



Estudo da influência de parâmetros ambientais (Fe e N) na produtividade lipídica da microalga *Chlamydomonas* sp.

ADELAIDE AMÉLIA MARTINS

Novembro de 2012

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL



Estudo da influência de parâmetros ambientais (Fe e N) na produtividade lipídica da microalga *Chlamydomonas sp.*

Adelaide Amélia Martins

Novembro de 2012

Orientadora:

Doutora Nídia de Sá Caetano

Co-orientadora:

Doutora Teresa Mata

Agradecimentos

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e sem as quais não teria sido possível a sua concretização, deixo aqui expresso um profundo agradecimento.

Agradeço à Doutora Nídia de Sá Caetano por me ter dado a conhecer o mundo das microalgas e a oportunidade de realizar esta dissertação, a simpatia e paciência com que sempre me tratou e toda a orientação e incansável ajuda ao longo destes meses de trabalho.

À Doutora Teresa Mata agradeço a simpatia com que me recebeu, a partilha dos seus conhecimentos e toda a disponibilidade e ajuda demonstrada no decorrer desta dissertação.

Agradeço aos engenheiros responsáveis pelo laboratório de Tecnologia Química do ISEP, Tomás Albergaria, Magda Marques e Marília Batista e, à Dona Lurdes a simpatia e apoio que sempre me prestaram.

Ao Engenheiro Octávio Oliveira agradeço a simpatia, camaradagem e todo o conhecimento que me foi transmitido.

Agradeço às minhas colegas de laboratório, Carolina Melo, Vânia Silva e Joana Teixeira o companheirismo, o bom ambiente de trabalho e, principalmente a ajuda e o apoio nas horas de maior desânimo.

Aos estagiários Emanuel Rocha, Rafael Morais, Tiago Sá, Bruno Silva e João Pinto agradeço a companhia, boa disposição e auxílio no desenvolvimento experimental deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos a amizade, a motivação e o apoio ao longo destes meses, em especial à Filipa pela paciência, compreensão e pelas palavras de força nos momentos mais difíceis de ultrapassar.

Ao meu namorado, com quem partilho todos os momentos da minha vida, agradeço todo o carinho, apoio, paciência, compreensão e confiança transmitida ao longo deste desafio.

Agradeço, especialmente, aos meus pais e à minha irmã, a quem gostaria de dedicar esta tese, pela confiança, apoio e amor incondicionais, por sempre acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

Resumo

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como objetivo o estudo da influência dos parâmetros ambientais, azoto e ferro, na produtividade lipídica da microalga *Chlamydomonas sp.* tendo em vista a sua utilização como matéria-prima para produção de biodiesel. Deste modo, realizaram-se ensaios tendo em vista a otimização das condições de produção das microalgas com vista à obtenção de elevadas taxas de crescimento de biomassa e/ou de elevados teores lipídicos, bem como testes com vista à extração do óleo da biomassa microalgal e à transformação do óleo extraído em biodiesel.

A influência do aumento da concentração de azoto (N) e ferro (Fe) nas culturas foi estudada variando a concentração de N, sob a forma de nitrato, em 5 e 10 vezes e, a concentração de Fe em 3, 5 e 10 vezes. O suplemento de Fe no meio de cultura potenciou o crescimento da *Chlamydomonas sp.*, cerca de 1,5 vezes relativamente ao meio padrão, verificando-se os melhores resultados para o ensaio em meio padrão com adição de 5x Fe, a que correspondeu uma produtividade média e máxima de $14,82 \pm 0,52$ e $33,11 \pm 1,55$ mg/L.dia, respetivamente.

O teor lipídico das células de *Chlamydomonas sp.* foi avaliado através da extração dos lípidos totais da biomassa das diferentes culturas, colhida no final do período de cultivo. As microalgas cultivadas nos ensaios em meio padrão com adição de ferro registaram teores lipídicos mais elevados, $24,52 \pm 2,99\%$, $20,91 \pm 5,01\%$ e $21,33 \pm 3,60\%$, respetivamente para os ensaios em meio padrão com adição de 3x Fe, 5x Fe e 10x Fe. Os melhores valores de produtividade lipídica máxima também se verificaram nestas condições, sendo de $6,70 \pm 1,63$, $6,91 \pm 1,67$ e $6,83 \pm 2,39$ mg/L.dia, respetivamente para os ensaios em meio padrão com adição de 3x Fe, 5x Fe e 10x Fe.

As melhores condições para o cultivo desta microalga tendo em vista a produção de lípidos correspondem a um aumento da concentração de ferro em 5 vezes relativamente ao meio de cultura padrão.

Foi realizada a esterificação dos lípidos extraídos da biomassa microalgal tendo em vista a obtenção do biodiesel. A análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos do biodiesel produzido a partir do óleo da *Chlamydomonas sp.*, por cromatografia gasosa, revelou a predominância dos ésteres C16:0 (palmitato) e C18:1 (oleato) considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade, estando também presentes os ésteres C14:0 (miristato) e C18:0 (estearato).

Palavras-chave: Biodiesel, *Chlamydomonas sp.*, extração de lípidos, microalgas, produtividade lipídica.

Abstract

The work developed within the context of this dissertation aimed to study the influence of environmental parameters, nitrogen and iron, on the lipid productivity of the microalgae *Chlamydomonas sp.* in order to be used as raw material for biodiesel production. Therefore, different tests were run aiming the optimization of growth conditions in order to reach high biomass growth rates and/or lipid content. Also tests were conducted aiming oil extraction from microalgae biomass and oil conversion into biodiesel.

The influence of increasing nitrogen (N) and iron (Fe) concentrations in the cultures was studied by varying the N concentration, in the form of nitrate, 5 and 10 times and, Fe concentration by 3, 5 and 10 times. Fe supplementation in culture medium enhanced the *Chlamydomonas sp.* growth, approximately 1,5 times comparing to standard cultivation conditions (*Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen*) and, the best results were found on standard medium with 5 times Fe addition, obtaining an average and maximum productivity of $14,82 \pm 0,52$ e $33,11 \pm 1,55$ mg/L.day, respectively.

The lipid content of *Chlamydomonas sp.* cells was evaluated by total lipid biomass extraction from different cultures, harvested at the end of the cultivation period. Tests using standard medium with Fe addition conducted to higher lipid content of, $24,52 \pm 2,99\%$, $20,91 \pm 5,01\%$ and $21,33 \pm 3,60\%$, respectively for tests using standard medium with 3, 5 and 10 times Fe addition. The best values of maximum lipid productivity were also found in these conditions, $6,70 \pm 1,63$, $6,91 \pm 1,67$ e $6,83 \pm 2,39$ mg/L.day for tests in standard medium with 3, 5 and 10 times iron addition, respectively.

The best conditions for the cultivation of this microalgae aiming lipid production correspond to a 5-fold increase of the Fe concentration in the culture medium, relatively to the standard medium.

The esterification of lipids extracted from microalgae biomass was carried out with the intent to obtain biodiesel. The analysis of fatty acid methyl esters of biodiesel produced from *Chlamydomonas sp.* oil, by gas chromatography, demonstrated the predominance of the esters C16: 0 (palmitate) and C18: 1 (oleate), that are considered ideal for the production of high quality biodiesel. Also C14: 0 (myristate) and C18: 0 (stearate) esters are present.

Keywords: Biodiesel, *Chlamydomonas sp.*, lipid extraction, microalgae, lipid productivity.

Índice

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	2
2. Estado da arte.....	3
2.1. Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel.....	3
2.2. Seleção da espécie de microalgas.....	4
2.2.2. Viabilidade das espécies de microalgas.....	5
2.3. Produção de biomassa algal.....	7
2.3.1. Disponibilidade de azoto.....	7
2.3.2. Disponibilidade do ferro.....	7
2.3.3. Efeito da temperatura.....	8
2.3.4. Efeito da luz.....	8
2.3.5. Efeito do pH.....	9
2.3.6. Arejamento/Agitação.....	9
2.4. Sistemas de produção.....	9
2.4.1. Sistemas de produção abertos.....	10
2.4.2. Fotobioreactores.....	10
2.5. Colheita.....	11
2.5.1. Centrifugação.....	12
2.5.2. Flocculação.....	12
2.5.3. Filtração.....	12
2.6. Extração.....	13
2.7. Biodiesel.....	13
2.7.1. Tecnologias de transesterificação na produção de biodiesel.....	14
3. Trabalho experimental.....	17
3.1. Preparação dos inóculos.....	17
3.2. Condições de Cultivo.....	18
3.3. Meio de cultura padrão.....	19
3.4. Ensaio realizados.....	19
3.5. Métodos de avaliação do crescimento das culturas.....	20
3.5.1. Método gravimétrico.....	21
3.5.2. Contagem celular.....	21
3.5.3. Densidade ótica.....	22
3.6. Extração de lípidos para avaliação do conteúdo lipídico.....	22

3.7.	Extração de lípidos em grande escala	23
3.8.	Esterificação dos lípidos extraídos.....	24
3.9.	Análise dos ésteres metílicos.....	25
4.	Resultados e Discussão	27
4.1.	Seleção da espécie a utilizar ao longo do estudo	27
4.2.	Avaliação do crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i>	28
4.2.1.	Seleção do método utilizado na quantificação da biomassa	28
4.2.2.	Avaliação do efeito da concentração de azoto no meio de cultura no crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i>	29
4.2.3.	Avaliação do efeito da concentração de ferro no meio de cultura no crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i>	32
4.3.	Avaliação do conteúdo lipídico da <i>Chlamydomonas sp.</i>	36
4.3.1.	Avaliação do efeito da concentração de azoto no meio de cultura no conteúdo lipídico e produtividade lipídica da <i>Chlamydomonas sp.</i>	36
4.3.2.	Avaliação do efeito da concentração de ferro no meio de cultura no teor lipídico e produtividade lipídica da <i>Chlamydomonas sp.</i>	38
4.4.	Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME).....	40
5.	Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro	45
	Referências bibliográficas	49
	Anexos.....	53
	Anexo 1. Meios de cultura	55
	Anexo 2. Métodos de quantificação da biomassa	57
	Anexo 3. Curva de calibração.....	65
	Anexo 4. Crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i>	67
	Anexo 5. Produtividade de biomassa	83
	Anexo 6. Teor de água na biomassa.....	87
	Anexo 7. Extração.....	89
	Anexo 8. Produtividade lipídica máxima	91

Índice de Figuras

Figura 1 - Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de Ahmad et al., 2011).	4
Figura 2 - Sistemas de produção abertos to tipo <i>raceway pond</i> (Gouveia, 2011).	10
Figura 3 - Sistemas de produção em fotobioreactores de coluna vertical (Gouveia, 2011).	11
Figura 4 - Reação de transesterificação (adaptado de Ferrari et al., 2005).	14
Figura 5 - Inoculação em tubos de ensaio das espécies <i>Chlorogonium elongatum</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , e <i>Oocystis sp.</i> , em meio líquido.	17
Figura 6 - Inóculos iniciais das espécies <i>Chlorogonium elongatum</i> , SAG-DB (SAG Data Base) 30.98; <i>Chlorella vulgaris</i> SAG-DB 211-12; <i>Chlamydomonas sp.</i> , SAG-DB 9.98; <i>Scenedesmus obliquus</i> , SAG-DB 276-3d e <i>Oocystis sp.</i> , SAG-DB 257-2, provenientes da Algoteca SAG.	17
Figura 7 - Preparação dos sistemas de cultura em câmara de fluxo laminar.	18
Figura 8 - Biomassa colhida das culturas por centrifugação.	20
Figura 9 - Monitorização do pH e temperatura das culturas, em câmara de fluxo laminar.	20
Figura 10 - Determinação do peso seco através de um sistema de filtração a vácuo.	21
Figura 11 - Contagem celular no microscópio usando uma câmara de contagem de Neubauer.	21
Figura 12 - Espectrofotómetro UV/Visível utilizado na avaliação do crescimento das culturas pelo método de densidade ótica.	22
Figura 13 – Tubos mostrando a fase metanólica, biomassa residual e fase clorofórmica obtidas durante o processo de extração de lípidos totais.	23
Figura 14 - Óleo presente nas amostras após evaporação dos solventes.	23
Figura 15 - Sistema bifásico formado durante o processo de extração de lípidos com uma mistura de hexano/isopropanol.	24
Figura 16 - Óleo extraído com a mistura de hexano/isopropanol.	24
Figura 17 - Sistema bifásico formado durante o processo de esterificação do óleo microalgal.	25
Figura 18 - Cromatógrafo Dani GC 1000.	26
Figura 19 - Avaliação qualitativa do desenvolvimento das espécies <i>Chlorogonium elongatum</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , e <i>Oocystis sp.</i> em <i>erlenmeyers</i> de 250 mL através da cor.	27

Figura 20 - Cultura de <i>Chlamydomonas sp.</i> em <i>erlenmeyers</i> de 250 mL.....	27
Figura 21 – Representação gráfica das curvas de crescimento de <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.....	30
Figura 22 - Representação gráfica da evolução do pH das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.	31
Figura 23 - Produtividades média e máxima da cultura de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão após 42 dias de cultivo.	31
Figura 24 - Produtividades média e máxima em biomassa da cultura de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N após 42 dias de cultivo.	32
Figura 25 - Representação gráfica das curvas de crescimento de <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.	33
Figura 26 - Representação gráfica da evolução do pH das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.	34
Figura 27 - Produtividades média e máxima em biomassa da cultura de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão , meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe após 19 dias de cultivo.....	34
Figura 28 - Teores lipídico e não lipídico da <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.....	37
Figura 29 - Produtividade Lipídica máxima da <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N, após 42 dias de cultivo.	37
Figura 30 - Teores lipídico e não lipídico da <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.	38
Figura 31 - Produtividade lipídica máxima da <i>Chlamydomonas sp.</i> para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe, após 19 dias de cultivo.	39
Figura 32 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de <i>Chlamydomonas sp.</i> , em meio padrão com adição de ferro (injeção 0,1 µL de amostra + 2 mL de padrão).	41

Figura 33 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de <i>Chlamydomonas sp.</i> , em meio padrão com adição de ferro (injeção 1 µL de amostra sem adição de padrão).	42
Figura 34 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de <i>Chlamydomonas sp.</i> , em meio padrão com adição de ferro (injeção 1 µL de amostra + 0,2 mL de padrão + 1,8 mL de heptano).	43
Figura A 1 - Culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão, em diversos estágios de desenvolvimento, para o estudo dos métodos de quantificação da biomassa	57
Figura A 2 - Contagem celular numa câmara de Neubauer.....	58
Figura A 3 – Curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a <i>Chlamydomonas sp.</i>	65
Figura A 4 - Soluções padrão preparadas a partir da biomassa de <i>Chlamydomonas sp.</i>	66
Figura A 5 - Pico máximo de absorvância determinado para a cultura mãe de <i>Chlamydomonas sp.</i>	66
Figura A 6 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão.....	69
Figura A 7 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x N.....	72
Figura A 8 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x N.....	75
Figura A 9 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 3x Fe.	77
Figura A 10 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x Fe.	79
Figura A 11 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x Fe.	81
Figura A 12 - Biomassa de <i>Chlamydomonas sp.</i> em eppendorfs para liofilização.	87

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição química de algumas espécies/estirpes de microalgas (% peso seco da biomassa) (Adaptado de Demirbas e Demirbas, 2011).	6
Tabela 2 - Teor de óleo de algumas espécies/estirpes de microalgas (Adapatado de Demirbas e Demirbas, 2011).....	6
Tabela 3 - Resumo dos valores de concentração, em biomassa seca, obtidos para os diferentes métodos de quantificação em estudo.....	29
Tabela 4 – Resumo dos valores da concentração em biomassa seca e produtividade média e máxima em biomassa da <i>Chlamydomonas sp.</i> , após 19 dias de cultivo, nas diferentes condições em estudo.	35
Tabela 5 – Resumo dos valores médios de produtividade em biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica da <i>Chlamydomonas sp.</i> nas diferentes condições em estudo, após 19 dias de cultivo.....	40
Tabela 6 - Identificação dos ésteres metílicos de ácidos gordos e sua quantificação. .	44
Tabela A 1- Composição do meio de cultura <i>Bold Basal Medium</i> (BBM).....	55
Tabela A 2 - Composição do meio de cultura <i>Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified</i> (3N-BBM).....	55
Tabela A 3 - Composição do meio de cultura desenvolvido como meio padrão.	56
Tabela A 4 - Avaliação do crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i> em maio padrão pelo método de contagem celular.	59
Tabela A 5 - Resumo final dos valores obtidos para a concentração celular da <i>Chlamydomonas sp.</i>	60
Tabela A 6 - Avaliação do crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i> em maio padrão pelo método de densidade ótica.....	60
Tabela A 7 - Resumo final dos valores obtidos de concentração em biomassa seca da <i>Chlamydomonas sp.</i> pelo método de densidade ótica.....	61
Tabela A 8 - Avaliação do crescimento da <i>Chlamydomonas sp.</i> em maio padrão pelo método gravimétrico.....	62
Tabela A 9 - Resumo final dos valores obtidos de concentração em biomassa seca da <i>Chlamydomonas sp.</i> pelo método gravimétrico.	63
Tabela A 10 - Valores de densidade ótica obtidos para as diferentes concentrações padrão.....	65
Tabela A 11 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão, ensaio 1.....	67

Tabela A 12 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão, ensaio 2.....	68
Tabela A 13 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão, ensaio 3.....	69
Tabela A 14 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x N, ensaio 1.	70
Tabela A 15 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x N, ensaio 2.	71
Tabela A 16 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x N, ensaio 3.	72
Tabela A 17 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x N, ensaio 1.	73
Tabela A 18 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x N, ensaio 2.	74
Tabela A 19 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x N, ensaio 3.	75
Tabela A 20 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 1.....	76
Tabela A 21 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 2.....	76
Tabela A 22 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 3.....	77
Tabela A 23 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 1.....	78
Tabela A 24 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 2.....	78
Tabela A 25 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 3.....	79
Tabela A 26 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 1.....	80
Tabela A 27 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 2.....	80
Tabela A 28 - Avaliação do crescimento das culturas de <i>Chlamydomonas sp.</i> em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 3.....	81
Tabela A 29 - Produtividade dos ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.....	84

Tabela A 30 – Produtividade dos ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.....	85
Tabela A 31 - Teor de água na biomassa de <i>Chlamydomonas sp.</i>	87
Tabela A 32 - Teor lipídico dos ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.....	89
Tabela A 33 - Teor lipídico dos ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.....	90
Tabela A 34 - Produtividade lipídica máxima após 19 dias de cultivo.....	92
Tabela A 35 - Produtividade lipídica máxima após 42 dias de cultivo.....	93

1. Introdução

A necessidade de atender à crescente necessidade mundial de energia causou o uso intensivo de combustíveis fósseis, como o carvão, petróleo e gás natural durante o último século, representando hoje, cerca de 66% do consumo de energia global (Gouveia, 2011). A intensificação do uso dos combustíveis fósseis originou uma série de impactos negativos sobre o meio ambiente e a vida humana. Um dos desafios mais urgentes passa pela redução das emissões de gases poluentes (CO_2 , HC, NO_x e SO_x) e das consequentes alterações climáticas, como o efeito de estufa e o aquecimento global. Outro desafio diz respeito à redução das reservas de petróleo bruto existentes. O consumo atual de petróleo é cerca de 10^5 vezes mais rápido do que a natureza pode criar (Satyanarayana et al., 2011). Este facto, associado às dificuldades na sua extração e processamento, conduz a um aumento dos preços dos combustíveis, que acarreta um elevado impacto, em particular no setor dos transportes uma vez que não existem alternativas relevantes (Mata et al., 2010). As necessidades existentes de energia e as considerações ecológicas levaram à procura de novos recursos, nomeadamente fontes renováveis/sustentáveis, que permitam diminuir a dependência energética dos combustíveis fósseis (Satyanarayana et al., 2011). Os biocombustíveis, nomeadamente o biodiesel, surgem como a principal alternativa para assegurar a sustentabilidade ambiental e económica das necessidades energéticas futuras. Na Europa, o biodiesel representa 82% da produção total de biocombustíveis, com tendência a aumentar (Mata et al., 2010).

A produção de biodiesel é feita sobretudo através de óleos vegetais. Mais de 95% da sua produção é realizada a partir de óleos vegetais comestíveis, gerando várias desvantagens tais como o impacto nos mercados globais, provocado pela competição do uso deste tipo de óleos como biocombustíveis e, o impacto ambiental negativo, causado devido à necessidade de grandes extensões de terra para o seu cultivo criando graves desequilíbrios ecológicos (Ahmad et al., 2011). Para reduzir a dependência nos óleos comestíveis, devem ser consideradas outras fontes alternativas de matérias-primas de baixo custo tais como óleos não comestíveis, óleos de fritura usados e gorduras animais (Mata et al., 2010). Apesar das vantagens deste tipo de matérias-primas, estas não têm sido utilizadas primariamente na produção de biodiesel devido a não existirem em abundância o suficiente para dar resposta à procura total de combustíveis para transporte e, também a problemas de biossegurança relacionados com o uso da gordura animal proveniente de animais contaminados (Ahmad et al., 2011). Devido à ineficiência e insustentabilidade deste tipo de matérias-primas surge a necessidade de recorrer a novos recursos, onde se destaca a utilização das microalgas.

Nos últimos anos vários estudos têm mostrado que as microalgas apresentam vantagens importantes em comparação com as culturas convencionais, tais como uma elevada taxa de crescimento, alta capacidade de produção de óleos (níveis de óleo de 20-50% são bastante comuns), alta eficiência na redução de CO₂, consumo de menos recursos e a utilização de terrenos incultos inadequados para a agricultura (Chisti, 2007; Oltra, 2011; Satyanarayana et al., 2011). Através de simples manipulações das propriedades físicas e químicas do seu meio de cultura consegue-se ainda induzir uma superprodução de lípidos e ácidos gordos específicos para a produção do biodiesel, reconhecendo desta forma as microalgas como uma fonte promissora para a sua produção (Oltra, 2011).

Apesar da produção de biodiesel a partir de microalgas ser considerada tecnicamente viável, existem ainda várias considerações técnicas e económicas que têm que ser abordadas. De forma a assegurar a sua viabilidade é necessário desenvolver e otimizar os sistemas de produção, incluindo os processos de cultivo, colheita, extração e esterificação.

1.1. Objetivos

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação visa o cultivo de microalgas e a extracção de óleo da biomassa microalgal, na quantidade necessária para produzir biodiesel e caracterizar o óleo e o biodiesel produzido. Os objetivos definidos passam pela otimização das condições de cultivo das microalgas com vista à obtenção de elevadas taxas de crescimento de biomassa e/ou de elevados teores lipídicos, assim como pela realização de testes com vista à extracção do óleo da biomassa microalgal e à transformação do óleo em biodiesel.

2. Estado da arte

2.1. Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel

As microalgas constituem um grupo distinto de microrganismos fotossintéticos, unicelulares ou coloniais, presentes em meios aquáticos doces ou salinos. Estas dividem-se em três classes principais: as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), clorófitas (*Chlorophyceae*) e crisófitas (*Chrysophyceae*) (Demirbas e Demirbas, 2011). Características como a elevada taxa de crescimento, elevada capacidade de produção de óleos e, uma maior eficiência fotossintética relativamente a outro tipo de oleaginosas tornam as microalgas uma fonte promissora para a produção de biodiesel (Satyanarayana et al., 2011). Estão associadas numerosas vantagens ao uso de culturas de microalgas em comparação com outras matérias-primas, tais como:

- Eficiência de conversão fotossintética da luz solar (Gouveia, 2011);
- Rendimentos mais elevados de produtividade da biomassa e altas taxas de crescimento (Ahmad et al., 2011; Satyanarayana et al., 2011);
- Elevados níveis de óleo (Satyanarayana et al., 2011; Chisti, 2007);
- Maior capacidade de fixação do CO₂ (Oltra, 2011; Ahmad et al., 2011);
- Possibilidade de cultivo em águas salobras reduzindo o uso de água doce (Gouveia, 2011; Amin, 2009);
- Uso de nutrientes, como o azoto e fósforo, provenientes de diferentes tipos de águas residuais (Satyanarayana et al., 2011; Gouveia, 2011);
- Utilização de terrenos não cultiváveis inadequados para a agricultura convencional, não competindo com a terra arável para produção de alimentos (Satyanarayana et al., 2011; Ahmad et al., 2011);
- Produção não sazonal (Gouveia, 2011);
- Indução da produção de elevadas concentrações de compostos como lípidos, biomassa, hidratos de carbono, proteínas e pigmentos (Amin, 2009);
- Adaptabilidade dos sistemas de produção a vários níveis de competências operacionais e tecnológicas (Gouveia, 2011; Amin, 2009);
- Cultivo sem uso de herbicidas e pesticidas, diminuindo o risco de poluição e resíduos (Ahmad et al., 2011; Gouveia, 2011);
- Produção de coprodutos e subprodutos de valor acrescentado (Ahmad et al., 2011; Gouveia, 2011).

Apesar de as microalgas serem encaradas como a forma mais eficiente de produção de biodiesel, para expandir a utilização desta matéria-prima a nível industrial é necessário a pesquisa e desenvolvimento dos sistemas de produção, desde a seleção das estirpes adequadas à otimização das diferentes etapas necessárias para uma operação em larga escala (produção de biomassa, colheita, extração) (Pruvost et al., 2011).

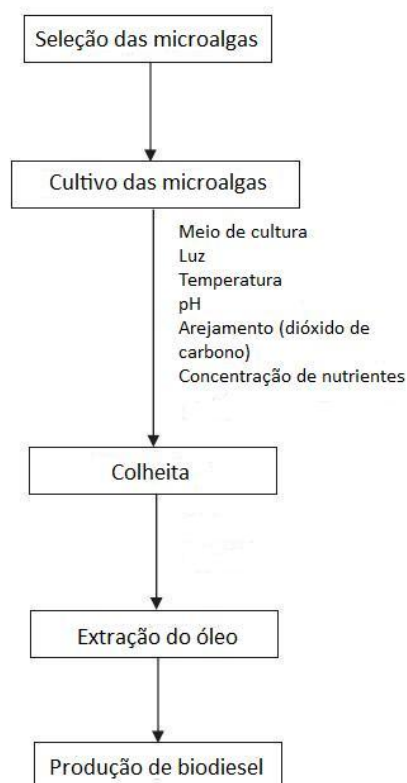


Figura 1 - Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de Ahmad et al., 2011).

2.2. Seleção da espécie de microalgas

O primeiro passo no processamento de biodiesel a partir de microalgas é a seleção de uma espécie/estirpe adequada, com as propriedades necessárias para as condições de cultura e produtos específicos (Ahmad et al., 2011).

Existem diversas espécies de microalgas que podem ser utilizadas na produção de biodiesel. A sua seleção é um passo fundamental no desenvolvimento do processo de microalgas e, devem ser tomados em consideração vários fatores na determinação da espécie/estirpe mais adequada. A capacidade de absorção de nutrientes disponíveis, o crescimento sob condições ambientais específicas, a elevada produtividade, o teor e produtividade de lípidos devem ser tomados em consideração (Amaro et al., 2011).

Segundo Amaro et al. (2011), Brennan e Owende (2010), a espécie ideal deverá apresentar:

- Elevada taxa de crescimento;
- Elevada produtividade de lípidos e óleos;
- Robustez e capacidade de sobrevivência a perturbações ambientais;
- Capacidade de dominar espécies selvagens em produções de tanque aberto;
- Necessidades limitadas de nutrientes;
- Tolerância a uma vasta gama de temperaturas resultante do ciclo diário e variações sazonais;
- Possibilidade de obtenção de coprodutos de valor acrescentado;
- Rápido ciclo de produção e,
- Revelar características de auto-floculação.

Atualmente ainda não é conhecida nenhuma espécie que reúna todas estas características. De acordo com Brennan e Owende (2010), as estirpes dominantes poderão não ser as mais adequadas para a produção de lípidos, sendo a manipulação genética um fator a ter em consideração.

2.2.2. Viabilidade das espécies de microalgas

A quantidade, qualidade e produtividade lipídica da espécie selecionada é fundamental para garantir a viabilidade do processo. Segundo Pruvost et al. (2011) é necessária uma ampla triagem da biodiversidade das microalgas e uma caracterização da sua produtividade para encontrar a melhor espécie.

A composição química de algumas microalgas numa base de matéria seca é apresentada na tabela 1, onde se podem observar diferenças significativas entre as várias espécies. O teor médio de lípidos, como se pode verificar, varia entre 2 e 40% de lípidos/óleo em peso (Demirbas e Demirbas, 2011). De acordo com Chisti (2007), o teor de óleo nas microalgas pode exceder os 80% em peso de matéria seca. Níveis de óleo entre 20 e 50% são muito comuns como podemos verificar na tabela 2. Para a produção de biodiesel são desejáveis espécies com elevada produtividade de óleo (Chisti, 2007), sendo a produtividade dada pelo produto da concentração de biomassa pelo teor de lípidos nas microalgas.

Vários estudos mostram que a quantidade e qualidade de lípidos nas células não dependem apenas da espécie/estirpe, mas também das condições de cultura. Segundo Pruvost et al. (2011) a otimização envolve o controlo de vários parâmetros que afetam a sua produtividade. De acordo com Converti et al. (2009), esta pode variar com alterações nas condições de crescimento, temperatura e intensidade da luz, ou com as características dos nutrientes do meio utilizado (concentração de azoto, fosfato e ferro).

Tabela 1 - Composição química de algumas espécies/estirpes de microalgas (% peso seco da biomassa) (Adaptado de Demirbas e Demirbas, 2011).

Espécie de Microalgas	Proteínas	Hidratos de carbono	Lípidos	Ácidos nucleicos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Tabela 2 - Teor de óleo de algumas espécies/estirpes de microalgas (Adaptado de Demirbas e Demirbas, 2011).

Espécie de microalgas	Teor de óleo (% peso seco da biomassa)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77

2.3. Produção de biomassa algal

A utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel tem como uma das principais vantagens a sua elevada taxa de crescimento. Chisti (2007) refere que a duplicação da biomassa é conseguida usualmente em apenas 24 h e, em algumas espécies, durante a fase exponencial, a duplicação ocorre em cerca de 3,5 h. No entanto, segundo estimativas de González-Fernández et al. (2012), apesar do seu rápido crescimento é necessário aumentar a taxa de produção cerca de três ordens de magnitude de forma a garantir a viabilidade da produção de biocombustível.

A produção de microalgas é afetada por diferentes fatores, como os sistemas de produção, nomeadamente o projeto do reator e as condições de cultura, que incluem a concentração dos nutrientes, luz, temperatura, pH, arejamento e agitação.

2.3.1. Disponibilidade de azoto

Têm sido realizados vários estudos sobre o efeito da concentração de fonte de azoto na produção de microalgas.

Segundo Pruvost et al. (2011) a carência de nitrato pode desencadear a acumulação de lípidos, nomeadamente os triacilgliceróis (TAG), adequados para a produção de biodiesel. Amaro et al. (2011) referem que a produtividade e o teor lipídico estão correlacionados inversamente e, em situações de *stress*, como a privação de azoto, o crescimento das células é limitado, aumentando por outro lado o teor de lípidos. De acordo com Scott et al. (2010) quando não existe azoto suficiente para a biossíntese das proteínas necessárias para o crescimento, o carbono em excesso proveniente da fotossíntese é canalizado para as moléculas de armazenamento, como os triacilgliceróis, aumentando a taxa lípidos/proteínas.

Converti et al. (2009) estudaram os efeitos da diminuição da concentração de nitrato no crescimento de duas espécies (*Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oculata*), concluindo que, em ambas, esta modificação resultou numa alteração significativa na composição das células, favorecendo a acumulação dos componentes lipídicos. A redução da concentração de azoto no meio fez aumentar a fração lipídica em ambas as espécies, apesar de uma taxa de crescimento praticamente constante, duplicando a produtividade do óleo.

2.3.2. Disponibilidade do ferro

Alguns investigadores têm-se debruçado sobre a função do ferro no crescimento de microalgas. Segundo Liu et al. (2008) a carência de ferro poderá ser um dos principais fatores limitantes na produtividade de biomassa algal. No entanto, o efeito da concentração de ferro no crescimento e nos componentes lipídicos das microalgas ainda não foi bem

documentado. Amaro et al. (2011) referem que elevadas concentrações de ferro no meio têm demonstrado induzir a acumulação de lípidos. Liu et al. (2008) investigaram o efeito do ferro sobre a produtividade de biomassa e o teor lipídico na espécie *Chlorella vulgaris*, concluindo que a densidade celular final aumentou com níveis de concentração de ferro mais elevados, verificando-se também um aumento considerável no teor de lípidos.

2.3.3.Efeito da temperatura

A temperatura assume um papel relevante na produção de biomassa algal e de lípidos, sendo um fator a considerar no desenvolvimento dos sistemas de produção.

Converti et al. (2009) estudaram os efeitos da temperatura no crescimento de duas microalgas, tendo concluído que, em ambas as espécies analisadas (*Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oculata*), o seu crescimento foi afetado significativamente com a temperatura. Foi observada uma diminuição da taxa de crescimento a temperaturas superiores a 30°C e, um aumento mais acentuado levou a uma interrupção súbita do crescimento e à morte das células.

Segundo Sheng et al. (2011), as mudanças induzidas pela temperatura na produção de biomassa apresentam um papel fundamental. Na espécie estudada (*Synechocystis sp.*) Sheng e colaboradores concluíram também que temperaturas elevadas e baixas temperaturas diminuem a taxa específica de crescimento, teor de lípidos e, consequentemente a taxa de produção de lípidos.

De acordo com Chisti (2007) a temperatura deve ser mantida geralmente entre 20 a 30 °C.

2.3.4.Efeito da luz

A luz é um dos parâmetros mais importantes a considerar no desenvolvimento dos sistemas de produção. Esta deve ser fornecida na intensidade, duração e comprimento de onda adequado, uma vez que estes são fatores críticos que afetam o crescimento das microalgas (Amaro et al., 2011). A intensidade excessiva de luz pode conduzir ao fenómeno de foto-oxidação e foto-inibição, enquanto luz insuficiente pode limitar o crescimento das culturas (Gouveia, 2011; Tang et al., 2011).

A penetração da luz no meio de cultura aumenta o crescimento das microalgas até se atingir o ponto de saturação de luz. Acima deste ponto, os recetores de luz são danificados causando a foto-inibição. Por outro lado, a limitação da luz não pode ser inteiramente ultrapassada dado que a penetração da luz é inversamente proporcional à concentração de células. Deste modo, o efeito de auto-sombreamento é comum em sistemas com elevada densidade celular ou com baixas taxas de mistura do meio de cultura. Nestas condições, a

capacidade natural das microalgas formarem agregados e, conseqüentemente, de formarem biofilmes contribui para dificultar a penetração da luz (González-Fernández et al., 2012). A eliminação deste fenómeno ou do seu adiamento para intensidades de luz mais elevadas pode aumentar significativamente a taxa média de crescimento diário das culturas (Chisti, 2007).

2.3.5. Efeito do pH

O pH tem uma influência importante sobre a capacidade de absorção de CO_2 . Diferentes níveis de pH geram variações nas proporções de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, podendo alterar as fontes de carbono úteis (Gouveia, 2011). Para garantir uma boa cultura o pH deve ser tal que exista carbono inorgânico disponível sob a forma de CO_2 livre. Ao longo do período de cultivo o carbono é consumido, deixando de estar disponível na forma e quantidade adequada para as microalgas presentes na cultura, resultando num aumento do pH. Este é um indicativo do estado de uma cultura e, para cada espécie existe um intervalo aceitável de pH.

2.3.6. Arejamento/Agitação

O arejamento e a agitação das culturas são também fatores importantes nos sistemas de produção, conduzindo a uma melhor mistura das culturas de microalgas, prevenindo a sedimentação, mantendo as condições homogêneas e, contribuindo para um melhor contacto entre as células e os nutrientes disponíveis (Mata et al., 2010). Um certo grau de turbulência, especialmente na produção em grande escala, é desejável de forma a promover a rápida circulação de células, favorecer a homogeneização de disponibilidade de luz a todas as células em suspensão e promover a eliminação de excesso de oxigénio dissolvido no meio. Por outro lado, elevados graus de turbulência podem danificar as microalgas devido à tensão de cisalhamento. O nível ótimo de turbulência (acima do qual ocorre a morte celular) é dependente da espécie e deve ser investigado a fim de evitar a queda de produtividade (Gouveia, 2011).

2.4. Sistemas de produção

A produção de microalgas pode ser feita em culturas de sistema aberto, como lagos ou lagoas, ou, em sistemas de cultura fechados, altamente controlados, designados por fotobiorreactores (Mata et al., 2010).

A viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das espécies de microalgas seleccionadas, assim como pelas condições climáticas e os custos associados ao terreno e à água utilizados (Brennan e Owende, 2010).

2.4.1. Sistemas de produção abertos

Os sistemas de produção abertos podem ser categorizados em águas naturais, como lagos ou lagoas, lagoas artificiais ou outros sistemas artificiais (Brennan e Owende, 2010).

Devido à ameaça inerente de contaminação por parte de outras espécies ou microrganismos, os sistemas abertos exigem ambientes altamente seletivos (Brennan e Owende, 2010). Quando comparados com os sistemas fechados, este tipo de sistemas apresenta uma elevada capacidade de produção e a sua construção e operação são normalmente menos dispendiosas (Mata et al. 2010). Apesar do seu baixo custo, a produção de biomassa nestes sistemas apresenta uma menor eficiência quando comparados com os fotobiorreactores (Chisti, 2007). Este facto pode ser atribuído a vários fatores: perdas por evaporação, oscilações na temperatura devidas aos ciclos diários e variações sazonais, potenciais deficiências de CO₂ resultantes da difusão para a atmosfera, limitação da transferência de massa provocada por uma mistura pobre devida a mecanismos de agitação ineficientes e, limitação do abastecimento de luz resultante da espessura da camada superior (Brennan e Owende, 2010; Chisti, 2007; Mata et al., 2010). Na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** apresenta-se uma fotografia de um sistema de produção aberto tipo *raceway pond*.



Figura 2 - Sistemas de produção abertos to tipo *raceway pond* (Gouveia, 2011).

Segundo Brennan e Owende (2010) é possível obter elevadas taxas de produção de biomassa nos sistemas abertos. No entanto, existem ainda inconsistências nas taxas de produção relatadas na literatura.

2.4.2. Fotobiorreactores

Os fotobiorreactores são sistemas flexíveis que podem ser otimizados de acordo com as características fisiológicas e biológicas das espécies selecionadas para cultivo (Mata et al., 2010). Ao contrário dos sistemas abertos, os fotobiorreactores permitem o cultivo de uma

única espécie de microalgas em períodos prolongados (Chisti, 2007). A produção de microalgas com base nesta tecnologia é projetada de forma a superar alguns dos principais problemas associados aos sistemas de produção abertos (Brennan e Owende, 2010). Os sistemas fechados, contrariamente aos sistemas abertos, oferecem um melhor controlo sobre as condições de cultura e parâmetros de crescimento, evitam perdas por evaporação, reduzem as perdas de CO₂, apresentam maior êxito na produção de grandes quantidades de biomassa, atingindo densidades e concentrações celulares mais elevadas e, evitam a contaminação por parte de microrganismos competidores (Chisti, 2007; Mata et al., 2010). **Na Erro! A origem da referência não foi encontrada.** apresentam-se alguns sistemas de fotobioreactores em coluna vertical.

Nos fotobioreactores os custos de colheita podem ser reduzidos significativamente devido à maior produtividade da biomassa obtida. No entanto, os custos deste tipo de sistemas são substancialmente mais elevados do que os dos sistemas de produção abertos (Brennan e Owende, 2010).



Figura 3 - Sistemas de produção em fotobioreactores de coluna vertical (Gouveia, 2011).

2.5. Colheita

A escolha da metodologia a ser usada no processo de colheita é um ponto fundamental na produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que a utilização de tecnologias que consomem elevada quantidade de energia torna o processo de produção de biodiesel economicamente desinteressante (Satyanarayana et al., 2011). A recuperação da biomassa de microalgas pode ser responsável por 20-30% dos custos totais de produção (Brennan e Owende, 2010).

A colheita de microalgas é um processo difícil e a técnica deve ser escolhida em função das características das microalgas e produção de biocombustível subsequente (González-Fernández et al., 2012). A seleção da técnica de colheita depende da densidade

e do tamanho das microalgas e do valor dos produtos que se pretendem recuperar/obter (Chen et al., 2011).

O custo desta operação é tipicamente elevado porque as frações mássicas de microalgas são geralmente baixas e, as células transportam normalmente cargas negativas e um excesso de matéria orgânica algogénica para manter a sua estabilidade num estado disperso (Amaro et al., 2011; Chen et al., 2011).

Apesar de apresentarem algumas limitações e nem sempre serem as menos dispendiosas, as principais técnicas aplicadas na colheita de microalgas a grande escala incluem a centrifugação, a floculação e a filtração (Satyanarayana et al., 2011).

2.5.1. Centrifugação

A centrifugação é a principal técnica aplicada na colheita da biomassa de microalgas e regista uma eficiência superior a 95% (Chen et al., 2011). Trata-se de um processo rápido que depende apenas das características de sedimentação das células, do tempo de residência na centrífuga e da profundidade de decantação. As desvantagens deste processo incluem os elevados custos energéticos e as exigências de manutenção elevadas (Brennan e Owende, 2010).

2.5.2. Floculação

As células de microalgas carregam uma carga negativa que impede a agregação natural das células em suspensão. Esta carga pode ser reduzida ou neutralizada através da adição de floculantes como catiões polivalentes e polímeros catiónicos, não afetando a composição e toxicidade do produto (Brennan e Owende, 2010). A floculação é um processo no qual as partículas dispersas são agregadas em conjunto para formar partículas de grandes dimensões para a solução. O tamanho da partícula aumentado conduz, consequentemente, a uma sedimentação mais rápida. Os floculantes podem ser orgânicos ou inorgânicos, tais como, cloreto de ferro (III), sulfato de ferro (III) ou sulfato de alumínio. Atualmente, a filtração não é um método de escolha para uma produção barata e sustentável. Desenvolvimentos recentes favorecem a autofloculação das células, que pode ocorrer durante a limitação de carbono ou mudanças de pH (Gouveia, 2011).

2.5.3. Filtração

O processo convencional de filtração, filtração sob vácuo, adequa-se para a colheita de microalgas relativamente grandes (> 70 µm), como a *Coelastrum* e a *Spirulina*. No entanto, este processo não pode ser aplicado na colheita de espécies de microalgas que se aproximam das dimensões bacterianas, como a *Scenedesmus*, *Dunaliella* e a *Chlorella*.

Para a recuperação de pequenas células de algas (<30 µm), a microfiltração e membranas de ultrafiltração (filtração por membranas utilizando pressão hidrostática) são alternativas tecnicamente viáveis à filtração convencional (Brennan e Owende, 2010).

2.6. Extração

O processo de extração de lípidos a partir de biomassa de microalgas e a sua eficiência representam um passo importante no processo de produção de biodiesel. Por esta razão, é fundamental encontrar um sistema de extração com um dispositivo eficiente para aumentar o rendimento de extração de lípidos (Adam et al., 2012).

Os componentes e teores lipídicos nas células das microalgas variam de espécie para espécie e podem ser divididos basicamente em duas classes, os lípidos neutros (como os triglicéridos) e lípidos polares (como os fosfolípidos e galactolípidos). Os lípidos neutros são os principais envolvidos na produção de biodiesel (Huang et al., 2010). O método ideal para a extração de lípidos deve ser específico, de forma a minimizar a co-extração de materiais não lipídicos, mas também seletivo para apenas algumas frações lipídicas, como os lípidos neutros. (Amaro et al., 2011).

Vários métodos têm sido utilizados para este fim, como a extração direta com hexano ou pelo método de soxhlet (Halim et al., 2011), o método de Bligh e Dyer (1959) com uma mistura de clorofórmio/metanol como solvente e, a extração por fluido supercrítico com CO₂ ou metanol (Adam et al., 2012).

A metodologia de Bligh e Dyer é uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por Folch et al. (1956) e distingue-se por ser um dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos, particularmente adequado para a análise de lípidos nas microalgas (Brum et al., 2009).

O hexano é um solvente menos eficiente do que o clorofórmio, no entanto, apresenta uma menor toxicidade, é menos dispendioso e, aparentemente apresenta uma grande seletividade para frações lipídicas neutras (Amaro et al., 2011). Este tem sido o solvente de eleição nas aplicações em grande escala (Mata et al., 2010).

A extração por fluido supercrítico com CO₂ é, por sua vez, uma tecnologia limpa e promissora que pode substituir o uso de solventes orgânicos tradicionais na extração de lípidos (Amaro et al., 2011).

2.7. Biodiesel

O biodiesel é definido pela ASTM como "um combustível constituído por ésteres monoalquílicos de ácidos gordos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais, designado B100".

O biodiesel é produzido através de um processo químico simples, conhecido como transesterificação (Figura 4), que envolve a reação dos triglicéridos com um álcool, na presença de um catalisador. Os produtos desta reação são os ésteres alquílicos de ácidos gordos (biodiesel) e, a glicerina, também conhecida como glicerol, é obtida como principal subproduto (Hoekman et al., 2012). A transesterificação pode-se realizar na presença quer de catalisadores homogéneos ou heterogéneos (método tradicional) e, estas alternativas podem ser comparadas em busca do método mais eficiente de produção de biodiesel a partir de lípidos de microalgas (Satyanarayana et al., 2010).

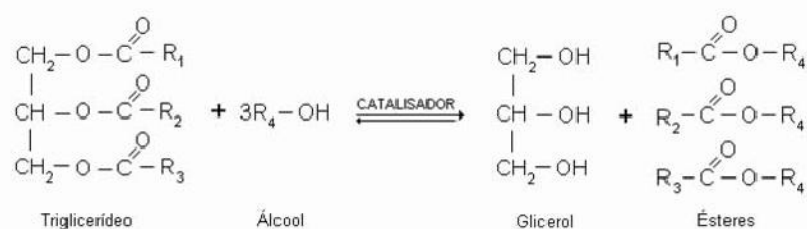


Figura 4 - Reação de transesterificação (adaptado de Ferrari et al., 2005).

Uma vez que o metanol é o principal álcool usado na produção de biodiesel, o biodiesel é também referido como ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Salvo indicação em contrário, o termo "biodiesel" refere-se ao material puro, isto é, 100% FAME, muitas vezes designado como B100. As concentrações mais baixas, como B20 (que representa uma mistura de 20% (% v/v) de biodiesel em diesel convencional), são adequadamente referidas por "misturas de biodiesel" e não biodiesel em si (Hoekman et al., 2012).

2.7.1. Tecnologias de transesterificação na produção de biodiesel

Ainda não existe muita informação disponível sobre a produção de biodiesel a partir de óleos de microalgas. No entanto, as tecnologias de produção de biodiesel de óleos vegetais podem ser aplicados para a produção de biodiesel de óleos de microalgas, devido às propriedades químicas e físicas semelhantes. No processo de transesterificação, os álcoois são substratos chave. Os principais álcoois utilizados neste processo são o metanol, etanol, propanol, butanol e o álcool amílico. O metanol, devido às suas propriedades físicas e ao seu baixo custo, é usado mais frequentemente (Huang et al., 2010).

Os catalisadores homogéneos (ácidos ou básicos) ou heterogéneos são normalmente utilizados para aumentar a taxa global de transesterificação (Amaro et al., 2011). A utilização de catalisadores ácidos tem-se revelado vantajosa na conversão de matérias-primas com

elevado teor de ácidos gordos livres em ésteres, mas as velocidades de reação para a conversão de triglicéridos a ésteres metílicos são demasiado lentas (Huang et al., 2010). Os catalisadores alcalinos apresentam uma maior taxa de reação e conversão do que os catalisadores ácidos para a transesterificação de triglicéridos. A transesterificação a partir de catalisadores alcalinos é cerca de 4000 vezes mais rápida do que a reação catalisada por ácidos e, por esta razão, a maioria dos processos industriais recorre aos catalisadores alcalinos como o NaOH ou o KOH (Amaro et al., 2011; Huang et al., 2010).

A transesterificação *in-situ* nas microalgas é uma alternativa ao processo de transesterificação convencional, que tem potencial para reduzir os custos associados aos processos finais de transformação. Este processo facilita a conversão direta dos ácidos gordos em ésteres alquílicos no interior da biomassa, eliminando desta forma o passo de extração com solvente e, reduzindo a necessidade de secagem da biomassa na fase de colheita (Amaro et al., 2011).

Outro processo alternativo é a produção de um combustível renovável por hidroprocessamento catalítico dos mesmos triglicéridos utilizados para a produção de biodiesel. Neste processo, não é necessário um álcool, os produtos são os hidrocarbonetos, em vez de ésteres de alquilo de ácidos gordos, e não há formação de subprodutos. Este processo ainda só foi aplicado a nível laboratorial, mas existem grandes expectativas em relação a esta tecnologia, uma vez que os custos associados à transformação do óleo são sensivelmente mais baixos do que os registados para o processo de transesterificação (Huber et al., 2006).

3. Trabalho experimental

3.1. Preparação dos inóculos

Começou-se por inocular em tubos de ensaio (Figuras 5) cinco espécies diferentes de microalgas, em meio de cultura adaptado a partir do *Bold Basal Medium* (BBM) (Tabela A1, no anexo 1). Os inóculos iniciais (Figura 6) foram adquiridos à Algoteca SAG (*Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen - Culture Collection of Algae*) e as espécies/estirpes inoculadas foram: *Chlorogonium elongatum*, SAG-DB 30.98; *Chlorella vulgaris* SAG-DB 211-12; *Chlamydomonas sp.*, SAG-DB 9.98; *Scenedesmus obliquus*, SAG-DB 276-3d e *Oocystis sp.*, SAG-DB 257-2. Os tubos de ensaio foram sujeitos a iluminação artificial, proveniente de lâmpadas fluorescentes, com um fotoperíodo de 12:12 horas e posicionados com a ajuda de um luxímetro (Lutron LX-1102) para que a intensidade luminosa se mantivesse constante a 2000 lux. A temperatura na sala de cultivo foi controlada com um sistema de ar condicionado portátil com bomba de calor (Orbegozo ADR-67), e mantida aproximadamente à temperatura ambiente (24°C).



Figura 5 - Inoculação em tubos de ensaio das espécies *Chlorogonium elongatum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas sp.*, *Scenedesmus obliquus*, e *Oocystis sp.*, em meio líquido.



Figura 6 - Inóculos iniciais das espécies *Chlorogonium elongatum*, SAG-DB (SAG Data Base) 30.98; *Chlorella vulgaris* SAG-DB 211-12; *Chlamydomonas sp.*, SAG-DB 9.98; *Scenedesmus obliquus*, SAG-DB 276-3d e *Oocystis sp.*, SAG-DB 257-2, provenientes da Algoteca SAG.

A inoculação dos tubos de ensaio foi efetuada em câmara de fluxo laminar (CRUMA 870-FL) e todos os materiais necessários para a sua preparação foram esterilizados de forma a eliminar possíveis contaminações das culturas. O processo de esterilização compreendeu a colocação dos materiais em autoclave a 121°C.

3.2. Condições de Cultivo

As culturas necessárias para o trabalho foram preparadas e mantidas em regime descontínuo. Os sistemas de cultura são fotobiorreatores que consistem em *erlenmeyers* de vidro com um sistema de arejamento e agitação, através de bombas de ar, garantindo as trocas gasosas e de nutrientes entre as células e o meio de cultura. A inoculação dos reatores foi efetuada em câmara de fluxo laminar (CRUMA 870-FL) (Figura 7) e todos os materiais necessários para a preparação e montagem dos sistemas de cultivo foram esterilizados de forma a eliminar possíveis contaminações das culturas. O processo de esterilização compreendeu a colocação dos materiais numa estufa a 80°C durante 60 min, seguido de 20 minutos sob radiação UV.



Figura 7 - Preparação dos sistemas de cultura em câmara de fluxo laminar.

Os meios utilizados na inoculação/repicagem e manutenção das culturas foram adaptados a partir do meio *Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified* (3N-BBM), (tabela A1, em anexo).

Os fotobiorreatores foram sujeitos a iluminação artificial, proveniente de lâmpadas fluorescentes, com um fotoperíodo de 12:12 horas e posicionados com a ajuda de um

luxímetro (Lutron LX-1102) para que a intensidade luminosa se mantivesse constante a 4500 lux. A temperatura na sala de cultivo foi controlada com um sistema de ar condicionado portátil com bomba de calor (Orbegozo ADR-67), e mantida aproximadamente à temperatura ambiente (24°C).

3.3. Meio de cultura padrão

A formulação do meio ideal é fundamental para garantir uma quantidade suficiente e estável de nutrientes, de forma a atingir a máxima aceleração do crescimento e densidade celular das culturas (Gouveia, 2011). O meio de crescimento deve fornecer os elementos inorgânicos que constituem as células das microalgas. Os elementos essenciais incluem o azoto, o fósforo, o ferro e o silício em alguns casos. As necessidades nutricionais mínimas podem ser estimadas utilizando a fórmula molecular aproximada de biomassa de microalgas, $C_{100}O_{48}H_{183}N_{11}P_1$ (Chisti, 2007). Vários estudos verificam a importância do azoto no crescimento de uma cultura, observando-se taxas de crescimento e conteúdo proteico muito mais baixos em culturas em meio deficitário em azoto. Nutrientes como o fósforo devem ser fornecidos em excesso, garantindo que todo o fósforo adicionado se encontra biodisponível, uma vez que os fosfatos adicionados complexam com iões metálicos (Chisti, 2007). Alguns autores mostram ainda que níveis de concentração de ferro no meio inicial mais elevados podem também induzir a acumulação de lípidos em algumas espécies de microalgas (Liu et al., 2008).

Atendendo a estas considerações, o meio desenvolvido como meio padrão para os ensaios realizados baseou-se no meio de cultura *Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified* (3N-BBM) (Tabela A2, no Anexo 1), garantindo um suplemento dos nutrientes azoto, fósforo e ferro. Assim, na constituição do meio padrão, utilizou-se um volume três vezes superior da solução de $NaNO_3$ e volumes duas vezes superiores das soluções de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Tabela A 3, no anexo 1).

3.4. Ensaio realizados

Numa primeira fase realizaram-se cinco ensaios com o objetivo de estudar a influência e a necessidade de otimização dos nutrientes azoto e ferro no crescimento das culturas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e, o meio desenvolvido como meio padrão foi usado como controlo. As culturas foram inoculadas em reatores de 1 L com 200 mL de cultura mãe. Dois ensaios visaram o estudo da influência da concentração de azoto nas culturas, através do aumento da concentração da solução de $NaNO_3$ no meio em 5x e 10x. Os restantes ensaios visaram o estudo da influência da concentração de ferro, variando a concentração da solução de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ no meio em 3x, 5x e 10x mais.

Numa segunda fase foi colhida a biomassa correspondente a cada ensaio para os testes de extração e quantificação de lípidos. A biomassa foi separada do meio de cultura por centrifugação, a uma velocidade de 2700 rpm durante 15 minutos (Centrífuga Orto Alresa Digicen). Nesta fase não foi possível realizar todos os testes em triplicado, visto que para alguns ensaios a quantidade de biomassa colhida não foi suficiente.

Numa última fase procedeu-se à transesterificação dos lípidos extraídos e à análise dos ésteres metílicos presentes nas amostras por cromatografia gasosa.

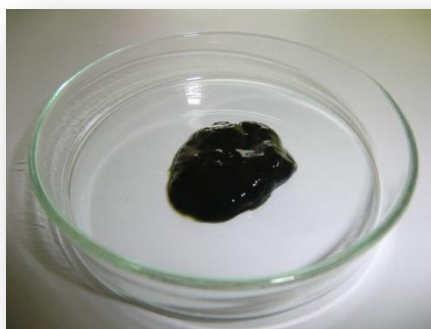


Figura 8 - Biomassa colhida das culturas por centrifugação.

3.5. Métodos de avaliação do crescimento das culturas

O crescimento das culturas foi avaliado pela monitorização diária da biomassa, pelos métodos gravimétrico, de contagem celular e da densidade ótica e ainda pela monitorização do pH (Schott Handylab pH12) e da temperatura (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**).



Figura 9 - Monitorização do pH e temperatura das culturas, em câmara de fluxo laminar.

3.5.1. Método gravimétrico

A avaliação do crescimento das culturas pelo método gravimétrico consiste na determinação do peso seco das amostras. Para tal, amostras de 3mL foram colhidas diariamente e filtradas sob vácuo, através de filtros de microfibras de vidro (VWR European) de 47 mm de diâmetro e porosidade 1,6 µm, como se pode observar na Figura 10. Os filtros foram previamente secos numa estufa (Raypa Dod-40), durante 24 h a 60°C, e tarados numa balança de precisão (Kern ALJ 220-4). Após a filtração, os filtros foram de novo secos durante 1h e depois mantidos em exsiccador até arrefecerem, sendo então pesados. O procedimento de secagem /arrefecimento/pesagem foi repetido até se verificar o peso constante.

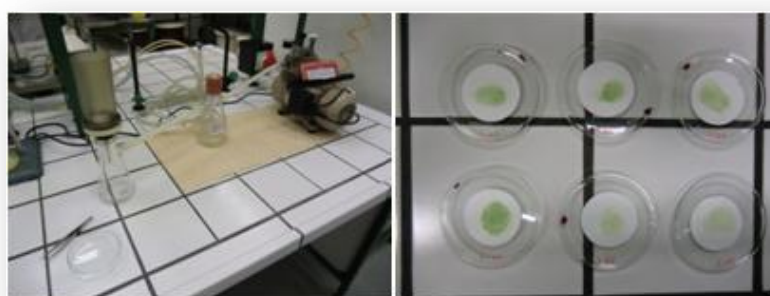


Figura 10 - Determinação do peso seco através de um sistema de filtração a vácuo.

3.5.2. Contagem celular

A avaliação do crescimento das culturas pelo método de contagem celular consiste na determinação do número de microrganismos presentes num determinado volume de amostra por contagem direta ao microscópio, usando uma câmara de contagem de Neubauer de 0,1 mm de profundidade (Figura 11). Este método é moroso e de difícil representatividade caso as microalgas sejam móveis e/ou estejam em grande concentração.



Figura 11 - Contagem celular no microscópio usando uma câmara de contagem de Neubauer.

3.5.3. Densidade ótica

A avaliação do crescimento das culturas pelo método da densidade ótica consiste na monitorização da absorvância das culturas a partir de amostras de 3 mL da suspensão de microalgas tomando como referência o meio de cultura, num espectrofotómetro UV/Visível (Shimadzu UV-160 A) (Figura 12). Quanto maior for o número de células, maior será a absorvância, traduzindo um aumento da densidade ótica. As leituras realizaram-se a um comprimento de onda de 682,5 nm, correspondente ao pico de absorvância máxima determinado para a cultura mãe. A relação entre a densidade ótica a um determinado comprimento de onda, λ , (OD_{λ}) e a concentração em biomassa seca (C_b , mg/L) foi estabelecida para o comprimento de onda $\lambda = 682,5$ nm e pode ser representada pela equação: $C_b = 1,1174 OD_{\lambda} - 0,0015$ (Anexo 3).



Figura 12 - Espectrofotómetro UV/Visível utilizado na avaliação do crescimento das culturas pelo método de densidade ótica.

3.6. Extração de lípidos para avaliação do conteúdo lipídico

Foi estudada a extração de lípidos totais para quantificação com uma mistura de clorofórmio: metanol: água (2:2:1,8 em volume), pelo método de Bligh e Dyer (1959) adaptado neste estudo de acordo com o procedimento descrito. As amostras de biomassa algal húmida foram taradas numa balança de precisão e efetuou-se uma primeira extração com (1:2:0,8) clorofórmio: metanol: água, homogeneizando as misturas em vórtex, a velocidade moderada, durante cerca de cinco minutos. Os homogeneizados resultantes foram colocados em seguida num banho de ultra-sons a 25°C durante 20 minutos. Procedeu-se depois a uma segunda extração com base na relação (2:2:1,8) clorofórmio: metanol: água, homogeneizando novamente as misturas em vórtex, a velocidade moderada, durante cerca de um minuto. As misturas foram seguidamente centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. Após centrifugação distinguiram-se nitidamente três fases como se

pode observar na Figura 13: uma fase superior (menos densa ou metanólica); uma fase intermédia, constituída pela biomassa residual e uma fase inferior (densa ou clorofórmica), onde se encontram os lípidos dissolvidos.

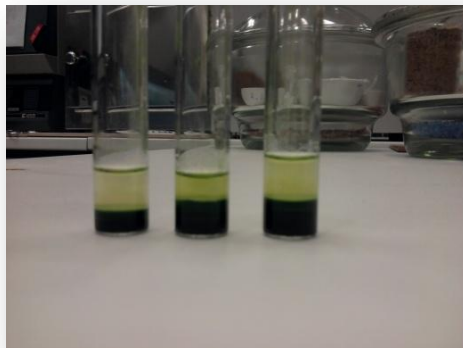


Figura 13 – Tubos mostrando a fase metanólica, biomassa residual e fase clorofórmica obtidas durante o processo de extração de lípidos totais.

Por fim, com uma pipeta de Pasteur a fase superior foi pipetada e rejeitada e, a fase inferior foi recolhida para um gobelé previamente pesado. Após evaporação do clorofórmio presente na fase recolhida (Figura 14), determinou-se o teor de óleo presente nas amostras.

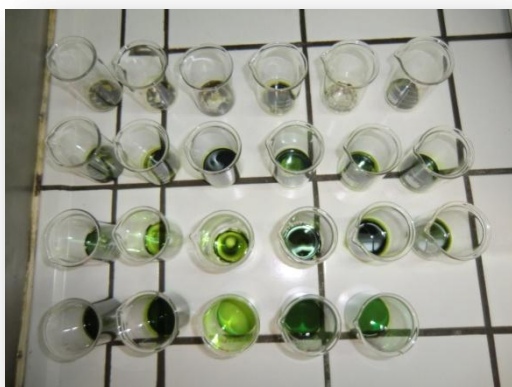


Figura 14 - Óleo presente nas amostras após evaporação dos solventes.

3.7. Extração de lípidos em grande escala

Foi estudada a extração de lípidos em grande escala com uma mistura de hexano/isopropanol de acordo com uma adaptação do método de Halim (Halim et al., 2011). Num frasco de reação foi adicionada à amostra a mistura dos co-solventes (3/2 (v/v)). A mistura resultante foi colocada no banho de ultrassons durante 15 a 30 min, seguida de um banho (a 60°C) com agitação durante 2 h para promover a extração. Após o arrefecimento, a mistura foi centrifugada para separar a biomassa residual. Ao filtrado foi adicionado hexano

e água nas proporções indicadas pelo autor, aproximadamente 40 mL de cada, observando-se a formação de um sistema bifásico (Figura 15). A mistura foi colocada num funil de decantação e a fase superior, onde se encontram a maior parte dos lípidos extraídos, foi recolhida. Por fim, procedeu-se à destilação da mistura recolhida separando o óleo extraído do hexano (Figura 16).



Figura 15 - Sistema bifásico formado durante o processo de extração de lípidos com uma mistura de hexano/isopropanol.



Figura 16 - Óleo extraído com a mistura de hexano/isopropanol.

3.8. Esterificação dos lípidos extraídos

Foi realizada a esterificação dos lípidos extraídos da biomassa microalgal com vista à obtenção do FAME. Para isso foi usado o método de Lepage e Roy (1984) modificado neste estudo de acordo com o procedimento a seguir descrito. As amostras de lípidos extraídos (cerca de 10 mg) são dissolvidas numa mistura de clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Aos homogeneizados resultantes adiciona-se 1 mL de metanol como reagente e 0,3 mL de ácido sulfúrico 95-97% como catalisador. Após enroscar a tampa os tubos são agitados vigorosamente durante 5 minutos. A reação da mistura nos tubos realizou-se num digestor (ECO 16 Thermoreactor Velp Scientifica), a 100 °C, durante 10 min. Após o arrefecimento dos tubos até à temperatura ambiente, adiciona-se 1 mL de água destilada para a separação de fases (após a adição de água observa-se a formação de duas fases, a camada superior rica em água, metanol, glicerol e ácido sulfúrico e, a camada inferior rica

em clorofórmio e ésteres, como se pode ver na Figura 17). Foi adicionado novamente 1 mL de água destilada para uma lavagem suave dos ésteres com a separação da camada de clorofórmio (mais densa que a camada de água) seguida do descarte da camada superior rica em água (camada menos densa). Este passo foi repetido mais duas vezes. Por fim, a camada rica em ésteres é filtrada usando um filtro de 0,2 μm e 13 mm de diâmetro (Cronus, UK) com o auxílio de uma seringa descartável Nylon. O clorofórmio é evaporado à secura à temperatura ambiente.

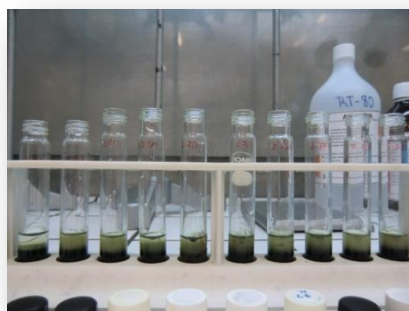


Figura 17 - Sistema bifásico formado durante o processo de esterificação do óleo microalgal.

3.9. Análise dos ésteres metílicos

As análises para identificação e quantificação dos ésteres metílicos presentes nas amostras foram realizadas por cromatografia gasosa (Dani GC 1000, equipado com um detetor FID) com uma coluna capilar TRB-WAX (Teknokroma, 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). As amostras foram diluídas em 2 mL de solução de metilheptadecanoato (padrão interno) e as condições de análise foram:

- Volume de injeção - 1 μL ;
- Temperatura de injeção: 250°C;
- Temperatura do detetor: 250 °C;
- Temperatura do forno: 195 °C;
- Gás de arraste: Hélio;
- Fluxo de gás na coluna: 1 mL/min.



Figura 18 - Cromatógrafo Dani GC 1000.

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção da espécie a utilizar ao longo do estudo

Numa primeira fase observou-se que das cinco espécies inoculadas, as espécies *Chlorogonium elongatum* e *Oocystis sp.* não apresentaram uma evolução favorável relativamente às outras espécies, razão pela qual não foram consideradas no restante estudo. Após a inoculação em tubos de ensaio, as três espécies foram repicadas posteriormente para *erlenmeyers* de 250 mL onde, através de uma avaliação qualitativa da cor (Figuras 19 e 20), se observou que a espécie *Chlamydomonas sp.* era, de entre as três espécies testadas, a que apresentava uma melhor evolução e crescimento mais rápido, sendo este o principal critério de seleção da espécie a utilizar nos ensaios seguintes.



Figura 19 - Avaliação qualitativa do desenvolvimento das espécies *Chlorogonium elongatum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas sp.*, *Scenedesmus obliquus*, e *Oocystis sp.* em *erlenmeyers* de 250 mL através da cor.



Figura 20 - Cultura de *Chlamydomonas sp.* em *erlenmeyers* de 250 mL.

Outro critério decisivo para a escolha da *Chlamydomonas sp.* é o potencial desta espécie para o processo em estudo. Segundo Morowvat et al. (2010) a *Chlamydomonas sp.* reúne várias propriedades que fazem desta microalga uma candidata valiosa para a

produção de biodiesel, tais como o fácil manuseamento e o crescimento rápido, a elevada taxa de crescimento e o teor de lípidos necessitando apenas de um meio de cultura simples e barato. Acresce que ainda não foram realizados muitos estudos sobre o processo de produção de biodiesel recorrendo a esta espécie, justificando o interesse da sua investigação neste trabalho.

A espécie de microalga em estudo, *Chlamydomonas sp.*, foi testada para a produção de lípidos por meio da avaliação da produtividade em biomassa e teor lipídico nas diferentes condições em estudo.

4.2. Avaliação do crescimento da *Chlamydomonas sp.*

O crescimento da *Chlamydomonas sp.* foi avaliado através da monitorização diária do pH e pela quantificação da biomassa da cultura.

4.2.1. Seleção do método utilizado na quantificação da biomassa

Com o objetivo de determinar qual o método mais adequado para a avaliação do crescimento e quantificação da biomassa, realizou-se um ensaio prévio que consistiu na monitorização diária de três culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão, durante 6 dias, através da contagem celular, determinação do peso seco e leitura de densidade ótica a 682,5 nm.

Na Tabela 3 apresenta-se o resumo dos resultados obtidos para os diferentes métodos de quantificação.

O método de contagem celular revelou-se extremamente difícil, principalmente quando a densidade celular da cultura começou a aumentar, dificultando a contagem do número de células, razão pela qual não foi considerado. Os restantes métodos conduziram a resultados semelhantes, embora se tenham observado oscilações nos valores registados para o método gravimétrico. Estas oscilações poderão ser devidas à secagem incompleta de algumas amostras e/ou à quantidade de amostra utilizada que não será suficientemente representativa para a aplicação deste método. O método gravimétrico adequa-se melhor a concentrações de biomassa muito elevadas pelo que não foi utilizado no resto do trabalho. Desta forma, adotou-se o método da densidade ótica para os ensaios a realizar, uma vez que, mesmo para baixas concentrações de microalgas, se revelou mais reprodutível e sensível do que os restantes métodos.

Tabela 3 - Resumo dos valores de concentração, em biomassa seca, obtidos para os diferentes métodos de quantificação em estudo.

Dias	Método de Quantificação		
	Contagem celular (nº células/L)	Gravimétrico (mg _{biomassa seca} /L)	Densidade ótica, OD _{682,5}
0	5,67E+06	70,37	7,11
1	1,34E+07	25,93	43,40
2	2,09E+07	244,44	77,51
3	3,50E+07	96,30	104,46
4	4,42E+07	111,11	125,94
6	7,08E+07	196,30	174,46

4.2.2. Avaliação do efeito da concentração de azoto no meio de cultura no crescimento da *Chlamydomonas sp.*

Através das curvas de crescimento apresentadas na Figura 21 pode-se verificar que o comportamento da *Chlamydomonas sp.* é semelhante para os diferentes ensaios. Estas curvas exibem as características das fases de crescimento em culturas *batch*, podendo observar-se a fase de indução, a fase exponencial e, a fase de desaceleração. Na fase de indução não se regista um aumento significativo da taxa de crescimento, devendo-se este fato à adaptação da espécie às novas condições de cultivo, após a sua repicagem. Na fase exponencial verifica-se um aumento constante e exponencial da biomassa, resultante da elevada taxa de crescimento. Por fim, na fase de desaceleração observa-se uma diminuição do crescimento, que poderá ser devida ao decréscimo da quantidade de nutrientes disponíveis no meio e à redução da atividade fotossintética devido ao aumento da densidade microalgal, que se traduzem numa elevação do pH do meio que contribui para o abrandamento do crescimento das microalgas. Observa-se que as culturas em meio padrão e em meio padrão com adição de 5x N, no fim do período de cultivo, tinham atingido a fase estacionária enquanto as culturas em meio padrão com adição de 10x N já se encontravam na fase de declínio.

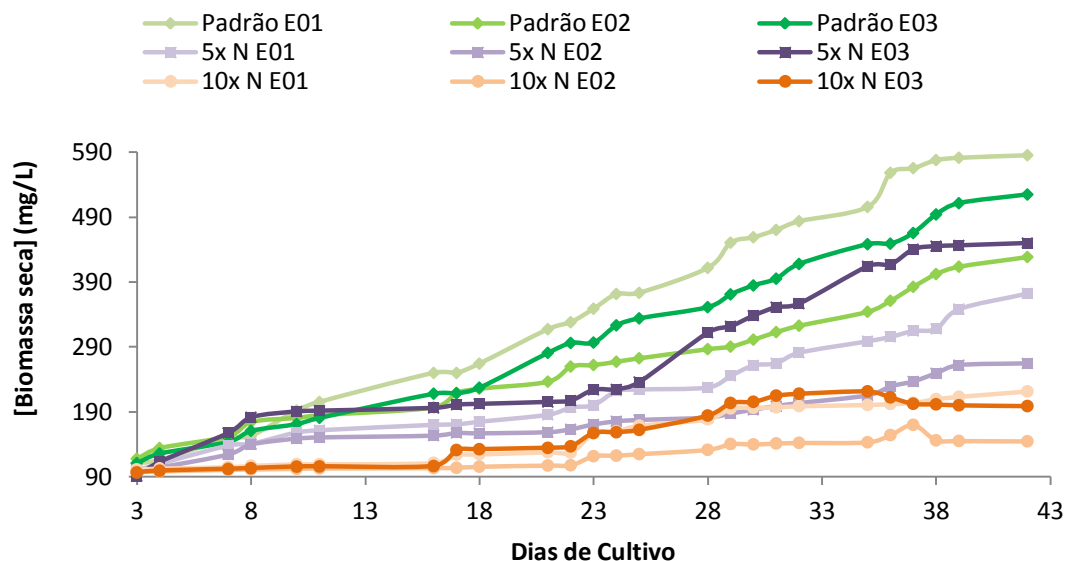


Figura 21 – Representação gráfica das curvas de crescimento de *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.

Comparando os diferentes meios do estudo, estes evidenciam diferenças na taxa de crescimento da *Chlamydomonas sp.*. Os ensaios realizados em meio padrão registam um melhor crescimento, atingindo na altura da colheita final concentrações, em biomassa seca, de 585,44, 428,52 e 524,88 mg/L para os ensaios PE01, PE02 e PE03, respetivamente. Relativamente aos ensaios em meio padrão com adição de azoto, nota-se que a biomassa se manteve superior no meio padrão com adição de 5x N durante a maior parte do período de cultivo, embora inferior aos ensaios em meio padrão. As concentrações em biomassa atingidas aquando da colheita foram de 372,44, 264,45 e 450,00 mg/L para os ensaios 5NE01, 5NE02 e 5NE03, respetivamente. Os ensaios em meio padrão com adição de 10x N registam as piores taxas de crescimento, observando-se um crescimento inicial significativamente inferior ao verificado nos ensaios anteriores. As concentrações em biomassa seca atingidas na altura da colheita final foram, respetivamente, de 221,50, 144,53 e 198,82 mg/L para os ensaios 10NE01, 10NE02 e 10NE03.

A evolução do pH das culturas, ao longo do período de cultivo, para as condições em estudo encontra-se registada na Figura 22. Observa-se que a variação do pH foi quase sempre crescente ao longo do período de cultivo, registando-se uma variação mais pronunciada a partir do 28º dia. Pode-se observar que a adição de uma maior concentração de azoto ao meio afeta a variação do pH nas culturas, relativamente à utilização do meio padrão. Nos ensaios realizados em meio padrão com adição de 10x N a variação do pH não é muito acentuada, apresentando os valores mais baixos relativamente aos restantes

ensaios, $6,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$. Os ensaios realizados em meio padrão e em meio padrão com adição 5x N apresentam uma dinâmica de pH semelhante, $6,8 \leq \text{pH} \leq 9,3$.

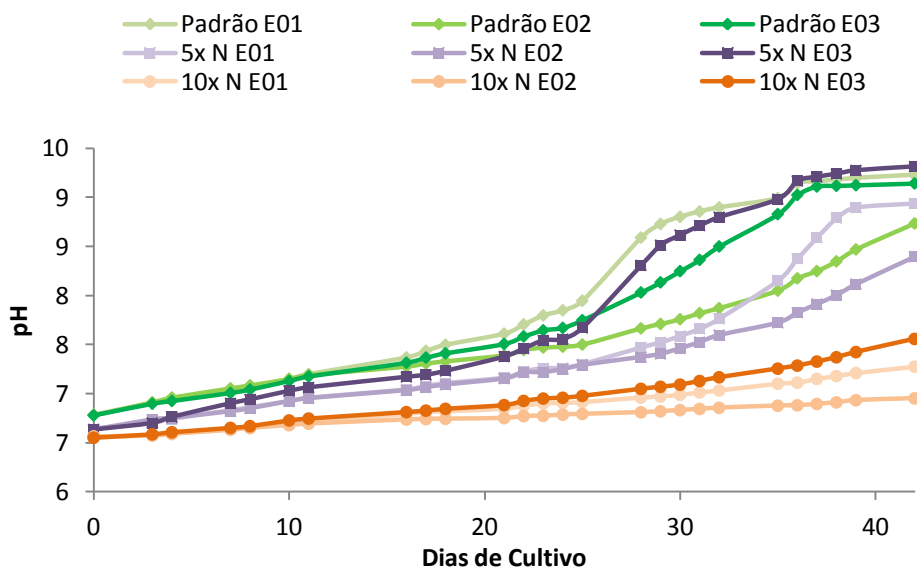


Figura 22 - Representação gráfica da evolução do pH das culturas de *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.

Nas Figuras 23 e 24 estão registados os valores de produtividade média e máxima calculados da cultura de *Chlamydomonas sp.* para os diferentes meios em estudo (Anexo 5). Considerando a produtividade em biomassa conseguida nos vários ensaios, constata-se que esta foi superior quando foi utilizado o meio padrão. O melhor resultado registou-se no primeiro ensaio, verificando-se uma produtividade média de 13,30 mg/L.dia e uma produtividade máxima de 52,50 mg/L.dia (registada ao 36º dia).

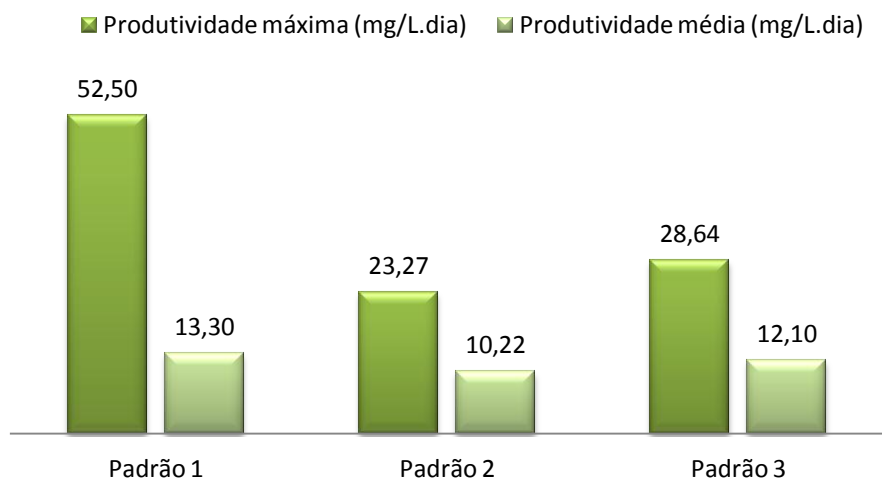


Figura 23 - Produtividades média e máxima da cultura de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão após 42 dias de cultivo.

Relativamente à produtividade em meio padrão com adição de azoto, não se verificam diferenças significativas nos resultados obtidos para a produtividade máxima, no entanto, a produtividade média é tanto menor quanto maior a adição de azoto. Quando utilizado o meio padrão com adição de 5x N, o melhor valor de produtividade média foi observado no terceiro ensaio, 9,51 mg/L.dia, e de produtividade máxima foi observado no primeiro ensaio, 30,43 mg/L.dia (ao 39º dia). O melhor resultado registado para o meio padrão com adição de 10x N observa-se no primeiro ensaio, com uma produtividade média de 4,19 mg/L.dia e produtividade máxima de 29,83 mg/L.dia (ao 23º dia).

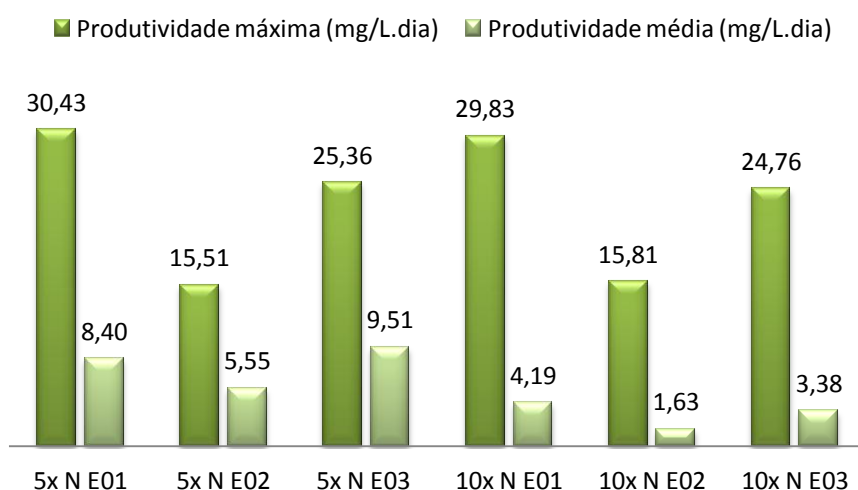


Figura 24 - Produtividades média e máxima em biomassa da cultura de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N após 42 dias de cultivo.

4.2.3. Avaliação do efeito da concentração de ferro no meio de cultura no crescimento da *Chlamydomonas sp.*

Tal como nos ensaios discutidos anteriormente, observa-se na Figura 25 que o comportamento da *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição de ferro é semelhante aos obtidos para os cultivos em meio padrão e meio padrão com adição de azoto. Nas condições estudadas esta espécie apresenta um crescimento contínuo ao longo do período de cultivo, observando-se as fases de indução, fase exponencial e de desaceleração. A diminuição da taxa de crescimento na fase final do período de cultivo indica a proximidade da fase estacionária, o que parece mais evidente para os cultivos em meio padrão com adição de 5X Fe..

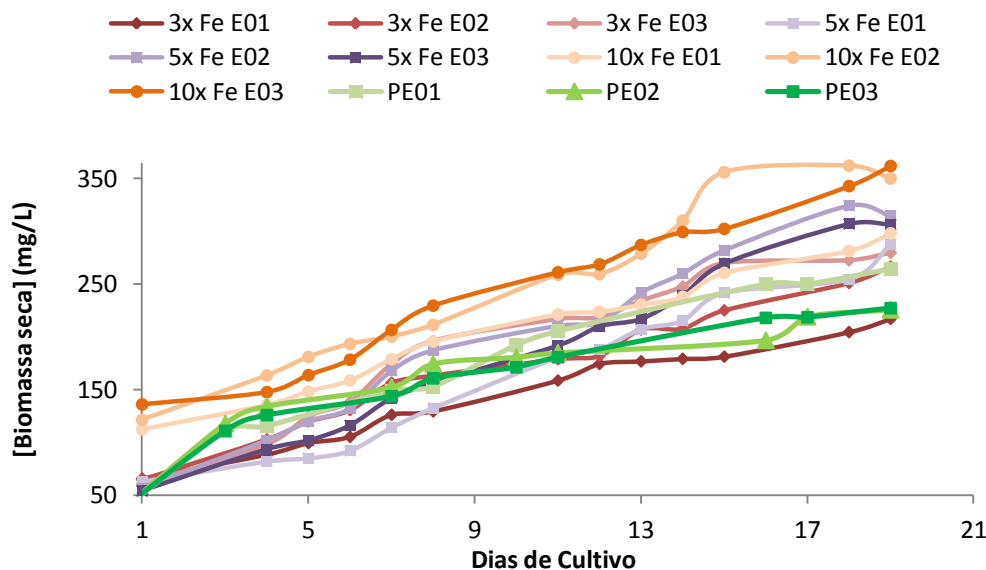


Figura 25 - Representação gráfica das curvas de crescimento de *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.

Comparando os ensaios em meio padrão com adição de ferro, constata-se que os ensaios realizados em meio padrão com adição de 10x Fe registam um crescimento ligeiramente superior da *Chlamydomonas sp.*, atingindo na altura da colheita final concentrações, em biomassa seca, de 298,16, 350,07 e 362,00 mg/L para os ensaios 10FeE01, 10FeE02 e 10FeE03, respetivamente. Nos ensaios em meio padrão com adição de 5x Fe, as concentrações em biomassa atingidas aquando da colheita foram de 287,72, 314,57 e 306,52 mg/L para os ensaios 5FeE01, 5FeE02 e 5FeE03, respetivamente. Para os ensaios em meio padrão com adição de 3x Fe, atingiram-se na altura da colheita final, concentrações em biomassa de 217,02, 266,54 e 279,67 mg/L para os ensaios 3FeE01, 3FeE02 e 3FeE03, respetivamente.

A evolução do pH das culturas, ao longo do período de cultivo, para os ensaios em meio padrão com adição de ferro encontra-se representada na Figura 26. Pode-se verificar que a adição de uma maior concentração de ferro provoca uma diminuição dos valores de pH relativamente aos ensaios discutidos anteriormente, devida à acidificação do meio inicial e, permite um maior controlo do pH, confirmado pela evolução mais suave das curvas de pH. Observa-se que a variação do pH foi quase sempre crescente ao longo do período de cultivo, não se registando grandes oscilações. Nos ensaios realizados em meio padrão com adição de 10x Fe a variação do pH não é muito acentuada, apresentando os valores mais baixos relativamente aos restantes ensaios, $6,7 \leq \text{pH} \leq 7,1$. Os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe e em meio padrão com adição 5x Fe apresentam uma dinâmica de pH semelhante, $6,9 \leq \text{pH} \leq 7,3$, observando-se uma pequena oscilação no 12º dia.

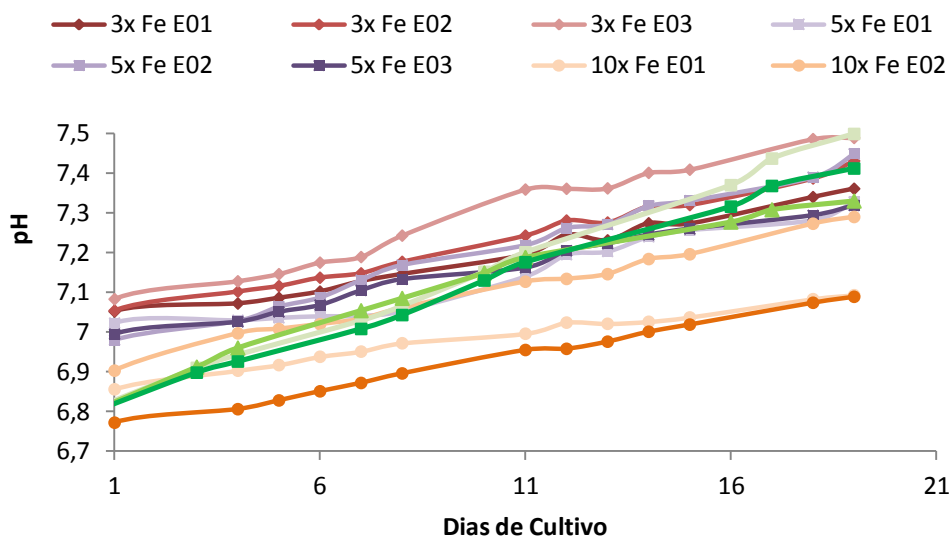


Figura 26 - Representação gráfica da evolução do pH das culturas de *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.

Na Figura 27 estão registados os valores de produtividade média e máxima calculados da cultura de *Chlamydomonas sp.* para os meios padrão com adição de ferro (Anexo 5). Observam-se diferenças significativas nas produtividades em biomassa para cada conjunto de ensaios em meio padrão com adição 3x Fe e em meio padrão com adição 10x Fe. Apenas para o ensaio 5x Fe se verificou a reprodutibilidade dos resultados. O melhor valor de produtividade média registou-se para o meio padrão com adição 5x Fe, no segundo ensaio, com um valor de 15,34 mg/L. O melhor valor de produtividade máxima registou-se para o meio padrão com adição 10x Fe, no segundo ensaio, com um valor de 45,94 (ao 15º dia).

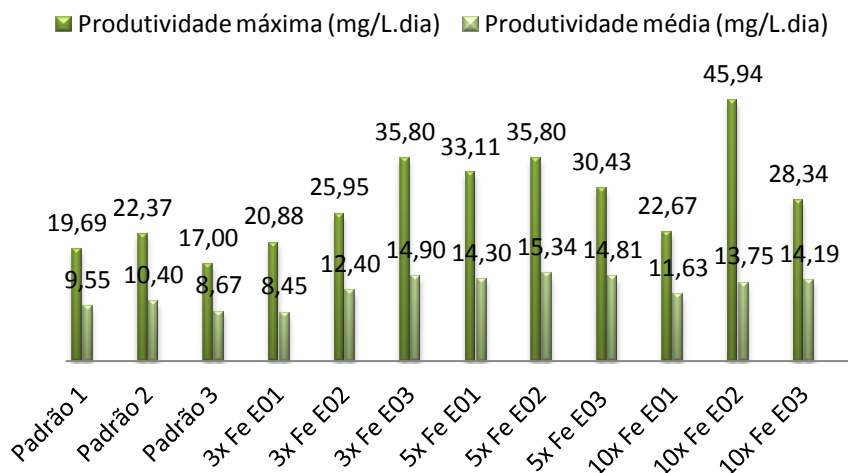


Figura 27 - Produtividades média e máxima em biomassa da cultura de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão , meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe após 19 dias de cultivo.

Na Tabela 4 estão resumidos os valores de produtividade encontrados para as diferentes condições em estudo após 19 dias de cultivo.

Tabela 4 – Resumo dos valores da concentração em biomassa seca e produtividade média e máxima em biomassa da *Chlamydomonas sp.*, após 19 dias de cultivo, nas diferentes condições em estudo.

Meio	Ensaio	C _{biomassa seca} (mg/L)	Produtividade média em biomassa seca (mg/L.dia)	Produtividade máxima em biomassa seca (mg/L.dia)
Padrão	1	264,15	9,55	19,69 (ao 10 ^o dia)
	2	225,67	10,40	22,37 (ao 17 ^o dia)
	3	227,16	8,67	17,00 (ao 8 ^o dia)
Padrão com adição 5x N	1	174,66	5,09	10,14 (ao 4 ^o dia)
	2	156,76	4,85	15,51 (ao 8 ^o dia)
	3	202,11	9,23	24,16 (ao 8 ^o dia)
Padrão com adição 10x N	1	124,55	2,38	12,53 (ao 17 ^o dia)
	2	105,45	0,73	1,79 (ao 18 ^o dia)
	3	132,30	4,04	24,76 (ao 17 ^o dia)
Padrão com adição 3x Fe	1	217,02	8,45	20,88 (ao 7 ^o dia)
	2	266,54	12,40	25,95 (ao 7 ^o dia)
	3	279,67	14,90	35,80 (ao 7 ^o dia)
Padrão com adição 5x Fe	1	287,72	14,30	33,11 (ao 19 ^o dia)
	2	314,57	15,34	35,80 (ao 7 ^o dia)
	3	306,52	14,81	30,43 (ao 15 ^o dia)
Padrão com adição 10x Fe	1	298,16	11,63	22,67 (ao 15 ^o dia)
	2	350,07	13,75	45,94 (ao 15 ^o dia)
	3	362,00	14,19	28,34 (ao 7 ^o dia)

Os ensaios com suplementação de ferro registam valores de produtividade em biomassa superiores aos encontrados nos ensaios em meio padrão e em meio padrão com adição de azoto na forma de nitrato.

Os resultados obtidos revelam a existência de alterações no crescimento da espécie *Chlamydomonas sp.* em resultado do meio utilizado no seu cultivo. Verifica-se que este é influenciado pelas concentrações de azoto e de ferro, registando-se um maior crescimento para os ensaios em meio padrão com adição de 10x Fe e, um menor crescimento para os ensaios em meio padrão com adição de azoto na forma de nitrato. O melhor resultado verifica-se para o ensaio em meio padrão com adição de 5x Fe; apesar da concentração em biomassa ser inferior à registada para o ensaio em meio padrão com adição de 10x Fe,

observam-se uma produtividade média e produtividade máxima superiores. Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de ferro no meio de cultura pode ser favorável ao crescimento desta espécie. Relativamente à concentração de azoto no meio de cultura, apesar de ser considerado um dos nutrientes principais necessários ao crescimento, em concentrações muito elevadas pode inibir o crescimento da espécie.

Para a produção desta espécie em larga escala, os resultados obtidos comprovam que o crescimento pode ser potenciado através da otimização das concentrações de ferro e de azoto no meio de cultura.

Não existem referências na literatura sobre a produtividade desta espécie. Quando comparada com a *Chlorella vulgaris*, referenciada por vários autores como uma boa opção para a produção de biodiesel em termos de quantidade (combinação de produtividade de biomassa e teor de lípidos) e qualidade (composição de ácidos gordos) (Gouveia, 2011), os valores de produtividade máxima em biomassa obtidos para a *Chlamydomonas sp.* estão próximos do limite inferior da gama de valores conseguidos para a *Chlorella vulgaris*, 20 a 200 mg/L.dia (Mata et al., 2010). No entanto, a produtividade média encontra-se abaixo do limite inferior.

4.3. Avaliação do conteúdo lipídico da *Chlamydomonas sp.*

O teor lipídico das células de *Chlamydomonas sp.* foi avaliado através da extração dos lípidos totais da biomassa das diferentes culturas, colhida no final do período de cultivo, utilizando o método de Bligh e Dyer (1959) modificado conforme a descrição em Oliveira (2009). A determinação do teor lipídico tem sido conduzida após extração com uma mistura de clorofórmio/metanol, devido à elevada eficácia de extração com a combinação destes solventes (Mulbry et al., 2009; Lee et al., 1998). No final, a massa de lípidos obtida para cada amostra foi quantificada gravimetricamente.

4.3.1. Avaliação do efeito da concentração de azoto no meio de cultura no conteúdo lipídico e produtividade lipídica da *Chlamydomonas sp.*

Na Figura 28 pode-se observar as frações lipídicas e não lipídicas obtidas para os diferentes ensaios em meio padrão e meio padrão com adição de azoto sob a forma de nitrato. Os valores registados representam a média das extrações realizadas para cada ensaio. A maior e menor percentagem de lípidos registaram-se para os ensaios em meio padrão com adição de 10x N, 33,19 e 2,04% (% biomassa seca), no primeiro e segundo ensaio respetivamente.

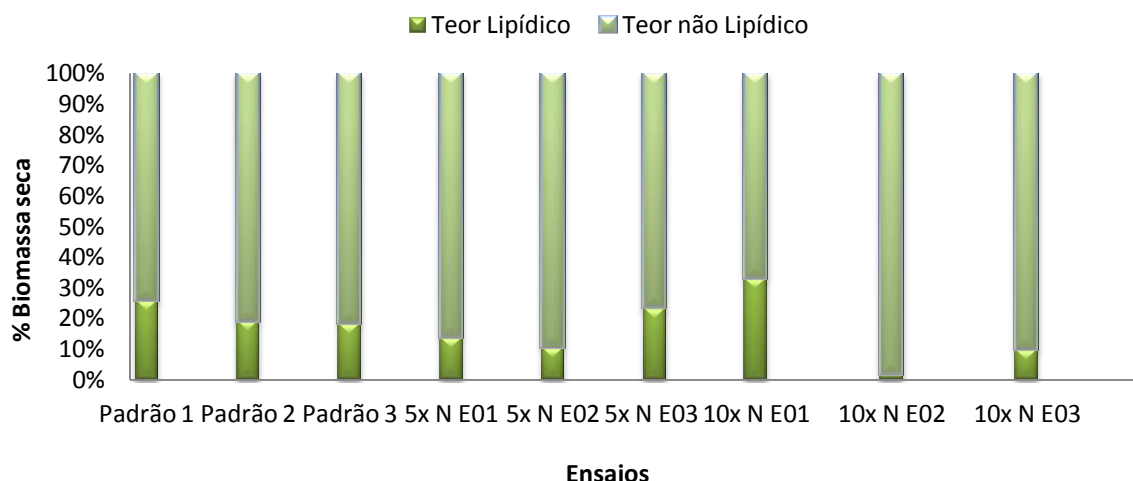


Figura 28 - Teores lipídico e não lipídico da *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.

A produtividade lipídica máxima calculada para os diferentes ensaios (Anexo 8) encontra-se registada na Figura 29. Observa-se que os valores máximos foram obtidos para o primeiro ensaio em meio padrão, 13,66 mg/L.dia e para o primeiro ensaio em meio padrão com adição 10x N, 9,90 mg/L.dia. Os menores valores observam-se no segundo ensaio quer em meio padrão com adição 5x N quer em meio padrão com adição 10x N, 1,65 e 0,32 mg/L.dia, respetivamente. Verifica-se uma evidente falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos, que é consequência não só da falta de reprodutibilidade nas produtividades em biomassa como na falta de reprodutibilidade na determinação do teor lipídico.

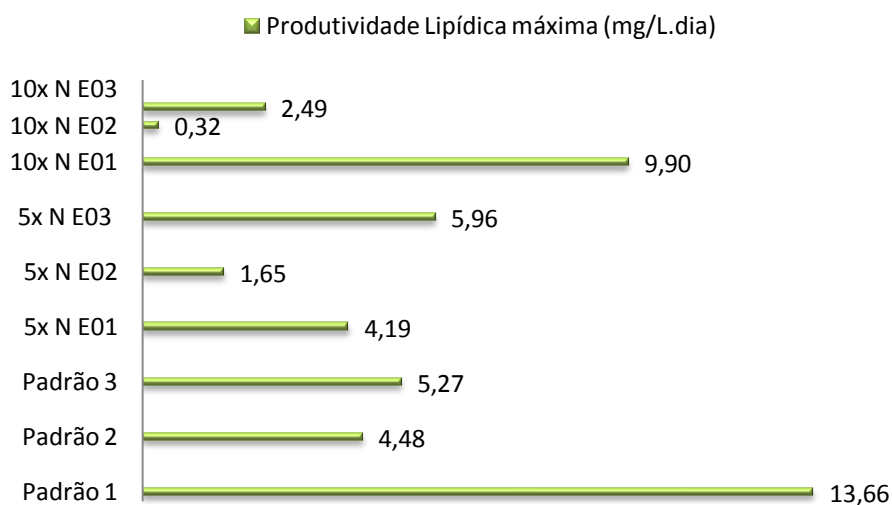


Figura 29 - Produtividade Lipídica máxima da *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N, após 42 dias de cultivo.

4.3.2. Avaliação do efeito da concentração de ferro no meio de cultura no teor lipídico e produtividade lipídica da *Chlamydomonas sp.*

Na Figura 30 pode-se observar as frações lipídicas e não lipídicas obtidas para os diferentes ensaios em meio padrão com adição de ferro. Os valores registados representam a média das extrações realizadas para cada ensaio. Verifica-se que os valores encontrados são semelhantes entre si. O maior teor de lípidos registou-se para o segundo ensaio em meio padrão com adição de 3x Fe, 27,92% (%biomassa seca) e o menor para o segundo ensaio em meio padrão com adição de 5x Fe, 17,36% (%biomassa seca).

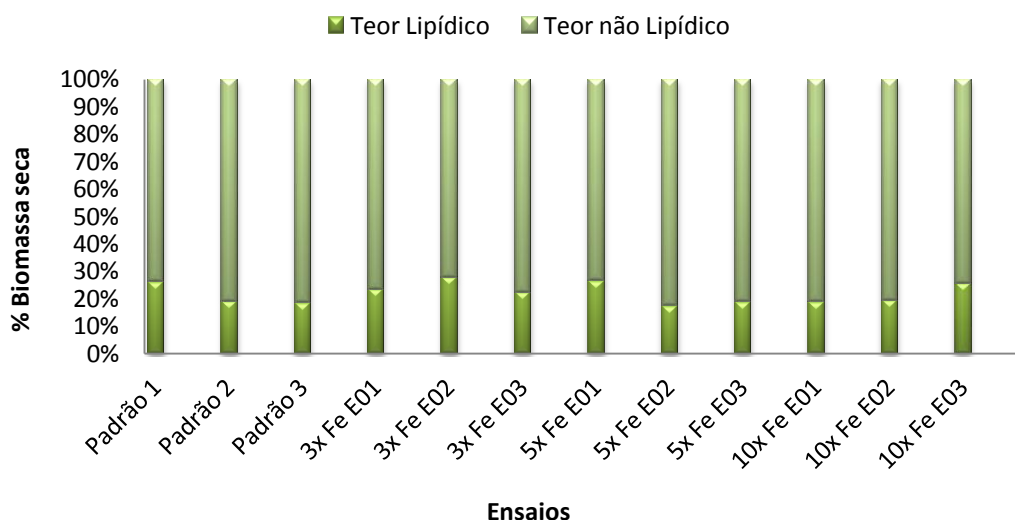


Figura 30 - Teores lipídico e não lipídico da *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.

A produtividade lipídica máxima calculada para os diferentes ensaios em meio padrão com adição de ferro (Anexo 8) encontra-se registada na Figura 31. Verifica-se que os valores máximos foram obtidos para o segundo ensaio em meio padrão com adição de 10x Fe, 9,01 mg/L.dia e para o primeiro ensaio em meio padrão com adição 5x Fe, 8,82 mg/L.dia. Os menores valores observam-se no primeiro ensaio quer em meio padrão com adição 3x Fe quer em meio padrão com adição 10x Fe, 4,87 e 4,28 mg/L.dia, respetivamente. Verifica-se mais uma vez a falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos.

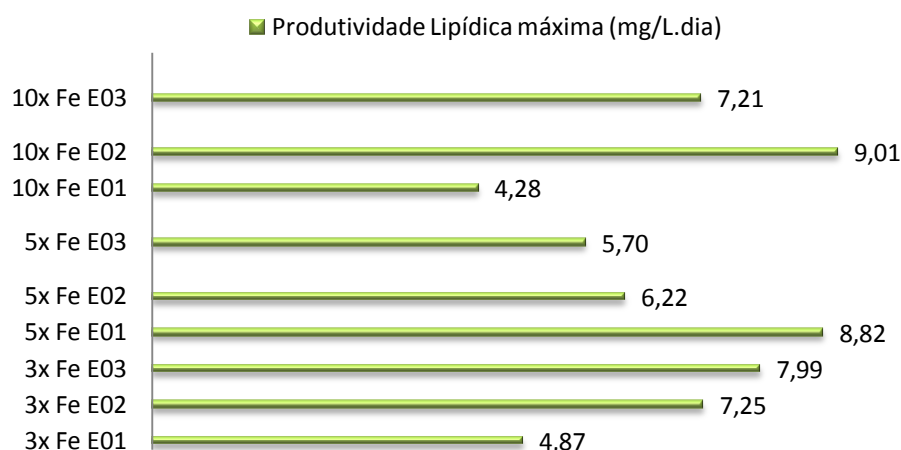


Figura 31 - Produtividade lipídica máxima da *Chlamydomonas sp.* para os ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe, após 19 dias de cultivo.

Os resultados obtidos revelam que existem variações no teor lipídico, resultantes das diferentes condições em estudo, determinando que o meio de cultura influencia a produção lipídica desta espécie. Os ensaios em meio padrão com adição de ferro registaram uma maior percentagem de teor lipídico. Embora as diferenças registadas com os ensaios em meio padrão não sejam significativas, o efeito da concentração de ferro é manifestado nos parâmetros em estudo. Os ensaios em meio padrão com adição de azoto registaram o menor teor lipídico.

Verifica-se que os teores lipídicos obtidos para a *Chlamydomonas sp.* são concordantes com o teor de lípidos que pode estar presente na composição química de microalgas do mesmo género, como a *Chlamydomonas reinhardtii*, com teor lipídico na ordem dos 21 % (% biomassa seca) (Demirbas e Demirbas, 2011).

Na Tabela 5 apresenta-se o resumo dos resultados finais obtidos para os diferentes meios de cultura testados.

Atendendo aos valores obtidos de produtividade em biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica, verifica-se que as melhores condições para o cultivo desta microalga para produção de lípidos correspondem a um aumento em 5 vezes da concentração de ferro no meio de cultura.

Tabela 5 – Resumo dos valores médios de produtividade em biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica da *Chlamydomonas sp.* nas diferentes condições em estudo, após 19 dias de cultivo.

Meio	Produtividade média em biomassa seca (mg/L.dia)	Produtividade máxima em biomassa seca (mg/L.dia)	Teor lipídico (%biomassa seca)	Produtividade máxima lipídica (mg/L.dia)
Padrão	9,54 ± 0,87	19,69 ± 2,69	21,22 ± 4,18	4,19 ± 1,00
Padrão com adição 5x N	6,39 ± 2,46	16,60 ± 7,07	15,97 ± 6,71	2,91 ± 2,40
Padrão com adição 10x N	2,38 ± 1,66	13,03 ± 11,49	15,09 ± 16,18	2,23 ± 2,07
Padrão com adição 3x Fe	11,92 ± 3,25	27,54 ± 7,58	24,52 ± 2,99	6,70 ± 1,63
Padrão com adição 5x Fe	14,82 ± 0,52	33,11 ± 1,55	20,91 ± 5,01	6,91 ± 1,67
Padrão com adição 10x Fe	13,19 ± 1,37	32,32 ± 12,13	21,33 ± 3,60	6,83 ± 2,39

A avaliação do crescimento e do teor lipídico são dois parâmetros essenciais quando se pretende fazer uma seleção racional de microalgas com elevada produção de lípidos, visando a produção de biodiesel (Griffiths e Harrison, 2009). Neste trabalho foi possível concluir quanto à variação do teor lipídico total em função da taxa de crescimento, verificando-se a associação de uma maior taxa de crescimento a uma maior produção lipídica. Quando comparada com a *Chlorella vulgaris*, apesar do elevado teor lipídico, a produtividade lipídica registada para a *Chlamydomonas sp.* é inferior aos valores de produtividade atingidos para esta espécie, 11,2 a 40,0 mg/L.dia (Mata et al., 2010). Estes resultados demonstram que a *Chlamydomonas sp.* pode não ser a espécie mais adequada para a produção de óleo em grande escala, face à baixa produtividade em lípidos. O aumento da acumulação de lípidos não resulta no aumento da produtividade lipídica uma vez que, a produtividade em biomassa e acumulação de lípidos não estão necessariamente correlacionados. A acumulação de lípidos refere-se ao aumento da concentração de lípidos no interior das células de microalgas sem considerar a produção de biomassa total. A produtividade lipídica leva em conta tanto a concentração de lípidos no interior das células como a biomassa produzida por essas células e, portanto, é um indicador mais útil dos potenciais custos de produção de biocombustíveis (Brennan e Owende, 2010).

Visando a produção de lípidos, a percentagem de lípidos das microalgas é menos importante do que a maximização das taxas de crescimento (Weldy e Huesemann, 2007).

4.4. Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME)

Para reconhecer o potencial dos biocombustíveis obtidos a partir de biomassa algal é necessário avaliar o perfil de ésteres metílicos dos ácidos gordos, formados após a esterificação das amostras. As propriedades destes ésteres vão ser responsáveis pela qualidade final do biodiesel produzido (Demirbas e Demirbas, 2011).

Nas Figuras 32, 33 e 34 estão representados os cromatogramas relativos aos ensaios de análise dos ésteres do biodiesel, produzido através do óleo extraído da cultura de *Chlamydomonas spec.*, em meio padrão com adição de ferro.

Numa primeira tentativa de obter o perfil dos FAME, realizou-se um ensaio com a injeção de 0,1 μL de amostra + 2 mL de padrão. A partir do cromatograma obtido, Figura 32, podemos observar que nestas condições não foi possível distinguir os picos representativos dos ésteres metílicos.

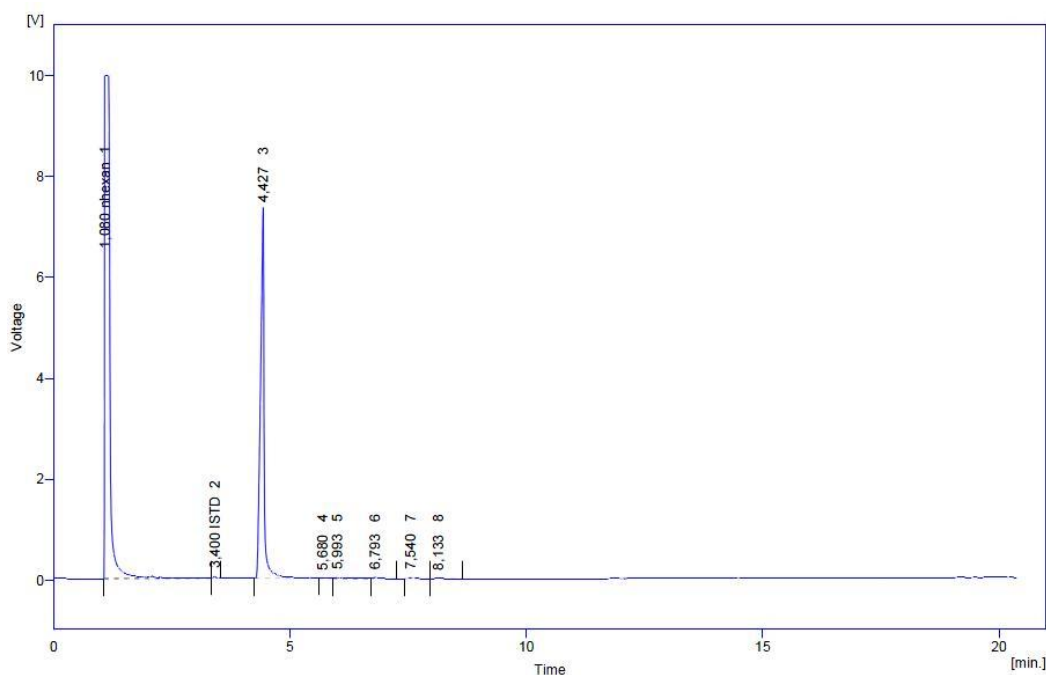


Figura 32 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de *Chlamydomonas sp.*, em meio padrão com adição de ferro (injeção 0,1 μL de amostra + 2 mL de padrão).

Para tentar visualizar e perceber a existência dos diferentes ésteres constituintes da amostra, realizou-se um segundo ensaio aumentando em dez vezes a amostra injetada diluída em 2 mL de heptano. Neste ensaio não foi adicionado o padrão, pois com o volume de amostra injetado ocorreria a sua saturação. Nestas condições, apesar de não ser possível a sua quantificação, podemos identificar os ésteres presentes na amostra.

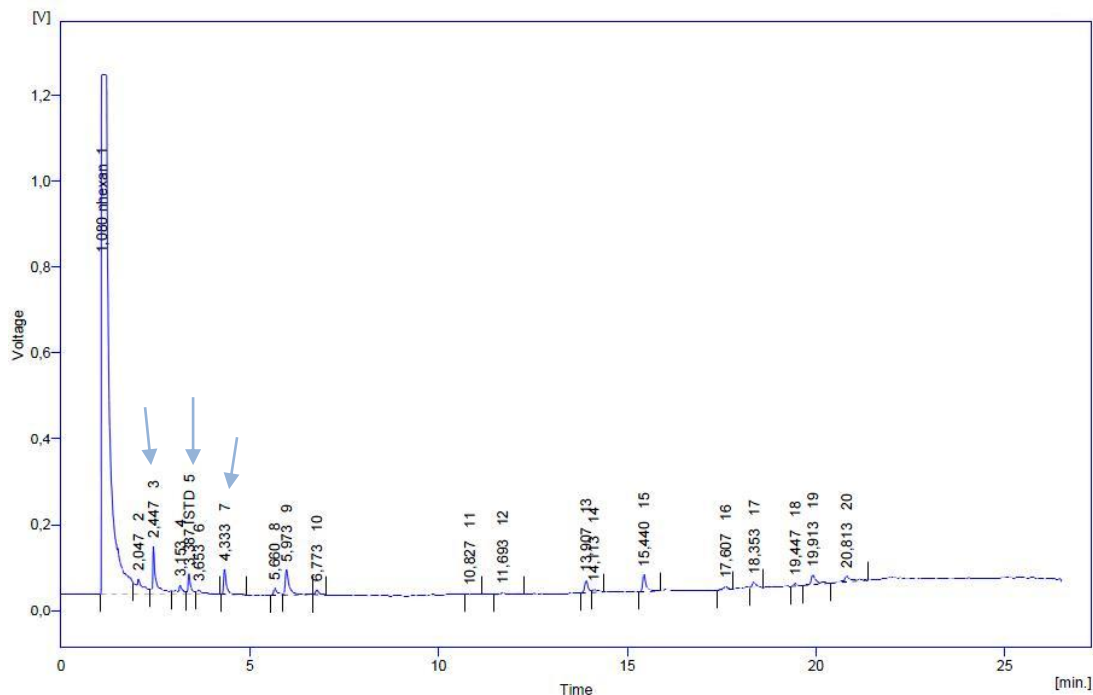


Figura 33 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de *Chlamydomonas sp.*, em meio padrão com adição de ferro (injeção 1 μ L de amostra sem adição de padrão).

Através do cromatograma obtido para este ensaio, Figura 33, podemos identificar três picos principais que dizem respeito aos ésteres metílicos dos ácidos gordos C14:0 (miristato), C16:0 (palmitato) e o C18:1 (oleato). Podem ainda observar-se outros picos em menor abundância, nomeadamente os picos representativos dos ésteres C18:0 (estearato) e C18:2 (linolato). Para além dos FAME identificados, podem ainda observar-se três picos que não correspondem a ésteres metílicos mas sim a ácidos gordos, dos quais o ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1) e o ácido linoleico (18:2). A identificação da presença de ácidos gordos na amostra revela que a esterificação dos lípidos não ocorreu eficientemente.

A identificação dos picos correspondentes aos diferentes ésteres foi possível comparando os tempos de retenção com os dos padrões adequados.

Numa última tentativa de quantificar os ésteres produzidos, realizou-se um ensaio com a injeção 1 μ L de amostra + 0,2 mL de padrão + 1,8 mL de heptano. Na Figura 34 está representado o cromatograma obtido nestas condições. Comparando os cromatogramas das figuras 33 e 34 a principal diferença deveria ser o pico correspondente ao pico do padrão, inexistente no ensaio anterior. No entanto, observam-se diferenças em outros picos. Tal como no ensaio anterior identificam-se quatro picos correspondentes aos ésteres C14:0 (Miristato), C16:0 (Palmitato), C18:0 (Estearato) e C18:1 (Oleato) e três picos correspondentes aos ácidos gordos Palmítico (16:0), Oleico (18:1) e Linoleico (18:2).

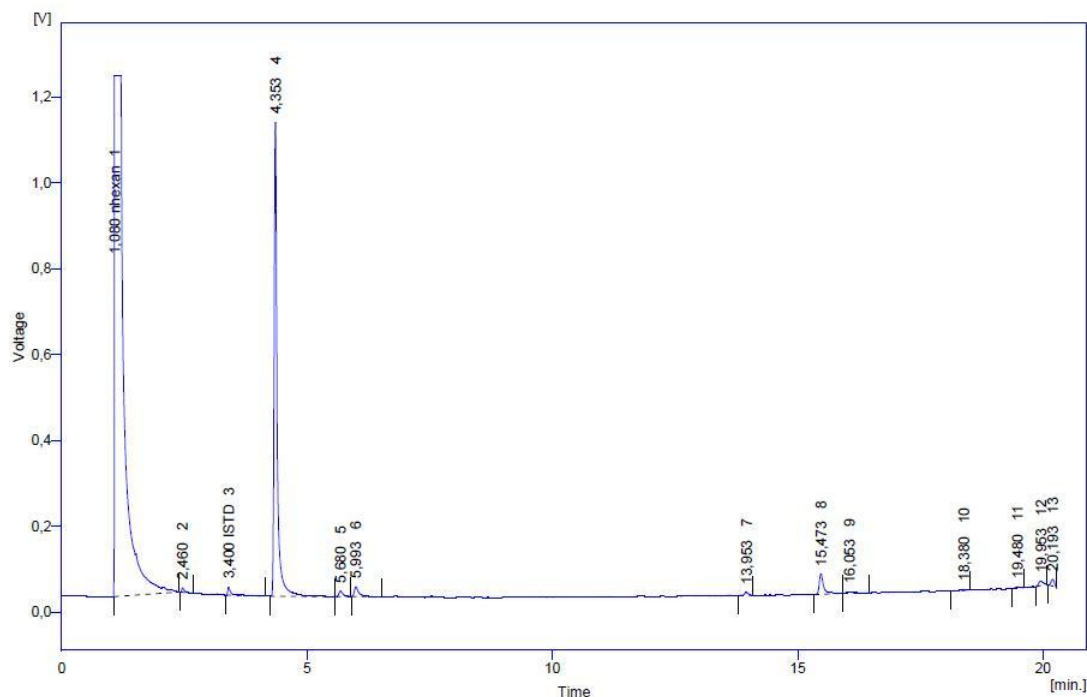


Figura 34 - Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos presentes na amostra de *Chlamydomonas sp.*, em meio padrão com adição de ferro (injeção 1 μ L de amostra + 0,2 mL de padrão + 1,8 mL de heptano).

O teor de ésteres presentes na amostra pode ser quantificado através da comparação da área do pico obtido com a área do pico do padrão interno injetado (Tabela 6). No entanto, os ésteres quantificados não são representativos da amostra uma vez que a presença dos ácidos gordos indica que não se processou a esterificação de todo o óleo. As quantidades demasiado pequenas não permitem ainda, a quantificação verdadeira de cada éster presente.

A composição característica em ácidos gordos da biomassa algal é composta sobretudo por uma mistura de ácidos gordos insaturados, tais como o ácido palmítoleico (16:1), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2) e o ácido linolénico (18:3). Os ácidos gordos saturados, tais como o ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0) estão também presentes em menor extensão (Gouveia, 2011). Os ésteres metílicos provenientes dos ácidos gordos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) são considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade. Estes constituem o parâmetro mais direto e preciso de avaliação do potencial da espécie de microalgas como substrato para a produção de biodiesel, uma vez que nem todos os compostos solúveis nos solventes orgânicos utilizados na extração podem ser convertidos em biodiesel.

Tabela 6 - Identificação dos ésteres metílicos de ácidos gordos e sua quantificação.

Pico	Tempo Retenção (min)	Área do pico (mV.s)	C	% Éster	Designação do Éster
1	1,080	16834,059			
2	2,460	41,905	C14:0	0,82	Miristato
3	3,400	95,711	C16:0	1,87	Palmitato
4	4,353	4746,581		92,94	Padrão
5	5,680	72,798	C18:0	1,43	Estearato
6	5,993	150,371	C18:1	2,94	Oleato

Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lípidos, hidrocarbonetos e outros óleos complexos. Nem todos os óleos provenientes de microalgas são satisfatórios para a produção de biodiesel, mas óleos adequados ocorrem vulgarmente (Chisti, 2007).

O perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos registado para a *Chlamydomonas sp.* mostra a predominância dos ésteres C16:0 (palmitato) e C18:1 (oleato), indicando uma boa qualidade do óleo extraído a partir desta espécie e a sua aplicabilidade na produção do biodiesel.

É importante salientar que esta análise se baseou sobretudo na identificação dos ésteres encontrados e não pela sua quantificação, uma vez que os baixos teores determinados derivaram da quantidade reduzida de amostra, das perdas ocorridas na preparação da amostra injetada e, principalmente, pelo fato de nem todos os ácidos gordos terem sido convertidos em ésteres, resultado de uma baixa eficiência do processo de esterificação.

5. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

O objetivo principal desta dissertação visou o cultivo de microalgas e a extração de óleo da biomassa microalgal, para a produção do biodiesel e a caracterização do óleo e biodiesel produzido. Inicialmente foram inoculadas as espécies *Chlorogonium elongatum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas sp.*, *Scenedesmus obliquus* e *Oocystis spec.*. A espécie que apresentou uma maior taxa de crescimento foi a *Chlamydomonas sp.*, razão pela qual foi selecionada para continuar o estudo.

O primeiro objetivo definido passava pela otimização das condições de cultivo das microalgas, com vista à obtenção de elevadas taxas de crescimento de biomassa e/ou de elevados teores lipídicos. Quando expostas a condições de cultivo sujeitas a situações de carência de determinados tipos de nutrientes, as culturas tem tendência a acumular lípidos em detrimento da divisão celular, podendo resultar em produtividades lipídicas mais baixas. A produtividade lipídica está dependente da produtividade da biomassa e do teor de lípidos. Por isso, embora o teor de lípidos possa ser mais elevado em situações de *stress*, devido à maior acumulação de lípidos em detrimento da divisão celular, como a produtividade de biomassa é menor, a produtividade lipídica também poderá ser ou não, menor. Assim, estudou-se o efeito do aumento da concentração dos nutrientes azoto e ferro no crescimento e produção de lípidos, por alteração da composição do meio de cultura, aumentando as concentrações de azoto em 5x e 10x e, de ferro em 3x, 5x e 10x relativamente ao meio padrão. Concluiu-se que a alteração de um único parâmetro de cultivo é suficiente para provocar alterações no crescimento da espécie. Os ensaios realizados em meio padrão com adição de 10x Fe foram os que registaram uma melhor taxa de crescimento, obtendo-se uma concentração final de biomassa cerca de 1,5 vezes superior aos ensaios realizados em meio padrão. O aumento da concentração de azoto pareceu inibir o crescimento das culturas e registou-se uma concentração final de biomassa cerca de 3 vezes inferior relativamente ao meio padrão. Verificou-se ainda, que o suplemento de ferro também potenciou o aumento do teor lipídico, obtendo-se teores médios de $24,52 \pm 2,99\%$, $20,91 \pm 5,01\%$ e $21,33 \pm 3,60\%$ para os ensaios realizados em meio padrão com adição de 3x Fe, 5x Fe e 10x Fe, respetivamente.

Apesar de algumas espécies possuírem elevadas concentrações lipídicas, por norma estas concentrações elevadas não se verificam em espécies com elevadas taxas de crescimento e, a baixa produtividade lipídica das microalgas nos cultivos em larga escala é um dos impedimentos que inviabiliza economicamente a produção de biocombustíveis. Os resultados obtidos revelam que apesar de um teor lipídico médio, a *Chlamydomonas sp.* tem baixas produtividades em biomassa e lipídicas quando comparada com outras espécies

(Mata et al., 2010). Os valores de produtividade em biomassa máxima e produtividade lipídica máxima registaram-se para os ensaios em meio padrão com adição de 5x Fe, sendo de $33,11 \pm 1,55$ e $6,91 \pm 1,67$ mg/L.dia, respetivamente. Atendendo aos valores obtidos para a produtividade em biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica, verifica-se que as melhores condições para o cultivo desta microalga, tendo em vista a produção de lípidos, correspondem a um aumento em 5 vezes da concentração de ferro no meio de cultura.

O último objetivo definido era a realização de testes com vista à extracção do óleo da biomassa microalgal e à transformação do óleo em biodiesel. A análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos do biodiesel produzido a partir do óleo da *Chlamydomonas sp.* revelou a predominância dos ésteres C16:0 (palmitato) e C18:1 (oleato) considerados ideais para a produção de biodiesel de elevada qualidade, estando também presentes os ésteres C14:0 (miristato) e C18:0 (estearato).

Apesar da baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos, de um modo geral, pode-se concluir que os parâmetros em estudo parecem ser afetados pelo meio desenvolvido e pelas suas soluções constituintes. Nos ensaios de otimização do ferro registam-se diferenças significativas, sugerindo que concentrações mais elevadas de ferro potenciam o crescimento da cultura e o seu teor lipídico. Desta forma, conclui-se que a produtividade pode ser potenciada pela otimização dos meios de cultura. A análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos produzidos demonstra uma boa qualidade dos óleos para um biodiesel, no entanto, a reduzida produtividade da *Chlamydomonas sp.* não confirma um elevado potencial de implementação a larga escala para a sua produção. Não existem muitas referências disponíveis sobre a sua valorização e é importante compreender toda a influência das condições de cultura, permitindo maximizar a produtividade em biomassa e a produtividade lipídica. Este trabalho permitiu obter informação relevante sobre esta espécie.

Num trabalho futuro seria importante, face aos resultados obtidos, estudar o efeito da carência dos nutrientes, nomeadamente do azoto e do ferro na produtividade e na produtividade lipídica da *Chlamydomonas sp.*

O cultivo em maior escala, por exemplo em sacos de mangas, seria fundamental possibilitando resultados mais representativos e permitindo a otimização dos processos finais de transformação, através do estudo dos métodos mais eficientes na extração e no processo de transesterificação.

A disponibilidade de nutrientes é apenas um entre vários fatores que influenciam o metabolismo dos lípidos e ácidos gordos, para além da temperatura e a luminosidade. De forma a compreender melhor o metabolismo lipídico da *Chlamydomonas sp.* seria também

importante estudar o efeito destas variáveis no teor lipídico e na composição química das células.

Referências bibliográficas

Abou-Shanab R.A.I., Hwang, J.H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B.H., 2011. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy* 88: 3300-3306.

Adam, F, Albert-Vian, M, Peltier, G, Chemat F, 2012. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096>.

Ahmad, AL, Yasin, NHM, Derek, CJC and Lim, JK, 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(1): 584 – 593.

Amaro, HM, Guedes, AC, Malcata,FX, 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*, 88(10): 3402-3410.

Amin, S, 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50(7): 1834-1840.

Bligh G., Dyer W., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37(8): 911 – 917.

Brennan, L, Owende, F, 2010. Biofuels from microalgae – A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2): 557-577.

Brum, A, Arruda, L, Regitano-d'Arce, M, 2009. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quim. Nova* 32(4): 849-854.

Chen, C, Yeh, K, Aisyah, R, Lee, D e Chang, J, 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technologie* 102(1): 71-81.

Chisti, Y, 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.

Converti, A, Casazza, A, Ortiz, E, Perego, P and 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(6): 1146-1151.

Demirbas, A, Demirbas, MF, 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management* 52(1): 163-170.

Ferrari, R, Oliveira, V, Scabio, A, 2005. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Quim. Nova* 28(1): 19-23.

Folch, J, Lees, M, Stanley, H, 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

González-Fernández, C, Sialve, B, Bernet, N and Steyer, JP, 2012. Review: Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6(1): 105-113.

Gouveia, L, 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer, 68 pp.

Griffiths, MJ, Harrison, S, 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21: 493-507.

Halim, R, Gladman, B, Danquah, M and Webley, P, 2011. Oil Extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102: 178-185.

Hoekman, S, Broch, A, Robbins, C, Ceniceros, E, Natarajan, M, 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 143-169.

Huang, G, Chen, F, Wei, D, Zhang, X, Chen, G, 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87: 38-46.

Huber, G, Iborra, S, Corma, A, 2006. *Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering*. American Chemical Society.

Hulatt, C, Thomas, D, 2011. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology* 102(10): 5775-5787.

Lee, S, Yoon, B, Oh, H, 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12: 553-556.

Lepage, G, Roy, C, 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, Vol. 25.

Liu, Z, Wang, G, Zhou, B, 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 99(11): 4717-4722.

Mata, TM, Martins, AA and Caetano, NS, 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1): 217-232.

Morowvat, MH, Rasoul-Amini, S and Ghasemi, Y, 2010. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. *Bioresource Technology* 101: 2059-2062.

Mulbry, W, Kondrad, S, Buyer J, Luthria D, 2009. Optimization of an Oil Extraction Process for Algae from the Treatment of Manure Effluent. *J Am Oil Chem Soc* 86: 909-915.

Oliveira, O, 2009. Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis. Tese de Mestrado em Bioenergia. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 69 pp.

Oltra, C, 2011. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. *Energy Policy* 39(3): 1774-1781.

Pruvost, J, Vooren, GV, Gouic, B, Couzinet-Mossion, A and Legrand, J, 2011. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology* 102(1): 150-158.

Satyanarayana, KG, Mariano, AB and J. V. C. Vargas, 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energy Res.* 35(4): 291– 311.

Scott, SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21(3): 277-286.

Sheng, J, Kim, HW, Badalamenti, JP, Zhou, C, Sridharakrishnan, S, Krajmalnik-Brown, R, Rittmann, BE, Vannela, R, 2011. Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis sp.* PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 102(24): 11218-11225.

Tang, H, Abunasser, N, Garcia, M, Chen, M, Ng, K, Salley, S, 2011. Potencial of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Appl Energy* 88: 3324-3330.

Weldy, CS, Huesemann, M, 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *US Department of Energy Journal of Undergraduate Research* 7(1): 115- 22.

Yang, J, Xu, M, Zhang, X, Hu, Q, Sommerfeld, M, Chen, Y, 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology* 102: 159-165.

Anexos

Anexo 1. Meios de cultura

Tabela A 1- Composição do meio de cultura *Bold Basal Medium* (BBM).

Reagentes		Soluções (g/L)	Volume (mL/L _{meio})
Macronutrientes	K ₂ HPO ₄	7,50	10,0
	KH ₂ PO ₄	17,50	10,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50	10,0
	NaNO ₃	25,00	10,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50	10,0
	NaCl	2,50	10,0
	EDTA-Na ₂ + KOH	50,00 + 31,00	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O + H ₂ SO ₄	4,98 + 1,00 mL	1,0
	H ₃ BO ₃	11,42	1,0
Micronutrientes	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,412	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,232	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,252	1,0
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,080	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,192	
H ₂ O destilada			916,0

Tabela A 2 - Composição do meio de cultura *Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified* (3N-BBM).

Reagentes		Soluções (g/L)	Volume (mL/L _{meio})
Macronutrientes	K ₂ HPO ₄	15,00	5,0
	KH ₂ PO ₄	35,00	5,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15,00	5,0
	NaNO ₃	75,00	10,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,00	5,0
	NaCl	5,00	5,0
	EDTA-Na ₂ + KOH	50,00 + 31,00	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O + H ₂ SO ₄	4,98 + 1,00 mL	1,0
	H ₃ BO ₃	11,42	1,0
Micronutrientes	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,412	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,232	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,252	1,0
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,080	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,192	
H ₂ O destilada			961,0

Tabela A 3 - Composição do meio de cultura desenvolvido como meio padrão.

	Reagentes	Soluções (g/L)	Volume (mL/L _{meio})
Macronutrientes	K₂HPO₄	15,00	10,0
	KH₂PO₄	35,00	10,0
	MgSO₄·7H₂O	15,00	5,0
	NaNO₃	75,00	30,0
	CaCl₂·2H₂O	5,00	5,0
	NaCl	5,00	5,0
	EDTA-Na₂ + KOH	50,00 + 31,00	1,0
	FeSO₄·7H₂O + H₂SO₄	4,98 + 1,00 mL	2,0
	H₃BO₃	11,42	1,0
Micronutrientes	ZnSO₄·7H₂O	1,412	
	MnCl₂·4H₂O	0,232	
	CuSO₄·5H₂O	0,252	0,5
	Co(NO₃)₂·6H₂O	0,080	
	Na₂MoO₄·2H₂O	0,192	
	H₂O destilada		930,5

Anexo 2. Métodos de quantificação da biomassa

Para a determinação do método mais adequado na avaliação do crescimento e quantificação da biomassa, realizou-se um ensaio prévio que consistiu na monitorização diária de três culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão (Figura A1), durante 6 dias, através da contagem celular, determinação do peso seco e leitura de densidade ótica. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Nos anexos 2.1, 2.2 e 2.3 estão registados os resultados obtidos para os diferentes métodos de quantificação.



Figura A 1 - Culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão, em diversos estágios de desenvolvimento, para o estudo dos métodos de quantificação da biomassa .

Anexo 2.1. Contagem celular

O número de células presente nas amostras das culturas de *Chlamydomonas sp.* foi obtido a partir da contagem direta ao microscópio com auxílio de uma câmara de contagem Neubauer de 0,1 mm de profundidade (Figura A2).

As câmaras de Neubauer são constituídas por uma lâmina gravada com um reticulado de dimensões conhecidas no fundo de uma pequena depressão que, coberta com uma lamela não flexível e perfeitamente aderente aos bordos, fica com uma profundidade livre geralmente conhecida. O espaço assim criado, cujo volume é conhecido, é preenchido com a amostra em que se encontram suspensas as células a contar. Admitindo que estas se distribuem homogeneamente na amostra e que esta é representativa da inicial, a contagem das células presentes num volume conhecido pode ser generalizada a essa amostra inicial.

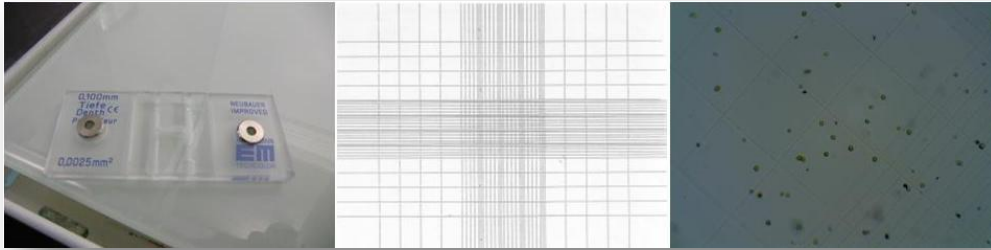


Figura A 2 - Contagem celular numa câmara de Neubauer.

Nas Tabelas A4 e A5 estão registados os valores obtidos pelo método de contagem celular para os ensaios realizados. A concentração celular final corresponde à média dos valores obtidos nos três ensaios.

Tabela A 4 - Avaliação do crescimento da *Chlamydomonas sp.* em maio padrão pelo método de contagem celular.

	Dias	Concentração celular (nº células / µL)														
		Réplica 1					Réplica 2					Ré				
		C1a	C1b	C1c	C1d	C1e	Média	C2a	C2b	C2c	C2d	C2e	Média	C3a	C3b	C3c
Ensaio 1	0	3	8	21	18	9	11,80	16	12	7	9	10	10,80	5	11	5
	1	14	10	15	19	12	14,00	14	9	17	16	15	14,20	9	10	8
	2	18	23	27	21	23	22,40	22	32	27	33	25	27,80	21	20	16
	3	34	36	22	24	23	27,80	34	35	42	29	36	35,20	38	33	26
	4	45	45	43	45	47	45,00	45	48	47	52	43	47,00	50	29	44
	6	57	64	89	58	85	70,60	61	58	57	68	51	59,00	55	66	52
Ensaio 2	0	3	2	2	7	2	3,20	2	7	7	1	9	5,20	3	5	1
	1	19	13	9	12	8	12,20	11	8	10	5	8	8,40	12	10	19
	2	16	17	16	25	12	17,20	10	11	17	14	11	12,60	18	19	19
	3	32	28	44	42	34	36,00	31	49	28	39	29	35,20	22	25	23
	4	39	31	42	32	33	35,40	39	44	40	44	36	40,60	36	36	39
	6	74	64	63	59	66	65,20	79	68	84	87	80	79,60	86	80	67
Ensaio 3	0	3	1	4	4	3	3,00	3	3	3	5	5	3,80	4	6	4
	1	23	13	8	11	19	14,80	10	21	19	12	9	14,20	17	9	18
	2	27	22	18	27	25	23,80	27	26	20	24	27	24,80	18	14	23
	3	56	36	28	27	40	37,40	37	22	66	45	39	41,80	52	31	25
	4	53	47	55	62	37	50,80	43	42	50	54	37	45,20	48	47	61
	6	69	80	80	77	83	77,80	72	94	75	64	85	78,00	73	82	72

Tabela A 5 - Resumo final dos valores obtidos para a concentração celular da *Chlamydomonas sp.*.

Dias	Concentração celular				
	(nº células/µL)				(nº células/L)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	
0	9,53	4,07	3,40	5,67	5,67E+06
1	12,87	12,33	14,87	13,36	1,34E+07
2	23,80	16,20	22,60	20,87	2,09E+07
3	32,27	32,53	40,13	34,98	3,50E+07
4	44,20	39,87	48,53	44,20	4,42E+07
6	62,00	72,87	77,60	70,82	7,08E+07

Anexo 2.2. Densidade ótica

Nas Tabelas A6 e A7 estão registados os valores obtidos pelo método de densidade ótica para os ensaios realizados.

As leituras de observância realizaram-se a um comprimento de onda de 682,5 nm, correspondente ao pico máximo de absorvância determinado para a cultura mãe.

Tabela A 6 - Avaliação do crescimento da *Chlamydomonas sp.* em maio padrão pelo método de densidade ótica.

	Dias	Absorvância _{682,5 nm}			
		1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média
Ensaio 1	0	0,004	0,007	0,004	0,005
	1	0,045	0,056	0,043	0,048
	2	0,089	0,085	0,086	0,087
	3	0,123	0,132	0,120	0,125
	4	0,149	0,161	0,153	0,154
	6	0,224	0,231	0,209	0,221
	Ensaio 2	0	0,002	0,007	0,005
1		0,045	0,049	0,042	0,045
2		0,080	0,078	0,077	0,078
3		0,102	0,104	0,101	0,102
4		0,113	0,137	0,127	0,126
6		0,169	0,167	0,188	0,175
Ensaio 3		0	0,007	0,012	0,010
	1	0,049	0,055	0,039	0,048
	2	0,091	0,091	0,089	0,090
	3	0,111	0,118	0,126	0,118
	4	0,127	0,130	0,156	0,138
	6	0,182	0,177	0,194	0,184

Tabela A 7 - Resumo final dos valores obtidos de concentração em biomassa seca da *Chlamydomonas sp.* pelo método de densidade ótica.

Dias	Absorvância _{682,5 nm}				C _{biomassa seca} (mg/L)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	
0	0,004	0,007	0,004	0,005	7,11
1	0,045	0,056	0,043	0,048	43,40
2	0,089	0,085	0,086	0,087	77,51
3	0,123	0,132	0,12	0,125	104,46
4	0,149	0,161	0,153	0,154	125,94
6	0,224	0,231	0,209	0,221	174,46

A concentração em biomassa seca obtida foi determinada segundo a relação estabelecida entre a absorvância e a concentração em biomassa seca, a partir da curva de calibração (Anexo 3).

Anexo 2.3. Método gravimétrico

A avaliação do crescimento das culturas pelo método gravimétrico consistiu na determinação do peso seco das amostras.

Nas Tabelas A8 e A9 estão registados os valores obtidos pelo método gravimétrico para os ensaios realizados.

Tabela A 8 - Avaliação do crescimento da *Chlamydomonas sp.* em maio padrão pelo método gravimétrico.

		Peso seco (g)								
		Dias	Réplica 1			Réplica 2				
			m _{filtro}	m _{filtro + biomassa seca}	m _{biomassa seca}	m _{filtro}	m _{filtro + biomassa seca}	m _{biomassa seca}	m _{filtro}	m _{filtro}
Ensaio 1	0	0,0911	0,0915	0,0004	0,0892	0,0895	0,0003	0,0922		
	1	0,0915	0,0915	0,0000	0,0919	0,0921	0,0002	0,0916		
	2	0,0918	0,0919	0,0001	0,0920	0,0937	0,0017	0,0902		
	3	0,0907	0,0911	0,0004	0,0917	0,0917	0,0000	0,0918		
	4	0,0905	0,0906	0,0001	0,0896	0,0898	0,0002	0,0899		
	6	0,0921	0,0930	0,0009	0,0925	0,0931	0,0006	0,0924		
Ensaio 2	0	0,0920	0,0922	0,0002	0,0919	0,0922	0,0003	0,0929		
	1	0,0916	0,0916	0,0000	0,0908	0,0908	0,0000	0,0902		
	2	0,0892	0,0896	0,0004	0,0913	0,0919	0,0006	0,0907		
	3	0,0920	0,0924	0,0004	0,0921	0,0924	0,0003	0,0925		
	4	0,0905	0,0906	0,0001	0,0909	0,0914	0,0005	0,0912		
	6	0,0931	0,0935	0,0004	0,0922	0,0929	0,0007	0,0902		
Ensaio 3	0	0,0922	0,0926	0,0004	0,0927	0,0928	0,0001	0,0919		
	1	0,0912	0,0912	0,0000	0,0915	0,0915	0,0000	0,0902		
	2	0,0920	0,0923	0,0003	0,0909	0,0914	0,0005	0,0908		
	3	0,0928	0,0931	0,0003	0,0919	0,0921	0,0002	0,0915		
	4	0,0919	0,0923	0,0004	0,0904	0,0909	0,0005	0,0911		
	6	0,0903	0,0909	0,0006	0,0907	0,0911	0,0004	0,0909		

Tabela A 9 - Resumo final dos valores obtidos de concentração em biomassa seca da *Chlamydomonas sp.* pelo método gravimétrico.

Dias	Peso seco (g)				C _{biomassa seca} (mg/L)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	
0	0,0003	0,0002	0,0002	0,0002	70,37
1	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	25,93
2	0,0012	0,0006	0,0004	0,0007	244,44
3	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	96,30
4	0,0002	0,0003	0,0005	0,0003	111,11
6	0,0007	0,0004	0,0006	0,0006	196,30

A concentração em biomassa seca foi determinada dividindo o valor da massa de microalgas seca obtida pelo volume de amostra (3 mL).

Anexo 3. Curva de calibração

Visando a aplicação do método de densidade ótica, para a quantificação da biomassa algal, na avaliação do crescimento das culturas em estudo foi necessário estabelecer uma relação entre a densidade ótica (OD) e a concentração em biomassa seca. Para tal, foi traçada uma curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a *Chlamydomonas sp.* (Figura A3) a partir de diferentes soluções padrão (Figura A4) preparadas com biomassa liofilizada colhida de uma cultura em meio padrão. As leituras realizaram-se a um comprimento de onda de 682,5 nm, correspondente ao pico máximo de absorvância determinado para a cultura mãe (Figura A5).

Os valores de densidade ótica obtidos para as diferentes concentrações padrão estão registados na Tabela A10.

Tabela A 10 - Valores de densidade ótica obtidos para as diferentes concentrações padrão.

	C_{biomassa seca} (g/L)	DO_{682,5}
1	1,3010	1,440
2	1,0408	1,172
3	0,6505	0,729
4	0,5204	0,582
5	0,3253	0,368
6	0,2602	0,293
7	0,1626	0,181
8	0,1301	0,141
9	0,0813	0,078

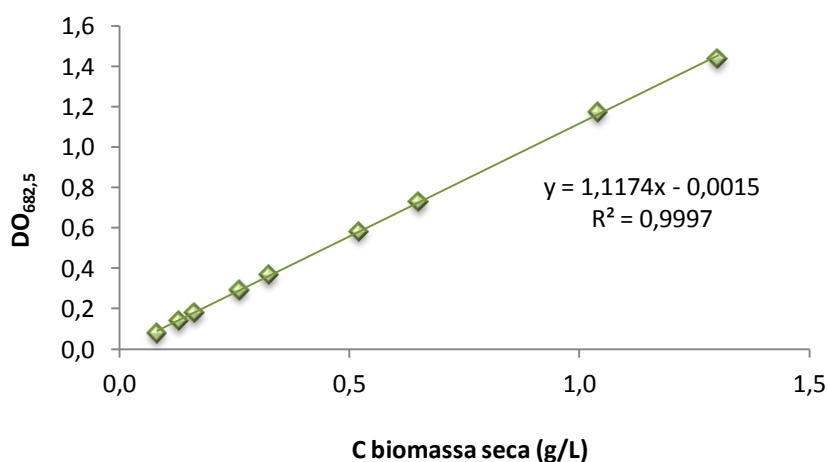


Figura A 3 – Curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a *Chlamydomonas sp.*.

A relação entre a densidade ótica e a concentração em biomassa seca estabelecida foi: $OD_{682,5} = 1,1174.C_{\text{biomassa seca}} [g/L] - 0,0015$.

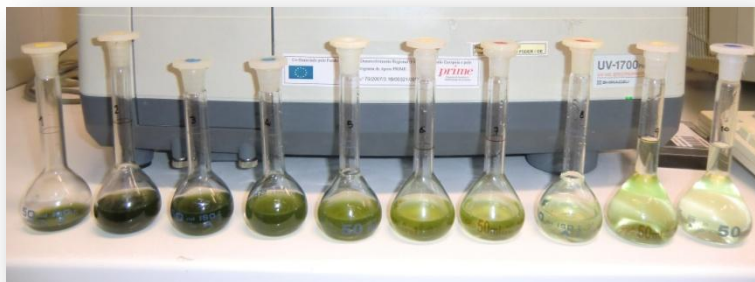


Figura A 4 - Soluções padrão preparadas a partir da biomassa de *Chlamydomonas sp.*

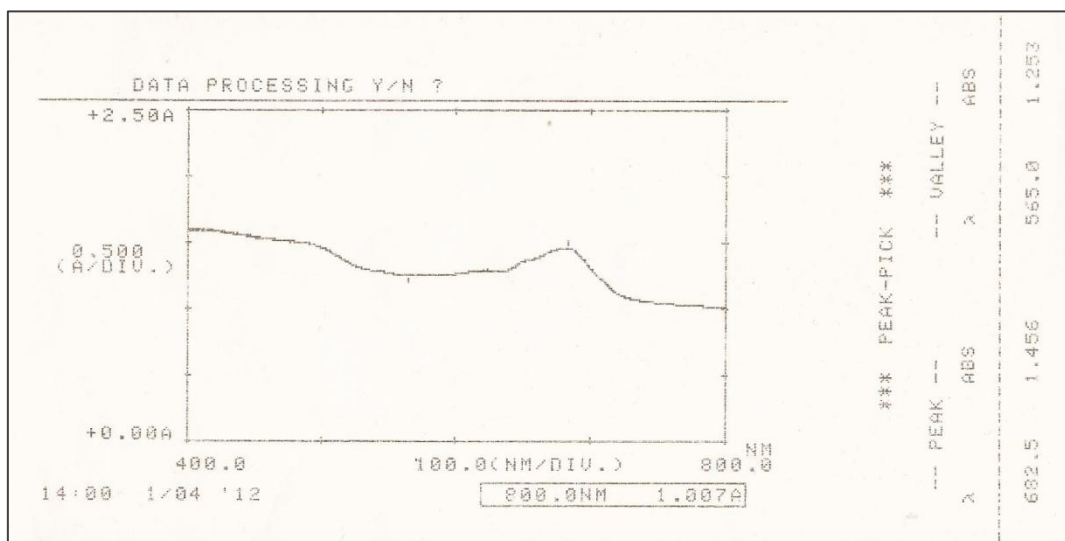


Figura A 5 - Pico máximo de absorvância determinado para a cultura mãe de *Chlamydomonas sp.*

Anexo 4. Crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.*

Face aos resultados obtidos no estudo comparativo das concentrações de microalgas pelos métodos gravimétrico, de densidade ótica e da contagem celular, o crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* foi avaliado através da monitorização diária do pH, da temperatura e, da biomassa seca pelo método de densidade ótica. Neste anexo são apresentados os resultados da monitorização do crescimento das microalgas nas diferentes condições em estudo (Tabelas A11 a A28; Figuras A6 a A11).

Tabela A 11 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,787	20,2	20,3	22,5	0,020	0,023	0,018	0,020	19,54
3	6,910	20,2	20,3	22,5	0,122	0,117	0,126	0,122	110,23
4	6,943	22,6	20,7	22,5	0,135	0,121	0,126	0,127	115,30
7	7,029	22,7	21,1	22,9	0,170	0,155	0,168	0,164	148,41
8	7,066	22,8	20,8	22,6	0,177	0,173	0,157	0,169	152,59
10	7,152	22,5	20,7	22,6	0,207	0,219	0,213	0,213	191,96
11	7,201	22,1	21,0	22,7	0,222	0,234	0,227	0,228	205,09
16	7,370	21,9	21,3	22,6	0,293	0,300	0,240	0,278	249,84
17	7,437	22,6	20,6	23,1	0,299	0,282	0,252	0,278	249,84
18	7,499	22,5	20,6	23,2	0,288	0,294	0,299	0,294	264,15
21	7,612	23,0	20,8	23,4	0,365	0,372	0,322	0,353	317,25
22	7,706	21,4	21,0	23,7	0,358	0,362	0,375	0,365	327,99
23	7,798	20,9	20,9	23,7	0,386	0,388	0,391	0,388	348,88
24	7,850	21,3	20,7	23,1	0,418	0,417	0,406	0,414	371,55
25	7,948	21,1	20,2	23,1	0,402	0,424	0,421	0,416	373,34
28	8,591	20,1	19,5	24,6	0,467	0,482	0,427	0,459	411,82
29	8,730	21,2	21,2	23,9	0,488	0,500	0,518	0,502	450,60
30	8,803	21,4	21,2	23,7	0,523	0,512	0,499	0,511	458,95
31	8,857	21,1	21,0	23,2	0,519	0,533	0,520	0,524	470,29
32	8,899	20,8	20,9	22,7	0,527	0,551	0,539	0,539	483,71
35	8,994	25,2	20,7	21,2	0,610	0,501	0,580	0,564	505,79
36	9,144	21,0	21,8	25,3	0,629	0,619	0,619	0,622	558,29
37	9,163	25,5	21,9	26,3	0,628	0,624	0,639	0,630	565,45
38	9,180	25,6	22,3	27,1	0,677	0,656	0,600	0,644	577,98
39	9,198	25,6	22,9	27,2	0,616	0,670	0,659	0,648	581,56
42	9,230	24,4	24,0	27,0	0,620	0,666	0,672	0,653	585,44

Tabela A 12 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,780	20,5	20,3	22,5	0,018	0,021	0,019	0,019	18,64
3	6,912	20,2	20,3	22,5	0,137	0,129	0,124	0,130	117,68
4	6,960	22,4	20,7	22,5	0,167	0,148	0,130	0,148	134,09
7	7,054	22,6	21,1	22,9	0,179	0,157	0,170	0,169	152,29
8	7,085	22,7	20,8	22,6	0,204	0,203	0,173	0,193	174,36
10	7,149	22,5	20,7	22,6	0,206	0,193	0,202	0,200	180,63
11	7,188	22,6	21,0	22,7	0,213	0,203	0,199	0,205	184,80
16	7,277	21,8	21,3	22,6	0,253	0,207	0,195	0,218	196,74
17	7,308	22,6	20,6	23,1	0,238	0,219	0,273	0,243	219,11
18	7,330	22,7	20,6	23,2	0,244	0,259	0,249	0,251	225,67
21	7,391	23,1	20,8	23,4	0,241	0,300	0,247	0,263	236,41
22	7,445	21,3	21,0	23,7	0,281	0,287	0,298	0,289	259,68
23	7,471	20,8	20,9	23,7	0,275	0,290	0,309	0,291	262,07
24	7,479	21,3	20,7	23,1	0,304	0,293	0,294	0,297	267,14
25	7,501	21,1	20,2	23,1	0,308	0,302	0,299	0,303	272,51
28	7,666	20,0	19,5	24,6	0,307	0,321	0,328	0,319	286,53
29	7,711	21,1	21,2	23,9	0,339	0,304	0,326	0,323	290,41
30	7,759	21,0	21,2	23,7	0,324	0,346	0,335	0,335	301,15
31	7,821	21,1	21,0	23,2	0,348	0,356	0,340	0,348	312,78
32	7,872	20,9	20,9	22,7	0,352	0,364	0,361	0,359	322,62
35	8,051	25,1	20,7	21,2	0,386	0,385	0,378	0,383	344,10
36	8,176	21,0	21,8	25,3	0,397	0,412	0,397	0,402	361,11
37	8,250	25,3	21,9	26,3	0,429	0,416	0,433	0,426	382,58
38	8,349	25,5	22,3	27,1	0,434	0,450	0,460	0,448	402,27
39	8,471	25,6	22,9	27,2	0,465	0,458	0,459	0,461	413,61
42	8,736	24,3	24,0	27,0	0,511	0,458	0,463	0,477	428,52

Tabela A 13 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,780	20,7	20,3	22,5	0,024	0,023	0,019	0,022	21,03
3	6,898	20,1	20,3	22,5	0,124	0,123	0,120	0,122	110,82
4	6,926	22,3	20,7	22,5	0,150	0,137	0,130	0,139	125,74
7	7,008	22,6	21,1	22,9	0,190	0,147	0,140	0,159	143,64
8	7,043	22,5	20,8	22,6	0,183	0,195	0,156	0,178	160,64
10	7,130	22,3	20,7	22,6	0,178	0,206	0,185	0,190	171,08
11	7,176	22,4	21,0	22,7	0,204	0,189	0,208	0,200	180,63
16	7,316	21,7	21,3	22,6	0,265	0,221	0,240	0,242	217,92
17	7,368	22,4	20,6	23,1	0,249	0,268	0,211	0,243	218,51
18	7,412	22,4	20,6	23,2	0,256	0,247	0,254	0,252	227,16
21	7,507	23,0	20,8	23,4	0,281	0,275	0,381	0,312	280,86
22	7,584	21,3	21,0	23,7	0,326	0,325	0,337	0,329	296,07
23	7,646	20,7	20,9	23,7	0,355	0,324	0,311	0,330	296,67
24	7,671	21,3	20,7	23,1	0,361	0,356	0,362	0,360	323,22
25	7,749	21,2	20,2	23,1	0,366	0,381	0,368	0,372	333,96
28	8,032	20,0	19,5	24,6	0,400	0,355	0,418	0,391	351,26
29	8,135	21,0	21,2	23,9	0,409	0,399	0,431	0,413	370,95
30	8,249	21,0	21,2	23,7	0,421	0,435	0,429	0,428	384,67
31	8,364	21,0	21,0	23,2	0,447	0,432	0,441	0,440	395,11
32	8,501	20,8	20,9	22,7	0,456	0,469	0,471	0,465	417,79
35	8,830	25,0	20,7	21,2	0,484	0,506	0,508	0,499	448,21
36	9,026	21,0	21,8	25,3	0,463	0,541	0,497	0,500	449,11
37	9,112	25,2	21,9	26,3	0,492	0,516	0,548	0,519	465,52
38	9,119	25,4	22,3	27,1	0,523	0,553	0,576	0,551	494,15
39	9,125	25,6	22,9	27,2	0,577	0,569	0,564	0,570	511,46
42	9,143	24,2	24,0	27,0	0,573	0,593	0,589	0,585	524,88



Figura A 6 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão.

Tabela A 14 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x N, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,639	20,3	20,3	22,5	0,019	0,023	0,019	0,020	19,54
3	6,711	20,3	20,3	22,5	0,113	0,104	0,113	0,110	99,79
4	6,741	22,3	20,7	22,5	0,123	0,120	0,121	0,121	109,93
7	6,830	22,4	21,1	22,9	0,164	0,155	0,139	0,153	137,97
8	6,860	22,4	20,8	22,6	0,156	0,173	0,138	0,156	140,65
10	6,924	22,3	20,7	22,6	0,175	0,188	0,163	0,175	158,25
11	6,956	22,4	21,0	22,7	0,177	0,181	0,179	0,179	161,54
16	7,041	21,8	21,3	22,6	0,194	0,193	0,178	0,188	169,89
17	7,077	22,5	20,6	23,1	0,192	0,185	0,190	0,189	170,49
18	7,106	22,5	20,6	23,2	0,194	0,199	0,188	0,194	174,66
21	7,162	22,9	20,8	23,4	0,190	0,211	0,216	0,206	185,40
22	7,226	21,2	21,0	23,7	0,208	0,205	0,242	0,218	196,74
23	7,258	20,5	20,9	23,7	0,212	0,217	0,238	0,222	200,32
24	7,260	21,2	20,7	23,1	0,236	0,250	0,254	0,247	222,09
25	7,299	20,9	20,2	23,1	0,257	0,241	0,250	0,249	224,48
28	7,470	20,0	19,5	24,6	0,236	0,253	0,269	0,253	227,46
29	7,522	20,9	21,2	23,9	0,227	0,254	0,337	0,273	245,36
30	7,588	20,8	21,2	23,7	0,294	0,279	0,299	0,291	261,47
31	7,660	20,8	21,0	23,2	0,301	0,298	0,284	0,294	264,75
32	7,764	20,7	20,9	22,7	0,313	0,328	0,297	0,313	281,16
35	8,152	24,8	20,7	21,2	0,305	0,336	0,356	0,332	298,76
36	8,377	20,8	21,8	25,3	0,348	0,326	0,346	0,340	305,62
37	8,591	25,0	21,9	26,3	0,328	0,336	0,386	0,350	314,57
38	8,791	25,0	22,3	27,1	0,336	0,326	0,399	0,354	317,85
39	8,897	25,2	22,9	27,2	0,375	0,397	0,391	0,388	348,28
42	8,939	24,2	24,0	27,0	0,390	0,422	0,432	0,415	372,44

Tabela A 15 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x N, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,632	20,4	20,3	22,5	0,027	0,024	0,022	0,024	23,12
3	6,735	20,1	20,3	22,5	0,106	0,113	0,105	0,108	98,00
4	6,752	22,3	20,7	22,5	0,116	0,116	0,113	0,115	104,26
7	6,819	22,5	21,1	22,9	0,148	0,141	0,123	0,137	124,25
8	6,849	22,5	20,8	22,6	0,154	0,174	0,136	0,155	139,76
10	6,922	22,3	20,7	22,6	0,171	0,162	0,161	0,165	148,71
11	6,953	22,4	21,0	22,7	0,167	0,164	0,169	0,167	150,50
16	7,034	21,7	21,3	22,6	0,169	0,178	0,162	0,170	153,18
17	7,064	22,5	20,6	23,1	0,176	0,181	0,166	0,174	157,36
18	7,091	22,6	20,6	23,2	0,169	0,174	0,178	0,174	156,76
21	7,153	23,0	20,8	23,4	0,185	0,175	0,167	0,176	158,55
22	7,215	21,0	21,0	23,7	0,172	0,191	0,179	0,181	163,03
23	7,218	20,3	20,9	23,7	0,188	0,190	0,189	0,189	170,49
24	7,249	21,2	20,7	23,1	0,194	0,201	0,188	0,194	175,26
25	7,292	21,0	20,2	23,1	0,189	0,198	0,203	0,197	177,35
28	7,373	20,0	19,5	24,6	0,194	0,198	0,210	0,201	180,93
29	7,405	20,8	21,2	23,9	0,191	0,221	0,211	0,208	187,19
30	7,462	20,8	21,2	23,7	0,218	0,209	0,216	0,214	193,16
31	7,526	20,7	21,0	23,2	0,215	0,227	0,220	0,221	198,82
32	7,597	20,7	20,9	22,7	0,224	0,222	0,231	0,226	203,30
35	7,723	24,7	20,7	21,2	0,233	0,238	0,246	0,239	215,23
36	7,826	20,8	21,8	25,3	0,243	0,266	0,254	0,254	228,95
37	7,914	24,8	21,9	26,3	0,268	0,247	0,274	0,263	236,71
38	8,005	24,9	22,3	27,1	0,260	0,301	0,270	0,277	249,24
39	8,117	25,1	22,9	27,2	0,304	0,282	0,287	0,291	261,77
42	8,396	24,1	24,0	27,0	0,268	0,302	0,312	0,294	264,45

Tabela A 16 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x N, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,634	20,6	20,3	22,5	0,027	0,021	0,027	0,025	23,72
3	6,701	20,3	20,3	22,5	0,102	0,095	0,103	0,100	90,84
4	6,763	22,3	20,7	22,5	0,124	0,121	0,129	0,125	112,91
7	6,902	22,4	21,1	22,9	0,184	0,177	0,162	0,174	157,36
8	6,942	22,6	20,8	22,6	0,203	0,223	0,178	0,201	181,52
10	7,029	22,4	20,7	22,6	0,216	0,214	0,204	0,211	190,47
11	7,064	22,5	21,0	22,7	0,202	0,219	0,217	0,213	191,67
16	7,171	21,9	21,3	22,6	0,206	0,221	0,225	0,217	195,84
17	7,191	22,7	20,6	23,1	0,219	0,263	0,187	0,223	200,91
18	7,232	22,7	20,6	23,2	0,234	0,223	0,216	0,224	202,11
21	7,378	23,2	20,8	23,4	0,225	0,252	0,206	0,228	205,09
22	7,461	21,1	21,0	23,7	0,235	0,232	0,223	0,230	207,18
23	7,542	20,4	20,9	23,7	0,244	0,258	0,244	0,249	223,88
24	7,556	21,4	20,7	23,1	0,239	0,241	0,268	0,249	224,48
25	7,671	21,3	20,2	23,1	0,272	0,255	0,259	0,262	235,82
28	8,308	20,1	19,5	24,6	0,334	0,344	0,363	0,347	311,88
29	8,514	21,0	21,2	23,9	0,336	0,361	0,377	0,358	321,73
30	8,617	20,9	21,2	23,7	0,364	0,376	0,389	0,376	338,14
31	8,713	20,8	21,0	23,2	0,396	0,384	0,393	0,391	351,26
32	8,799	20,8	20,9	22,7	0,395	0,407	0,389	0,397	356,63
35	8,983	24,8	20,7	21,2	0,460	0,445	0,479	0,461	414,21
36	9,168	20,9	21,8	25,3	0,452	0,478	0,463	0,464	416,89
37	9,210	25,0	21,9	26,3	0,423	0,462	0,587	0,491	440,46
38	9,241	25,0	22,3	27,1	0,487	0,565	0,436	0,496	445,23
39	9,276	25,2	22,9	27,2	0,501	0,489	0,502	0,497	446,42
42	9,315	24,1	24,0	27,0	0,482	0,517	0,505	0,501	450,00



Figura A 7 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x N.

Tabela A 17 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x N, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,563	20,6	20,3	22,5	0,049	0,052	0,046	0,049	45,19
3	6,572	20,3	20,3	22,5	0,113	0,110	0,112	0,112	101,28
4	6,588	22,4	20,7	22,5	0,117	0,110	0,113	0,113	102,77
7	6,636	22,7	21,1	22,9	0,115	0,118	0,114	0,116	104,86
8	6,651	22,6	20,8	22,6	0,117	0,114	0,123	0,118	106,94
10	6,700	22,5	20,7	22,6	0,121	0,124	0,117	0,121	109,33
11	6,719	22,7	21,0	22,7	0,119	0,123	0,120	0,121	109,33
16	6,793	22,0	21,3	22,6	0,123	0,116	0,130	0,123	111,42
17	6,813	22,7	20,6	23,1	0,136	0,130	0,145	0,137	123,95
18	6,821	22,8	20,6	23,2	0,141	0,138	0,134	0,138	124,55
21	6,846	23,4	20,8	23,4	0,146	0,135	0,143	0,141	127,83
22	6,879	21,2	21,0	23,7	0,142	0,143	0,137	0,141	127,23
23	6,900	20,4	20,9	23,7	0,166	0,168	0,188	0,174	157,06
24	6,906	21,4	20,7	23,1	0,177	0,166	0,189	0,177	160,04
25	6,914	21,2	20,2	23,1	0,184	0,191	0,186	0,187	168,70
28	6,960	20,2	19,5	24,6	0,190	0,189	0,215	0,198	178,54
29	6,971	21,1	21,2	23,9	0,184	0,230	0,236	0,217	195,24
30	6,989	21,1	21,2	23,7	0,208	0,224	0,221	0,218	196,14
31	7,012	21,0	21,0	23,2	0,221	0,213	0,222	0,219	197,03
32	7,033	21,0	20,9	22,7	0,233	0,219	0,210	0,221	198,82
35	7,101	24,8	20,7	21,2	0,209	0,206	0,253	0,223	200,61
36	7,112	21,0	21,8	25,3	0,213	0,220	0,240	0,224	202,11
37	7,151	24,9	21,9	26,3	0,222	0,218	0,239	0,226	203,90
38	7,179	25,0	22,3	27,1	0,221	0,237	0,240	0,233	209,56
39	7,210	25,1	22,9	27,2	0,236	0,229	0,245	0,237	213,14
42	7,275	24,2	24,0	27,0	0,208	0,254	0,276	0,246	221,50

Tabela A 18 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x N, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,562	20,7	20,3	22,5	0,043	0,048	0,051	0,047	43,70
3	6,575	20,5	20,3	22,5	0,097	0,113	0,111	0,107	97,10
4	6,592	22,6	20,7	22,5	0,109	0,109	0,107	0,108	98,29
7	6,631	21,7	21,1	22,9	0,115	0,104	0,114	0,111	100,68
8	6,650	22,7	20,8	22,6	0,114	0,116	0,105	0,112	101,28
10	6,679	22,5	20,7	22,6	0,115	0,105	0,118	0,113	102,17
11	6,694	22,6	21,0	22,7	0,108	0,113	0,119	0,113	102,77
16	6,736	22,1	21,3	22,6	0,114	0,110	0,118	0,114	103,36
17	6,741	22,7	20,6	23,1	0,112	0,105	0,126	0,114	103,66
18	6,744	22,7	20,6	23,2	0,116	0,119	0,114	0,116	105,45
21	6,751	23,6	20,8	23,4	0,121	0,115	0,119	0,118	107,24
22	6,771	21,4	21,0	23,7	0,120	0,118	0,118	0,119	107,54
23	6,774	20,6	20,9	23,7	0,129	0,136	0,138	0,134	121,56
24	6,786	21,6	20,7	23,1	0,129	0,140	0,137	0,135	122,46
25	6,793	21,5	20,2	23,1	0,133	0,146	0,135	0,138	124,84
28	6,810	20,3	19,5	24,6	0,141	0,144	0,151	0,145	131,41
29	6,820	21,1	21,2	23,9	0,145	0,160	0,161	0,155	140,36
30	6,832	21,1	21,2	23,7	0,158	0,149	0,157	0,155	139,76
31	6,844	21,0	21,0	23,2	0,159	0,152	0,158	0,156	141,25
32	6,856	20,9	20,9	22,7	0,157	0,160	0,155	0,157	142,15
35	6,877	24,8	20,7	21,2	0,157	0,156	0,162	0,158	143,04
36	6,881	21,0	21,8	25,3	0,159	0,172	0,181	0,171	154,08
37	6,895	24,9	21,9	26,3	0,155	0,184	0,226	0,188	169,89
38	6,911	25,0	22,3	27,1	0,151	0,167	0,167	0,162	146,02
39	6,933	25,2	22,9	27,2	0,166	0,156	0,160	0,161	145,13
42	6,952	24,3	24,0	27,0	0,161	0,172	0,147	0,160	144,53

Tabela A 19 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x N, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,551	20,8	20,3	22,5	0,042	0,037	0,042	0,040	37,44
3	6,586	20,5	20,3	22,5	0,105	0,103	0,111	0,106	96,50
4	6,607	22,8	20,7	22,5	0,109	0,105	0,114	0,109	99,19
7	6,651	22,7	21,1	22,9	0,113	0,107	0,117	0,112	101,87
8	6,669	22,7	20,8	22,6	0,109	0,120	0,112	0,114	103,07
10	6,727	22,7	20,7	22,6	0,112	0,115	0,122	0,116	105,45
11	6,746	22,7	21,0	22,7	0,121	0,111	0,118	0,117	105,75
16	6,812	22,2	21,3	22,6	0,113	0,123	0,116	0,117	106,35
17	6,827	22,8	20,6	23,1	0,141	0,148	0,146	0,145	131,11
18	6,845	22,8	20,6	23,2	0,144	0,146	0,149	0,146	132,30
21	6,883	23,9	20,8	23,4	0,157	0,141	0,148	0,149	134,39
22	6,926	21,6	21,0	23,7	0,142	0,145	0,167	0,151	136,78
23	6,950	20,8	20,9	23,7	0,178	0,177	0,168	0,174	157,36
24	6,958	21,8	20,7	23,1	0,173	0,174	0,180	0,176	158,55
25	6,977	21,6	20,2	23,1	0,178	0,182	0,179	0,180	162,13
28	7,049	20,6	19,5	24,6	0,198	0,206	0,209	0,204	184,21
29	7,070	21,1	21,2	23,9	0,226	0,224	0,228	0,226	203,60
30	7,092	21,1	21,2	23,7	0,234	0,221	0,229	0,228	205,39
31	7,129	21,0	21,0	23,2	0,267	0,219	0,230	0,239	214,93
32	7,167	21,0	20,9	22,7	0,243	0,222	0,261	0,242	217,92
35	7,255	24,9	20,7	21,2	0,206	0,238	0,294	0,246	221,50
36	7,286	21,1	21,8	25,3	0,223	0,256	0,228	0,236	212,25
37	7,327	24,9	21,9	26,3	0,208	0,248	0,218	0,225	202,40
38	7,371	25,1	22,3	27,1	0,209	0,222	0,240	0,224	201,51
39	7,424	25,2	22,9	27,2	0,227	0,219	0,220	0,222	200,02
42	7,558	24,4	24,0	27,0	0,209	0,232	0,221	0,221	198,82



Figura A 8 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x N.

Tabela A 20 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,937	22,1	20,7	31,1	0,038	0,054	0,049	0,047	43,40
1	7,052	22,3	20,6	31,1	0,071	0,078	0,066	0,072	65,48
4	7,072	23,6	21,0	25,1	0,094	0,108	0,089	0,097	88,15
5	7,086	23,8	21,1	25,0	0,101	0,119	0,108	0,109	99,19
6	7,102	23,9	21,1	25,1	0,127	0,115	0,106	0,116	105,15
7	7,128	23,2	23,3	26,5	0,139	0,142	0,137	0,139	126,04
8	7,146	23,2	23,3	26,4	0,135	0,148	0,146	0,143	129,32
11	7,195	22,8	22,5	26,5	0,161	0,183	0,183	0,176	158,55
12	7,245	23,0	23,5	26,1	0,231	0,167	0,182	0,193	174,36
13	7,231	22,3	23,6	26,1	0,209	0,205	0,174	0,196	176,75
14	7,274	22,3	23,5	25,7	0,206	0,183	0,207	0,199	179,14
15	7,273	22,0	23,4	26,6	0,185	0,191	0,227	0,201	181,22
18	7,340	22,0	22,2	25,8	0,220	0,239	0,222	0,227	204,49
19	7,361	21,8	22,6	25,7	0,244	0,240	0,239	0,241	217,02

Tabela A 21 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,934	22,0	20,7	31,1	0,057	0,044	0,058	0,053	48,77
1	7,054	22,2	20,6	31,1	0,076	0,068	0,068	0,071	64,58
4	7,102	23,4	21,0	25,1	0,103	0,111	0,126	0,113	102,77
5	7,116	23,5	21,1	25,0	0,148	0,122	0,127	0,132	119,77
6	7,137	23,5	21,1	25,1	0,135	0,152	0,146	0,144	130,51
7	7,148	23,2	23,3	26,5	0,168	0,199	0,153	0,173	156,46
8	7,177	23,1	23,3	26,4	0,176	0,169	0,198	0,181	163,33
11	7,243	22,9	22,5	26,5	0,201	0,200	0,194	0,198	178,84
12	7,281	22,9	23,5	26,1	0,197	0,218	0,190	0,202	181,82
13	7,276	22,5	23,6	26,1	0,227	0,234	0,228	0,230	206,88
14	7,317	22,4	23,5	25,7	0,242	0,226	0,224	0,231	207,77
15	7,320	22,0	23,4	26,6	0,259	0,245	0,246	0,250	225,08
18	7,387	22,1	22,2	25,8	0,291	0,250	0,296	0,279	251,03
19	7,431	21,8	22,6	25,7	0,313	0,266	0,310	0,296	266,54

Tabela A 22 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 3x Fe, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,944	22,0	20,7	31,1	0,057	0,035	0,040	0,044	40,72
1	7,083	22,2	20,6	31,1	0,065	0,065	0,067	0,066	60,11
4	7,128	23,5	21,0	25,1	0,104	0,119	0,101	0,108	98,00
5	7,146	23,6	21,1	25,0	0,130	0,144	0,139	0,138	124,55
6	7,175	24,1	21,1	25,1	0,146	0,166	0,147	0,153	138,27
7	7,189	23,2	23,3	26,5	0,187	0,191	0,201	0,193	174,06
8	7,243	22,8	23,3	26,4	0,229	0,216	0,208	0,218	196,14
11	7,359	22,9	22,5	26,5	0,231	0,233	0,258	0,241	216,72
12	7,361	22,9	23,5	26,1	0,241	0,262	0,224	0,242	218,21
13	7,362	22,5	23,6	26,1	0,266	0,264	0,250	0,260	234,03
14	7,401	22,4	23,5	25,7	0,261	0,268	0,297	0,275	247,75
15	7,409	22,1	23,4	26,6	0,356	0,265	0,279	0,300	269,82
18	7,486	22,0	22,2	25,8	0,316	0,288	0,305	0,303	272,51
19	7,489	22,5	22,6	25,7	0,303	0,298	0,332	0,311	279,67

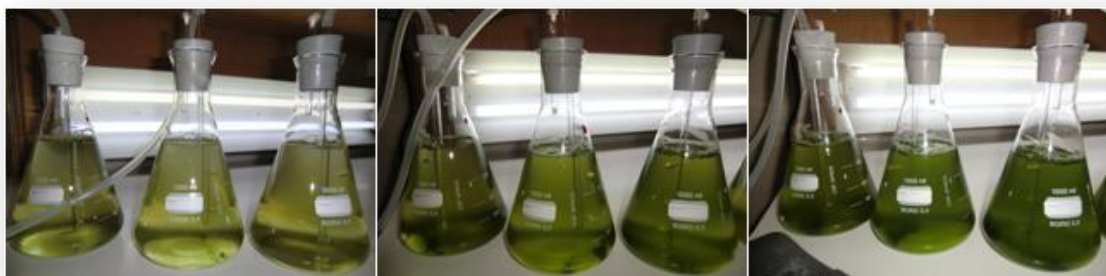


Figura A 9 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 3x Fe.

Tabela A 23 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,883	22,0	20,7	31,1	0,054	0,040	0,049	0,048	44,00
1	7,023	22,1	20,6	31,1	0,073	0,071	0,062	0,069	62,79
4	7,030	23,5	21,0	25,1	0,088	0,094	0,088	0,090	81,89
5	7,036	23,6	21,1	25,0	0,091	0,086	0,103	0,093	84,87
6	7,040	23,7	21,1	25,1	0,100	0,106	0,098	0,101	92,03
7	7,041	23,2	23,3	26,5	0,124	0,129	0,124	0,126	113,81
8	7,053	23,2	23,3	26,4	0,157	0,133	0,149	0,146	132,30
11	7,140	22,8	22,5	26,5	0,195	0,213	0,192	0,200	180,33
12	7,195	23,0	23,5	26,1	0,200	0,202	0,224	0,209	188,09
13	7,203	22,3	23,6	26,1	0,225	0,225	0,240	0,230	207,18
14	7,240	22,4	23,5	25,7	0,248	0,238	0,231	0,239	215,23
15	7,257	22,3	23,4	26,6	0,260	0,295	0,251	0,269	241,78
18	7,282	22,0	22,2	25,8	0,291	0,286	0,272	0,283	254,61
19	7,328	22,7	22,6	25,7	0,339	0,326	0,295	0,320	287,72

Tabela A 24 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,889	22,0	20,7	31,1	0,053	0,044	0,050	0,049	45,19
1	6,980	22,4	20,6	31,1	0,065	0,066	0,054	0,062	56,53
4	7,028	23,6	21,0	25,1	0,109	0,129	0,099	0,112	101,87
5	7,064	23,6	21,1	25,0	0,138	0,127	0,133	0,133	120,07
6	7,087	23,8	21,1	25,1	0,142	0,150	0,146	0,146	132,00
7	7,131	23,1	23,3	26,5	0,192	0,190	0,176	0,186	167,80
8	7,169	23,0	23,3	26,4	0,203	0,219	0,201	0,208	187,19
11	7,219	23,0	22,5	26,5	0,251	0,226	0,224	0,234	210,46
12	7,262	23,0	23,5	26,1	0,234	0,231	0,244	0,236	212,85
13	7,271	22,4	23,6	26,1	0,262	0,268	0,276	0,269	241,78
14	7,318	22,3	23,5	25,7	0,304	0,270	0,293	0,289	259,98
15	7,331	22,7	23,4	26,6	0,355	0,310	0,276	0,314	282,05
18	7,390	22,8	22,2	25,8	0,350	0,349	0,384	0,361	324,41
19	7,449	22,5	22,6	25,7	0,365	0,335	0,350	0,350	314,57

Tabela A 25 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x Fe, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,878	22,0	20,7	31,1	0,034	0,052	0,040	0,042	38,93
1	6,995	22,1	20,6	31,1	0,064	0,060	0,052	0,059	53,85
4	7,026	23,5	21,0	25,1	0,102	0,097	0,109	0,103	93,22
5	7,051	23,7	21,1	25,0	0,114	0,119	0,103	0,112	101,58
6	7,068	23,8	21,1	25,1	0,145	0,123	0,116	0,128	115,89
7	7,105	23,4	23,3	26,5	0,168	0,154	0,149	0,157	141,85
8	7,133	23,1	23,3	26,4	0,173	0,177	0,169	0,173	156,17
11	7,162	22,9	22,5	26,5	0,212	0,215	0,211	0,213	191,67
12	7,205	23,0	23,5	26,1	0,238	0,225	0,236	0,233	209,86
13	7,223	22,5	23,6	26,1	0,236	0,217	0,270	0,241	217,02
14	7,245	22,5	23,5	25,7	0,272	0,270	0,255	0,266	239,10
15	7,260	22,8	23,4	26,6	0,287	0,335	0,277	0,300	269,52
18	7,294	22,4	22,2	25,8	0,351	0,370	0,304	0,342	307,11
19	7,319	22,7	22,6	25,7	0,311	0,362	0,350	0,341	306,52



Figura A 10 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 5x Fe.

Tabela A 26 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 1.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,758	22,3	20,7	31,1	0,103	0,120	0,105	0,109	99,19
1	6,856	22,6	20,6	31,1	0,122	0,117	0,133	0,124	112,31
4	6,903	23,9	21,0	25,1	0,149	0,142	0,158	0,150	135,28
5	6,917	24,0	21,1	25,0	0,166	0,159	0,167	0,164	148,11
6	6,938	24,0	21,1	25,1	0,168	0,192	0,167	0,176	158,55
7	6,951	23,7	23,3	26,5	0,207	0,202	0,186	0,198	178,84
8	6,972	23,5	23,3	26,4	0,219	0,210	0,222	0,217	195,54
11	6,996	23,4	22,5	26,5	0,246	0,245	0,246	0,246	221,20
12	7,024	23,2	23,5	26,1	0,251	0,253	0,241	0,248	223,58
13	7,021	22,6	23,6	26,1	0,257	0,250	0,261	0,256	230,45
14	7,026	23,0	23,5	25,7	0,274	0,255	0,264	0,264	237,90
15	7,037	23,7	23,4	26,6	0,296	0,272	0,301	0,290	260,58
18	7,083	22,9	22,2	25,8	0,327	0,300	0,312	0,313	281,46
19	7,093	23,1	22,6	25,7	0,349	0,363	0,283	0,332	298,16

Tabela A 27 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 2.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,800	22,2	20,7	31,1	0,112	0,113	0,113	0,113	102,17
1	6,903	22,5	20,6	31,1	0,127	0,137	0,138	0,134	121,26
4	6,997	23,9	21,0	25,1	0,183	0,171	0,189	0,181	163,33
5	7,008	24,0	21,1	25,0	0,207	0,194	0,201	0,201	180,93
6	7,020	24,0	21,1	25,1	0,199	0,233	0,211	0,214	193,16
7	7,033	23,8	23,3	26,5	0,243	0,209	0,215	0,222	200,32
8	7,061	23,5	23,3	26,4	0,228	0,239	0,237	0,235	211,35
11	7,127	23,3	22,5	26,5	0,304	0,290	0,269	0,288	258,79
12	7,134	23,4	23,5	26,1	0,280	0,319	0,266	0,288	259,38
13	7,146	22,8	23,6	26,1	0,312	0,322	0,296	0,310	278,77
14	7,184	23,1	23,5	25,7	0,385	0,318	0,332	0,345	310,09
15	7,196	23,8	23,4	26,6	0,389	0,411	0,389	0,396	356,03
18	7,273	23,4	22,2	25,8	0,397	0,404	0,409	0,403	362,30
19	7,290	23,2	22,6	25,7	0,405	0,408	0,356	0,390	350,07

Tabela A 28 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x Fe, ensaio 3.

Dia	pH	T _{cultura} (°C)	T _{ambiente} (°C)		DO _{682,5}				C _{biomassa seca} (mg/L)
			T _{mínima}	T _{máxima}	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Média	
0	6,671	22,2	20,7	31,1	0,122	0,141	0,141	0,135	121,86
1	6,772	22,5	20,6	31,1	0,150	0,160	0,141	0,150	135,88
4	6,806	24,0	21,0	25,1	0,174	0,151	0,165	0,163	147,52
5	6,828	24,0	21,1	25,0	0,185	0,180	0,179	0,181	163,62
6	6,851	24,1	21,1	25,1	0,197	0,209	0,187	0,198	178,24
7	6,872	23,8	23,3	26,5	0,232	0,229	0,227	0,229	206,58
8	6,896	23,5	23,3	26,4	0,246	0,261	0,258	0,255	229,55
11	6,955	23,3	22,5	26,5	0,304	0,294	0,273	0,290	261,17
12	6,958	23,4	23,5	26,1	0,302	0,312	0,282	0,299	268,63
13	6,976	22,9	23,6	26,1	0,302	0,286	0,370	0,319	287,12
14	7,001	23,2	23,5	25,7	0,328	0,284	0,387	0,333	299,36
15	7,019	23,5	23,4	26,6	0,345	0,338	0,326	0,336	302,34
18	7,074	23,3	22,2	25,8	0,380	0,387	0,378	0,382	342,91
19	7,089	23,2	22,6	25,7	0,378	0,371	0,460	0,403	362,00



Figura A 11 - Avaliação do crescimento das culturas de *Chlamydomonas sp.* em meio padrão com adição 10x Fe.

Anexo 5. Produtividade de biomassa

A produtividade de biomassa é determinada pelo declive da recta de ajuste tangente da fase exponencial, formada pelo conjunto de pontos de valor de concentração de biomassa seca ao longo do tempo, traduzida pela equação 1:

Equação 1

$$\text{Produtividade} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L.dia}} \right) = \frac{C2 - C1}{t2 - t1}$$

em que, C2 é a concentração de biomassa seca (mg/L) no dia t2 (dia) e C1 é a concentração de biomassa seca (mg/L) no dia t1 (dias) durante a fase exponencial de crescimento das microalgas.

Para o primeiro ensaio em meio padrão, entre os dias 35 e 36, a produtividade em biomassa seca vem:

$$\text{Produtividade} = \frac{558,29 - 505,79}{36 - 35} = 52,50 \frac{\text{mg}}{\text{L.dia}}$$

A produtividade máxima de biomassa seca foi calculada para um período de cultivo de 24 horas.

Os valores de produtividade calculados para os diferentes ensaios estão registados nas Tabelas A29 e A30.

Tabela A 29 - Produtividade dos ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.

Dias	Padrão			Padrão com adição 5x N			Padrão com adição 10x N		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3 a 4	5,07	16,41	14,92	10,14	6,26	22,08	1,49	1,19	2,68
4 a 7	11,04	6,07	5,97	9,35	6,66	14,82	0,70	0,80	0,89
7 a 8	4,18	22,08	17,00	2,68	15,51	24,16	2,09	0,60	1,19
8 a 10	19,69	3,13	5,22	8,80	4,47	4,47	1,19	0,45	1,19
10 a 11	13,13	4,18	9,55	3,28	1,79	1,19	0,00	0,60	0,30
11 a 16	8,95	2,39	7,46	1,67	0,54	0,84	0,42	0,12	0,12
16 a 17	0,00	22,37	0,60	0,60	4,18	5,07	12,53	0,30	24,76
17 a 18	14,32	6,56	8,65	4,18	-0,60	1,19	0,60	1,79	1,19
18 a 21	17,70	3,58	17,90	3,58	0,60	0,99	1,09	0,60	0,70
21 a 22	10,74	23,27	15,21	11,34	4,47	2,09	-0,60	0,30	2,39
22 a 23	20,88	2,39	0,60	3,58	7,46	16,71	29,83	14,02	20,58
23 a 24	22,67	5,07	26,55	21,78	4,77	0,60	2,98	0,89	1,19
24 a 25	1,79	5,37	10,74	2,39	2,09	11,34	8,65	2,39	3,58
25 a 28	12,83	4,67	5,77	0,99	1,19	25,36	3,28	2,19	7,36
28 a 29	38,78	3,88	19,69	17,90	6,26	9,84	16,71	8,95	19,39
29 a 30	8,35	10,74	13,72	16,11	5,97	16,41	0,89	-0,60	1,79
30 a 31	11,34	11,63	10,44	3,28	5,67	13,13	0,89	1,49	9,55
31 a 32	13,42	9,84	22,67	16,41	4,47	5,37	1,79	0,89	2,98
32 a 35	7,36	7,16	10,14	5,87	3,98	19,19	0,60	0,30	1,19
35 a 36	52,50	17,00	0,89	6,86	13,72	2,68	1,49	11,04	-9,25
36 a 37	7,16	21,48	16,41	8,95	7,76	23,57	1,79	15,81	-9,84
37 a 38	12,53	19,69	28,64	3,28	12,53	4,77	5,67	-23,86	-0,89
38 a 39	3,58	11,34	17,30	30,43	12,53	1,19	3,58	-0,89	-1,49
39 a 42	1,29	4,97	4,47	8,05	0,89	1,19	2,78	-0,20	-0,40
Produtividade média (mg/L.dia)	13,30	10,22	12,10	8,40	5,55	9,51	4,19	1,63	3,38
Produtividade máxima (mg/L.dia)	52,50	23,27	28,64	30,43	15,51	25,36	29,83	15,81	24,76

Tabela A 30 – Produtividade dos ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.

Dias	Padrão com adição 3x Fe			Padrão com adição 5x Fe			Padrão com adição 10x Fe		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 a 4	7,56	12,73	12,63	6,36	15,11	13,13	7,66	14,02	3,88
4 a 5	11,04	17,00	26,55	2,98	18,20	8,35	12,83	17,60	16,11
5 a 6	5,97	10,74	13,72	7,16	11,93	14,32	10,44	12,23	14,62
6 a 7	20,88	25,95	35,80	21,78	35,80	25,95	20,29	7,16	28,34
7 a 8	3,28	6,86	22,08	18,50	19,39	14,32	16,71	11,04	22,97
8 a 11	9,74	5,17	6,86	16,01	7,76	11,83	8,55	15,81	10,54
11 a 12	15,81	2,98	1,49	7,76	2,39	18,20	2,39	0,60	7,46
12 a 13	2,39	25,06	15,81	19,09	28,94	7,16	6,86	19,39	18,50
13 a 14	2,39	0,89	13,72	8,05	18,20	22,08	7,46	31,32	12,23
14 a 15	2,09	17,30	22,08	26,55	22,08	30,43	22,67	45,94	2,98
15 a 18	7,76	8,65	0,89	4,28	14,12	12,53	6,96	2,09	13,52
18 a 19	12,53	15,51	7,16	33,11	-9,84	-0,60	16,71	-12,23	19,09
Produtividade média (mg/L.dia)	8,45	12,40	14,90	14,30	15,34	14,81	11,63	13,75	14,19
Produtividade máxima (mg/L.dia)	20,88	25,95	35,80	33,11	35,80	30,43	22,67	45,94	28,34

Anexo 6. Teor de água na biomassa

O teor de água na biomassa de *Chlamydomonas sp.* foi avaliado a partir da liofilização de uma amostra de biomassa húmida (Figura A12).

Os resultados obtidos estão registados na Tabela A31.

Tabela A 31 - Teor de água na biomassa de *Chlamydomonas sp.*.

m_{ependorf} (g)	$m_{\text{biomassa húmida}}$ (g)	$m_{\text{ependorf+biomassa seca}}$ (g)	$m_{\text{biomassa seca}}$ (g)	$m_{\text{água}}$ (g)	Teor água (%)
0,8790	1,7265	0,9532	0,0742	1,6523	95,7



Figura A 12 - Biomassa de *Chlamydomonas sp.* em eppendorfs para liofilização.

Anexo 7. Extração

Tabela A 32 - Teor lipídico dos ensaios em meio padrão, meio padrão com adição 5x N e meio padrão com adição 10x N.

Meio	Ensaio	Réplica	$m_{\text{biomassa seca}} \text{ (g)}$	$m_{\text{lipidos}} \text{ (g)}$	Teor Lipídico (% $_{\text{biomassa seca}}$)	Média do Teor Lipídico (% $_{\text{biomassa seca}}$)
Padrão	1	1	0,0433	0,0207	47,8%	26,02
		2	0,0435	0,0061	14,0%	
		3	0,0469	0,0076	16,2%	
	2	1	0,0439	0,0081	18,4%	19,25
		2	0,0436	0,0086	19,7%	
		3	0,0444	0,0087	19,6%	
	3	1	0,0448	0,0069	15,4%	18,40
		2	0,0481	0,0083	17,3%	
		3	0,0479	0,0108	22,5%	
Padrão com adição 5x N	1	1	0,0411	0,0060	14,6%	13,77
		2	0,0436	0,0055	12,6%	
		3	0,0397	0,0056	14,1%	
	2	1	0,0372	0,0046	12,4%	10,64
		2	0,0290	0,0016	5,5%	
		3	0,0249	0,0035	14,0%	
	3	1	0,0452	0,0061	13,5%	23,50
		2	0,0445	0,0163	36,6%	
		3	0,0447	0,0091	20,4%	
Padrão com adição 10x N	1	1	0,0434	0,0144	33,2%	33,19
		2	0,0419	0,0139	33,2%	
	2	1	0,0295	0,0006	2,0%	2,04
	3	1	0,0483	0,0055	11,4%	10,05
		2	0,0470	0,0041	8,7%	

Tabela A 33 - Teor lipídico dos ensaios em meio padrão com adição 3x Fe, meio padrão com adição 5x Fe e meio padrão com adição 10x Fe.

Meio	Ensaio	Réplica	$m_{\text{biomassa seca}}$ (g)	$m_{\text{lipídios}}$ (g)	Teor Lipídico (% $_{\text{biomassa seca}}$)	Média do Teor Lipídico (% $_{\text{biomassa seca}}$)
Padrão com adição 3x Fe	1	1	0,0288	0,0093	32,29%	23,33%
		2	0,0271	0,0039	14,37%	
	2	1	0,0290	0,0109	37,59%	27,92%
		2	0,0241	0,0044	18,26%	
	3	1	0,0338	0,0063	18,63%	22,32%
		2	0,0331	0,0086	26,01%	
Padrão com adição 5x Fe	1	1	0,0334	0,0111	33,23%	26,64%
		2	0,0339	0,0068	20,05%	
	2	1	0,0282	0,0039	13,82%	17,36%
		2	0,0299	0,0058	19,37%	
		3	0,0312	0,0059	18,89%	
	3	1	0,0385	0,0078	20,26%	18,72%
		2	0,0312	0,0072	23,10%	
		3	0,0375	0,0048	12,81%	
	Padrão com adição 10x Fe	1	1	0,0347	0,0066	19,03%
2			0,0341	0,0064	18,77%	
2		1	0,0438	0,0144	32,87%	19,62%
		2	0,0427	0,0055	12,89%	
		3	0,0458	0,0060	13,10%	
3		1	0,0360	0,0092	25,57%	25,46%
		2	0,0356	0,0141	39,63%	
		3	0,0439	0,0049	11,17%	

Anexo 8. Produtividade lipídica máxima

A produtividade lipídica máxima é determinada pelo produto da produtividade máxima em biomassa seca pelo teor lipídico máximo, acumulado no final do cultivo (% biomassa seca), como descrito na equação 2.

Equação 2

$$\begin{aligned} \text{Produtividade lipídica máxima} \left(\frac{mg}{L.dia} \right) \\ = \text{produtividade máxima} \left(\frac{mg}{L.dia} \right) \times \text{teor lipídico (\% biomassa seca)} \end{aligned}$$

Para o primeiro ensaio em meio padrão, após 42 dias de cultivo, a produtividade lipídica máxima vem:

$$\text{Produtividade lipídica máxima} = 52,50 \times 0,2602 = 13,66 \frac{mg}{L.dia}$$

Os valores de produtividade lipídica máxima calculados para os diferentes ensaios estão registados nas Tabelas A34 e A35.

Tabela A 34 - Produtividade lipídica máxima após 19 dias de cultivo.

	Ensaio	Produtividade máxima (mg/L.dia)	Teor lipídico (% _{biomassa seca})	Produtividade lipídica máxima (mg/L.dia)
Padrão	1	19,69	26,02%	5,12
	2	22,37	19,25%	4,31
	3	17,00	18,40%	3,13
Padrão com adição 5x N	1	10,14	13,77%	1,40
	2	15,51	10,64%	1,65
	3	24,16	23,50%	5,68
Padrão com adição 10x N	1	12,53	33,19%	4,16
	2	1,79	2,04%	0,04
	3	24,76	10,05%	2,49
Padrão com adição 3x Fe	1	20,88	23,33%	4,87
	2	25,95	27,92%	7,25
	3	35,80	22,32%	7,99
Padrão com adição 5x Fe	1	33,11	26,64%	8,82
	2	35,80	17,36%	6,22
	3	30,43	18,72%	5,70
Padrão com adição 10x Fe	1	22,67	18,90%	4,28
	2	45,94	19,62%	9,01
	3	28,34	25,46%	7,21

Tabela A 35 - Produtividade lipídica máxima após 42 dias de cultivo.

	Ensaio	Produtividade máxima (mg/L.dia)	Teor lipídico (% _{biomassa seca})	Produtividade lipídica máxima (mg/L.dia)
Padrão	1	52,50	26,02%	13,66
	2	23,27	19,25%	4,48
	3	28,64	18,40%	5,27
Padrão com adição 5x N	1	30,43	13,77%	4,19
	2	15,51	10,64%	1,65
	3	25,36	23,50%	5,96
Padrão com adição 10x N	1	29,83	33,19%	9,90
	2	15,81	2,04%	0,32
	3	24,76	10,05%	2,49