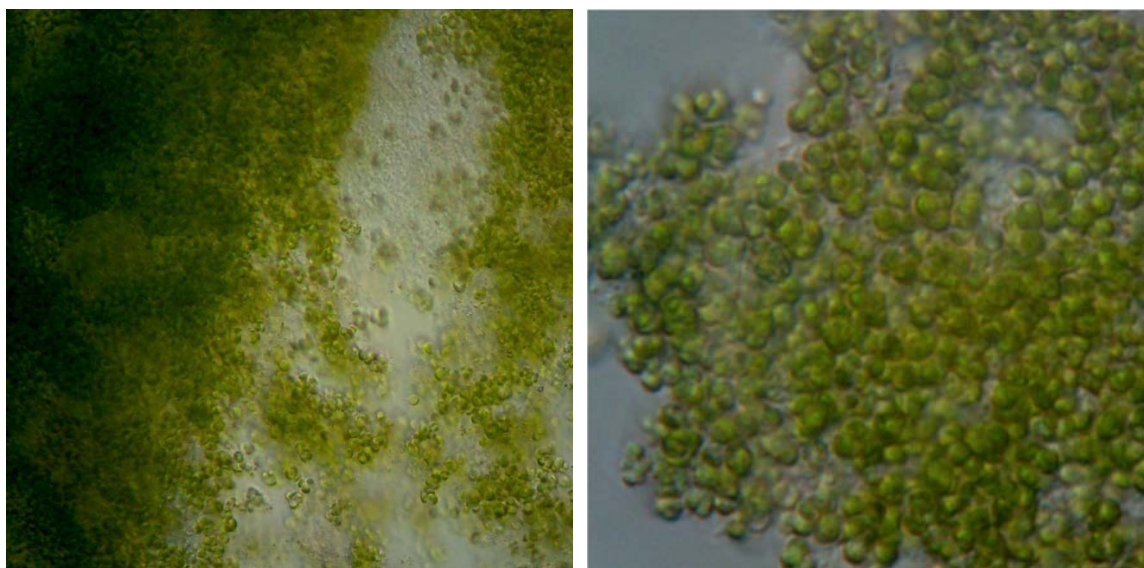


Figura I.4 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Chlorella vulgaris*.

O nome *Chlorella* deriva do nome grego *chloros* (verde) e do sufixo diminutivo latino *ella* (pequeno).

A primeira cultura pura de *Chlorella vulgaris* foi produzida em 1890 pelo microbiologista M.W. Beijerinck. Em 1931, Otto Heinrich Warburg recebeu o Prémio Nobel em Fisiologia e Medicina pelo estudo da fotossíntese do género *Chlorella*. Durante a década de 40, na Venezuela, Jorgensen e Convit utilizaram sopa de concentrado de *Chlorella* em cerca de 80 pacientes numa instituição de tratamento contra a lepra, e os resultados clínicos obtidos

com a utilização de *Chlorella* como suplemento alimentar/farmacológico foram promissores (Bewicke, 1984).

Também na década de 40, técnicas de cultivo em contínuo do género *Chlorella* tiveram início na Alemanha. No início da década de 50, estudos relativos a sistemas piloto de cultivo algal no Carnegie Institution em Washington, DC, mostraram que o conteúdo lipídico e proteico de células de *Chlorella sp.* podia ser modificado ao fazer-se variar as condições ambientais de cultivo. Em 1957, Hiroshi Tamiya e os seus colaboradores do Tokugawa Institute of Biology, Tokyo, associados ao Carnegie Institution, desenvolveram um projecto de produção em massa de *Chlorella*. O Japão foi o primeiro país produtor e a comercializar biomassa de *Chlorella sp.* como suplemento alimentar com o nome de “Chlorella growth factor” (Vonshak, 2002).

A *Chlorella vulgaris* é considerada um suplemento alimentar completo devido ao seu elevado teor em proteínas (contém todos os oito aminoácidos essenciais), minerais, polissacarídeos (galactose, xilose, ramnose e arabinose), fibras, vitaminas (rica no complexo B, em particular na vitamina B-12) e clorofila (Bewicke, 1984).

I.4. Meios de cultura, fontes nutricionais e de stress

I.4.1. Fontes nutricionais (carbono, azoto e fósforo)

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

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

Parte do carbono existente nos meios aquáticos encontra-se numa forma oxidada (inorgânica) e combinada com oxigénio molecular, sob as formas de dióxido de carbono (CO_2), hidrogenocarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^{2-}) (Falkowski e Raven, 1990).

O carbono inorgânico é fundamental no processo de fotossíntese / autotrofia e a sua concentração no meio está directamente relacionada com o pH. Para valores de pH inferiores a 5,0, apenas o CO_2 é consumido; entre 7 e 9 o hidrogenocarbonato passa a ser também utilizado como fonte de carbono no processo fotossintético; acima de 9,5 o consumo de carbonato passa a ser predominante (Esteves, 1988).

As microalgas podem crescer em regime autotrófico, utilizando luz e dióxido de carbono; podem ser cultivadas em regime heterotrófico, usando compostos orgânicos como fonte de energia e fonte de carbono, ou ainda em regime de cultivo mixotrófico (Barclay *et al.*, 1994). Neste último tipo de crescimento utiliza-se simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO_2 e substrato orgânico como fontes de carbono (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004).

O azoto é essencial para o metabolismo das microalgas na medida em que contribui para a formação de proteínas. A redução na quantidade de azoto no meio de cultura leva a que sejam sintetizados preferencialmente lípidos e hidratos de carbono (Rigano *et al.*, 1998).

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

O fósforo é também considerado um macronutriente e a quantidade existente no meio de cultura pode limitar o crescimento de algumas espécies de microalgas. Em culturas de *Chlorella sp.*, com 0,25 mg.L⁻¹ de fosfato, o valor de teor proteico obtido foi de 15,7%; com o aumento da concentração de fosfato para 0,50 mg.L⁻¹, o teor proteico obtido foi de 37%; deste modo a massa, de K₂HPO₄ ou KH₂PO₄, usada na preparação do meio de cultura influencia a concentração de proteína final da biomassa algal (Mahasneh, 1997).

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

I.5. Processos de cultivo

I.5.1. Parâmetros químicos e físicos de cultivo

A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, e depende de factores como, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação (Miao e Wu, 2004). O pH do meio também é importante no processo de cultivo e varia de aproximadamente 7 a 9 para a maioria das espécies de microalgas (Raven, 1990).

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

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

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

I.5.2. Processos de cultivo de microalgas

Os reactores biológicos podem operar em modo descontínuo, semicontínuo ou contínuo.

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

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

3º) Quando a cultura atingir a fase requerida procede-se à colheita total e à obtenção do(s) produto(s).

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

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

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

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

I.5.3. Fotobioreactores vs sistemas de cultivo a céu aberto

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

Os sistemas a céu aberto são usualmente do tipo *raceway pond* (lagoas abertas tipo pista de corrida), com pequena profundidade para assegurar a adequada incidência da luz solar (Fig. I.5). Estes sistemas podem ser de plástico, betão, fibra de vidro ou alvenaria. Durante o

Inverno, os tanques devem ser cobertos para evitar variações de temperatura e impedir que a camada superficial do meio de cultura congele durante a noite. Em regiões temperadas e subtropicais a cobertura também reduz as perdas do meio por evaporação e diminui a contaminação da biomassa colhida por insectos. A desvantagem dos cultivos cobertos reside na diminuição da penetração da luz no sistema de cultivo, tanto pela existência da cobertura, como pela condensação de água na superfície interna (Becker, 1981).

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

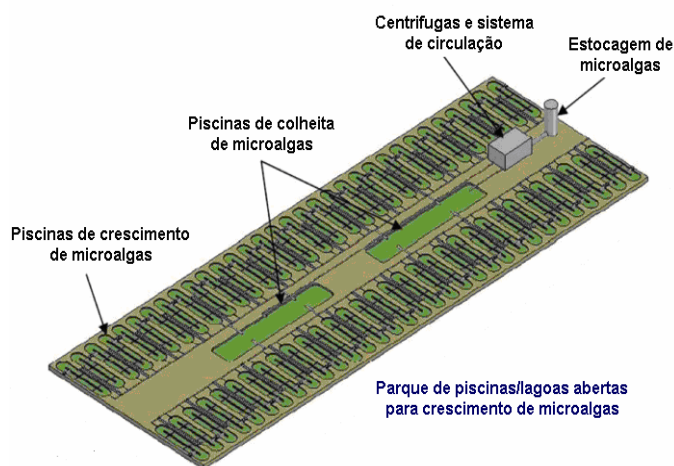


Figura I.5 – Sistemas de produção de microalgas a céu aberto do tipo *raceway pond* (www.was.org/Meetings/AbstractData.asp?AbstractId=10854).

Os fotobioreactores podem ter diversas concepções estruturais. São usualmente construídos com tubos/superfícies de plástico transparente, vidro ou policarbonato. A estrutura pode ser do tipo tubular (Fig. I.6), em coluna (forma cilíndrica) ou em painéis.

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

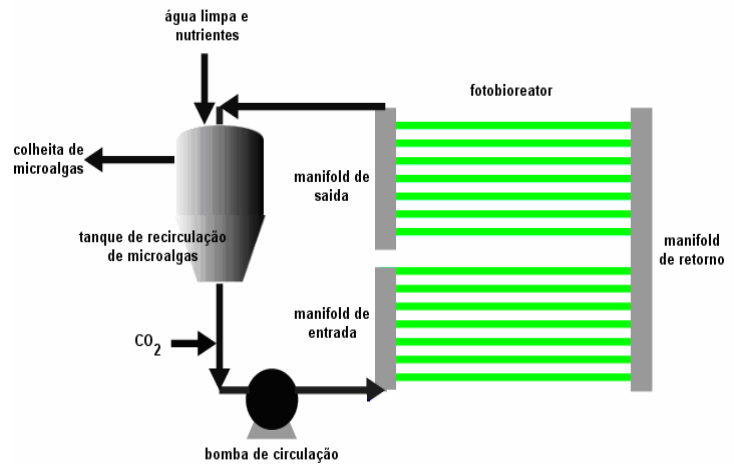
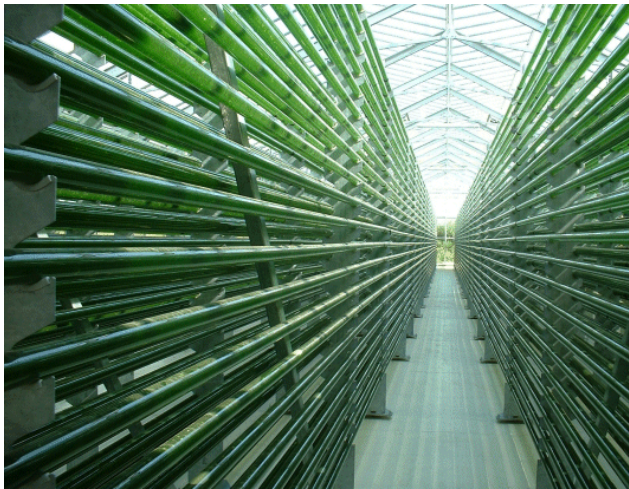


Figura I.6 – Sistemas de produção de microalgas em fotobioreactores tubulares

(<http://brae.calpoly.edu/CEAE/biofuels.html>).

Na tabela I.3 resumem-se as vantagens e desvantagens destes dois tipos de sistemas de cultivo.

Tabela I.3 – Vantagens/desvantagens dos sistemas de cultivo (adaptado de: Pulz, 2001)

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

I.6. Métodos de colheita de microalgas e de extracção de óleo

Para a produção de alimentos, bem como, para a extracção de produtos de valor acrescentado, é necessário separar a biomassa algal do meio de cultivo. O processo de colheita (Fig. I.7) envolve uma ou mais etapas de separação sólido-líquido, como por exemplo, floculação, centrifugação e filtração. Após a colheita e no caso do processo produtivo sequente estar padronizado para utilizar a biomassa seca, então será necessário secar (ex. secagem ao sol) ou desidratar a biomassa (ex. liofilização) (Grima *et al.*, 2003).



Figura I.7 – Colheita de microalgas (a) <http://microalgas-producao.blogspot.com>;
b) www.cyanotech.com).

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

Os métodos utilizados para extrair óleo das sementes oleaginosas, podem também ser aplicados para a extracção de óleo das microalgas (Folch *et al.*, 1957; Bligh e Dyer, 1959; Grima *et al.*, 2003; Demirbas, 2009):

Prensagem: Processo físico no qual a extracção é realizada comprimindo-se as microalgas confinadas num determinado volume, por meio da aplicação de uma pressão mecânica adequada. A quantidade de óleo extraído poderá ser de 70 a 75% do total presente na biomassa. Poderá ser utilizada uma combinação de pressão mecânica e de solventes químicos para extracção do óleo.

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

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

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

Extracção com CO₂ supercrítico: Este método permite extrair quase 100% de todo o óleo. Neste processo extractivo, o CO₂ é liquefeito sob pressão e aquecido ao seu ponto supercrítico, em que tem as propriedades tanto de líquido como de gás. Este fluido líquido actua então como um poderoso solvente para extracção do óleo.

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

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

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

I.7. Biodiesel

Nos últimos anos o biodiesel tem recebido uma atenção considerável como substituto do diesel fóssil, por diversos factores, de entre os quais se destacam a sua biodegradabilidade, o facto de ser um combustível não tóxico e renovável, e de a sua combustão não emitir compostos de enxofre para a atmosfera, não contribuindo deste modo para a ocorrência de chuvas ácidas e, no caso dos países que não detêm reservas de petróleo, por permitir a diminuição da dependência energética do exterior. A sua produção e utilização apoiam um sistema energético sustentável e contribuem para alcançar metas como a assumida no Protocolo de Quioto por diversos países Europeus, de reduzir as emissões de Gases com Efeito de Estufa (GEE) em 8% relativamente a 1990, durante o período de 2008 a 2012.

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

As microalgas podem ser produzidas em solos considerados impróprios (não férteis) para o cultivo de oleaginosas ou cereais alimentares. Por outro lado, o teor de óleo em algumas espécies de algas é muito elevado, pelo que a quantidade de biomassa e, consequentemente, de óleo produzido por unidade de superfície é muito superior àquela que se conseguiria obter em materiais oleaginosos convencionais.

A produtividade em óleo de algumas espécies de algas pode ser incrementada mediante o seu cultivo em condições optimizadas. Por outro lado, podem existir localmente espécies/estirpes de microalgas mais adaptadas e que potenciem a produção de óleos com características adequadas à produção de biocombustível.

Na tabela I.4 o volume de óleo extraído por hectare e ano relativo à cultura de *Microalgas** foi estimado, com base na produtividade num sistema de cultivo fechado na Alemanha, perto de Wolfsburg, de uma espécie do género *Chlorella*, de 130 toneladas de biomassa seca por hectare e ano (Pulz, 2001). Foi também considerado um teor em óleo na biomassa algal seca de 30%.

Tabela I.4 – Óleo extraído de diferentes matérias oleaginosas convencionais e microalgas (Pulz, 2001)

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

Pelo acima exposto, pode-se dizer que actualmente ainda não existe um género de microalgas, espécie ou estirpe definida como a preferencial para produção de óleo para biodiesel. Um ponto comum nos estudos correntes é a necessidade de baixar os custos de produção de uma determinada estirpe e tornar viável a sua produção em massa, tendo em conta as características ecofisiológicas da espécie requeridas. Uma forma de baixar os custos de produção será utilizar meios residuais como fonte de nutrientes no cultivo microalgal.

I.7.1. Considerações genéricas sobre os óleos para produção de biodiesel

A avaliação qualitativa de óleos extraídos de microalgas e de outros produtos vegetais é importante, no sentido em que as percentagens de ácidos gordos relativas aos lípidos totais, da matéria-prima (óleo) antes de ser sujeita ao processo de transesterificação (sub-capítulo I.7.2), poderão tornar o combustível biodiesel aceitável ou não, segundo a Norma Europeia EN 14214.

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

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

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

De seguida apresentam-se (tabela I.5) as composições percentuais de alguns tipos de ácidos gordos presentes em três espécies de microalgas: a *Arthrospira platensis*, a *Chlorella vulgaris* e a *Isochrysis galbana*.

Tabela I.5 – Composição (% mássica) de ácidos gordos, com cadeias de 16 a 20 átomos de carbono, de três espécies de microalgas, relativamente aos lípidos totais (Adaptado de: Tokusoglu e Ünal, 2003)

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

Como se pode verificar na tabela I.5, as três espécies de microalgas são particularmente ricas nos ácidos gordos C16:0 e C18:1 n-9, e a *Arthrospira platensis* e a *Chlorella vulgaris* diferenciam-se essencialmente da *Isochrysis galbana* pelo teor em C18:2 n-6 e C16:1 n-7.

I.7.2. Transesterificação

O biodiesel é produzido industrialmente por transesterificação de óleos com um álcool de cadeia curta (geralmente o metanol). Os óleos e gorduras usados na produção do biodiesel têm diversas origens: óleos vegetais virgens, óleos residuais da indústria alimentar ou do pequeno proprietário de uma cadeia de restauração, gorduras produzidas nos lagares de azeite e o agricultor produtor de oleaginosas. Esta origem é muito distribuída (o que encarece a recolha dos óleos/gorduras) e de difícil acesso às grandes unidades de produção de biodiesel.

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

Na figura I.8 é apresentado um exemplo de uma reacção de transesterificação em que os triglicerídeos (provenientes de óleo microalgal) reagem com metanol, na presença de um catalisador, produzindo glicerol (subproduto) e o éster metílico de ácido gordo (biodiesel).

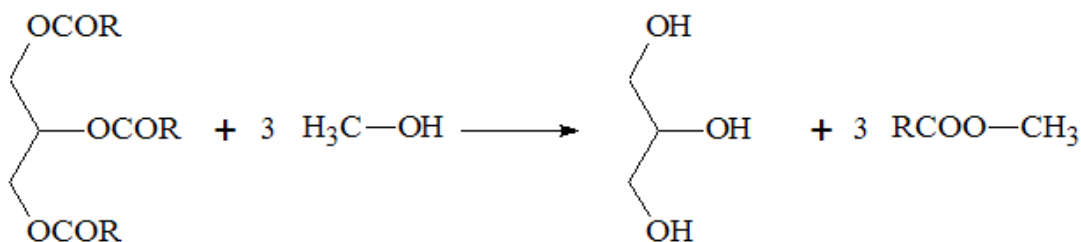


Figura I.8 – Reacção de transesterificação.

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

O nome biodiesel muitas vezes é confundido com a mistura “diesel+biodiesel”, disponível em alguns postos de combustível. A designação correcta para a mistura vendida nestes postos deve ser precedida pela letra B (do inglês *Blend*). Neste caso, a mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100.

I.7.3. Legislação vigente

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

Algumas microalgas, pela sua elevada produtividade de biomassa relativamente a plantas superiores de rápido crescimento, fazem parte do grupo de culturas bioenergéticas e por este motivo poderão no futuro representar um papel importante na mitigação de CO₂, como também na biofixação de carbono e de outros elementos (ex. azoto e fósforo) de fontes residuais orgânicas.

Com a publicação do DL nº 62/2006, foi transposta para a legislação nacional a Directiva 2003/30/CE. O referido DL “visa a colocação no mercado de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis”. De acordo com o DL nº

66/2006, as metas estabelecidas para a incorporação mínima de biocombustível no mercado são de 2% para o ano de 2006, 3% para o ano de 2007 e 5,75% (em média anual) para o período de 2008 a 2010. A Resolução do Conselho de Ministros n.º 21/2008 de 7 de Janeiro ajustou estas metas para 1,75% em 2009, 4,25% em 2010, 6,5% em 2011 e 10% em 2012. A necessidade de produzir biodiesel é evidente nas metas estabelecidas.

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

Face a todas estas considerações, o estudo da produção de biomassa algal como fonte de óleo para biocombustíveis reveste-se de particular importância, uma vez que a produção de microalgas permite satisfazer as necessidades de matéria-prima para a produção de biocombustíveis (os lípidos são usados para a produção de biodiesel, a biomassa residual rica em hidratos de carbono pode ser usada para a produção de bioetanol), contribuindo para a mitigação das emissões de CO₂, para o tratamento de águas residuais e não necessitando da utilização de solo agrícola fértil destinado a culturas alimentares.

II. Parte Experimental: Materiais, Reagentes e Métodos

O estudo experimental realizado visa otimizar as condições de crescimento de biomassa algal com vista à produção de óleo para utilização como matéria-prima na produção de biodiesel.

Em fases distintas foram testadas diferentes estirpes. Assim, na fase de inoculação foram usados tubos de ensaio e matrizes de 250 mL, tendo sido testadas quatro espécies correspondendo a cinco estirpes de algas (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Botryococcus brauni* e *Haematococcus pluvialis*).

O estudo de optimização do crescimento incidiu em particular sobre a *Chlorella vulgaris*, devido ao facto de esta ser uma estirpe muito resistente, com rápido crescimento, e muito comum nos ambientes aquáticos nacionais, tendo sido efectuado em matrizes de 250 mL, 1 L e 5 L.

O cultivo de *Chlorella vulgaris* nas condições optimizadas foi efectuado em matrizes de 1 L, de modo a permitir obter uma quantidade de microalgas suficiente para a extracção de óleo para permitir a sua caracterização.

II.1. Parâmetros físicos fixados

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

Tabela II.1 – Parâmetros físicos fixados

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

II.2. Inoculação das microalgas de água doce *Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Botryococcus brauni* e *Haematococcus pluvialis*

Conforme mencionado anteriormente, o estudo do crescimento e cultivo de microalgas inicia-se pela inoculação das espécies/estirpes a estudar. No caso concreto, optou-se pelo estudo de espécies adaptadas ao crescimento em água doce.

II.2.1. Identificação das microalgas estudadas

As microalgas usadas no estudo foram provenientes de duas algotecas, uma nacional, a Algoteca de Coimbra (ACOI), e a outra Alemã (SAG). A sua identificação e meios de cultura usados no estudo (BBM - Bold Basal Medium e BBM 3N - Bold Basal Medium com o triplo de concentração da fonte de azoto) encontram-se na tabela II.2.

Tabela II.2 – Identificação das microalgas estudadas

Espécie	Estirpe		Meio de Cultura
	Algoteca	Código	
<i>Chlorella vulgaris</i>	ACOI	879	BBM
<i>Chlorella emersonii</i>	ACOI	516	BBM
<i>Botryococcus brauni</i>	ACOI	1257	BBM 3N
<i>Botryococcus brauni</i>	SAG	30.81	BBM 3N
<i>Haematococcus pluvialis</i>	SAG	49.94	BBM 3N

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

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

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

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

II.2.3. Condições de Inoculação / Cultivo

a) A inoculação das microalgas (Figuras II.1 e II.2) foi efectuada em sala climatizada, sobre bancadas, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes “luz dia”, posicionadas lateralmente às bancadas. A intensidade de irradiação luminosa foi medida com um luxímetro (Lutron LX-1102) e os tubos de ensaio foram posicionados de forma a receberem 2000 lux num fotoperíodo de 12:12 horas, controlado por um temporizador automático (Perfu electric). A temperatura da sala foi mantida a 28 ± 2 °C por um aparelho de ar condicionado do tipo Splitt (Samsung) de 18000 BTU.



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



Figura II.2 – Tubos de ensaio e matrizes inoculados.

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

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

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



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

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

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

- i) fixou-se, em posição invertida e vertical, uma pipeta graduada de 20,0 mL a um suporte com garra;
- ii) colocou-se água com sabão no interior de uma mini-pompete e esta foi posta no topo (que se encontra invertido) da pipeta graduada e ligada através de tubagem de silicone à bomba de ar;
- iii) bombeou-se a água com sabão ao longo da pipeta;
- iv) com recurso a um cronómetro (SILVA, 1/100 sec. Precision) registou-se o tempo que as bolhas de sabão demoram a percorrer 15 mL;

- v) o procedimento foi repetido para todas as posições da bomba de ar;
- vi) o procedimento de calibração foi efectuado para o conjunto das duas saídas de difusão de ar, pelo que o caudal debitado por cada saída será metade desse valor;
- vii) a aplicação de difusores (Rena) nas saídas de difusão da bomba de ar, diminui o caudal de ar na proporção inversa do nº de saídas de cada difusor (ex: $Q_{1 \text{ saída}} = 0,48$ v.v.m implica que cada saída de um difusor com quatro saídas debite um caudal de 0,12 v.v.m).

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

II.2.4. Meios de Cultura

Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura a seguir mencionados são reagentes p.a., para microbiologia.

a) Meio de cultura padrão BBM

O meio de cultura padrão utilizado foi o Bold Basal Medium, UTEX (BBM), cuja composição dos reagentes utilizados por cada litro de cultura se encontra na Tabela II.3:

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

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

As soluções concentradas de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$ foram preparadas em hotte e as soluções concentradas de H_3BO_3 foram as únicas a necessitar de aquecimento a 70 °C, além da agitação magnética.

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

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

Tabela II.3 – Composição do meio BBM, meio de cultura padrão para cultivo de *Chlorella vulgaris*

Reagentes		$C_{Mássica}$ (g/L _{final})	$C_{Mássica}$ (g/L _{conc})	Volume (mL _{conc} /L _{final})	[elemento] (mg/L)	
					Elemento	mg/L
Macronutrientes	K ₂ HPO ₄	0,0750	7,50	10,0	K	33,7
					P	13,3
	KH ₂ PO ₄	0,1750	17,50	10,0	K	50,3
					P	39,9
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0750	7,50	10,0	Mg	7,4
					S	9,8
	NaNO ₃	0,2500	25,00	10,0	N	41,2
					Na	67,6
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0250	2,50	10,0	Ca	6,8
					Cl	12,1
NaCl	0,0250	2,50	10,0	Na	9,8	
				Cl	15,2	
EDTA-Na ₂ + KOH	0,0500 + 0,0310	50,00 + 31,00	1,0	C	16,1	
				N	3,7	
				Na	6,2	
				K	21,6	
FeSO ₄ ·7H ₂ O + H ₂ SO ₄ *	0,0050 + 0,0010 mL	4,98 + 1,00 mL	1,0	Fe	1,0	
				S	1,6	
H ₃ BO ₃	0,0114	11,42	1,0	B	2,0	
Micronutrientes	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001412	1,412	1,0	Zn	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,000232	0,232		S	
					Mn	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000252	0,252		Cl	
					Cu	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,000080	0,080	S			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,000192	0,192	Co			
			Mo			
Na				Na		
H ₂ O destilada	—	—	—	936		

* C_{H₂SO₄} = 1,84 g/mL



Figura II.4 – Homogeneização dos meios de cultura (à esq.) e armazenamento dos meios de cultura concentrados em frio (à dir.).

b) Meio de cultura BBM 3N

Conforme referido em II.2.1. foi usado meio de cultura BBM 3N na inoculação de três espécies (quatro estirpes). A única variação relativamente ao meio BBM é o aumento de volume de NaNO_3 que é três vezes superior ao volume usado para o meio de cultivo BBM, ou seja, por cada litro de cultura $V_{\text{NaNO}_3} = 30,0 \text{ mL}$ e a conseqüente diminuição do volume de água destilada, que passa a ser de 916 mL. O pH do meio BBM 3N é de $6,85 \pm 0,15$.

II.3. Cultivo de *Chlorella vulgaris*

II.3.1. Repicagens

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

A primeira espécie a ser repicada para erlenmeyers de 250 mL foi a *Chlorella vulgaris* (Figura II.5), conseguindo-se repicar em seguida para erlenmeyers de 1L aquando das repicagens para erlenmeyers de 250 mL das outras quatro espécies. A *Chlorella vulgaris* foi repicada do volume de 1 L para 5 L, sendo esta última cultura, a cultura mãe para futuras inoculações.



Figura II.5 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em erlenmeyers de 250 mL.

II.3.2. Monitorização de possíveis contaminações das culturas

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

II.4. Curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris*

II.4.1. Metodologia para traçar a curva de calibração

A curva de calibração – Abs vs [biomassa seca] (mg/L) (ver Anexo 2.) – foi traçada para o regime de crescimento autotrófico. Para tal foram observados os seguintes passos:

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

II.4.2. Avaliação do crescimento microalgal

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

- a) Cultura (em triplicado) em **regime autotrófico** e nove culturas (em triplicado) de concentrações distintas em **regime mixotrófico**, com **adição de carbono orgânico**, sob a forma de glucose;
- b) Cinco culturas (em triplicado) de concentrações distintas, em **regime mixotrófico** com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ e com **subtracção de azoto** ao meio de cultura;
- c) Nove culturas (em triplicado) de concentrações distintas, em **regime mixotrófico** com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ e com **adição de cloreto de sódio** ao meio de cultura.

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



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

A avaliação do crescimento das culturas (Figura II.6) (ver III. Resultados experimentais e Anexo 3) foi efectuada diariamente através de:

- a) Leitura de pH e temperatura, feita com equipamento da marca Schott Instruments (Figura II.7), sendo usado um eléctrodo para cada estirpe;



Figura II.7 – Avaliação do crescimento das culturas - medição de pH e temperatura.

b) Leitura da absorvância por espectrofotometria UV-Vísivel. Para cada leitura era recolhido um volume de 3 mL. Como a absorvância para cada cultura era lida em duplicado e os ensaios feitos em triplicado, no total retiraram-se 18 mL de cada cultura distinta. O respectivo meio de cultura era repostado em volume.

A estabilização dos valores de absorvância indicava que a cultura entrou em fase estacionária.

II.4.3. Cálculo da concentração de biomassa algal produzida

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

II.5. Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria

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

Após o término de todos os ensaios de avaliação do crescimento microalgal, a biomassa foi descongelada e deu-se início à extracção do óleo. A extracção foi feita com clorofórmio:metanol:água (2:2:1,8 em volume), de acordo com o procedimento abaixo descrito e adaptado de Bligh e Dyer (1959), após a realização de alguns ensaios para optimização da extracção:

- a) Na balança digital de precisão $\pm 5 \times 10^{-5}$ g (Kern ALJ 220-4) tarar tubos de centrifuga (ECCO);
- b) Nos tubos de ensaio tarados pesar as biomassas algais húmidas;
- c) Sabendo-se que cerca de 90% da biomassa algal húmida é constituída por água (ver Anexo 4.), determina-se a massa de água como $m_{\text{água}} = 0,9 * m_{\text{biomassa húmida}}$ (g);
- d) Como 90% da biomassa algal é água e sendo $\rho_{\text{água}} = 1$ g/mL, pode-se considerar que $\rho_{\text{biomassa húmida}} \cong 1$ g/mL, o que permite obter a aproximação: $m_{\text{biomassa húmida}}$ (g) $\cong V_{\text{biomassa húmida}}$ (mL);
- e) A 1ª extracção é feita com (1:2:0,8) clorofórmio:metanol:água. Como a fracção de água na $m_{\text{biomassa húmida}}$ é de 0,9 a proporção de solventes deverá ser corrigida para (1,125; 2,25; 0,9) clorofórmio:metanol:água:
 - i. Na hotte, com a extracção de ar ligada, adicionar no tubo de ensaio tarado com a biomassa algal húmida $V_{\text{clorofórmio}} = 1,125 * V_{\text{biomassa húmida}}$ (mL);
 - ii. Em seguida adicionar $V_{\text{metanol}} = 2,25 * V_{\text{biomassa húmida}}$ (mL);
 - iii. Agitação em tubos fechados com tampa, a velocidade moderada, da mistura em vortex (Snijders 34524) durante cerca de cinco minutos;
- f) A 2ª extracção é feita com base na relação (2:2:1,8) clorofórmio:metanol:água, ou seja, o volume dos solventes a adicionar à extracção anterior será (χ_1 : 0: χ_2):
 - i. χ_1 (clorofórmio) = $V_{\text{metanol}} - V_{\text{clorofórmio}}$ (volumes da alínea e));
 - ii. χ_2 (água) = $(V_{\text{metanol}} * 1,8) / 2$ (volume de metanol da alínea e));
 - iii. Agitação, a velocidade moderada, da mistura em vortex, durante cerca de um minuto;
- g) Colocar os tubos de ensaio num banho de ultra-sons (Crest), de modo a que os tubos fiquem imersos na água destilada até à altura do seu conteúdo. O procedimento

deverá ser feito a 25 °C durante 20 minutos;

- h)** Agitação a velocidade moderada, em vortex, durante 30 segundos;
- i)** Centrifugação (Centrifuga marca Ecco) a 4000 rpm durante 20 minutos;
- j)** Após a centrifugação distinguem-se nitidamente três fases:
 - i. Superior (menos densa ou metanólica);
 - ii. Intermédia, constituída pela biomassa residual;
 - iii. Inferior (densa ou clorofórmica); os lípidos encontram-se dissolvidos nesta fase;
- k)** Com uma pipeta de Pasteur pipetar e rejeitar a fase superior; furar a fase intermédia e recolher para um goblé previamente pesado a fase inferior;
- l)** Deixar evaporar, na hotte, o clorofórmio presente na fase recolhida e pesar o conjunto “goblé + lípidos” até que não se verifiquem alterações de massa (Figura II.8). Está assim encontrada a massa de lípidos para o ensaio em estudo;
- m)** Determinar a % de óleo presente na biomassa algal (considerando que 10% dos lípidos totais ficam retidos na biomassa residual).



Figura II.8 – Quantificação gravimétrica de lípidos presentes na biomassa algal.

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

III. Resultados experimentais e sua discussão

III.1. Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo

A monitorização de possíveis contaminações das culturas desde a fase de inóculo em tubo de ensaio até erlenmeyers de 5 L foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em II.3.2. – Monitorização de possíveis contaminações do Cultivo. Nas Figuras III.1.1 a III.1.5 apresentam-se imagens de microscópio óptico das estirpes estudadas.

Ao longo de todo o trabalho experimental não foram detectadas quaisquer contaminações nos meios de cultivo, sendo que o controlo foi efectuada diariamente, por observação ao microscópio.

III.1.1. Espécie: *Chlorella vulgaris*, Estirpe: ACOI, 879

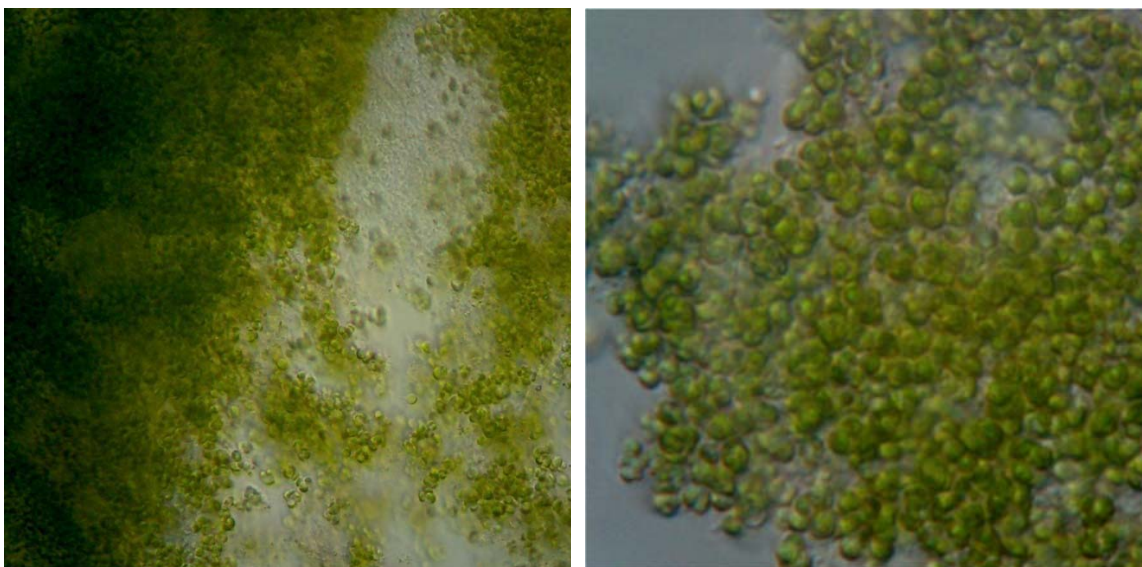


Figura III.1 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Chlorella vulgaris*.

III.1.2. Espécie: *Chlorella emersonii*, Estirpe: ACOI, 516

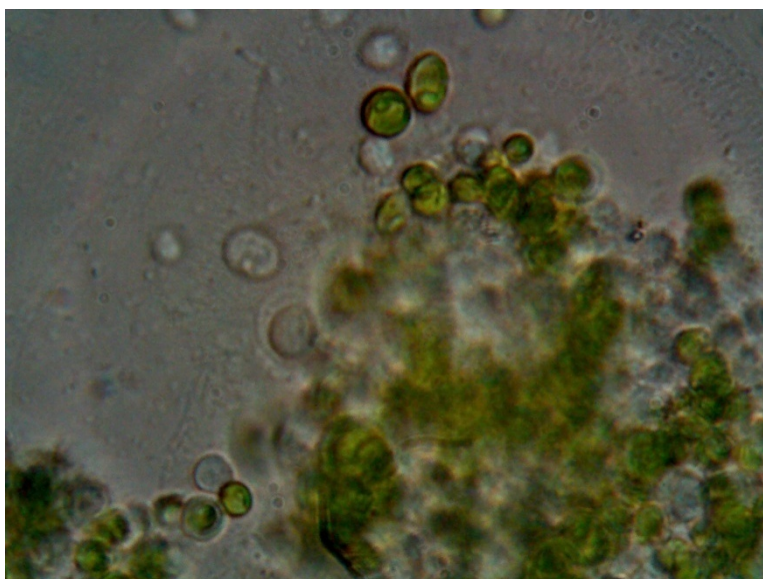


Figura III.2 – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de *Chlorella emersonii*.

III.1.3. Espécie: *Botryococcus brauni*, Estirpe: ACOI, 1257



Figura III.3 – Imagem de microscópio óptico (ampliação 1000x) da estirpe de *Botryococcus brauni*.

III.1.4. Espécie: *Botryococcus brauni*, Estirpe: SAG, 30.81

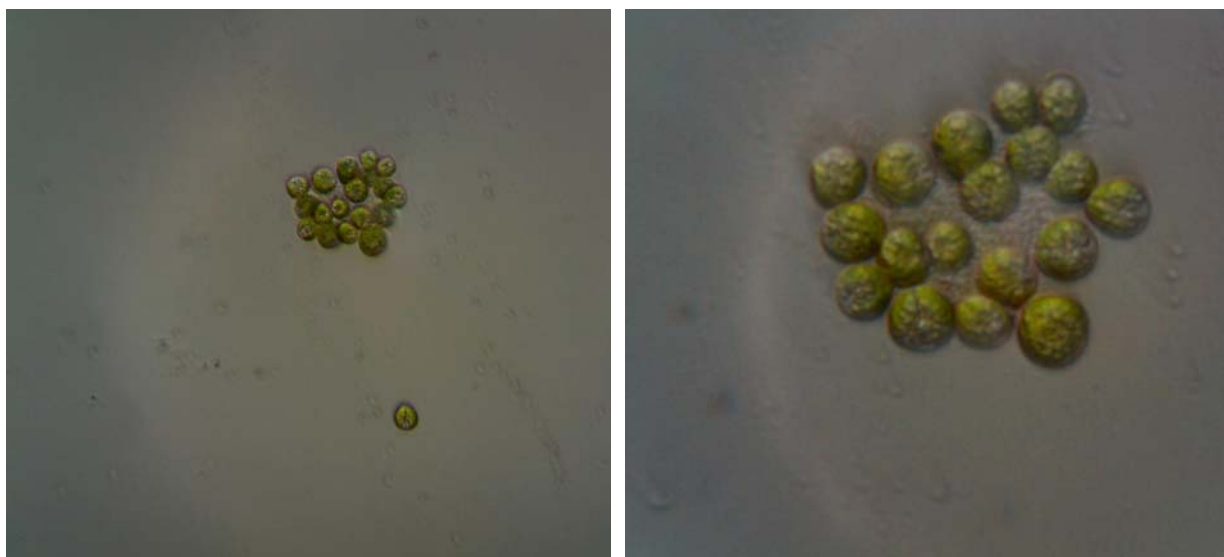


Figura III.4 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Botryococcus brauni*.

III.1.5. Espécie: *Haematococcus pluvialis*, Estirpe: SAG, 49.94

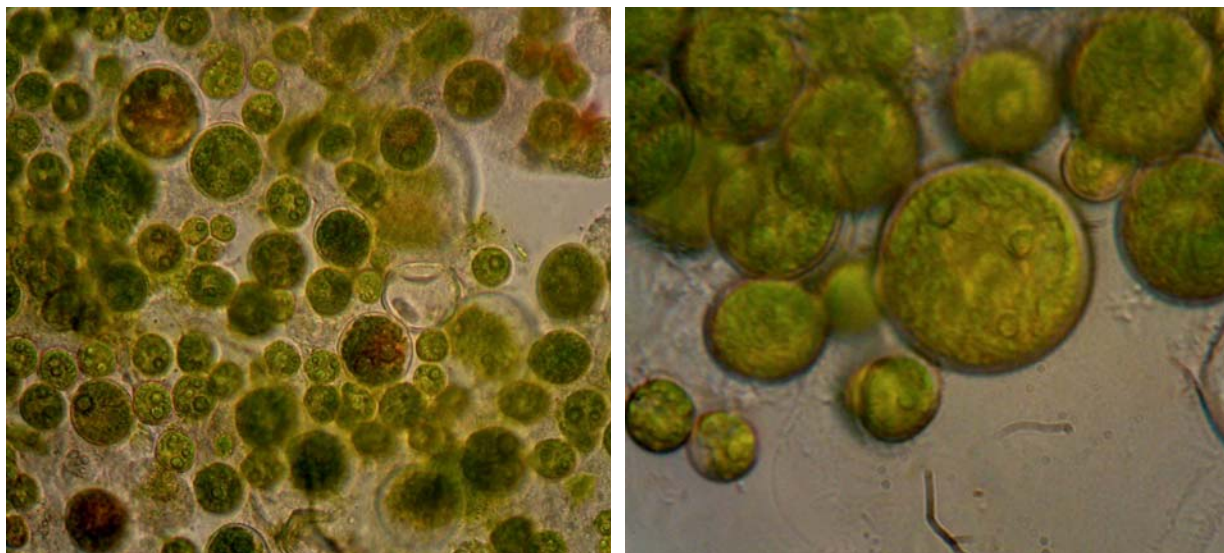


Figura III.5 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Haematococcus pluvialis*.

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

Das cinco estirpes objecto de teste de crescimento, a *Chlorella vulgaris* ACOI 879 foi a primeira a ser inoculada num reactor de 1 L com sucesso, e deste modo, mediante o critério utilizado, a escolhida para o estudo em questão.

III.2. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris*

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

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

Os primeiros ensaios foram realizados em regime autotrófico e em regime mixotrófico com a adição de $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$. Para este último ensaio as três culturas (réplicas) de *Chlorella vulgaris* tiveram decréscimo populacional até à morte da cultura ao fim de 2 a 3 dias de cultivo.

As Figuras III.6 e III.7 mostram uma das culturas de *Chlorella vulgaris* ao fim de 1 dia e 3 dias de cultivo, respectivamente, sendo evidente o decréscimo de população algal na cultura em condições mixotróficas com adição de $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$.



Figura III.6 – Culturas de *Chlorella vulgaris* em regime autotrófico (à esquerda) e em regime mixotrófico com a adição de $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ (à direita) ao fim de 1 dia de cultivo.



Figura III.7 – Culturas de *Chlorella vulgaris* em regime autotrófico (à esquerda) e em regime mixotrófico com a adição de $4,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ (à direita) ao fim de 3 dias de cultivo.

O pH do meio nesta fase era inferior a 5,0, o que é indicativo do estado de morte da cultura. Outro factor indicativo do declínio foi o aumento do odor a matéria orgânica putrefacta nas culturas ao longo dos três dias, o qual era cada vez mais intenso. Por este motivo realizaram-se novos ensaios, reduzindo a quantidade de glucose adicionada ao meio BBM desde $0,2 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ até um valor máximo de $3,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$.

Nas Figuras III.8 e III.9 apresentam-se as curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo e curvas de pH vs dias de cultivo, respectivamente para os regimes de crescimento autotrófico (meio de cultura BBM padrão) e mixotrófico.

O crescimento em regime mixotrófico foi efectuado com meio de cultura BBM ao qual foi adicionado glucose. As concentrações de glucose usadas no estudo variam de $0,20 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ até $3,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$.

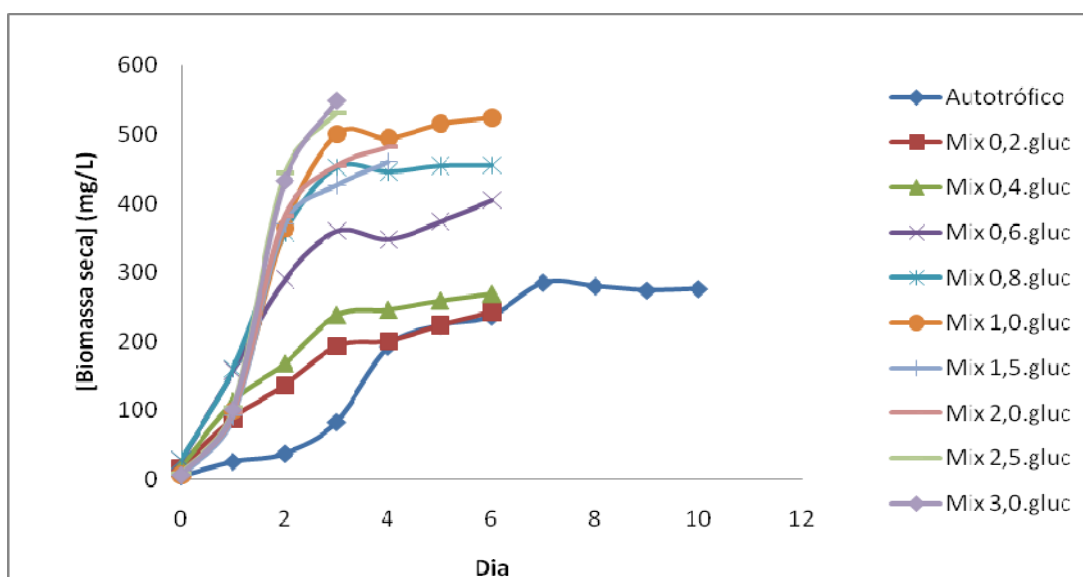


Figura III.8 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia.

Na figura III.8 é patente que a adição de glucose ao meio potencia o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo atingidas muito mais rapidamente elevadas concentrações de biomassa algal.

A adição de glucose acelera o metabolismo das microalgas, o que leva à libertação de CO_2 para o meio de cultura, induzindo o abaixamento do pH do meio. Em consequência, o abaixamento do pH contribui para a morte das microalgas. Na figura III.9 é patente que a adição de glucose em níveis superiores a $1 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ não é aconselhável.

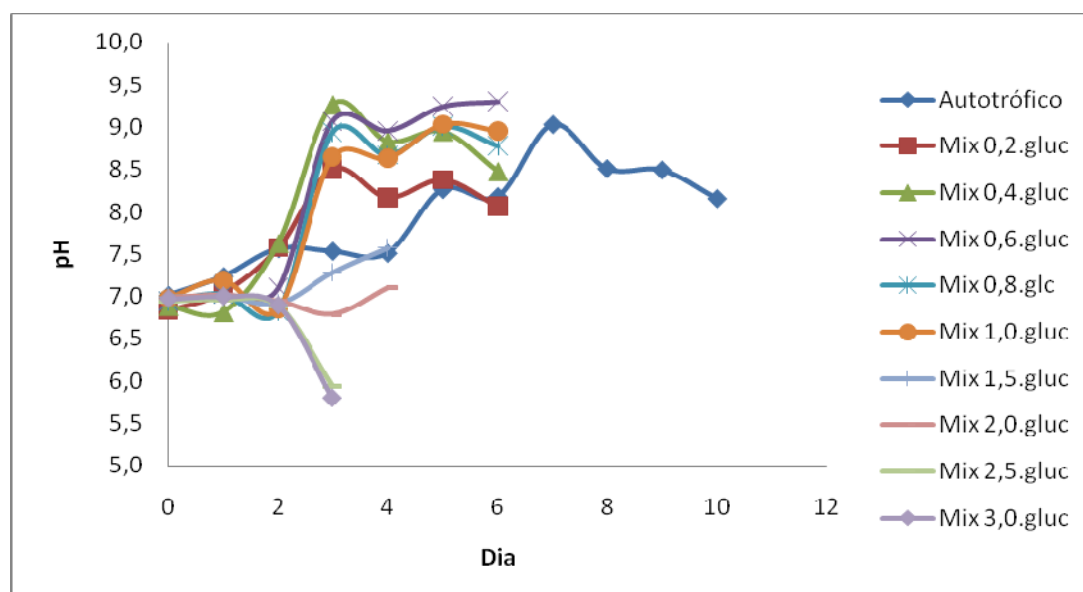


Figura III.9 – Curvas de variação do pH ao longo do período de ensaio.

Os ensaios realizados com adição de $2,5 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e com $3,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$, ao fim de três dias tinham o mesmo mau odor. Além disso, nestas culturas verificou-se de igual forma o decréscimo de pH desde o início do cultivo (Figura III.9). As produtividades máximas num período de 24h, para os ensaios “mix 2,5 gluc” e “mix 3,0 gluc” foram de $340,83 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ e de $332,14 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$, respectivamente. Embora estes resultados tenham sido os mais elevados em termos de produtividade, pela existência de mau odor e decréscimo de pH verificados (valores médios inferiores a 6,0), e pela qualidade da biomassa algal (Figura III.10), estes ensaios não foram considerados.

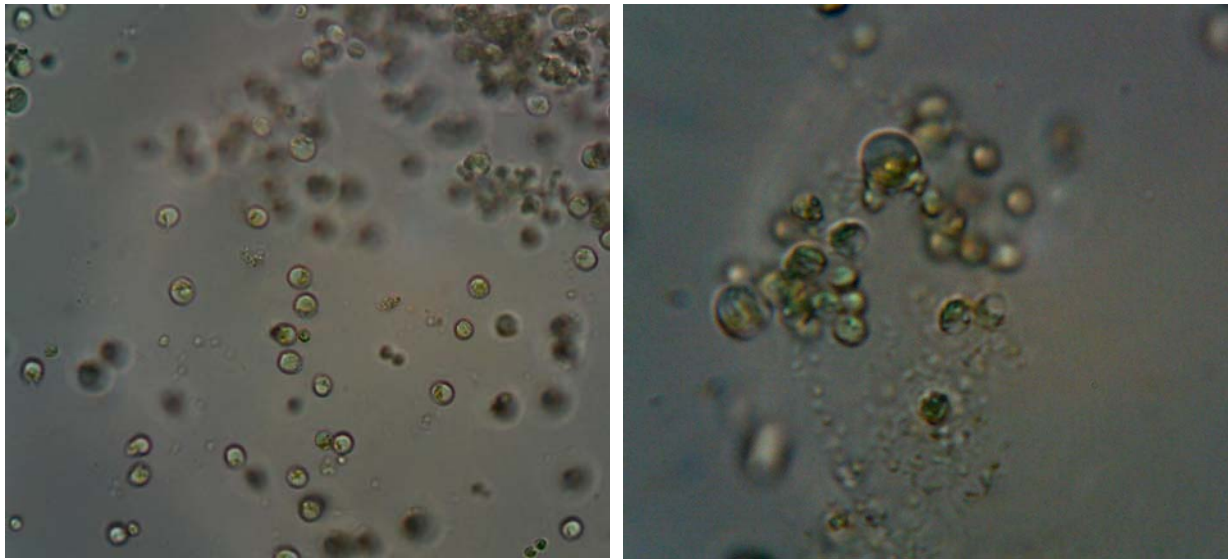


Figura III.10 – Imagens de microscópio óptico (ampliação 400x e 1000x, respectivamente) da estirpe de *Chlorella vulgaris* cultivada em condições mixotróficas com adição de $2,5 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$.

III.2.2. Cinco culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}$ com subtracção de azoto ao meio de cultura

Os ensaios realizados com subtracção de azoto foram designados pela variação da percentagem de azoto adicionado ao meio de cultura relativamente à quantidade de azoto do meio BBM padrão. Como exemplo, para o ensaio com 40% de azoto (designado como “mix 0,4N”) apenas se adicionou 40% da massa de NaNO_3 do meio padrão (Tabela II.3), cujo valor corresponde a $0,1 \text{ g}_{\text{NaNO}_3}/\text{L}_{\text{meio}}$.

Nas Figuras III.11 e III.13 apresentam-se as curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo e curvas de pH vs dias de cultivo, respectivamente, para este conjunto de ensaios. O crescimento foi efectuado em regime mixotrófico com meio de cultura BBM e adição de $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$. Em quatro culturas foi feita a subtracção da fonte de azoto (NaNO_3) em percentagens de 20 (0,8N), 40 (0,6N), 60 (0,4N) e 80% (0,2N).

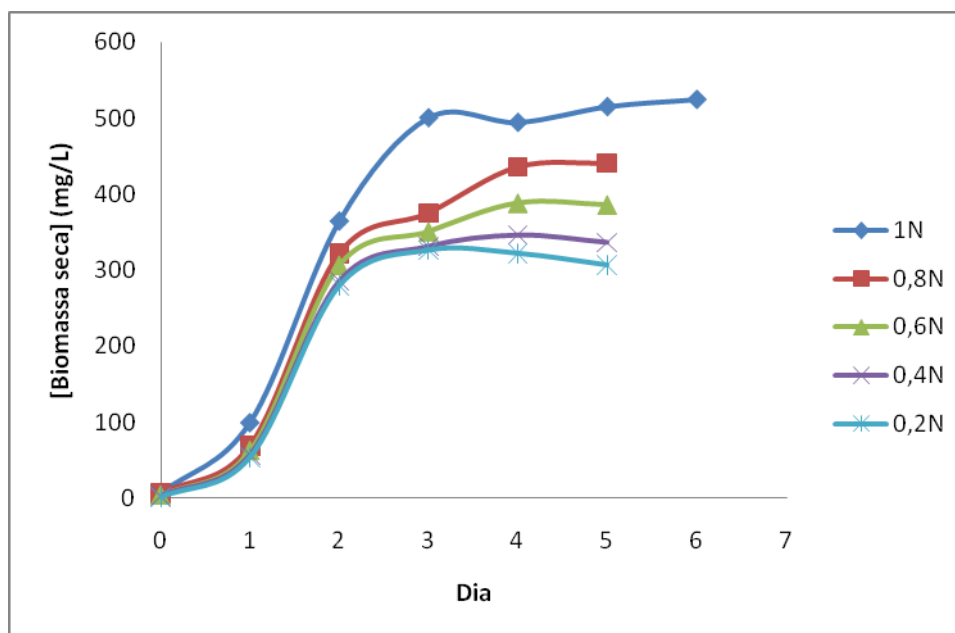


Figura III.11 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia.

Nesta figura é patente que a remoção de azoto ao meio inibe o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*.

Os valores de produtividade de biomassa seca correspondentes aos ensaios com redução de fonte de azoto foram todos inferiores ao valor do ensaio “mix 1,0 gluc” (padrão para este conjunto de ensaios). As diferenças percentuais relativas a este ensaio foram de -4,6%, -8,1%, -14% e -15%, para os ensaios “mix 0,8N”, “mix 0,6N”, “mix 0,4N” e “mix 0,2N”, respectivamente. O decréscimo da concentração de azoto no meio inicial de cultura reduz o valor de produtividade máxima de biomassa seca de *Chlorella vulgaris*. Estes resultados eram os esperados, já que o azoto é um dos macronutrientes no cultivo de microalgas.

Antes da colheita, as culturas com 20% e 40% de azoto tinham uma tonalidade verde amarelada mais acentuada que as restantes (Figura III.12).



Figura III.12 – Culturas de *Chlorella vulgaris* em regime mixotrófico 1,0 g_{glucose}/L_{meio}: com diferentes percentagens de subtracção de azoto (à esquerda) e com subtracção da fonte de azoto em 80% (0,2N) (à direita).

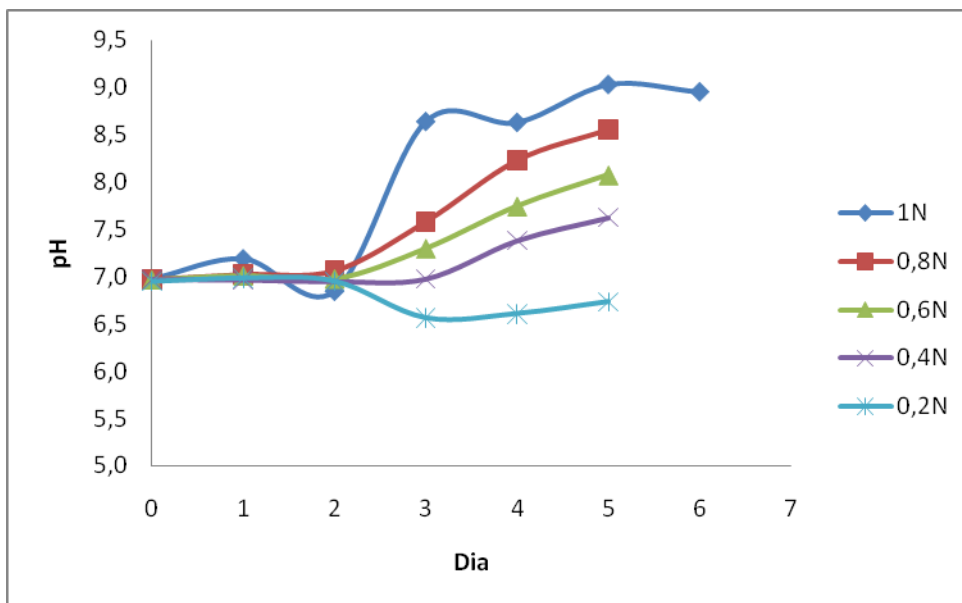


Figura III.13 – Curvas de pH vs Dia.

Nesta figura é patente que a remoção de azoto ao meio, por inibir o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, permite um maior controlo do pH. A variação de pH foi crescente ao longo do tempo de cultivo, sendo esse aumento mais acentuado quanto maior a concentração de azoto presente no meio de cultura.

III.2.3. Nove culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g_{glucose}/L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura

A adição de cloreto de sódio ao meio de cultura em percentagens superiores ao meio padrão BBM foi efectuada como fonte de *stress*, no cultivo de *Chlorella vulgaris* (uma microalga de água doce).

Os ensaios iniciais com majoração de NaCl foram os de adição de 250%, 500%, 750% e 1000% de NaCl relativamente ao meio BBM padrão. Nestes ensaios verificou-se um decréscimo na produtividade máxima de biomassa seca relativamente ao ensaio padrão “mix 1,0 gluc”, de -1,2%, -5,6%, -8,3% e -10,8%, respectivamente.

Como um dos objectivos era determinar um valor próximo do limite superior de aceitabilidade da espécie ao *stress* salino, realizaram-se mais quatro ensaios: adição ao meio de cultura padrão de 5.000%, 10.000%, 15.000% e 20.000% de NaCl, cujos valores correspondem a 1,25 g_{NaCl}/L_{meio}, 2,50 g_{NaCl}/L_{meio}, 3,75 g_{NaCl}/L_{meio} e 5,00 g_{NaCl}/L_{meio} (a quantidade de NaCl presente numa água salgada corresponde a aproximadamente 30 ± 5 g/L).

Nas Figuras III.14 e III.15 apresentam-se as curvas de crescimento ([Biomassa seca] (mg/dia) vs dias de cultivo) e curvas de evolução do pH (pH vs dias de cultivo), respectivamente. O crescimento foi efectuado em regime mixotrófico com meio de cultura BBM e adição de 1,0 g_{gluc}/L_{meio}. Em oito culturas foi feita a adição de cloreto de sódio em percentagens que variam entre 250% e 20.000% (2,5x e 200x mais NaCl, respectivamente, que o presente no meio de cultura BBM padrão).

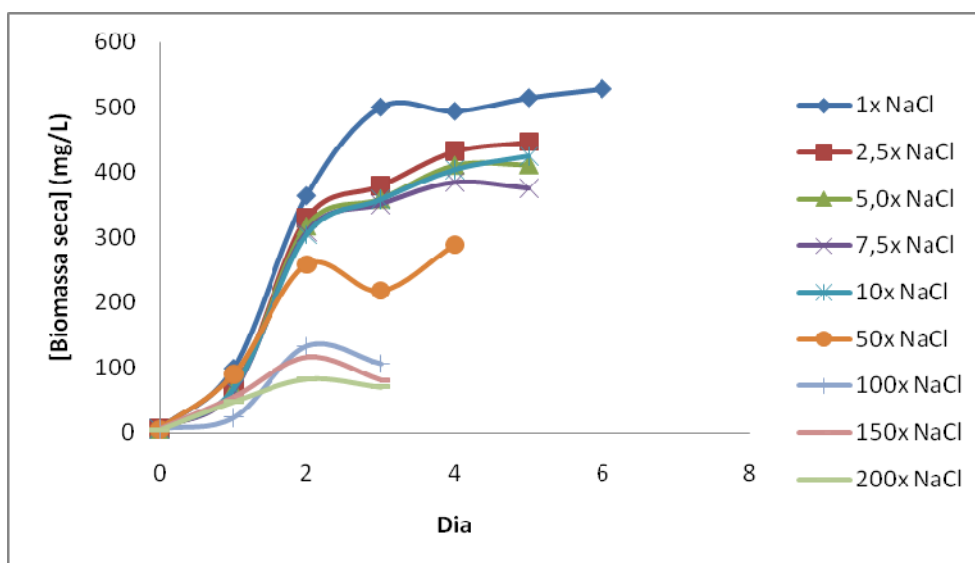


Figura III.14 – Curvas de crescimento [Biomassa seca] (mg/dia) vs Dia.

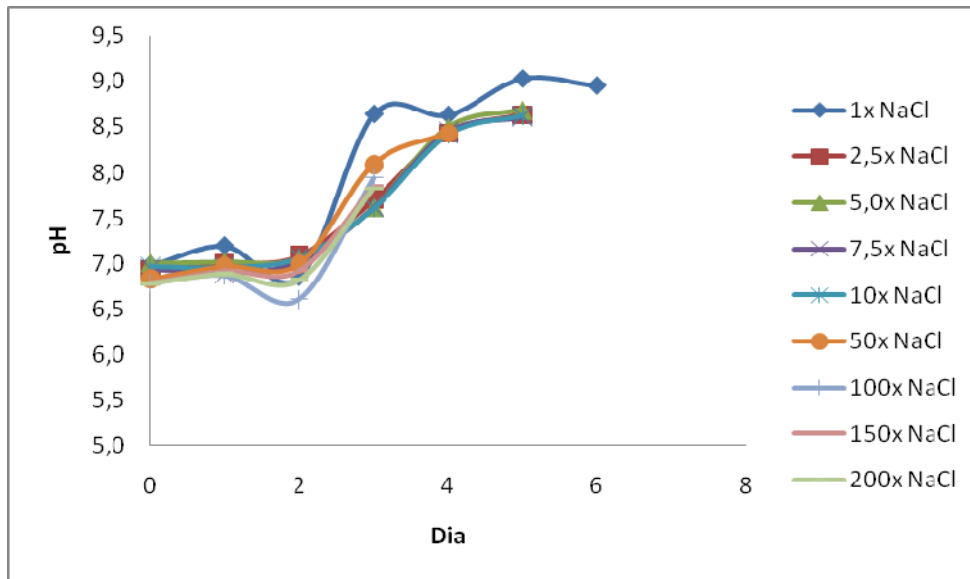


Figura III.15 – Curvas de pH vs Dia.

Nestes últimos ensaios, aqueles em que as percentagens em NaCl eram superiores ao meio padrão em 10.000% (100x NaCl), 15.000% (150x NaCl) e 20.000% (200x NaCl), e ao fim de 3 dias de cultivo, tinham um odor semelhante ao descritos em III.2.1, para concentrações superiores a 2,5 g_{glucose}/L_{meio}. Além deste facto, as produtividades máximas obtidas foram inferiores às demais: 109,29 mg_{secas}/L.dia para o ensaio “100x NaCl”, 60,48 mg_{secas}/L.dia para o ensaio “150x NaCl” e 43,75 mg_{secas}/L.dia para o ensaio “200x NaCl”. Por estes factores, considerou-se que estas condições de *stress* eram suficientemente nefastas ao cultivo de *Chlorella vulgaris* e então a produtividade lipídica foi calculada para adições até 5.000% de NaCl.

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

Observa-se na Figura III.8 e nos resultados apresentados no Anexo 6, nas Tabelas A5.1 a A5.9, que nos regimes de cultivo mixotrófico a fase exponencial ocorre entre o dia 0 e o dia 3 de período de cultivo. Para o regime autotrófico a fase exponencial foi observada entre os dias 2 e 4 de cultivo.

Os valores de produtividade máxima e média são apresentados na Tabela III.1 e na Figura III.16 (ver informação adicional no Anexo 5 – Determinação das produtividades máxima e média)

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

Nº ensaio	Ensaio <i>Chlorella vulgaris</i>	Produtividade máxima [mg _{secas} /L.dia]		
		24h	48h	72h
1	Regime autotrófico	109,70	77,77	61,96
2	Regime mixotrófico 0,2 g _{gluc} /L _{meio}	72,38	60,03	58,97
3	Regime mixotrófico 0,4 g _{gluc} /L _{meio}	94,76	75,03	73,35
4	Regime mixotrófico 0,6 g _{gluc} /L _{meio}	132,62	131,37	111,13
5	Regime mixotrófico 0,8 g _{gluc} /L _{meio}	196,55	164,46	141,37
6	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio}	265,18	200,60	164,84
7	Regime mixotrófico 1,5 g _{gluc} /L _{meio}	279,35	182,77	140,48
8	Regime mixotrófico 2,0 g _{gluc} /L _{meio}	285,89	186,88	148,53
9	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} 20% N _{de BBM} /L _{meio}	225,42	139,02	108,27
10	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 40% N _{de BBM} /L _{meio}	228,15	141,16	109,31
11	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 60% N _{de BBM} /L _{meio}	243,81	151,28	115,60
12	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 80% N _{de BBM} /L _{meio}	253,04	157,92	122,96
13	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 250% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	262,02	126,61	124,56
14	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 500% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	250,30	148,99	117,44
15	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 750% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	243,27	150,83	114,90
16	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 1000% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	236,67	155,39	117,30
17	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 5000% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	169,05	161,82	70,95

Nesta tabela III.1 estão assinalados na cor correspondente para cada tipo de cultivo, as produtividades obtidas consideradas como óptimas.

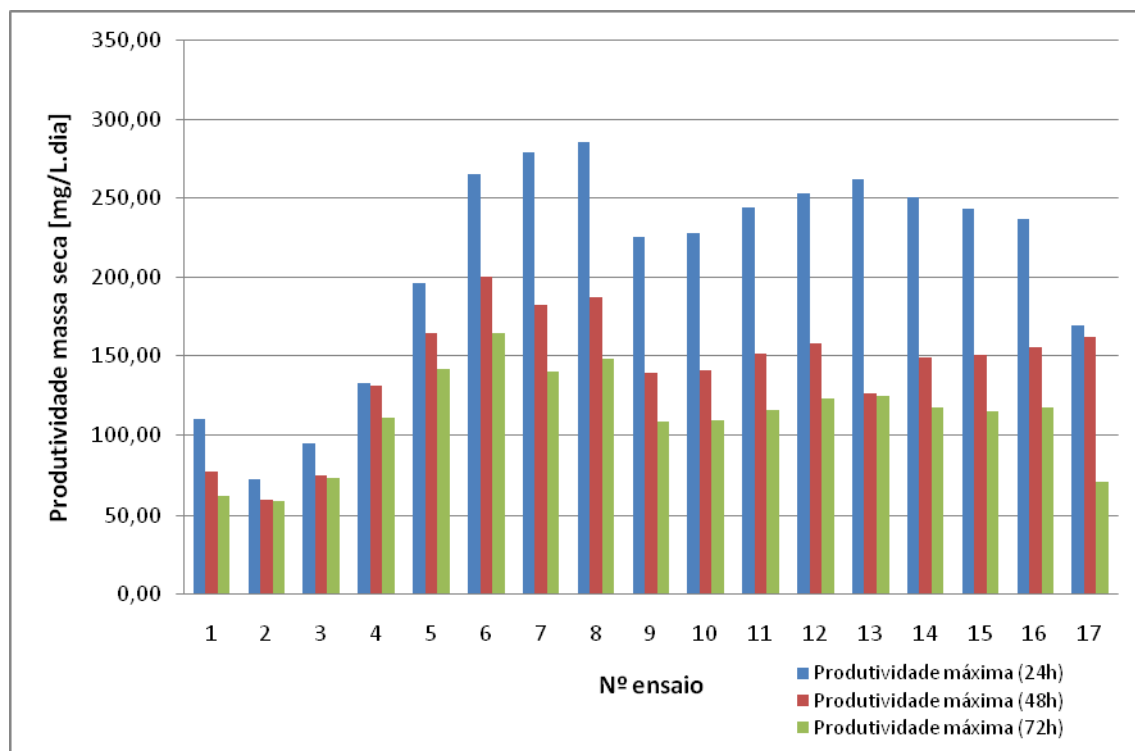


Figura III.16 – Produtividade máxima para os ensaios constantes na Tabela III.1.

Para o regime de crescimento autotrófico a produtividade máxima para 24h foi obtida do dia 3 ao dia 4, sendo o valor de 109,70 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$. A produtividade máxima para o período de cultura entre os dias 2 e 4 foi de 77,77 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$.

Os valores mais elevados de produtividade de biomassa seca, para os ensaios “Mix gluc 0,2” e “Mix gluc 0,4” verificaram-se durante o período de 24h do dia 0 ao dia 1, sendo de 72,38 e 94,76 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$, respectivamente. Para os restantes ensaios em regime de cultivo mixotrófico o período de 24 h do dia 1 ao dia 2 foi o de maior produtividade. Destes últimos, os valores de produtividade superiores corresponderam aos ensaios “Mix 1,0 gluc”, “Mix 1,5 gluc” e “Mix 2,0 gluc”, sendo a produtividade de 265,18, 279,35 e 285,89 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$, respectivamente. Quando comparado o valor do ensaio “Mix 1,0 gluc” com os resultados dos ensaios “Mix 1,5 gluc” e “Mix 2,0 gluc” a diferença percentual de produtividade máxima é de -5,3% e -7,8%, respectivamente.

A produtividade máxima para o ensaio “Mix 1,0 gluc” e num período de 48h foi de 200,60 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$. Este valor representa uma diferença percentual de 8,9% e de 6,8% relativamente aos ensaios “Mix 1,5 gluc” e “Mix 2,0 gluc”, cujos valores de produtividade são de 182,77 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ e 186,88 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$, respectivamente.

Para o mesmo ensaio (“Mix 1,0 gluc”) e num período de 72h o valor obtido foi de 164,84 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$. Em comparação com os valores de produtividade dos ensaios “Mix 1,5 gluc” (140,48 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$) e “Mix 2,0 gluc” (148,53 $\text{mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$), a diferença percentual foi de 14,8% e 9,9%, respectivamente.

Pela estabilidade de resultados de produtividade máxima relativos ao ensaio “Mix 1,0 gluc” nos diversos períodos da fase exponencial de crescimento (24 h, 48 h e 72 h) escolheu-se o valor de 1,0 $\text{g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ como constante nos ensaios seguintes, no estudo do efeito da limitação de azoto no meio de cultura e da adição de NaCl em comparação com o meio BBM padrão.

III.3. Quantificação de óleos por gravimetria

Após se proceder à extracção de óleo foi feita a sua quantificação gravimétrica, de acordo com o procedimento descrito em II.5. A produtividade máxima lipídica foi calculada pela multiplicação do teor lipídico (massa de lípidos/massa seca de microalga x 100%) pela produtividade máxima de biomassa seca. Os resultados obtidos são os apresentados na Tabela III.2 e nas Figuras III.17 e III.18.

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

Nº ensaio	Ensaio <i>Chlorella vulgaris</i>	Teor lipídico (%)	Produtividade máxima [mg _{lípidos} /L.dia]		
			24h	48h	72h
1	Regime autotrófico	16,7	18,3	13,0	10,3
2	Regime mixotrófico 0,2 g _{gluc} /L _{meio}	14,4	10,5	8,7	8,5
3	Regime mixotrófico 0,4 g _{gluc} /L _{meio}	9,4	8,9	7,1	6,9
4	Regime mixotrófico 0,6 g _{gluc} /L _{meio}	10,1	13,4	13,3	11,2
5	Regime mixotrófico 0,8 g _{gluc} /L _{meio}	16,6	32,5	27,2	23,4
6	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio}	16,6	43,9	33,2	27,3
7	Regime mixotrófico 1,5 g _{gluc} /L _{meio}	13,6	37,9	24,8	19,1
8	Regime mixotrófico 2,0 g _{gluc} /L _{meio}	14,3	40,7	26,6	21,2
9	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} 20% N _{de BBM} /L _{meio}	19,8	44,7	27,6	21,5
10	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} 40% N _{de BBM} /L _{meio}	13,7	31,3	19,4	15,0
11	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} 60% N _{de BBM} /L _{meio}	13,4	32,6	20,3	15,5
12	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} 80% N _{de BBM} /L _{meio}	13,8	35,0	21,8	17,0
13	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 250% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	14,2	37,2	18,0	17,7
14	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 500% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	15,5	38,7	23,0	18,1
15	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 750% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	17,4	42,3	26,2	20,0
16	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 1000% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	18,5	43,8	28,7	21,7
17	Regime mixotrófico 1,0 g _{gluc} /L _{meio} ; 5000% NaCl _{de BBM} /L _{meio}	23,0	38,9	37,2	16,3

Nesta tabela III.2 estão assinalados na cor correspondente para cada tipo de cultivo, as maiores produtividades lipídicas obtidas em cada conjunto de ensaios.

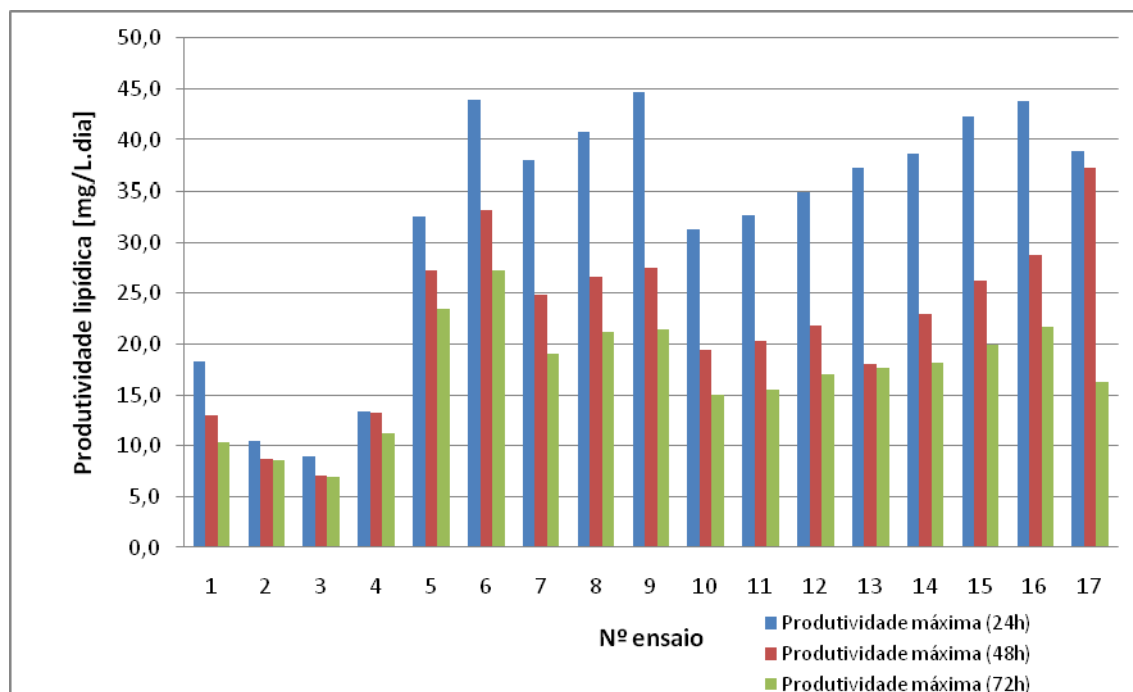


Figura III.17 – Produtividade lipídica para os ensaios constantes na Tabela III.2.

Dos ensaios em regime mixotrófico, os que atingiram um teor lipídico superior foram os de adição de $0,8 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$, cujo valor relativo à biomassa seca foi de 16,6% (m/m) para ambos. Estes valores foram semelhantes ao valor obtido em regime autotrófico, de 16,7%, o qual também se encontra dentro do resultado esperado como se pode observar na Tabela I.2.

Para os ensaios com redução de azoto e aumento da concentração de NaCl no meio, os teores lipídicos máximos corresponderam aos de redução em 80% de NaNO_3 (0,2N) e de aumento da concentração de NaCl em 5.000%, sendo de 19,8% e 23,0%, respectivamente.

Para os ensaios em que houve uma redução em 80% da fonte de azoto (NaNO_3) adicionada ao meio, obteve-se um valor próximo do referido em bibliografia, de 16,4% de teor lipídico (Converti *et al.*, 2009). A diferença entre os resultados obtidos e os referidos na literatura pode dever-se, à diferença nos regimes de cultura utilizados no estudo destes autores que apenas usaram o CO_2 do ar como fonte de carbono (regime autotrófico) e neste estudo (mixotrófico) ou a uma extracção mais eficiente neste estudo.

Os melhores resultados de produtividade máxima lipídica resultaram dos ensaios de cultivo mixotrófico com 1,0 g_{glucose}/L_{meio}, redução em 80% de fonte de azoto e com adição de 750% e 1.000% de NaCl, sendo de 43,9, 44,7, 42,3 e 43,8 mg_{lipidos}/L.dia, respectivamente. Estes resultados foram superiores, em mais de duas vezes, quando comparados com o valor obtido para regime autotrófico, de 18,3 mg_{lipidos}/L.dia.

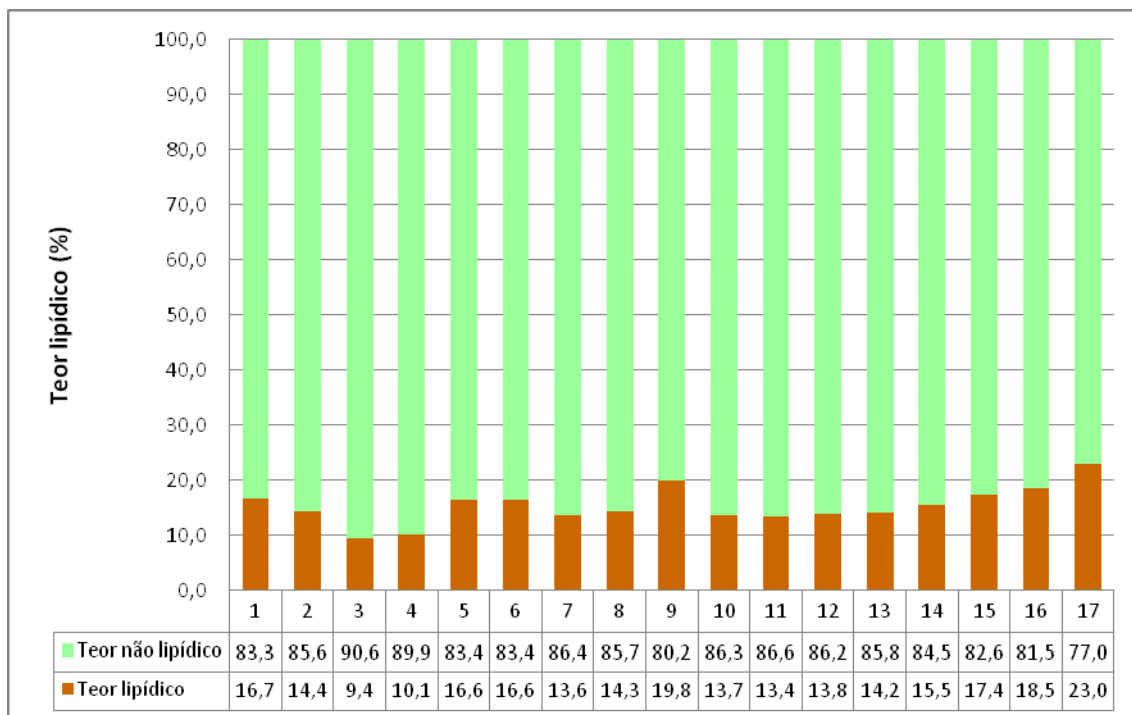


Figura III.18 – Fracções lipídicas e não lipídicas da biomassa algal, para os ensaios constantes na Tabela III.2.

IV. Conclusões

Foi efectuado o estudo do crescimento de cinco estirpes de microalgas de água doce (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella emersonii*, *Botryococcus brauni* e *Haematococcus pluvialis*), em regime autotrófico, usando os meios de cultura mais indicados. Concluiu-se que, deste conjunto, a estirpe que apresenta uma maior taxa de crescimento é a *Chlorella vulgaris*, ACOI 879, pelo que todo o restante estudo de influência das condições de cultivo (regime autotrófico ou mixotrófico, com redução de fonte de azoto – NaNO_3 – ou indução de *stress* salino – por adição de NaCl) na produtividade mássica e na produtividade lipídica foi efectuado sobre esta estirpe.

Face aos resultados obtidos e à análise efectuada, considera-se que o ensaio em regime mixotrófico com adição de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ em conjugação com redução de teor de azoto em 80%, é o mais adequado para produção de biomassa da estirpe de *Chlorella vulgaris* ACOI 879 em estudo com vista à maximização da produtividade lipídica, permitindo obter uma produtividade lipídica máxima de $44,7 \text{ mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$.

Considerando um fotobioreactor com um volume total de cultivo equivalente ao volume de uma piscina de 1 ha e 15 cm de profundidade ($V = 1.500 \text{ m}^3$) tem-se que o valor de produtividade lipídica máxima de $44,7 \text{ mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$ corresponde a uma produtividade (o óleo tem uma massa específica de cerca de 900 g/L) máxima de cerca de 27.200 L/ha.ano . Este valor é de cerca de 23 e 34 vezes superior quando comparado com a produtividade de óleo em monoculturas de colza e girassol (Tabela I.4).

Esta produtividade é muito atractiva quando comparada com a produtividade de uma oleaginosa vegetal convencional, tanto mais que a *Chlorella vulgaris* não é uma estirpe reconhecida como excepcionalmente interessante para a produção de óleos como matéria-prima na indústria de biodiesel, apesar de o seu óleo permitir que o biodiesel produzidos cumpra com as especificações da norma EN 14214.

Um outro ponto vantajoso nestas condições de cultivo será a redução de custos na produção pela diminuição de fonte de azoto a fornecer ao meio de cultura.

Relativamente aos ensaios efectuados com aplicação de *stress* salino, no ensaio com incremento em 5.000% da concentração de NaCl obteve-se um teor lipídico de 23%, mas com baixa produtividade de biomassa de $169,05 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$ ($38,9 \text{ mg}_{\text{lipídios}}/\text{L.dia}$). Neste caso considera-se que se o *stress* tivesse sido aplicado no início da fase estacionária

poderia ter facultado uma produtividade lipídica superior, já que o crescimento na fase exponencial é favorecido em condições de regime mixotrófico e para qualquer taxa de redução de azoto. No entanto, tal deveria ser comprovado a partir da realização de ensaios suplementares.

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

Em diversas referências bibliográficas são apresentados estudos do efeito da aplicação de *stress* salino sobre microalgas de água salgada (exemplo Takagi *et al.*, 2006; Mishra e Jha, 2009). A vertente mais inovadora do presente estudo foi a aplicação de *stress* salino numa microalga de água doce, concluindo-se que esta se comporta de modo análogo às de água salgada, isto é, quanto maior a concentração salina (até um valor máximo de 5.000% de NaCl – 50x concentração de NaCl no meio BBM – para a *Chlorella vulgaris*) maior será o teor lipídico presente na biomassa algal.

V. Sugestões para trabalhos futuros

Após a realização deste trabalho e a análise dos resultados obtidos, sugere-se que, em trabalhos futuros sejam efectuadas as seguintes alterações:

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

Cultivo em regime mixotrófico de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ em conjugação com redução do teor de azoto em 80% e indução de *stress* salino aplicado no início da fase estacionária, para diferentes concentrações de NaCl.

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

3) Realização do mesmo estudo, substituindo os reagentes p.a. por fontes nutricionais residuais (como sendo os resíduos provenientes da industria alimentar)

4) Realização do mesmo estudo com outras espécies / estirpes de microalgas, nomeadamente as de água salgada.

5) A partir da conjugação das fontes nutricionais e de *stress* que majoram a produtividade máxima lipídica (cultivo em regime mixotrófico de $1,0 \text{ g}_{\text{glucose}}/\text{L}_{\text{meio}}$ em conjugação com redução de teor de azoto em 80% e indução de *stress* salino de 5.000% (50x) da concentração de NaCl, aplicado no início da fase estacionária) proceder ao *scale-up* deste estudo, ou seja, implementação deste estudo à escala piloto.

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

7) Realização de um estudo similar de cultivo de *Chlorella vulgaris* em que o *stress* é provocado por adição de ferro ao meio de cultura.

VI. Referências bibliográficas

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C., 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Servicio de Publicacions, Universidade da Coruna. 210p.
- Abalde, J., Porta, F., Gabeiras, M., Fabregas, J., 1987. *Potencial de utilizacion de la microalga marina Dunaliella tertiolecta como fuente de vitaminas A, C y E*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 505-510.
- Balboa, B., Abalde, J., Herrero, C., Fabregas, J., 1987. *Utilizacion de nutrientes comerciales Algal-1 en cultivos estaticos y masivos de las microalgas marinas Tetraselmis suecica e Isochrysis galbana*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 517-520.
- Barclay, W.R., Meager, K.M., Abril, J.R., 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 6: 123-129.
- Becker, W., 1981. Algae mass cultivation – production and utilization. *Process Biochemistry*, 16 (5): 10-14.
- Becker, W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. Em: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science, 566p.
- Becker, W., Venkataraman, L.V., 1984. Production and utilization of the blue-green algae *Spirulina* in India. *Biomass*, 4: 105-125.
- Behrenfeld MJ, Randerson JT, McClain CR, Feldman GC, Los SO, 2001. Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science*, 291: 2594–97.
- Belay, A., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 235-240.
- Beneman, J. R., 1990. Microalgae products and production: an overview. *Journal of Industrial Microbiology*, 31 (5): 247-256.
- Bewicke, D., 1984. *Chlorella: the emerald food*. Ronin Publishing, p.5-3.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (8): 911-917.
- Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9: 393-401.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H., 2009. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*.
- Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.J., 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the

- energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1): 21-34.
- Converti, A., Casazza, A. 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*, 48: 1148-1151.
 - Cornet, J.F., Dussap, C.G., Gros, J.B., 1998. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59: 155-223.
 - Demirbas, A., 2009. Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 31:2, 163-168.
 - Esteves, F.A., 1988. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 575p.
 - Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1990. *Aquatic photosynthesis*. Oxford: Blackwell Science, 375p.
 - Fogg, G.E., 1975. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Second Edition. The University of Wisconsin Press, 108p.
 - Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
 - Grima, E.M., E.-H. Belarbi, E.H., Fernández, F.G., Medina A.R., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20: 491-515.
 - Grobbelaar, J.U., 2004. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, 70: 140-144.
 - Guillard, R.L., 1972. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Em: Smith, W., Chanley, M., (eds). *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press., 338p.
 - Guimarães, J., Amaral, R., Santos, M.F., Santos, L.M.A., 2009. *Colheita, identificação e conservação de microalgas*. ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 88p.
 - Henrikson, R., 1989. *Earth food Spirulina*. California: Ronore Enterprises. 180p.
 - Herrero, C., Liaño, R., Abalde, J., Fabregas, J., (1987). “Utilización de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en nutrición animal”. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12, p.483-488.
 - Herrero, C., Vecino, E., Cancelo, M.J., Fabregas, J., 1987. *Composicion en vitamina E de diferentes microalgas marinas utilizadas en acuicultura*. Universidad de Santiago, Espanha. Cuad. Marisq. Publ. Téc., 12: 495-498.

- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. *Manual on the production and use of life food for aquaculture*. FAO Fisc Tech. Pap, 361: 7-42.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, Fourth Edition, 547 pp.
- Lee, Y.K., Shen, H., 2004. Basic culturing techniques. Em: Richmond, A., (Ed.). *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, 566 pp..
- Mahasneh, I.A., 1997. Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella sp.* (*Chlorophyta*). *Cytobios*, 90: 153-161.
- Miao, X., WU, Q., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110: 85-93.
- Mirón, A.S., García, M.C.C., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors, *Biochem. Eng. J.*, 16: 287-297.
- Mishra, A., Jha, B., 2009. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2009.02.006
- Ogonna, J.C., Tanaka, H., 1996. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (6): 558-564.
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20: 459-466.
- Phang, S.M., Miah, M.S., Chu, W.L., Hashim, M., 2000. Spirulina culture in digest sago starch factory waste water. *J. Appl. Phycol.*, 12: 395-400.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems of phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 287-293.
- Raven, J.A., 1990. Sensing pH?. *Plant, Cell and Environment*, 13: 721-729.
- Rehm, H.J., Reed, G., 1995. *Enzymes, biomass, food and feed*. Biotechnology Multi Volume Comprehensive Treatise, 9: 170-215.
- Richmond, A., 1990. *CRC Handbook of microalgal mass culture*. Florida, CRC, 528p.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford, Blackwell Science, 566 pp.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., Kopel, R., 1993. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J. Appl. Phycol.*, 5: 327-332.
- Rigano, V.D.M., Vona, V., Esposito, S., Carillo, P., Carfagna, S., Rigano, C., 1998. The physiological significance of light and dark NH_4^+ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, 47: 177-181.

- Stein, J.R., 1973. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University, 448p.
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (3): 223-226.
- Tokusoglu, Ö., Ünal, M.K., 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68 (4): 1144-48.
- Tomaselli, L., 2004. The microalgal cell. Em: Richmond, A., (ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford, Blackwell Science, 566 p.
- Vonshak, A., 1990. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. Em: Richmond, A., (ed). *CRC Handbook of microalgae mass culture*. Boca Raton: CRC, 117-145.
- Vonshak, A., 2002. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis e-Library, 233 pp.

VII. Anexos

Anexo 1. Calibração - bomba de ar

Uma bomba de ar (Pacific AP6), com duas saídas para difusão foi calibrada pelo método da bolha de sabão, conforme descrito em II.2.3. Condições de Inoculação / Cultivo, alínea d.

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

Exemplo de cálculo:

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

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

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

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

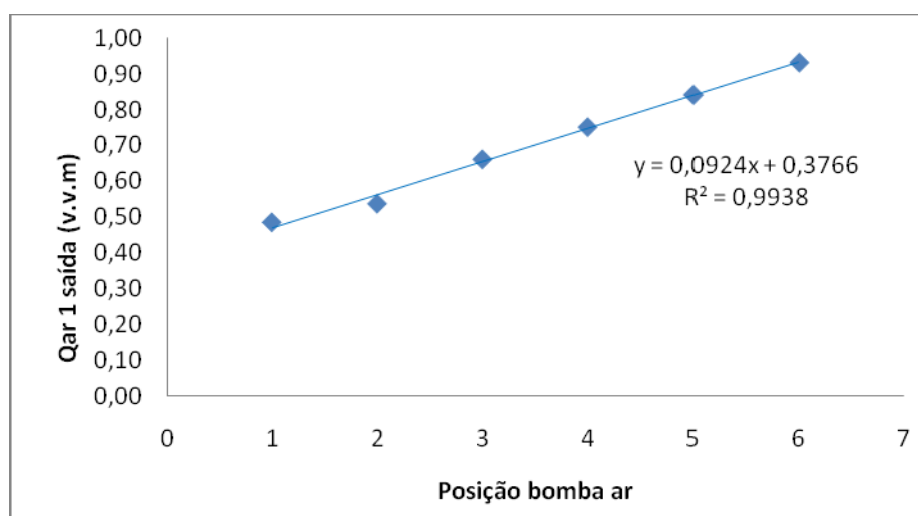


Figura A1.1 – Curva de calibração da bomba de ar.

Anexo 2. Calibração - Curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris*

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

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

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

Amostra	[Biomassa seca] mg/L	Abs (a 680 nm)
8	30	0,117
7	60	0,236
6	120	0,473
5	240	0,899
4	343	1,129
3	490	1,533
2	700	1,973
1	1000	2,478

Com os valores de [Biomassa seca] mg/L e de Abs (a 680 nm) apresentados na tabela A2.1 traçou-se a curva de calibração apresentada na Figura A2.1; esta curva apresenta um valor de correlação (r^2) = 0,9785, ou seja, $r = 0,9892$.

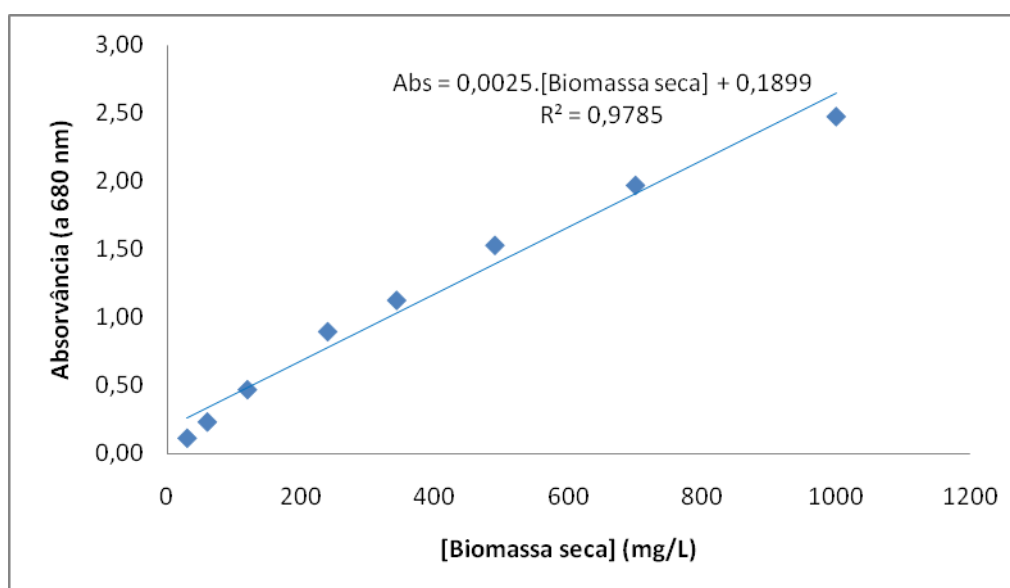


Figura A2.1 – Curva de calibração do crescimento da *Chlorella vulgaris* (rejeitada).

Como r é inferior a 0,99 a curva de calibração deverá ser ajustada até se obter $r \geq 0,99$, para tal o ponto correspondente à amostra 1 foi eliminado.

Traçou-se nova curva de calibração que é apresentada na Figura A2.2; esta curva apresenta um valor de correlação (r^2) = 0,9869, ou seja, $r = 0,9934$.

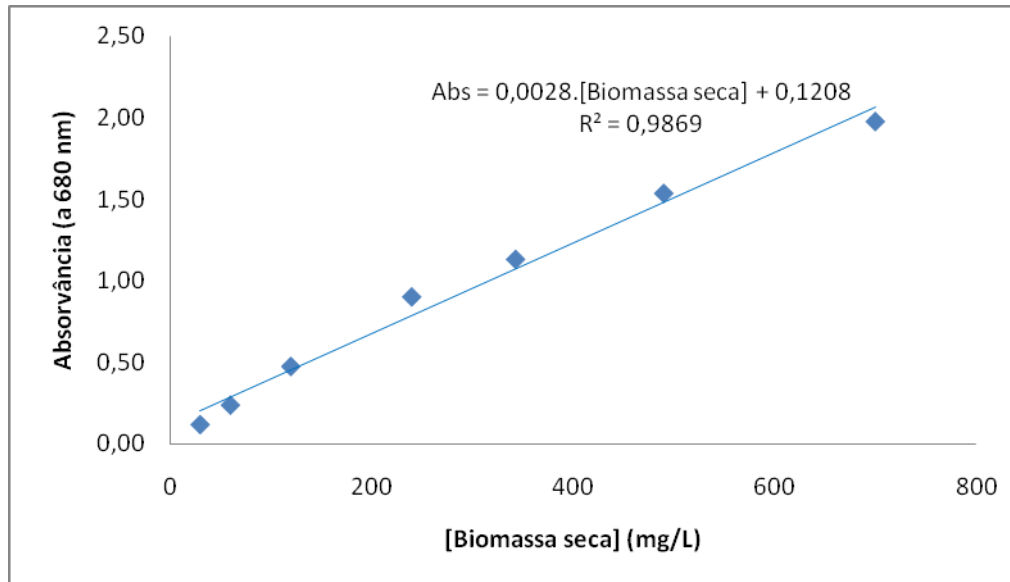


Figura A2.2 – Curva de calibração do crescimento da *Chlorella vulgaris*.

Anexo 3. Avaliação do crescimento microalgal

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

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

Tabela A3.1 – Avaliação do crescimento em regime autotrófico

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,02	7,01	0,135	0,133	0,134	4,714	4,71
	2	6,99		0,125	0,121	0,123	0,786	
	3	7,02		0,120	0,115	0,118	-1,179	
Dia 1	1	7,27	7,23	0,202	0,203	0,203	29,179	25,90
	2	7,22		0,198	0,192	0,195	26,500	
	3	7,21		0,185	0,180	0,183	22,036	
Dia 2	1	7,60	7,56	0,222	0,221	0,222	35,964	37,45
	2	7,56		0,235	0,229	0,232	39,714	
	3	7,52		0,225	0,222	0,224	36,679	
Dia 3	1	7,59	7,53	0,358	0,354	0,356	84,000	83,29
	2	7,48		0,376	0,375	0,376	90,964	
	3	7,52		0,331	0,330	0,331	74,893	
Dia 4	1	7,55	7,51	0,655	0,645	0,650	189,000	192,99
	2	7,53		0,705	0,708	0,707	209,179	
	3	7,44		0,627	0,627	0,627	180,786	
Dia 5	1	8,21	8,26	0,742	0,740	0,741	221,500	223,35
	2	8,51		0,762	0,757	0,760	228,107	
	3	8,06		0,739	0,737	0,738	220,429	
Dia 6	1	8,17	8,18	0,782	0,783	0,783	236,321	236,44
	2	8,32		0,775	0,774	0,775	233,464	
	3	8,04		0,793	0,790	0,792	239,536	
Dia 7	1	9,19	9,03	0,896	0,912	0,904	279,714	285,37
	2	9,01		0,878	0,873	0,876	269,536	
	3	8,88		0,990	0,970	0,980	306,857	
Dia 8	1	8,47	8,51	0,877	0,897	0,887	273,643	280,37
	2	8,48		0,879	0,875	0,877	270,071	
	3	8,57		0,949	0,958	0,954	297,393	
Dia 9	1	8,43	8,49	0,870	0,877	0,874	268,821	274,36
	2	8,60		0,877	0,876	0,877	269,893	
	3	8,44		0,932	0,902	0,917	284,357	
Dia 10	1	8,10	8,15	0,879	0,867	0,873	268,643	276,50
	2	8,20		0,907	0,892	0,900	278,107	
	3	8,16		0,922	0,903	0,913	282,750	

NOTA: Os valores de [Biomassa seca] para o Dia 0 na avaliação de crescimento em regime autotrófico (assinalados a verde) não foram considerados no cálculo da [Biomassa seca] média, pois são divergentes:

- do valor lido para a cultura 1;
- do comportamento de crescimento verificado nas culturas mixotróficas para o dia 0

Tabela A3.2 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,2 g_{gluc}/L_{meio}

		pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
Data	Cultura	lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,81	6,83	0,164	0,164	0,164	15,429	15,73
	2	6,83		0,167	0,164	0,166	15,964	
	3	6,85		0,166	0,164	0,165	15,786	
Dia 1	1	7,04	7,05	0,359	0,343	0,351	82,214	88,11
	2	7,02		0,344	0,335	0,340	78,107	
	3	7,09		0,418	0,406	0,412	104,000	
Dia 2	1	7,58	7,57	0,499	0,494	0,497	134,179	135,79
	2	7,54		0,471	0,477	0,474	126,143	
	3	7,60		0,528	0,537	0,533	147,036	
Dia 3	1	8,40	8,50	0,649	0,650	0,650	188,821	192,63
	2	8,38		0,623	0,614	0,619	177,750	
	3	8,73		0,709	0,716	0,713	211,321	
Dia 4	1	8,30	8,17	0,658	0,674	0,666	194,714	200,07
	2	8,11		0,641	0,641	0,641	185,786	
	3	8,10		0,743	0,729	0,736	219,714	
Dia 5	1	8,31	8,38	0,747	0,738	0,743	222,036	222,99
	2	8,36		0,710	0,707	0,709	209,893	
	3	8,46		0,791	0,778	0,785	237,036	
Dia 6	1	8,04	8,06	0,805	0,816	0,811	246,321	242,33
	2	8,09		0,764	0,781	0,773	232,750	
	3	8,06		0,826	0,804	0,815	247,929	

Tabela A3.3 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,4 g_{gluc}/L_{meio}

		pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
Data	Cultura	lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,87	6,88	0,168	0,171	0,170	17,393	17,69
	2	6,88		0,170	0,178	0,174	19,000	
	3	6,90		0,172	0,163	0,168	16,679	
Dia 1	1	6,93	6,81	0,429	0,437	0,433	111,500	112,45
	2	6,81		0,432	0,434	0,433	111,500	
	3	6,70		0,457	0,425	0,441	114,357	
Dia 2	1	7,73	7,63	0,578	0,591	0,585	165,607	167,75
	2	7,69		0,624	0,638	0,631	182,214	
	3	7,46		0,545	0,567	0,556	155,429	
Dia 3	1	9,11	9,26	0,774	0,791	0,783	236,321	237,75
	2	9,51		0,815	0,786	0,801	242,750	
	3	9,17		0,779	0,774	0,777	234,179	
Dia 4	1	8,57	8,83	0,822	0,818	0,820	249,714	245,73
	2	8,97		0,811	0,814	0,813	247,036	
	3	8,95		0,797	0,791	0,794	240,429	
Dia 5	1	8,66	8,95	0,873	0,876	0,875	269,179	258,88
	2	9,30		0,828	0,820	0,824	251,143	
	3	8,88		0,860	0,817	0,839	256,321	
Dia 6	1	8,30	8,48	0,917	0,891	0,904	279,714	268,82
	2	8,88		0,845	0,866	0,856	262,393	
	3	8,25		0,852	0,870	0,861	264,357	

Tabela A3.4 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,6 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,94	6,95	0,195	0,196	0,196	26,679	26,74
	2	6,94		0,196	0,196	0,196	26,857	
	3	6,97		0,196	0,195	0,196	26,679	
Dia 1	1	7,03	7,02	0,521	0,520	0,521	142,750	156,86
	2	7,05		0,556	0,624	0,590	167,571	
	3	6,99		0,575	0,564	0,570	160,250	
Dia 2	1	7,09	7,10	0,877	0,875	0,876	269,714	289,48
	2	7,19		0,939	0,963	0,951	296,500	
	3	7,02		0,968	0,966	0,967	302,214	
Dia 3	1	9,05	9,07	1,118	1,121	1,120	356,679	360,13
	2	8,99		1,127	1,145	1,136	362,571	
	3	9,17		1,128	1,136	1,132	361,143	
Dia 4	1	8,91	8,96	1,099	1,100	1,100	349,536	347,93
	2	8,91		1,113	1,114	1,114	354,536	
	3	9,05		1,074	1,070	1,072	339,714	
Dia 5	1	9,29	9,24	1,173	1,178	1,176	376,679	373,70
	2	9,28		1,177	1,174	1,176	376,679	
	3	9,16		1,152	1,149	1,151	367,750	
Dia 6	1	9,27	9,30	1,226	1,219	1,223	393,464	404,95
	2	9,27		1,292	1,256	1,274	411,857	
	3	9,36		1,258	1,277	1,268	409,536	

Tabela A3.5 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 0,8 g_{gluc}/L_{meio}

		pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
Data	Cultura	lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,92	6,94	0,201	0,196	0,199	27,750	27,87
	2	6,96		0,199	0,199	0,199	27,929	
	3	6,95		0,198	0,200	0,199	27,929	
Dia 1	1	6,98	7,03	0,583	0,575	0,579	163,643	160,25
	2	7,04		0,564	0,569	0,567	159,179	
	3	7,08		0,562	0,564	0,563	157,929	
Dia 2	1	6,86	6,83	1,119	1,099	1,109	352,929	356,80
	2	6,76		1,101	1,102	1,102	350,250	
	3	6,86		1,132	1,166	1,149	367,214	
Dia 3	1	9,00	8,94	1,392	1,398	1,395	455,071	451,98
	2	8,88		1,377	1,381	1,379	449,357	
	3	8,93		1,379	1,391	1,385	451,500	
Dia 4	1	8,61	8,67	1,357	1,352	1,355	440,607	445,85
	2	8,73		1,384	1,399	1,392	453,821	
	3	8,67		1,359	1,364	1,362	443,107	
Dia 5	1	8,94	9,01	1,392	1,382	1,387	452,214	454,60
	2	9,01		1,412	1,409	1,411	460,607	
	3	9,08		1,369	1,398	1,384	450,964	
Dia 6	1	8,75	8,78	1,390	1,407	1,399	456,321	455,49
	2	8,79		1,434	1,402	1,418	463,286	
	3	8,79		1,376	1,368	1,372	446,857	

Tabela A3.6 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,02	6,98	0,137	0,139	0,138	6,143	5,90
	2	7,09		0,138	0,137	0,138	5,964	
	3	6,83		0,137	0,136	0,137	5,607	
Dia 1	1	7,21	7,19	0,414	0,419	0,417	105,607	99,24
	2	7,31		0,411	0,417	0,414	104,714	
	3	7,06		0,360	0,371	0,366	87,393	
Dia 2	1	6,90	6,85	1,166	1,169	1,168	373,821	364,42
	2	6,74		1,101	1,070	1,086	344,536	
	3	6,91		1,175	1,166	1,171	374,893	
Dia 3	1	8,79	8,64	1,479	1,571	1,525	501,500	500,43
	2	8,42		1,480	1,485	1,483	486,321	
	3	8,72		1,594	1,523	1,559	513,464	
Dia 4	1	8,68	8,63	1,500	1,490	1,495	490,786	494,30
	2	8,56		1,473	1,488	1,481	485,607	
	3	8,66		1,549	1,529	1,539	506,500	
Dia 5	1	9,05	9,03	1,552	1,541	1,547	509,179	515,01
	2	9,04		1,552	1,495	1,524	500,964	
	3	9,01		1,621	1,616	1,619	534,893	
Dia 6	1	8,77	8,96	1,581	1,573	1,577	520,071	524,48
	2	8,91		1,606	1,589	1,598	527,393	
	3	9,19		1,616	1,571	1,594	525,964	

Tabela A3.7 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,5 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,99	6,99	0,123	0,133	0,128	2,571	5,13
	2	6,99		0,142	0,143	0,143	7,750	
	3	6,99		0,139	0,131	0,135	5,071	
Dia 1	1	6,97	7,00	0,378	0,380	0,379	92,214	91,32
	2	7,00		0,387	0,368	0,378	91,679	
	3	7,03		0,381	0,365	0,373	90,071	
Dia 2	1	6,88	6,91	1,138	1,147	1,143	364,893	370,67
	2	6,87		1,173	1,203	1,188	381,143	
	3	6,99		1,176	1,115	1,146	365,964	
Dia 3	1	7,23	7,28	1,322	1,318	1,320	428,286	426,56
	2	7,27		1,324	1,321	1,323	429,179	
	3	7,35		1,301	1,305	1,303	422,214	
Dia 4	1	7,48	7,57	1,415	1,395	1,405	458,643	460,25
	2	7,58		1,401	1,427	1,414	461,857	
	3	7,66		1,417	1,402	1,410	460,250	

Tabela A3.8 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 2,0 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,00	6,98	0,142	0,145	0,144	8,107	8,35
	2	6,94		0,150	0,147	0,149	9,893	
	3	7,00		0,141	0,140	0,141	7,036	
Dia 1	1	7,03	7,01	0,380	0,385	0,383	93,464	96,20
	2	7,06		0,389	0,414	0,402	100,250	
	3	6,95		0,396	0,377	0,387	94,893	
Dia 2	1	6,94	6,94	1,116	1,100	1,108	352,571	382,10
	2	6,96		1,219	1,228	1,224	393,821	
	3	6,92		1,241	1,240	1,241	399,893	
Dia 3	1	6,68	6,79	1,358	1,382	1,370	446,143	453,94
	2	6,83		1,404	1,407	1,406	458,821	
	3	6,85		1,394	1,406	1,400	456,857	
Dia 4	1	7,01	7,10	1,392	1,452	1,422	464,714	481,74
	2	7,07		1,491	1,490	1,491	489,179	
	3	7,22		1,508	1,485	1,497	491,321	

Tabela A3.9 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 2,5 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,94	6,94	0,136	0,142	0,139	6,500	7,75
	2	6,95		0,140	0,159	0,150	10,250	
	3	6,94		0,138	0,140	0,139	6,500	
Dia 1	1	6,97	6,96	0,387	0,405	0,396	98,286	103,82
	2	6,96		0,428	0,428	0,428	109,714	
	3	6,95		0,415	0,406	0,411	103,464	
Dia 2	1	6,86	6,89	1,393	1,381	1,387	452,214	444,65
	2	6,91		1,345	1,365	1,355	440,786	
	3	6,89		1,350	1,361	1,356	440,964	
Dia 3	1	5,93	5,94	1,548	1,594	1,571	517,929	531,74
	2	5,82		1,554	1,578	1,566	516,143	
	3	6,06		1,717	1,667	1,692	561,143	

Tabela A3.10 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 3,0 g_{gluc}/L_{meio}

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,97	6,97	0,135	0,131	0,133	4,357	5,61
	2	6,97		0,133	0,150	0,142	7,393	
	3	6,96		0,134	0,136	0,135	5,071	
Dia 1	1	6,97	7,00	0,398	0,393	0,396	98,107	100,31
	2	6,98		0,389	0,401	0,395	97,929	
	3	7,04		0,417	0,412	0,415	104,893	
Dia 2	1	6,85	6,89	1,248	1,310	1,279	413,643	432,45
	2	6,88		1,348	1,273	1,311	424,893	
	3	6,94		1,388	1,423	1,406	458,821	
Dia 3	1	5,84	5,80	1,865	1,782	1,824	608,107	548,58
	2	6,07		1,695	1,717	1,706	566,143	
	3	5,48		1,510	1,372	1,441	471,500	

Anexo 3.2. Cinco culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g_{glucose}/L com subtracção de azoto ao meio de cultura

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

Tabela A3.11 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} (igual à tabela A3.6)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,02	6,98	0,137	0,139	0,138	6,143	5,90
	2	7,09		0,138	0,137	0,138	5,964	
	3	6,83		0,137	0,136	0,137	5,607	
Dia 1	1	7,21	7,19	0,414	0,419	0,417	105,607	99,24
	2	7,31		0,411	0,417	0,414	104,714	
	3	7,06		0,360	0,371	0,366	87,393	
Dia 2	1	6,90	6,85	1,166	1,169	1,168	373,821	364,42
	2	6,74		1,101	1,070	1,086	344,536	
	3	6,91		1,175	1,166	1,171	374,893	
Dia 3	1	8,79	8,64	1,479	1,571	1,525	501,500	500,43
	2	8,42		1,480	1,485	1,483	486,321	
	3	8,72		1,594	1,523	1,559	513,464	
Dia 4	1	8,68	8,63	1,500	1,490	1,495	490,786	494,30
	2	8,56		1,473	1,488	1,481	485,607	
	3	8,66		1,549	1,529	1,539	506,500	
Dia 5	1	9,05	9,03	1,552	1,541	1,547	509,179	515,01
	2	9,04		1,552	1,495	1,524	500,964	
	3	9,01		1,621	1,616	1,619	534,893	
Dia 6	1	8,77	8,96	1,581	1,573	1,577	520,071	524,48
	2	8,91		1,606	1,589	1,598	527,393	
	3	9,19		1,616	1,571	1,594	525,964	

Tabela A3.12 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto (NaNO₃) em 20% (0,8N)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,99	6,97	0,138	0,135	0,137	5,607	6,08
	2	6,96		0,140	0,138	0,139	6,500	
	3	6,95		0,140	0,136	0,138	6,143	
Dia 1	1	7,00	7,02	0,314	0,309	0,312	68,107	68,88
	2	7,01		0,315	0,316	0,316	69,536	
	3	7,05		0,318	0,310	0,314	69,000	
Dia 2	1	7,04	7,06	0,991	1,028	1,010	317,393	321,92
	2	6,95		1,038	1,016	1,027	323,643	
	3	7,19		1,031	1,029	1,030	324,714	
Dia 3	1	7,50	7,58	1,182	1,168	1,175	376,500	374,95
	2	7,52		1,145	1,164	1,155	369,179	
	3	7,72		1,178	1,187	1,183	379,179	
Dia 4	1	8,20	8,23	1,332	1,333	1,333	432,750	435,43
	2	8,25		1,319	1,315	1,317	427,214	
	3	8,24		1,366	1,375	1,371	446,321	
Dia 5	1	8,57	8,56	1,349	1,353	1,351	439,357	440,67
	2	8,55		1,368	1,369	1,369	445,607	
	3	8,55		1,348	1,341	1,345	437,036	

Tabela A3.13 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto (NaNO₃) em 40% (0,6N)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,97	6,97	0,133	0,131	0,132	4,000	3,52
	2	6,95		0,131	0,131	0,131	3,643	
	3	6,98		0,137	0,121	0,129	2,929	
Dia 1	1	7,02	7,01	0,298	0,298	0,298	63,286	62,27
	2	6,99		0,283	0,276	0,280	56,679	
	3	7,02		0,308	0,308	0,308	66,857	
Dia 2	1	6,75	6,98	0,949	0,956	0,953	297,036	306,08
	2	7,05		0,980	0,982	0,981	307,214	
	3	7,13		1,003	0,997	1,000	314,000	
Dia 3	1	7,26	7,30	1,079	1,067	1,073	340,071	350,31
	2	7,30		1,055	1,065	1,060	335,429	
	3	7,33		1,170	1,174	1,172	375,429	
Dia 4	1	7,69	7,74	1,405	1,137	1,271	410,786	387,75
	2	7,74		1,105	1,093	1,099	349,357	
	3	7,80		1,246	1,253	1,250	403,107	
Dia 5	1	7,95	8,07	1,191	1,173	1,182	379,000	385,49
	2	8,12		1,141	1,149	1,145	365,786	
	3	8,15		1,271	1,276	1,274	411,679	

Tabela A3.14 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto (NaNO₃) em 60% (0,4N)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,97	6,97	0,127	0,128	0,128	2,393	3,11
	2	6,96		0,127	0,131	0,129	2,929	
	3	6,97		0,133	0,131	0,132	4,000	
Dia 1	1	6,94	6,96	0,276	0,275	0,276	55,250	57,27
	2	7,00		0,285	0,287	0,286	59,000	
	3	6,95		0,285	0,279	0,282	57,571	
Dia 2	1	6,95	6,95	0,914	0,912	0,913	282,929	285,43
	2	6,99		0,918	0,917	0,918	284,536	
	3	6,90		0,934	0,925	0,930	288,821	
Dia 3	1	6,96	6,97	1,007	1,017	1,012	318,286	331,02
	2	6,96		1,081	1,079	1,080	342,571	
	3	7,00		1,056	1,046	1,051	332,214	
Dia 4	1	7,38	7,38	1,037	1,016	1,027	323,464	346,02
	2	7,36		1,124	1,123	1,124	358,107	
	3	7,40		1,104	1,134	1,119	356,500	
Dia 5	1	7,63	7,62	0,989	0,974	0,982	307,393	336,44
	2	7,61		1,111	1,108	1,110	353,107	
	3	7,63		1,089	1,106	1,098	348,821	

Tabela A3.15 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto (NaNO₃) em 80% (0,2N)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,94	6,95	0,130	0,126	0,128	2,571	1,44
	2	6,95		0,121	0,122	0,122	0,250	
	3	6,95		0,125	0,125	0,125	1,500	
Dia 1	1	7,01	6,98	0,301	0,296	0,299	63,464	54,06
	2	6,94		0,248	0,244	0,246	44,714	
	3	7,00		0,266	0,278	0,272	54,000	
Dia 2	1	6,99	6,95	0,997	0,946	0,972	303,821	279,48
	2	6,87		0,856	0,882	0,869	267,214	
	3	6,99		0,879	0,860	0,870	267,393	
Dia 3	1	6,55	6,56	1,049	1,022	1,036	326,679	326,26
	2	6,58		1,037	1,043	1,040	328,286	
	3	6,55		1,033	1,022	1,028	323,821	
Dia 4	1	6,57	6,61	1,001	1,000	1,001	314,179	322,04
	2	6,63		1,046	1,059	1,053	332,750	
	3	6,62		1,019	1,010	1,015	319,179	
Dia 5	1	6,73	6,73	0,975	0,972	0,974	304,536	306,74
	2	6,75		0,991	0,985	0,988	309,714	
	3	6,72		0,972	0,983	0,978	305,964	

Anexo 3.3. Nove culturas de concentrações distintas, em regime mixotrófico de 1,0 g_{glucose}/L com adição de cloreto de sódio ao meio de cultura

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

Tabela A3.16 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} (igual à tabela A3.6 e à Tabela A3.11)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,02	6,98	0,137	0,139	0,138	6,143	5,90
	2	7,09		0,138	0,137	0,138	5,964	
	3	6,83		0,137	0,136	0,137	5,607	
Dia 1	1	7,21	7,19	0,414	0,419	0,417	105,607	99,24
	2	7,31		0,411	0,417	0,414	104,714	
	3	7,06		0,360	0,371	0,366	87,393	
Dia 2	1	6,90	6,85	1,166	1,169	1,168	373,821	364,42
	2	6,74		1,101	1,070	1,086	344,536	
	3	6,91		1,175	1,166	1,171	374,893	
Dia 3	1	8,79	8,64	1,479	1,571	1,525	501,500	500,43
	2	8,42		1,480	1,485	1,483	486,321	
	3	8,72		1,594	1,523	1,559	513,464	
Dia 4	1	8,68	8,63	1,500	1,490	1,495	490,786	494,30
	2	8,56		1,473	1,488	1,481	485,607	
	3	8,66		1,549	1,529	1,539	506,500	
Dia 5	1	9,05	9,03	1,552	1,541	1,547	509,179	515,01
	2	9,04		1,552	1,495	1,524	500,964	
	3	9,01		1,621	1,616	1,619	534,893	
Dia 6	1	8,77	8,96	1,581	1,573	1,577	520,071	524,48
	2	8,91		1,606	1,589	1,598	527,393	
	3	9,19		1,616	1,571	1,594	525,964	

Tabela A3.17 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,92	6,93	0,139	0,136	0,138	5,964	5,90
	2	6,93		0,137	0,139	0,138	6,143	
	3	6,95		0,134	0,139	0,137	5,607	
Dia 1	1	7,00	7,00	0,308	0,303	0,306	65,964	67,51
	2	6,99		0,317	0,310	0,314	68,821	
	3	7,00		0,311	0,310	0,311	67,750	
Dia 2	1	7,12	7,09	1,002	1,026	1,014	319,000	329,54
	2	7,05		1,051	1,063	1,057	334,357	
	3	7,09		1,071	1,048	1,060	335,250	
Dia 3	1	7,71	7,70	1,162	1,171	1,167	373,464	379,60
	2	7,67		1,185	1,193	1,189	381,500	
	3	7,72		1,196	1,195	1,196	383,821	
Dia 4	1	8,40	8,43	1,295	1,302	1,299	420,607	432,21
	2	8,43		1,351	1,328	1,340	435,250	
	3	8,46		1,355	1,355	1,355	440,786	
Dia 5	1	8,56	8,63	1,319	1,329	1,324	429,714	446,74
	2	8,66		1,395	1,386	1,391	453,464	
	3	8,68		1,403	1,398	1,401	457,036	

Tabela A3.18 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	7,01	7,00	0,139	0,140	0,140	6,679	6,44
	2	6,97		0,139	0,140	0,140	6,679	
	3	7,02		0,137	0,138	0,138	5,964	
Dia 1	1	7,01	7,01	0,305	0,313	0,309	67,214	66,92
	2	7,04		0,308	0,303	0,306	65,964	
	3	6,99		0,311	0,309	0,310	67,571	
Dia 2	1	7,02	7,05	1,019	1,005	1,012	318,286	317,21
	2	7,11		0,993	0,984	0,989	309,893	
	3	7,02		1,035	1,018	1,027	323,464	
Dia 3	1	7,57	7,61	1,153	1,161	1,157	370,071	358,76
	2	7,68		1,115	1,121	1,118	356,143	
	3	7,59		1,095	1,107	1,101	350,071	
Dia 4	1	8,57	8,49	1,250	1,337	1,294	418,821	410,25
	2	8,46		1,286	1,279	1,283	414,893	
	3	8,45		1,225	1,240	1,233	397,036	
Dia 5	1	8,86	8,69	1,289	1,260	1,275	412,036	411,26
	2	8,66		1,324	1,302	1,313	425,786	
	3	8,54		1,232	1,227	1,230	395,964	

Tabela A3.19 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,92	6,94	0,139	0,137	0,138	6,143	6,38
	2	6,98		0,139	0,144	0,142	7,393	
	3	6,93		0,138	0,135	0,137	5,607	
Dia 1	1	6,98	6,89	0,305	0,313	0,309	67,214	64,77
	2	6,72		0,288	0,282	0,285	58,643	
	3	6,97		0,315	0,310	0,313	68,464	
Dia 2	1	7,05	7,03	1,002	0,982	0,992	311,143	308,05
	2	7,01		0,905	0,997	0,951	296,500	
	3	7,03		1,013	1,001	1,007	316,500	
Dia 3	1	7,66	7,62	1,138	1,120	1,129	360,071	351,08
	2	7,59		1,055	1,060	1,058	334,536	
	3	7,61		1,129	1,121	1,125	358,643	
Dia 4	1	8,45	8,45	1,208	1,190	1,199	385,071	384,60
	2	8,48		1,141	1,154	1,148	366,679	
	3	8,43		1,243	1,250	1,247	402,036	
Dia 5	1	8,55	8,61	1,195	1,160	1,178	377,393	375,43
	2	8,72		1,126	1,135	1,131	360,607	
	3	8,56		1,206	1,210	1,208	388,286	

Tabela A3.20 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,94	6,97	0,138	0,142	0,140	6,857	6,50
	2	6,98		0,137	0,137	0,137	5,786	
	3	6,98		0,141	0,139	0,140	6,857	
Dia 1	1	6,93	6,96	0,314	0,304	0,309	67,214	67,81
	2	6,96		0,311	0,303	0,307	66,500	
	3	6,98		0,316	0,316	0,316	69,714	
Dia 2	1	7,00	7,06	0,922	0,966	0,944	294,000	304,48
	2	7,07		0,963	0,980	0,972	303,821	
	3	7,12		1,036	0,973	1,005	315,607	
Dia 3	1	7,54	7,61	1,088	1,078	1,083	343,643	358,40
	2	7,60		1,204	1,089	1,147	366,321	
	3	7,68		1,140	1,147	1,144	365,250	
Dia 4	1	8,42	8,42	1,215	1,222	1,219	392,036	404,18
	2	8,42		1,243	1,241	1,242	400,429	
	3	8,41		1,294	1,300	1,297	420,071	
Dia 5	1	8,60	8,62	1,436	1,230	1,333	432,929	425,19
	2	8,61		1,256	1,253	1,255	404,893	
	3	8,66		1,368	1,325	1,347	437,750	

Tabela A3.21 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,84	6,83	0,133	0,137	0,135	5,071	5,25
	2	6,83		0,130	0,134	0,132	4,000	
	3	6,83		0,139	0,140	0,140	6,679	
Dia 1	1	7,00	6,97	0,362	0,349	0,356	83,821	89,42
	2	6,95		0,341	0,347	0,344	79,714	
	3	6,96		0,413	0,415	0,414	104,714	
Dia 2	1	7,02	7,00	0,839	0,829	0,834	254,714	258,46
	2	7,06		0,876	0,848	0,862	264,714	
	3	6,91		0,832	0,843	0,838	255,964	
Dia 3	1	7,96	8,09	0,635	0,605	0,620	178,286	218,11
	2	8,08		0,750	0,754	0,752	225,429	
	3	8,23		0,807	0,838	0,823	250,607	
Dia 4	1	8,39	8,43	0,908	0,895	0,902	278,821	288,52
	2	8,47		0,917	0,933	0,925	287,214	
	3	8,43		0,958	0,961	0,960	299,536	

Tabela A3.22 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com $1,0 \text{ g}_{\text{gluc}}/\text{L}_{\text{meio}}$ e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,79	6,79	0,142	0,138	0,140	6,857	6,56
	2	6,78		0,137	0,138	0,138	5,964	
	3	6,79		0,140	0,140	0,140	6,857	
Dia 1	1	6,90	6,86	0,279	0,230	0,255	47,750	23,58
	2	6,88		0,173	0,171	0,172	18,286	
	3	6,81		0,135	0,133	0,134	4,714	
Dia 2	1	6,70	6,60	0,545	0,516	0,531	146,321	132,87
	2	6,56		0,448	0,502	0,475	126,500	
	3	6,55		0,502	0,444	0,473	125,786	
Dia 3	1	7,93	7,94	0,523	0,460	0,492	132,393	105,73
	2	8,12		0,435	0,396	0,416	105,250	
	3	7,78		0,343	0,344	0,344	79,536	

Tabela A3.23 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,79	6,79	0,135	0,138	0,137	5,607	6,14
	2	6,79		0,140	0,130	0,135	5,071	
	3	6,80		0,141	0,144	0,143	7,750	
Dia 1	1	6,89	6,92	0,250	0,267	0,259	49,179	55,19
	2	6,95		0,275	0,290	0,283	57,750	
	3	6,92		0,281	0,289	0,285	58,643	
Dia 2	1	6,91	6,92	0,396	0,420	0,408	102,571	115,67
	2	7,09		0,381	0,333	0,357	84,357	
	3	6,77		0,547	0,591	0,569	160,071	
Dia 3	1	7,60	7,84	0,282	0,278	0,280	56,857	80,61
	2	7,78		0,280	0,273	0,277	55,607	
	3	8,15		0,473	0,493	0,483	129,357	

Tabela A3.24 – Avaliação do crescimento em regime mixotrófico com 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200x)

Data	Cultura	pH		Absorvância (a 680 nm)			[Bio. seca] (mg/L)	[Bio. seca] média (mg/L)
		lido	média	A	B	média		
Dia 0	1	6,80	6,78	0,131	0,133	0,132	4,000	4,12
	2	6,77		0,134	0,137	0,136	5,250	
	3	6,78		0,124	0,135	0,130	3,107	
Dia 1	1	6,89	6,88	0,254	0,255	0,255	47,750	47,87
	2	6,90		0,277	0,275	0,276	55,429	
	3	6,86		0,233	0,235	0,234	40,429	
Dia 2	1	6,81	6,82	0,369	0,298	0,334	75,964	83,05
	2	6,86		0,442	0,376	0,409	102,929	
	3	6,78		0,315	0,320	0,318	70,250	
Dia 3	1	7,91	7,82	0,391	0,388	0,390	95,964	70,37
	2	7,99		0,290	0,314	0,302	64,714	
	3	7,57		0,255	0,269	0,262	50,429	

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

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

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

Conforme referido em II.4.c) procedeu-se à liofilização da biomassa húmida colhida para traçar a curva de calibração. Este procedimento vai desidratar a biomassa húmida, obtendo-se no final do processo biomassa seca. Os valores obtidos são os apresentados na Tabela A4.1.

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

m (Epp.) (g)	m (Epp.+ Biom húmida) (g)	m (Biom húmida) (g)	m (Epp.+ Biom seca) (g)	m (Biom seca) (g)	% Biomassa seca
0,8702	1,3857	0,5155	0,9281	0,0579	11,2

Exemplos de cálculo:

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

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

$$\% \text{ Biomassa seca} = \frac{0,0579 \times 100}{0,5155} = 11,2 \%$$

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

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

$$\% \text{ Água} = 100 - 11,2 = 88,8\%$$

NOTA: No procedimento descrito em II.5. o valor do teor de Água foi aproximado a 90%, por uma questão de simplificação de cálculos.

Anexo 5. Determinação das produtividades máximas de biomassa seca

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

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

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

Exemplos de cálculo:

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

$$produtividade = \frac{192,99 - 37,45}{4 - 2} = 77,77 \text{ mg}_{\text{secas}}/\text{L.dia}$$

Todos os valores calculados são apresentados nas Tabelas A5.1 a A5.9, que serviram de base para a construção da Tabela III.1 e da Figura III.12 do capítulo III.2.4.

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

Período	Auto	Mix 0,2.gluc	Mix 0,4.gluc	Mix 0,6.gluc	Mix 0,8.gluc	Mix 1,0.gluc	Mix 1,5.gluc	Mix 2,0.gluc
Dias 0-1	21,19	72,38	94,76	130,12	132,38	93,33	86,19	87,86
Dias 1-2	11,55	47,68	55,30	132,62	196,55	265,18	279,35	285,89
Dias 2-3	45,83	56,85	70,00	70,65	95,18	136,01	55,89	71,85
Dias 3-4	109,70	7,44	7,98	-12,20	-6,13	-6,13	33,69	27,80
Dias 4-5	30,36	22,92	13,15	25,77	8,75	20,71		
Dias 5-6	13,10	19,35	9,94	31,25	0,89	9,46		

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

Período	Auto	Mix 0,2.gluc	Mix 0,4.gluc	Mix 0,6.gluc	Mix 0,8.gluc	Mix 1,0.gluc	Mix 1,5.gluc	Mix 2,0.gluc
Dias 0-2	16,37	60,03	75,03	131,37	164,46	179,26	182,77	186,88
Dias 1-3	28,69	52,26	62,65	101,64	145,86	200,60	167,62	178,87
Dias 2-4	77,77	32,14	38,99	29,23	44,52	64,94	44,79	49,82
Dias 3-5	70,03	15,18	10,57	6,79	1,31	7,29		
Dias 4-6	21,73	21,13	11,55	28,51	4,82	15,09		

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

Período	Auto	Mix 0,2.gluc	Mix 0,4.gluc	Mix 0,6.gluc	Mix 0,8.gluc	Mix 1,0.gluc	Mix 1,5.gluc	Mix 2,0.gluc
Dias 0-3	26,19	58,97	73,35	111,13	141,37	164,84	140,48	148,53
Dias 1-4	55,69	37,32	44,42	63,69	95,20	131,69	122,98	128,51
Dias 2-5	61,96	29,07	30,38	28,08	32,60	50,20		
Dias 3-6	51,05	16,57	10,36	14,94	1,17	8,02		

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

Período	Mix 1,0; 0,8N	Mix 1,0; 0,6N	Mix 1,0; 0,4N	Mix 1,0; 0,2N
Dias 0-1	62,80	58,75	54,17	52,62
Dias 1-2	253,04	243,81	228,15	225,42
Dias 2-3	53,04	44,23	45,60	46,79
Dias 3-4	60,48	37,44	15,00	-4,23
Dias 4-5	5,24	-2,26	-9,58	-15,30

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

Período	Mix 1,0; 0,8N	Mix 1,0; 0,6N	Mix 1,0; 0,4N	Mix 1,0; 0,2N
Dias 0-2	157,92	151,28	141,16	139,02
Dias 1-3	153,04	144,02	136,88	136,10
Dias 2-4	56,76	40,83	30,30	21,28
Dias 3-5	32,86	17,59	2,71	-9,76

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

Período	Mix 1,0; 0,8N	Mix 1,0; 0,6N	Mix 1,0; 0,4N	Mix 1,0; 0,2N
Dias 0-3	122,96	115,60	109,31	108,27
Dias 1-4	122,18	108,49	96,25	89,33
Dias 2-5	39,58	26,47	17,00	9,09

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

Período	Mix 1,0; 2,5x NaCl	Mix 1,0; 5x NaCl	Mix 1,0; 7,5x NaCl	Mix 1,0; 10x NaCl	Mix 1,0; 50x NaCl
Dias 0-1	61,61	60,48	58,39	61,31	84,17
Dias 1-2	262,02	250,30	243,27	236,67	169,05
Dias 2-3	50,06	41,55	43,04	53,93	-40,36
Dias 3-4	52,62	51,49	33,51	45,77	70,42
Dias 4-5	14,52	1,01	-9,17	21,01	

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

Período	Mix 1,0; 2,5x NaCl	Mix 1,0; 5x NaCl	Mix 1,0; 7,5x NaCl	Mix 1,0; 10x NaCl	Mix 1,0; 50x NaCl
Dias 0-2	161,82	155,39	150,83	148,99	126,61
Dias 1-3	156,04	145,92	143,15	145,30	64,35
Dias 2-4	51,34	46,52	38,27	49,85	15,03
Dias 3-5	33,57	26,25	12,17	33,39	

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

Período	Mix 1,0; 2,5x NaCl	Mix 1,0; 5x NaCl	Mix 1,0; 7,5x NaCl	Mix 1,0; 10x NaCl	Mix 1,0; 50x NaCl
Dias 0-3	124,56	117,44	114,90	117,30	70,95
Dias 1-4	121,57	114,44	106,61	112,12	66,37
Dias 2-5	39,07	31,35	22,46	40,24	

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

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

Ensaio <i>Chlorella vulgaris</i>	Posição Matriz / outros	mte (g)	mte+bm (g)	mbm (g)	mH2O	Clorofórmio (mL)		Metanol (mL)		Água destilada (mL)		mgoblé (g)	mgoblé+crf_0 (g)		mgoblé + óleo (g)	móleo (g)	%óleo	%óleo final	média %óleo final	Produtividade máxima (mg _{secas} /L.dia)	Produtividade máxima de lípidos (mg/L.dia)
						1ªfase	2ªfase	1ªfase	2ªfase	1ªfase	2ªfase		0min	60min							
auto_1	B2	11,9219	12,4702	0,5483	0,4935	0,62	0,62	1,23	0,00	0,00	0,62	32,2010	33,3000	32,2092	32,2092	0,0082	14,96	16,62			
auto_2	B2+B4	11,9067	12,6190	0,7123	0,6411	0,80	0,80	1,60	0,00	0,00	0,80	32,2406	33,7500	32,2513	32,2513	0,0107	15,02	16,69	16,65	109,7	18,3
mix0,2_1	B6+B8	12,0131	12,5688	0,5557	0,5001	0,63	0,63	1,25	0,00	0,00	0,63	30,6746	31,5200	30,6818	30,6818	0,0072	12,96	14,40	14,45	72,4	10,5
mix0,2_2	B6+B8	12,1048	12,7178	0,6130	0,5517	0,69	0,69	1,38	0,00	0,00	0,69	33,1618	34,2000	33,1698	33,1698	0,0080	13,05	14,50			
mix0,4_1	B10+B12	11,8757	12,9376	1,0619	0,9557	1,19	1,19	2,39	0,00	0,00	1,19	34,3701	35,7700	34,3790	34,379	0,0089	8,38	9,31	9,41	94,8	8,9
mix0,4_2	B10+B12	12,0389	13,2185	1,1796	1,0616	1,33	1,33	2,65	0,00	0,00	1,33	33,6256	35,1900	33,6357	33,6357	0,0101	8,56	9,51			
mix0,6_1	B14+B16	11,8629	13,0925	1,2296	1,1066	1,38	1,38	2,77	0,00	0,00	1,38	32,5639	33,7100	32,5742	32,5742	0,0103	8,38	9,31	10,09	132,6	13,4
mix0,6_2	B14+B16	11,9793	13,0937	1,1144	1,0030	1,25	1,25	2,51	0,00	0,00	1,25	31,8016	32,7000	31,8125	31,8125	0,0109	9,78	10,87			
mix0,8_1	B18+B20	11,9867	12,7387	0,7520	0,6768	0,85	0,85	1,69	0,00	0,00	0,85	33,1615	35,3900	33,1731	33,1731	0,0116	15,43	17,14	16,56	196,5	32,5
mix0,8_2	B18+B20	11,8761	12,7593	0,8832	0,7949	0,99	0,99	1,99	0,00	0,00	0,99	32,2405	34,6100	32,2532	32,2532	0,0127	14,38	15,98			
mix1,0_1	B22+B24+A25	12,1036	13,0914	0,9878	0,8890	1,11	1,11	2,22	0,00	0,00	1,11	32,2008	35,7000	32,2155	32,2155	0,0147	14,88	16,54	16,56	265,2	43,9
mix1,0_2	B22+B24+A25	11,8638	12,6748	0,8110	0,7299	0,91	0,91	1,82	0,00	0,00	0,91	30,6747	34,5400	30,6868	30,6868	0,0121	14,92	16,58			
mix1,5_1	E5+E7+E9	11,9793	13,3025	1,3232	1,1909	1,49	1,49	2,98	0,00	0,00	1,49	30,6749	33,8200	30,6911	30,6911	0,0162	12,24	13,60	13,58	279,3	37,9
mix1,5_2	E5+E7+E9	11,9211	13,3226	1,4015	1,2614	1,58	1,58	3,15	0,00	0,00	1,58	32,5634	36,1100	32,5805	32,5805	0,0171	12,20	13,56			
mix2,0_1	E11+E13+E15	11,8631	13,2670	1,4039	1,2635	1,58	1,58	3,16	0,00	0,00	1,58	32,2403	35,4700	32,2588	32,2588	0,0185	13,18	14,64	14,25	285,9	40,7
mix2,0_2	E11+E13+E15	12,1033	13,4577	1,3544	1,2190	1,52	1,52	3,05	0,00	0,00	1,52	32,2016	35,3800	32,2185	32,2185	0,0169	12,48	13,86			
mix0,2N_1	C1+C3	12,0189	13,1507	1,1318	1,0186	1,27	1,27	2,55	0,00	0,00	1,27	32,5637	35,0400	32,5851	32,5851	0,0214	18,91	21,01	19,83	225,4	44,7
mix0,2N_2	C1+C3	12,0662	13,0554	0,9892	0,8903	1,11	1,11	2,23	0,00	0,00	1,11	31,8006	33,9400	31,8172	31,8172	0,0166	16,78	18,65			
mix0,4N_1	C5+C7	11,9477	13,3524	1,4047	1,2642	1,58	1,58	3,16	0,00	0,00	1,58	33,6255	36,9000	33,6421	33,6421	0,0166	11,82	13,13	13,73	228,2	31,3
mix0,4N_2	C5+C7	11,9606	13,2796	1,3190	1,1871	1,48	1,48	2,97	0,00	0,00	1,48	34,3692	37,5100	34,3862	34,3862	0,0170	12,89	14,32			
mix0,6N_1	C9+C11	12,0770	13,3047	1,2277	1,1049	1,38	1,38	2,76	0,00	0,00	1,38	32,2403	34,3200	32,2545	32,2545	0,0142	11,57	12,85	13,39	243,8	32,6
mix0,6N_2	C9+C11	12,0251	13,3736	1,3485	1,2137	1,52	1,52	3,03	0,00	0,00	1,52	33,1620	35,5900	33,1789	33,1789	0,0169	12,53	13,92			
mix0,8N_1	C13+C15	11,8499	12,8838	1,0339	0,9305	1,16	1,16	2,33	0,00	0,00	1,16	30,6750	32,1800	30,6874	30,6874	0,0124	11,99	13,33	13,81	253,0	35,0
mix0,8N_2	C13+C15	12,0785	13,2674	1,1889	1,0700	1,34	1,34	2,68	0,00	0,00	1,34	32,2011	34,1100	32,2164	32,2164	0,0153	12,87	14,30			
mix2,5NaCl_1	D2+D4	11,8629	13,1100	1,2471	1,1224	1,40	1,40	2,81	0,00	0,00	1,40	31,5048	34,9700	31,5206	31,5206	0,0158	12,67	14,08	14,22	262,0	37,2
mix2,5NaCl_2	D2+D4	12,1033	13,0632	0,9599	0,8639	1,08	1,08	2,16	0,00	0,00	1,08	31,6592	33,4400	31,6716	31,6716	0,0124	12,92	14,35			
mix5,0NaCl_1	D6+D8	11,9858	13,2974	1,3116	1,1804	1,48	1,48	2,95	0,00	0,00	1,48	33,0667	35,7900	33,0853	33,0853	0,0186	14,18	15,76	15,45	250,3	38,7
mix5,0NaCl_2	D6+D8	11,8760	13,2333	1,3573	1,2216	1,53	1,53	3,05	0,00	0,00	1,53	32,5566	35,3300	32,5751	32,5751	0,0185	13,63	15,14			
mix7,5NaCl_1	D10+D12	12,0759	13,2349	1,1590	1,0431	1,30	1,30	2,61	0,00	0,00	1,30	31,8000	35,5800	31,8188	31,8188	0,0188	16,22	18,02	17,37	243,3	42,3
mix7,5NaCl_2	D10+D12	11,8460	12,9961	1,1501	1,0351	1,29	1,29	2,59	0,00	0,00	1,29	33,1616	36,8400	33,1789	33,1789	0,0173	15,04	16,71			
mix10,0NaCl_1	D14+D16	12,0241	13,1044	1,0803	0,9723	1,22	1,22	2,43	0,00	0,00	1,22	33,6253	36,6500	33,6427	33,6427	0,0174	16,11	17,90	18,50	236,7	43,8
mix10,0NaCl_2	D14+D16	12,0742	13,3075	1,2333	1,1100	1,39	1,39	2,77	0,00	0,00	1,39	34,3690	38,3800	34,3902	34,3902	0,0212	17,19	19,10			
mix50,0NaCl_1	E1+E3	12,0390	13,3338	1,2948	1,1653	1,46	1,46	2,91	0,00	0,00	1,46	31,6584	35,0500	31,6868	31,6868	0,0284	21,93	24,37	23,01	169,0	38,9
mix50,0NaCl_2	E1+E3	11,9056	12,6598	0,7542	0,6788	0,85	0,85	1,70	0,00	0,00	0,85	33,0662	35,1400	33,0809	33,0809	0,0147	19,49	21,66			

Anexo 7. Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm), medida no espectrofotómetro UV-visível UV-160A, aquando das leituras de Abs para culturas constantes nas Tabelas A3.1 a A3.24

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

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

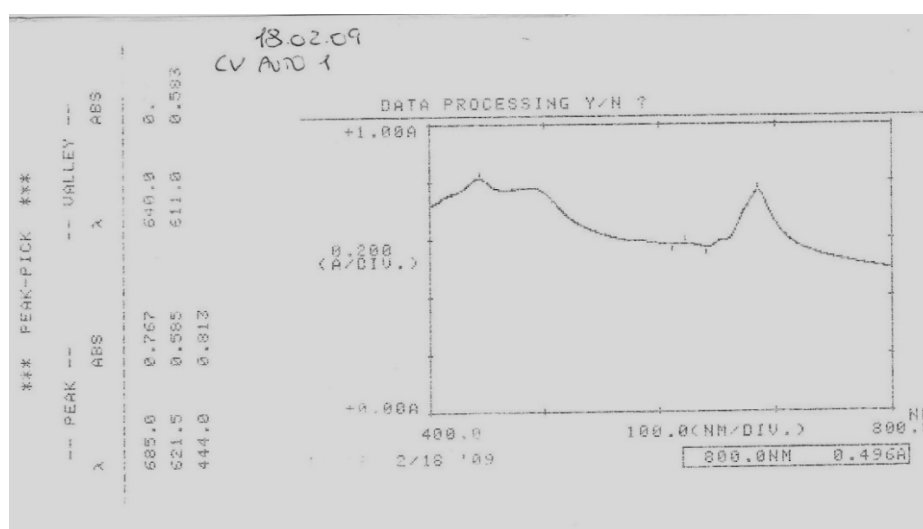


Figura A7.1 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime autotrófico – dia zero (17-02-2009, por engano registado como sendo 18-02-2009).

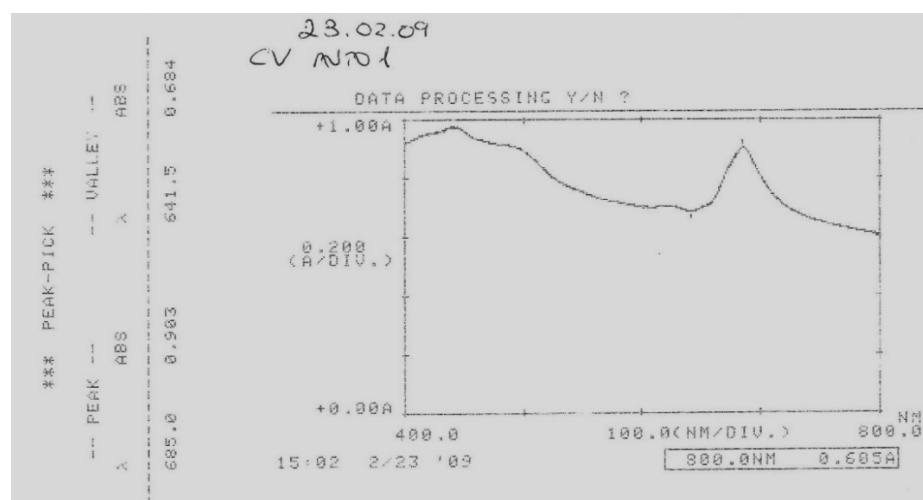


Figura A7.2 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime autotrófico – dia seis.

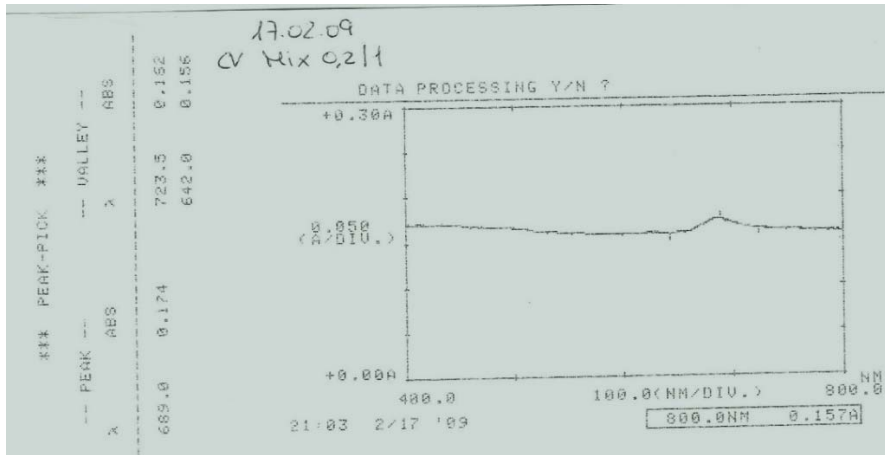


Figura A7.3 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime de mixotrófico 0,2 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

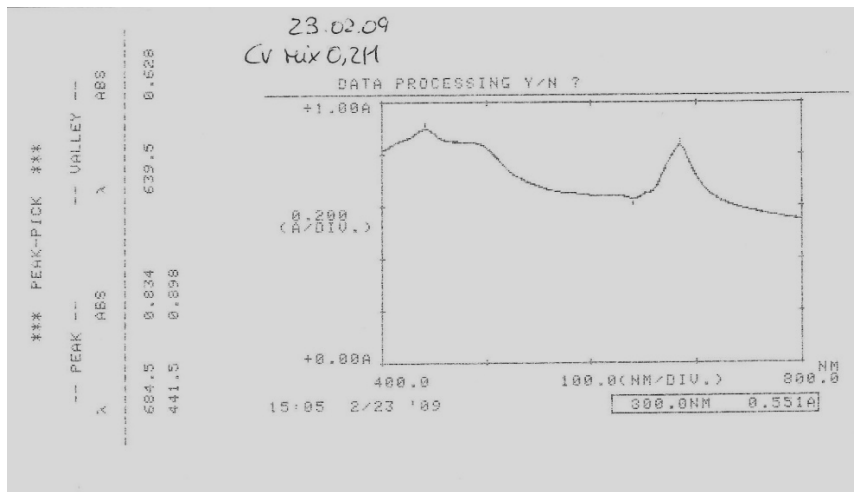


Figura A7.4 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,2 g_{gluc}/L_{meio} – dia 6.

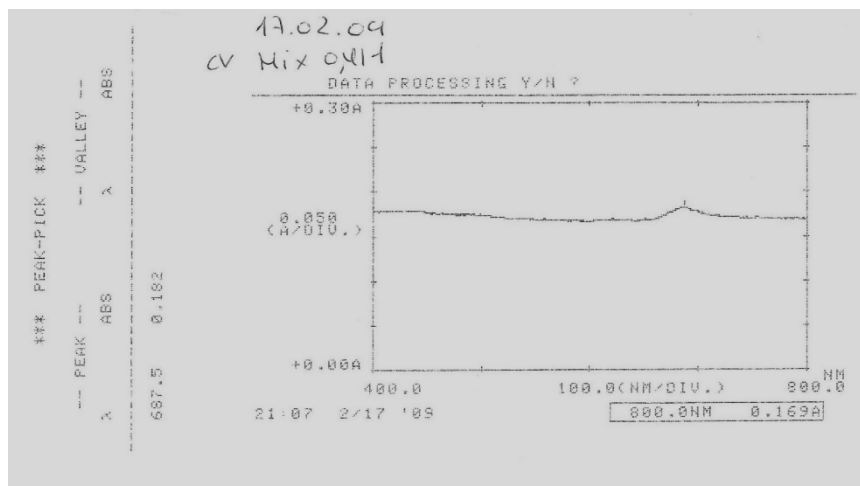


Figura A7.5 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,4 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

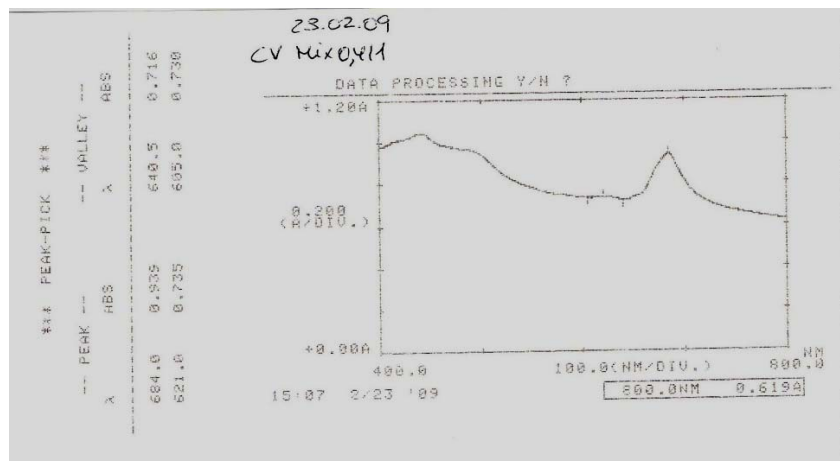


Figura A7.6 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,4 g_{gluc}/L_{meio} – dia 6.

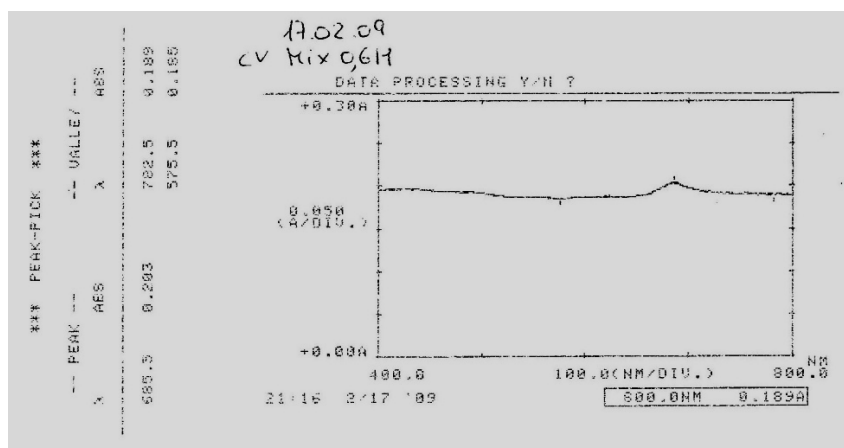


Figura A7.7 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,6 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

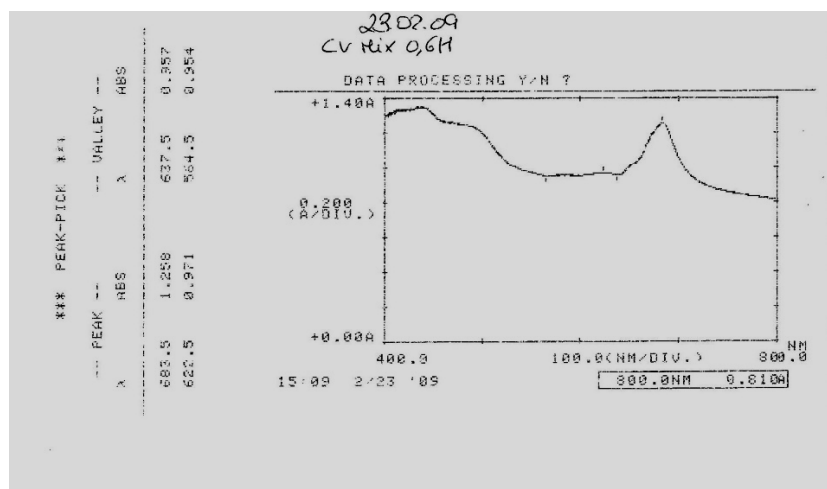


Figura A7.8 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,6 g_{gluc}/L_{meio} – dia 6.

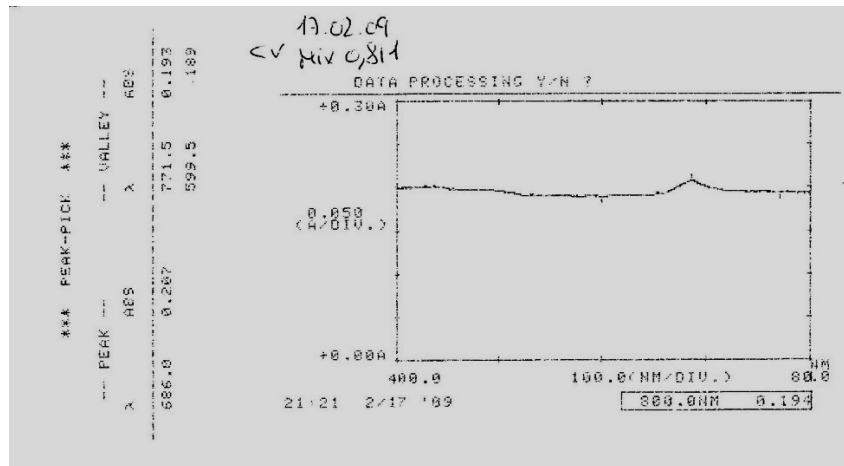


Figura A7.9 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,8 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

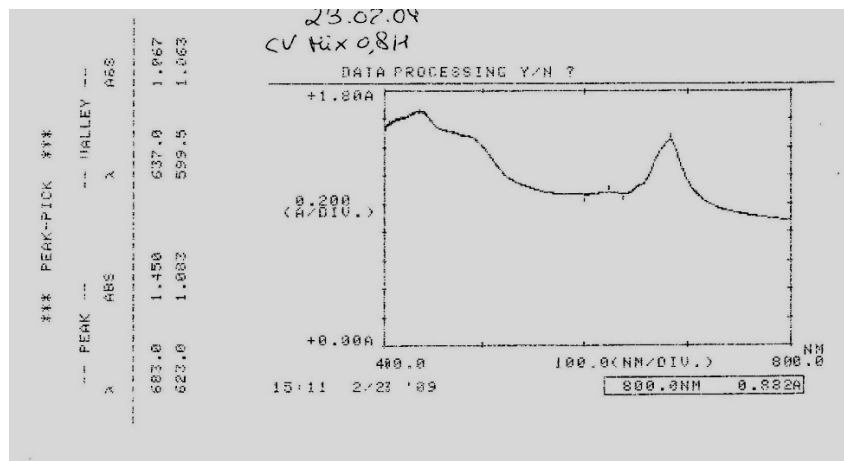


Figura A7.10 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 0,8 g_{gluc}/L_{meio} – dia 6.

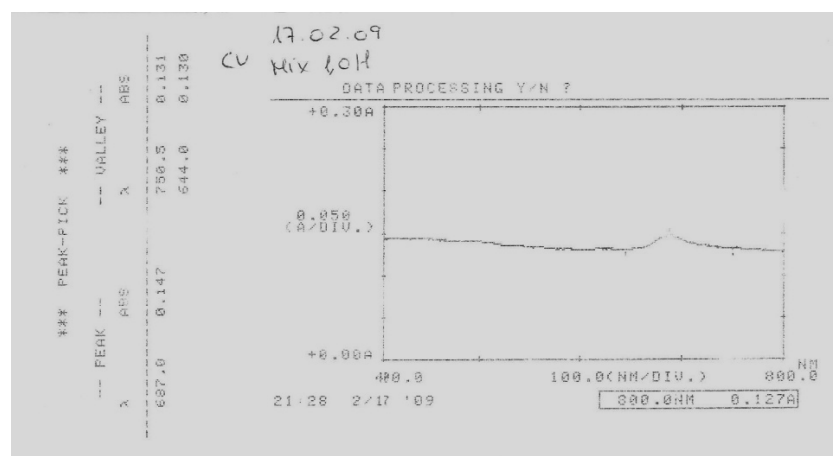


Figura A7.11 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

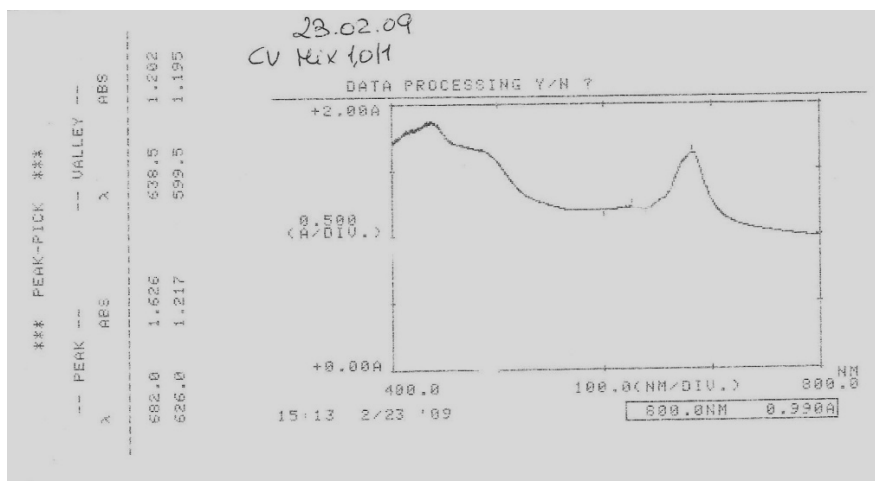


Figura A7.12 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 6.

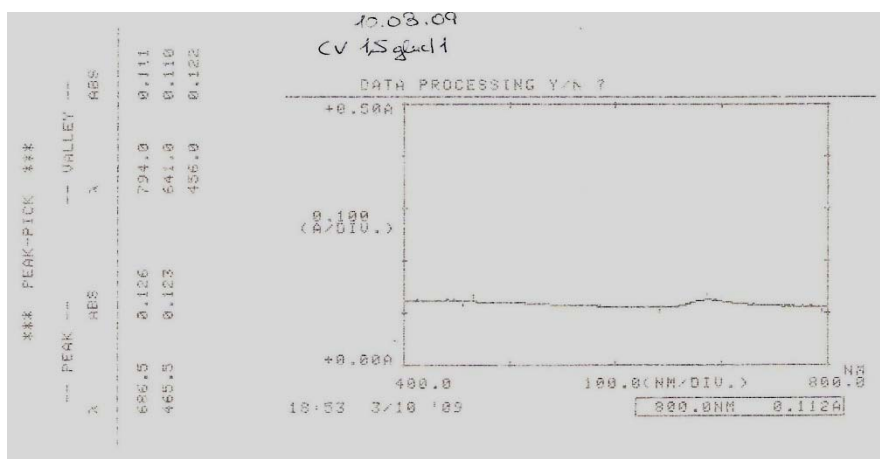


Figura A7.13 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,5 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

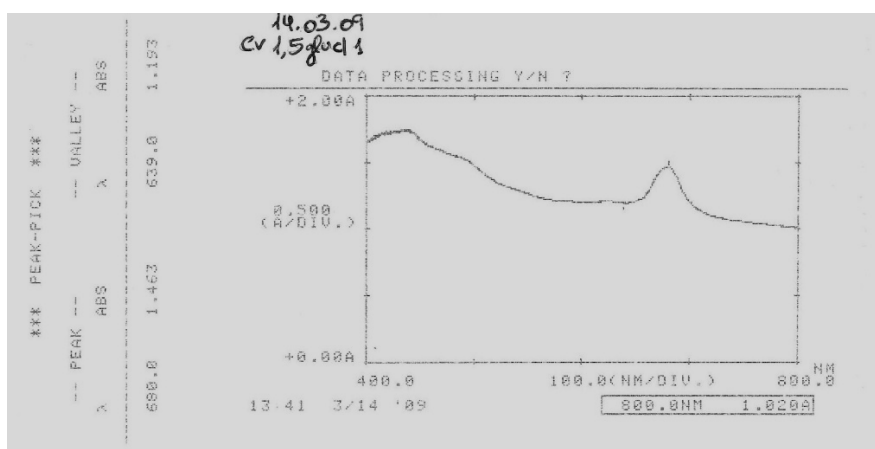


Figura A7.14 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,5 g_{gluc}/L_{meio} – dia 4.

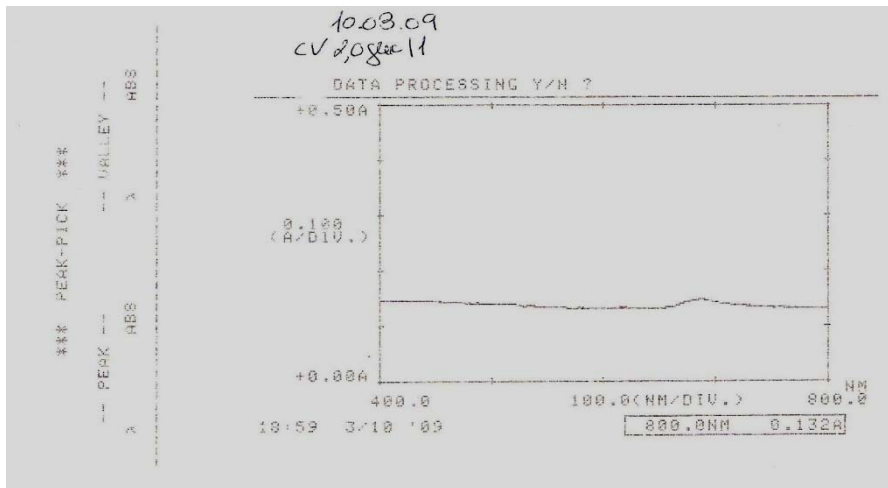


Figura A7.15 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

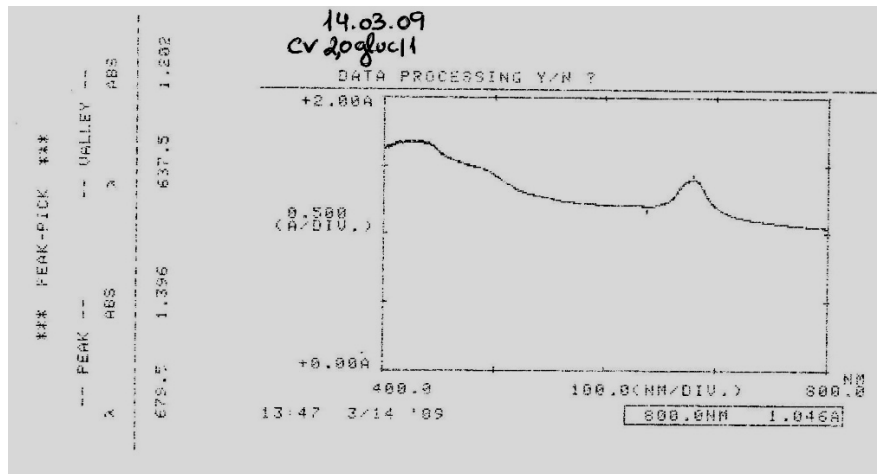


Figura A7.16 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 4.

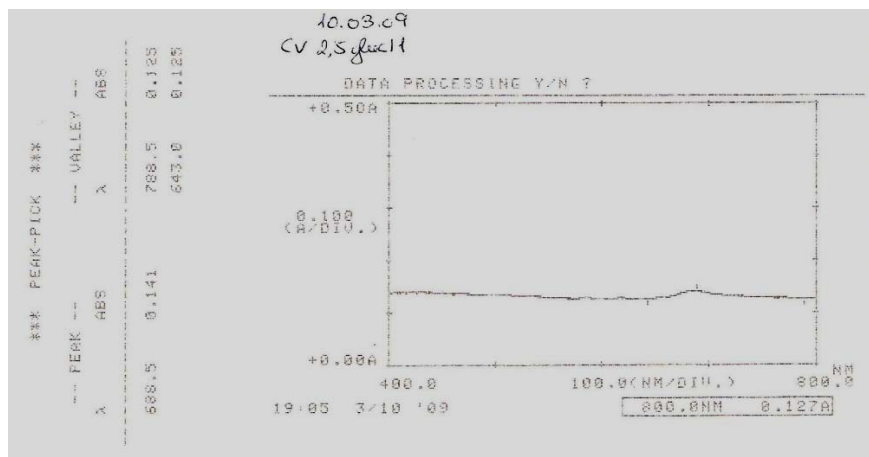


Figura A7.17 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,5 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

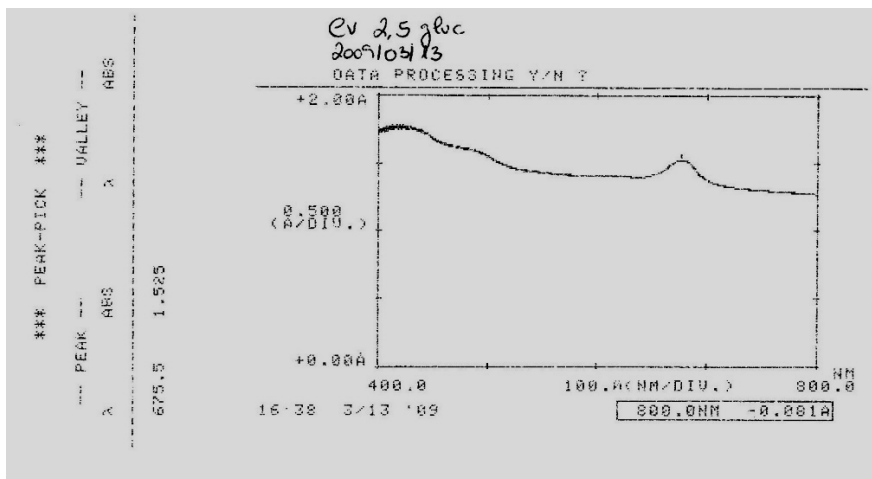


Figura A7.18 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 2,5 g_{gluc}/L_{meio} – dia 3.

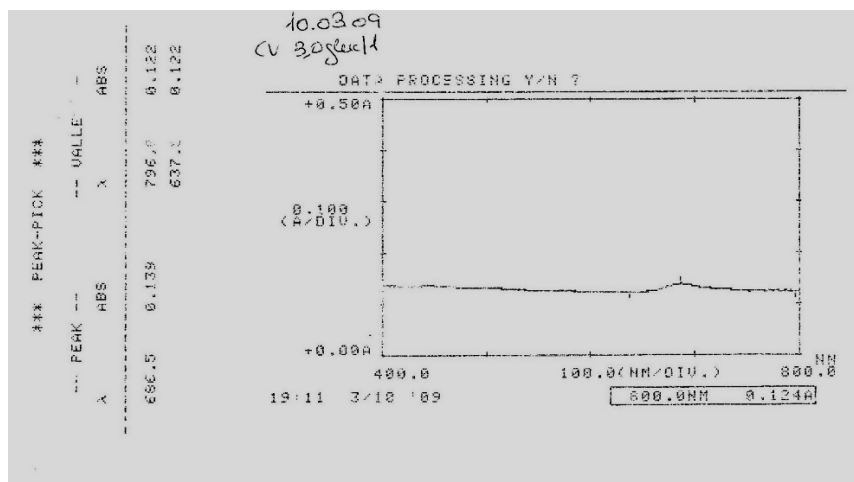


Figura A7.19 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 3,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 0.

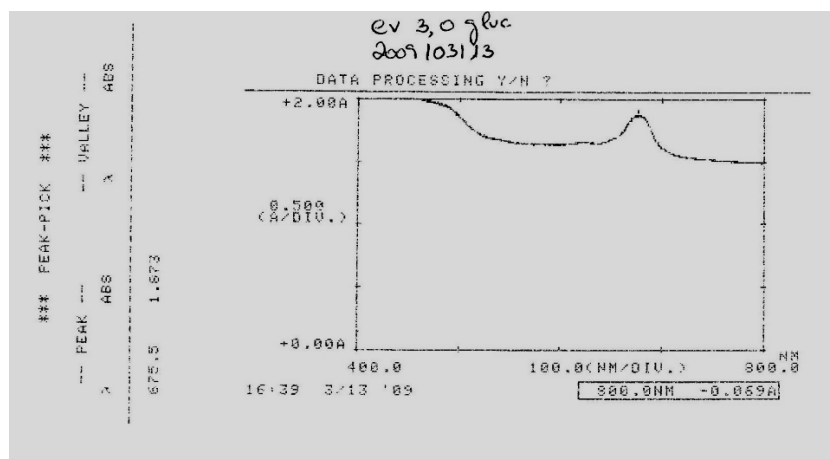


Figura A7.20 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 3,0 g_{gluc}/L_{meio} – dia 3.

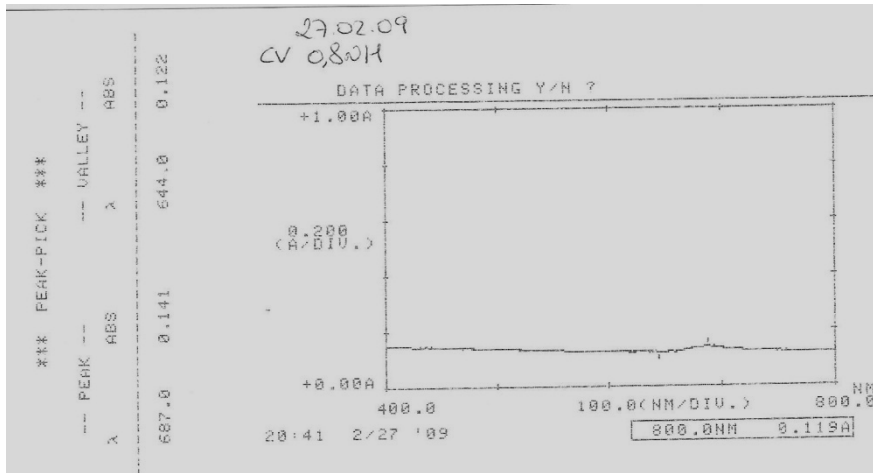


Figura A7.21 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 20% (0,8N) – dia 0.

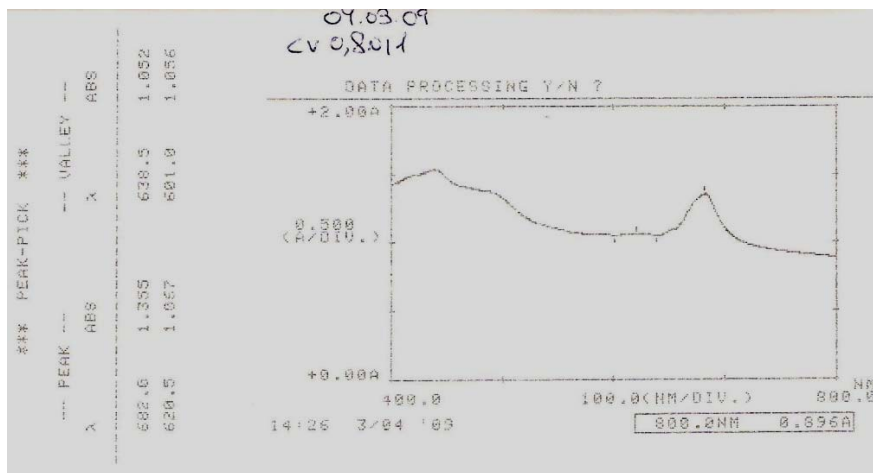


Figura A7.22 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 20% (0,8N) – dia 5.

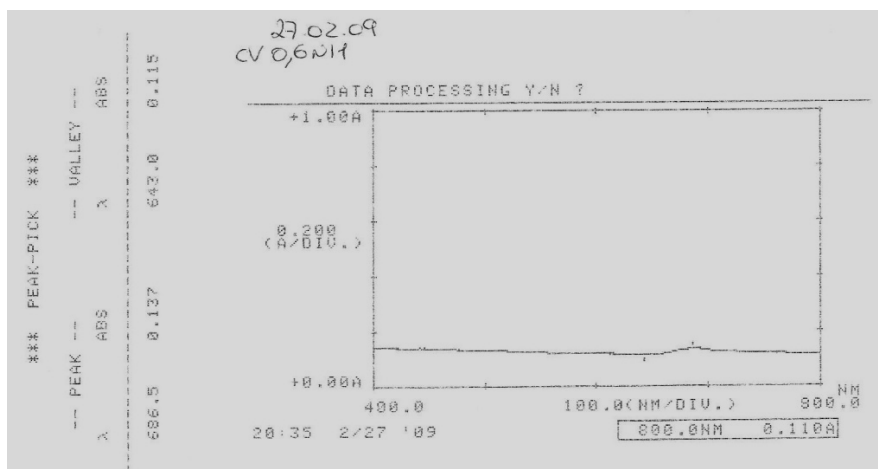


Figura A7.23 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 0.

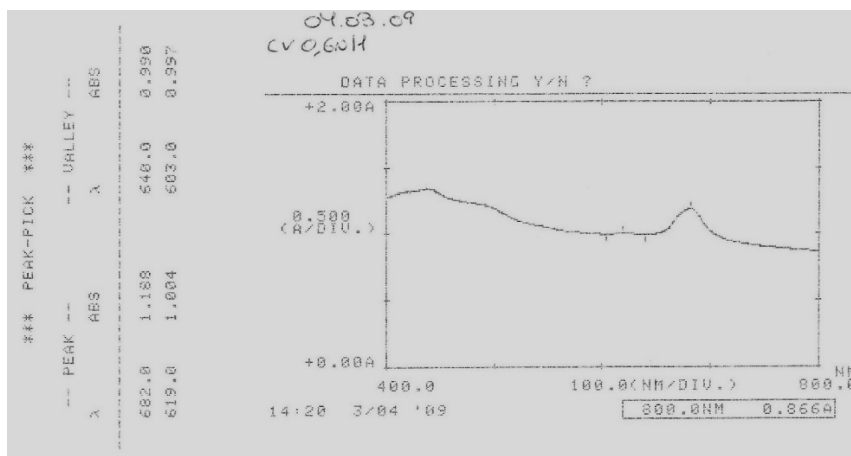


Figura A7.24 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 40% (0,6N) – dia 5.

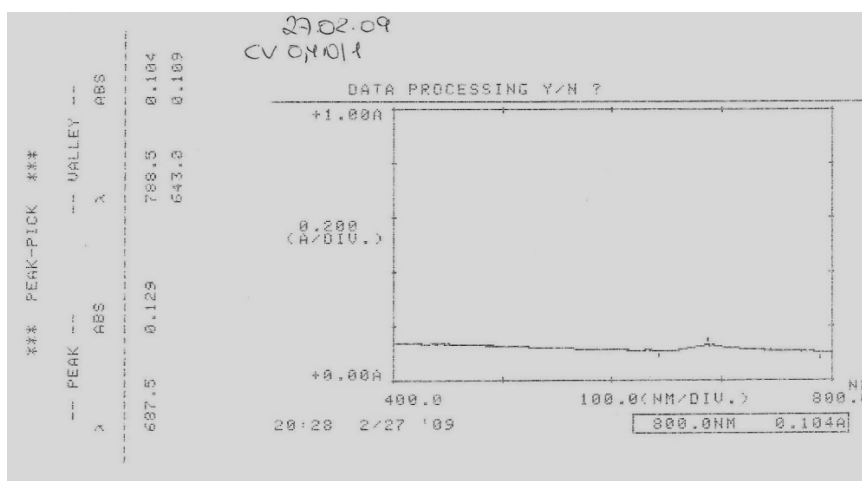


Figura A7.25 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 60% (0,4N) – dia 0.

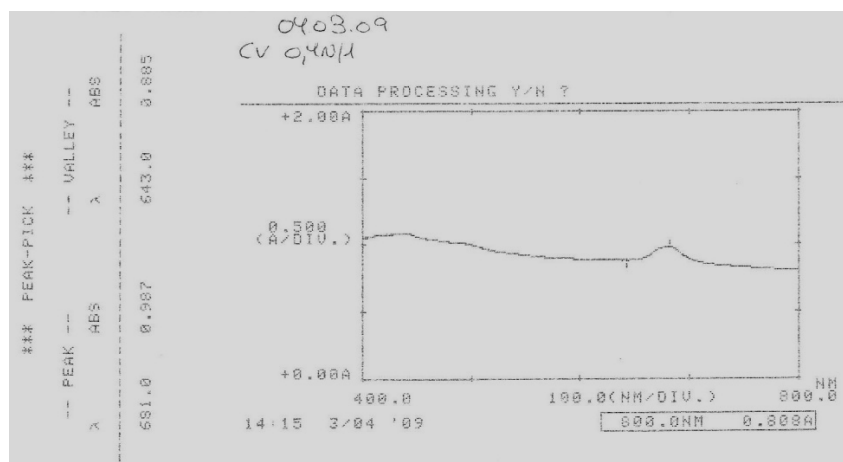


Figura A7.26 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtracção da fonte de azoto em 60% (0,4N) – dia 5.

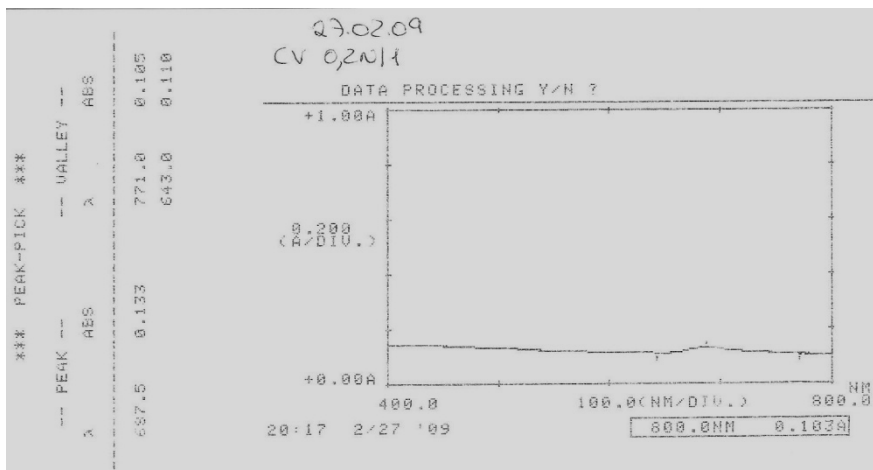


Figura A7.27 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 0.

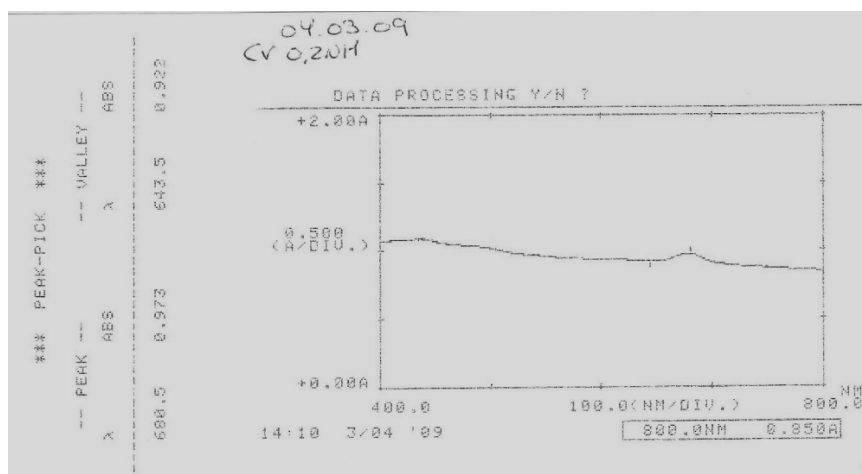


Figura A7.28 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e subtração da fonte de azoto em 80% (0,2N) – dia 5.

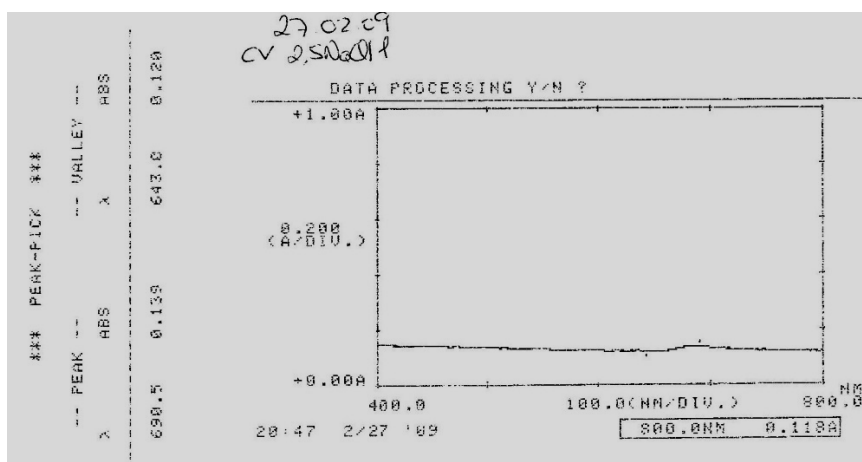


Figura A7.29 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x) – dia 0.

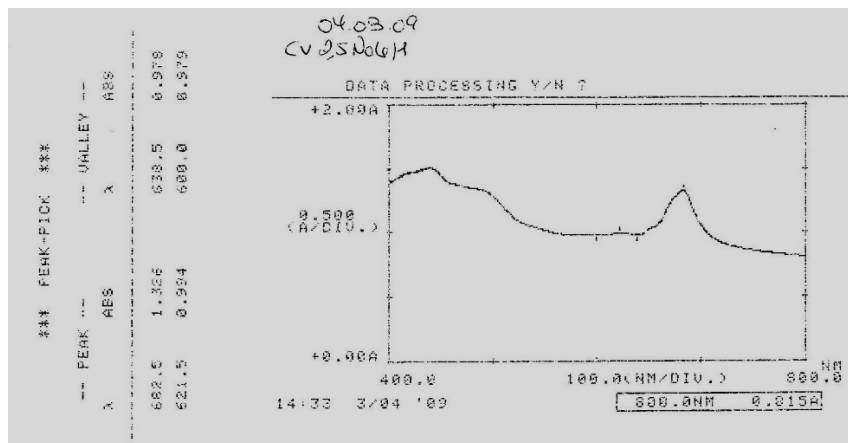


Figura A7.30 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 250% (2,5x) – dia 5.

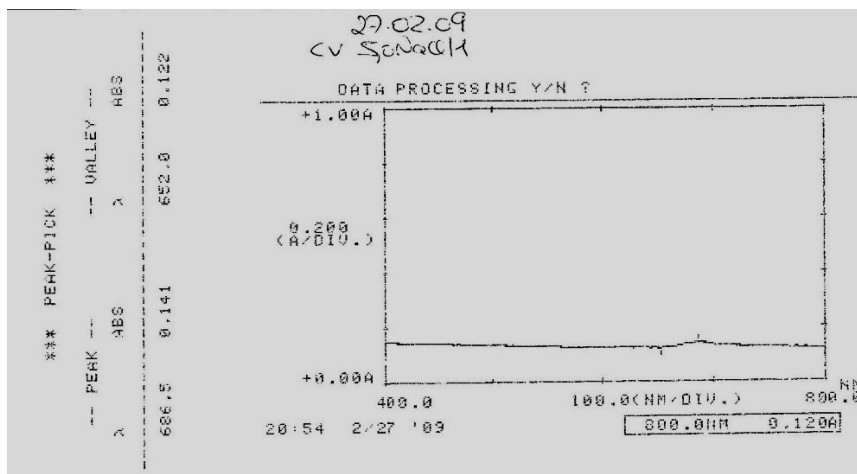


Figura A7.31 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x) – dia 0.

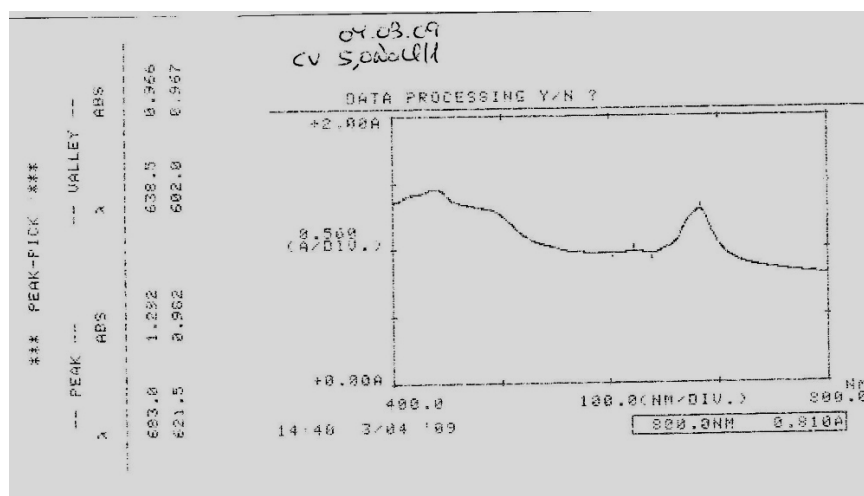


Figura A7.32 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 500% (5,0x) – dia 5.

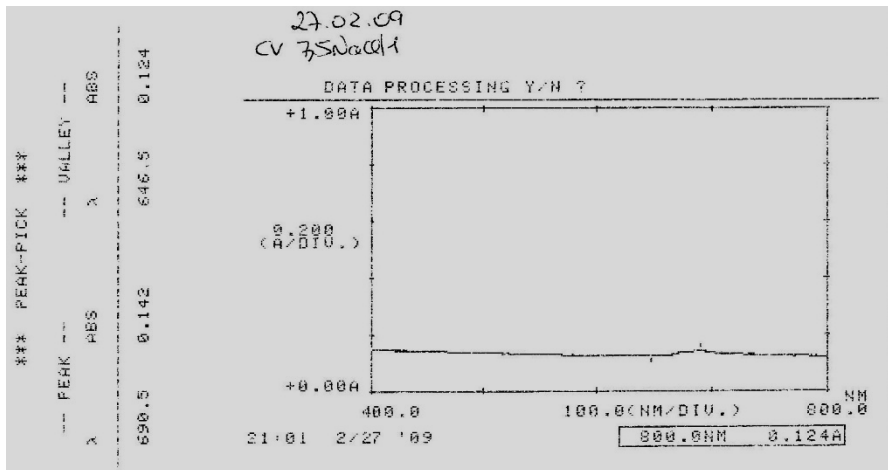


Figura A7.33 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x) – dia 0.

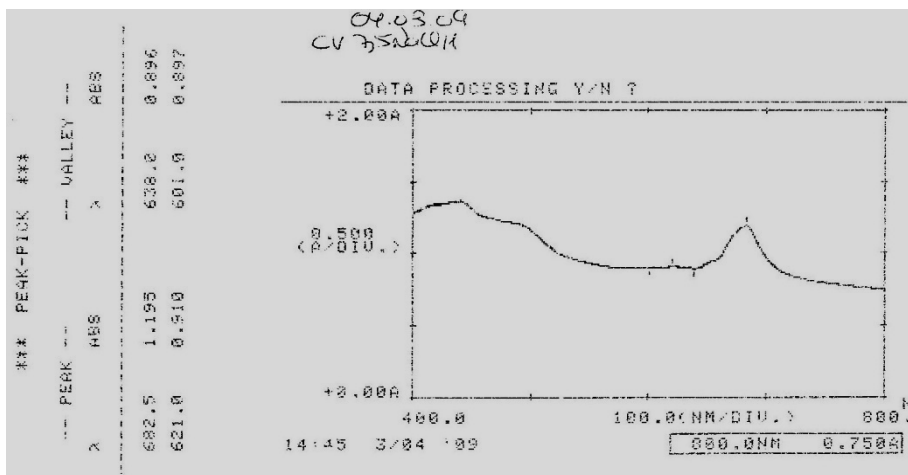


Figura A7.34 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 750% (7,5x) – dia 5.

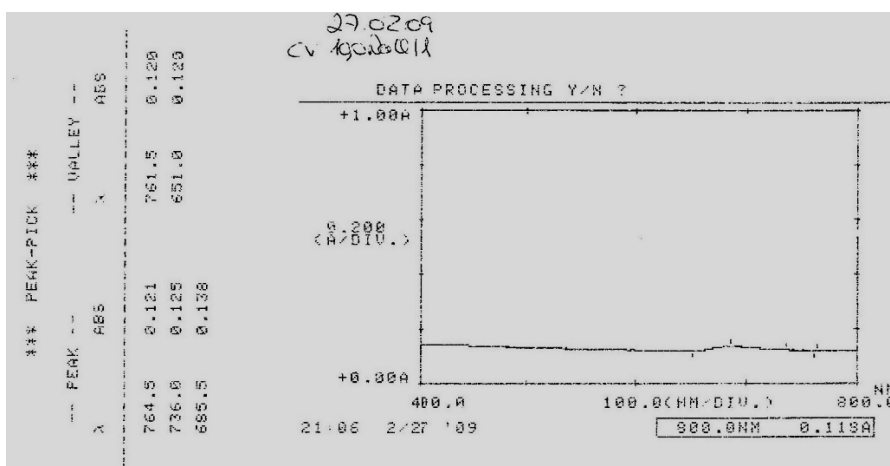


Figura A7.35 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10,0x) – dia 0.

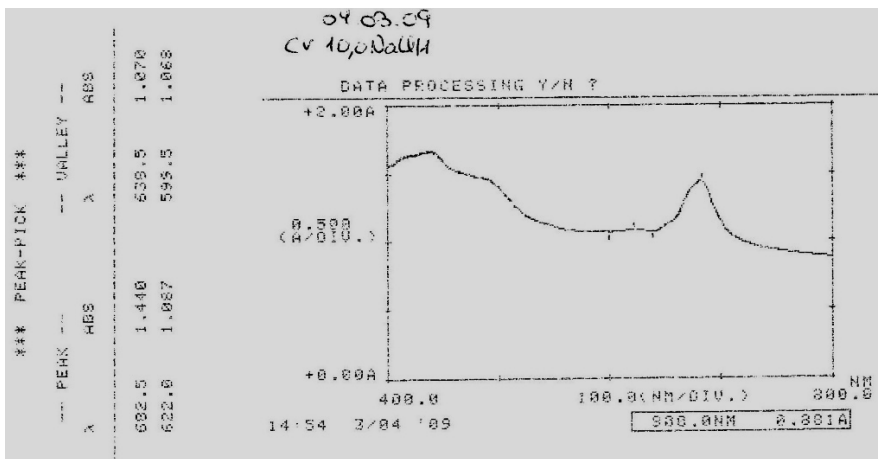


Figura A7.36 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 1.000% (10,0x) – dia 5.

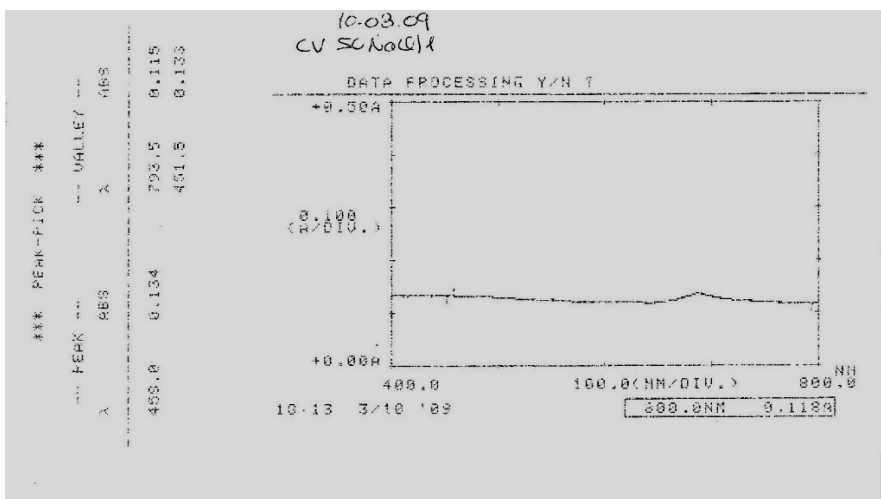


Figura A7.37 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50,0x) – dia 0.

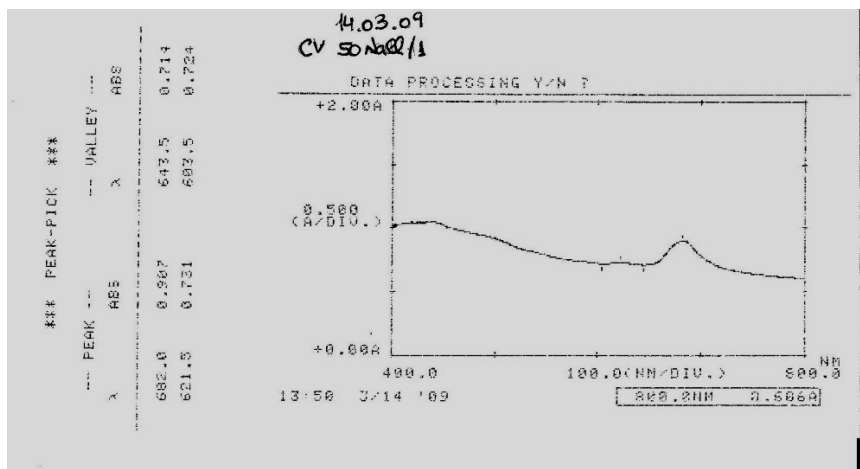


Figura A7.38 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 5.000% (50,0x) – dia 4.

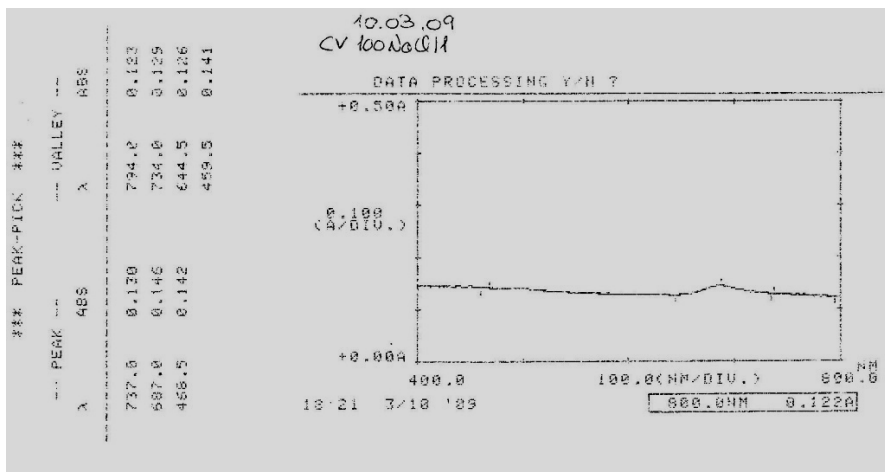


Figura A7.39 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100,0x) – dia 0.

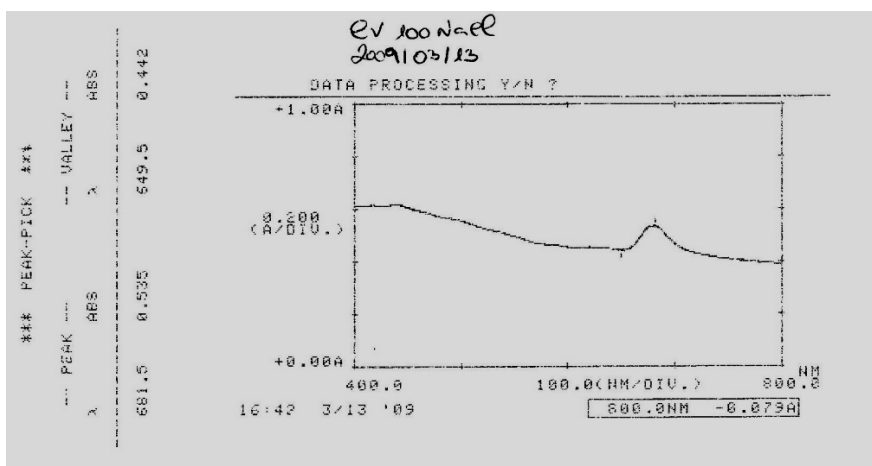


Figura A7.40 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 10.000% (100,0x) – dia 3.

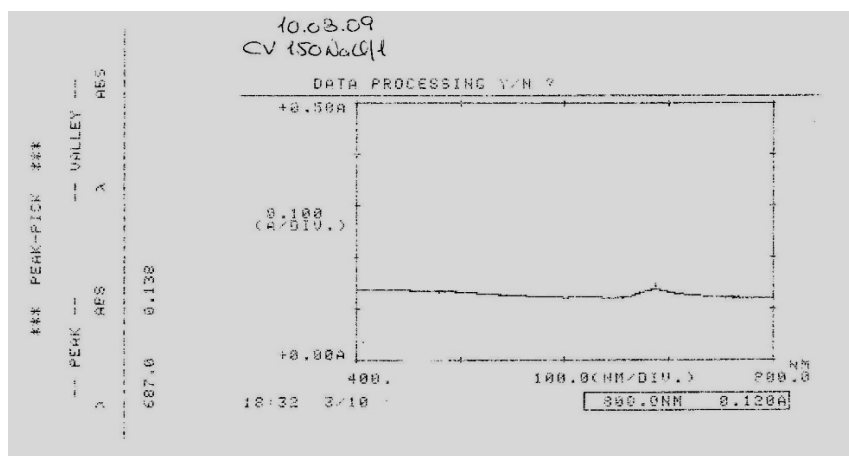


Figura A7.41 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150,0x) – dia 0.

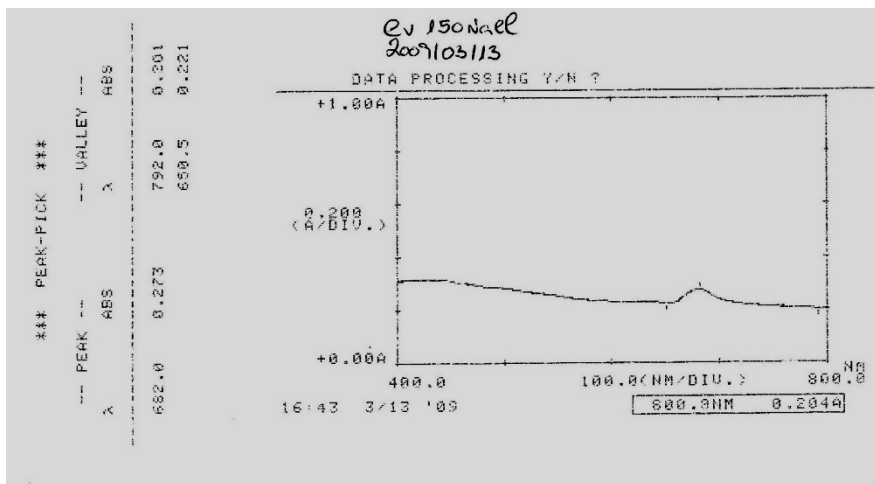


Figura A7.42 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 15.000% (150,0x) – dia 3.

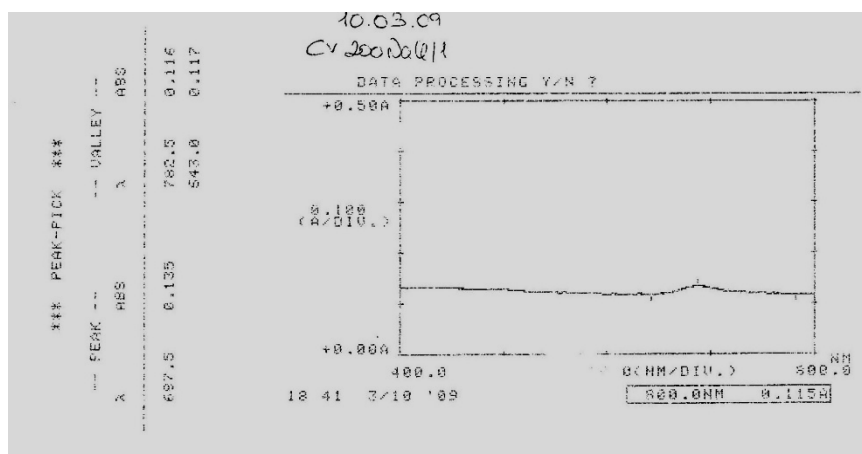


Figura A7.43 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200,0x) – dia 0.

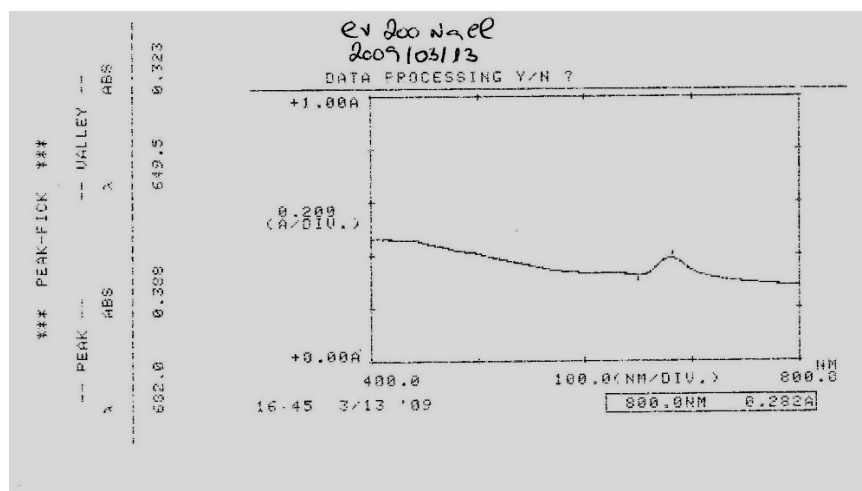


Figura A7.44 – Curva de Abs vs λ (nm) para regime mixotrófico 1,0 g_{gluc}/L_{meio} e adição de cloreto de sódio em 20.000% (200,0x) – dia 3.