



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Valorização de biomassa algal produzida em fotobiorreatores para a produção de biocombustíveis e outros produtos**

**José Miguel Saraiva Fraga**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotecnologia**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões  
Co-orientador: Prof. Doutor António João Carvalho de Albuquerque

**Covilhã, Junho de 2016**



**“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um  
castelo”**

**Fernando Pessoa**



# Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao Professor Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões por ter aceite orientar-me neste projeto. O seu apoio e compreensão foram essenciais para a realização deste trabalho. No entanto este agradecimento fica aquém da gratidão sentida por toda a disponibilidade demonstrada e pela partilha de informação ao longo de todo o ano.

Queria agradecer ao Professor Doutor António João Carvalho de Albuquerque, meu co-orientador, pelo apoio e motivação transmitidos no decorrer deste projeto.

À Ana Margarida Afonso, à Vera Costa e à Sónia Sousa, um sincero obrigado pela partilha de conhecimento científico, apoio e orientação nos laboratórios.

Ao meu Pai, por todo o seu amor, apoio e sacrifício incondicional na concretização desta etapa, um sentido obrigado por tudo. É uma dívida impagável.

À minha Mãe, à minha tia Teresa Fraga e ao meu Tio António Fraga, estou-vos agradecido por todo o apoio que me foi dado. Que permitiram atenuar as dificuldades que senti ao longo de toda a dissertação.

Ao meu irmão Nuno, por nunca ter deixado de acreditar e apoiar-me.

A toda a minha família e amigos, por todo o apoio incondicional que me foi transmitido e que me ajudou a superar as dificuldades que surgiram.

A toda a equipa de investigação FibEnTech, por todo o apoio manifestado e financiamento deste projeto.

Concluindo, agradeço à Universidade da Beira Interior por me ter permitido a concretização da dissertação e pela sua contínua manifestação de apoio durante a sua realização.



# Resumo

Atualmente, os combustíveis fósseis representam 80% da produção energética global, sendo que os restantes 20% correspondem às energias renováveis. Desta forma, é imperiosa a procura de fontes alternativas de energia sustentável de modo a reduzir as emissões de gases com efeito de estufa, nomeadamente o dióxido de carbono, que atinge já os 400 ppmv na atmosfera. A biomassa algal tem sido apresentada como uma alternativa para a redução da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, já que tem a capacidade de sequestrar 1,83 kg CO<sub>2</sub> por 1 kg de biomassa produzida. Para além disso, a biomassa algal pode constituir uma fonte de biocombustíveis e outros produtos de maior valor acrescentado. No entanto, a implementação industrial da produção e exploração da biomassa algal depara-se ainda com vários desafios, nomeadamente a redução de custos e recursos nos processos *upstream* e *downstream*, onde os vários estudos têm sido centrados.

Com vista a contribuir para o esclarecimento de algumas das questões acima apresentadas, foram abordados aspectos da produção de biomassa e principalmente as questões da desconstrução da biomassa da espécie *Chlorella vulgaris*. A produção de biomassa algal foi avaliada a partir de duas séries de ensaios de crescimento algal onde várias variáveis físicas e bioquímicas foram testadas. A concentração máxima de biomassa obtida foi de 0,7 g/L, utilizando um meio de referência (meio Bristol normal modificado) e alimentando ar a um caudal de 1,5 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Noutra série de ensaios em que o caudal de ar foi aumentado para 3 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> a produção de biomassa caiu para cerca de 0,1 g/L, indiciando problemas com a transferência de massa e/ou stress mecânico.

Relativamente à disrupção celular, foram testados vários métodos físicos e físico-químicos, nomeadamente ultrassons, moagem, tratamento térmico e ácido, aplicados a biomassa seca e húmida. Nos hidrolisados analisaram-se os teores em açúcares, proteína e lípidos.

Dos vários métodos testados em biomassa húmida, o que apresentou melhores resultados foi a hidrólise ácida (pH=1, Temperatura: 121°C, tempo: 1h) com uma recuperação de 29,7% de açúcares e 21,3% de proteínas. A secagem prévia das amostras (altamente intensiva em energia) não contribuiu para um aumento significativo da extensão da disrupção celular. O incremento foi de 51,9% para 53,3% (açúcares e proteína) para a biomassa seca, o que está dentro do erro experimental e claramente não justifica o consumo energético envolvido na secagem. Por outro lado, a composição do meio influenciou a composição das células. O reforço dos nutrientes azoto e fósforo conduziu à redução da síntese de açúcares e potenciou a síntese de proteínas. O teor de lípidos recuperados da biomassa rondou os 22%. Os ensaios realizados com maior quantidade de biomassa, necessária para a determinação dos lípidos, permitiu evidenciar a presença de um resíduo sólido, de cerca de 20%, que deverá ser objeto de estudos futuros.

## Palavras-chave

*Chlorella vulgaris*; Produção de biomassa; Disrupção celular; Composição bioquímica; Valorização biomassa;







# Abstract

Currently, fossil fuels account for 80% of global energy production, and the remaining 20% correspond to renewable energy. Thus, it is imperative to search for alternative sources of energy to reduce greenhouse effect emissions, mainly carbon dioxide, which already reach 400 ppmv in the atmosphere. The algal biomass has been presented as an alternative to reduce CO<sub>2</sub> concentration in the atmosphere, since it has the ability to scavenge 1.83 kg CO<sub>2</sub> per 1 kg of biomass produced. Additionally, the algal biomass can be a source of biofuels and other products of higher value. However, the industrial implementation of the exploration and production of algal biomass is still faced with many challenges, including the reduction of costs and resources in the upstream and downstream processes, where several studies have been centered.

In order to contribute to the clarification of some of the above issues, some aspects of biomass production and mainly its deconstruction were addressed with the specie *Chlorella vulgaris*. The production of algal biomass was evaluated with two algal growth test series where several physical and biochemical variables were tested. The maximum concentration of biomass obtained was 0.7 g/L, using a reference medium (modified standard Bristol medium) and feeding air at a flow rate of 1.5 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. In another series of tests in which the air flow rate was increased to 3 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> biomass production fell to about 0.1 g/L, indicating problems with the mass transfer and/or mechanical stress.

With regard to cell disruption, various physical and physico-chemical procedures were tested, including sonication, grinding, heat treatment and acid, applied to dry and wet biomass. The hydrolysates were analyzed at the levels of sugars, proteins and lipids.

Of the various disruption methods tested in wet biomass, the one that showed better results was the acid hydrolysis (pH=1, temperature: 121°C, time: 1h) with a recovery of 29.7% sugar and 21.3% protein. The pre-drying of the samples (highly energy intensive) did not contribute to a significant increase of the extent of cell disruption. The increase was from 51.9% to 53.3% (sugar and protein) for dry biomass, which is within the experimental error and clearly does not justify the energy consumption involved in the process of drying. On the other hand, the composition of the medium influenced the biomass chemical composition. The strengthening of nitrogen and phosphorus nutrients lead to a reduction of the synthesis of sugars and potentiated the synthesis of proteins. The lipid content recovered from the biomass was around 22%. The lipid tests required the utilization of higher amount of biomass, which enabled to reveal the presence of a solid residue of about 20% after the extraction. This solid residue will be the object of a future study.

## Keywords

*Chlorella vulgaris*; Biomass production; Cell disruption; Biochemical composition; Biomass valorization;





# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	1
1.1 Biocombustíveis	1
1.2 Algas	3
1.2.1 Remoção de nutrientes	4
1.2.2 Produção de Carbohidratos	8
1.2.3 Produção de Lípidos	9
1.2.4 Produção de Proteínas	11
1.2.5 Outros produtos	11
1.3 Sistemas de produção de microalgas	12
1.3.1 Sistemas abertos	14
1.3.2 Sistemas fechados	15
1.4 Métodos de disrupção celular	17
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b>	23
<b>Capítulo 3 - Materiais e métodos</b>	25
3.1 Materiais	25
3.1.1 Reagentes	25
3.1.2 Microalgas	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Produção de biomassa algal	26
3.2.2 Recuperação da biomassa algal	28
3.2.3 Avaliação de diferentes métodos de lise celular	29
3.2.3.1 Avaliação de diferentes métodos de ruptura celular em biomassa	29
3.2.3.2 Avaliação da influência da humidade na ruptura celular	29
3.2.3.3 Avaliação da influência das condições de crescimento na composição da biomassa	30
3.2.4 Caracterização das amostras lisadas	30
3.2.4.1 Avaliação do teor em açúcares totais e dos açúcares de degradação	30
3.2.4.2 Avaliação do teor em proteínas	31
3.2.4.3 Avaliação do teor em lípidos	31
3.2.4.4 Avaliação e pesagem dos resíduos sólidos não hidrolisados	32
<b>Capítulo 4 - Resultados e discussão</b>	35
4.1 Produção de biomassa algal	35
4.1.1 1ª Série de crescimento algal	35
4.1.2 2ª Série de crescimento algal	38
4.2 Calibração dos métodos de caracterização	39
4.2.1 Calibração do método de HPLC	39

4.2.2	Calibração do método de Lowry para proteínas .....	40
4.3	Avaliação de diferentes métodos de lise celular .....	41
4.3.1	Biomassa húmida.....	41
4.3.2	Influência da humidade na rutura celular .....	44
4.3.3	Influência das condições de crescimento na composição da biomassa .....	45
4.3.4	Avaliação do teor em lípidos nas células .....	47
<b>Capítulo 5</b>	<b>- Conclusões .....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 6</b>	<b>- Perspectivas de trabalho futuras .....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 7</b>	<b>- Referências .....</b>	<b>55</b>
<b>Capítulo 8</b>	<b>- Apêndices.....</b>	<b>67</b>







# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Diversas fontes de biomassa e suas classificações.....	2
<b>Figura 2</b> - Produtores de combustíveis derivados de algas.....	3
<b>Figura 3</b> - Equilíbrio do sistema tampão ácido-base fraco do dióxido de carbono.....	4
<b>Figura 4</b> - Simbiose nutricional entre microalgas e bactérias .....	7
<b>Figura 5</b> - Reações de produção de O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> por fotólise da água por parte das microalgas....	12
<b>Figura 6</b> - Sistema aberto circular.....	15
<b>Figura 7</b> - Sistema fechado <i>flat plate</i> .....	16
<b>Figura 8</b> - Sistema fechado tubular .....	16
<b>Figura 9</b> - Fermentadores Schott com as culturas de algas. ....	26
<b>Figura 10</b> - Primeira série dos ensaios de crescimento com <i>C. vulgaris</i> .....	28
<b>Figura 11</b> - Segunda série dos ensaios de crescimento com <i>C. vulgaris</i> . ....	28
<b>Figura 12</b> - Concentração de biomassa algal produzida ao longo do tempo na 1ª série de crescimento.....	35
<b>Figura 13</b> - Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> adicionado ao longo do tempo para manter o pH a 7,5. .	36
<b>Figura 14</b> - Concentração de biomassa algal produzida ao longo do tempo na 2ª série de crescimento.....	38
<b>Figura 15</b> - Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> adicionado ao longo do tempo para manter o pH a 7,5. .	39
<b>Figura 16</b> - Composição da biomassa húmida após hidrólise ácida. ....	43
<b>Figura 17</b> - Composição da biomassa húmida após moagem mais hidrólise ácida. ....	43
<b>Figura 18</b> - Composição da biomassa húmida após ultrassons mais hidrólise ácida. ....	43
<b>Figura 19</b> - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações referência. ....	46
<b>Figura 20</b> - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações 5N1P.....	46
<b>Figura 21</b> - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações 5N3P.....	46
<b>Figura 22</b> - Separação de 3 fases pelo método de quantificação de lípidos Bligh and Dyer. ..	47
<b>Figura 23</b> - Composição da biomassa no método da hidrólise ácida. ....	48



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Produção de etanol a partir de diferentes fontes de biomassa.....	8
<b>Tabela 2</b> - Teor de açúcares em microalgas .....	9
<b>Tabela 3</b> - Teor de lípidos em microalgas .....	10
<b>Tabela 4</b> - Composição do meio Bristol modificado. ....	26
<b>Tabela 5</b> - Retas de calibração para os carboidratos. ....	40
<b>Tabela 6</b> - Reta de calibração para o método de Lowry.....	40
<b>Tabela 7</b> - Açúcares presentes nas amostras nos diferentes métodos de lise celular (mg.mg <sup>-1</sup> ). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente.....	41
<b>Tabela 8</b> - Composição da biomassa húmida aquando dos diferentes métodos de lise celular (mg.mg <sup>-1</sup> ). ....	42
<b>Tabela 9</b> - Açúcares presentes nas amostras de biomassa húmida e seca (mg.mg <sup>-1</sup> ). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente. ....	44
<b>Tabela 10</b> - Composição da biomassa húmida e da biomassa seca (mg.mg <sup>-1</sup> ). ....	44
<b>Tabela 11</b> - Açúcares presentes nas amostras das diferentes condições de crescimento (mg.mg <sup>-1</sup> ). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente.....	45
<b>Tabela 12</b> - Composição da biomassa nas amostras das diferentes condições de crescimento (mg.mg <sup>-1</sup> ). ....	45
<b>Tabela 13</b> - Lípidos e resíduos presentes na biomassa húmida após hidrólise ácida (mg.mg <sup>-1</sup> ). ....	47



# Lista de Acrónimos

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DIC	Carbono inorgânico dissolvido
CCM	Mecanismo de concentração do CO <sub>2</sub> no cloroplasto
RuBisCO	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxiganase
dCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> dissolvido
TAG	Triacilgliceróis
PPFD	Densidade de fluxo dos fotões fotossintéticos
CMC	Carboximetilcelulose
dO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> dissolvido
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
5N1P	Meio referência com a concentração de azoto aumentada cinco vezes
5N3P	Meio referência com a concentração de azoto aumentada cinco vezes e a de fósforo três vezes





# Capítulo 1

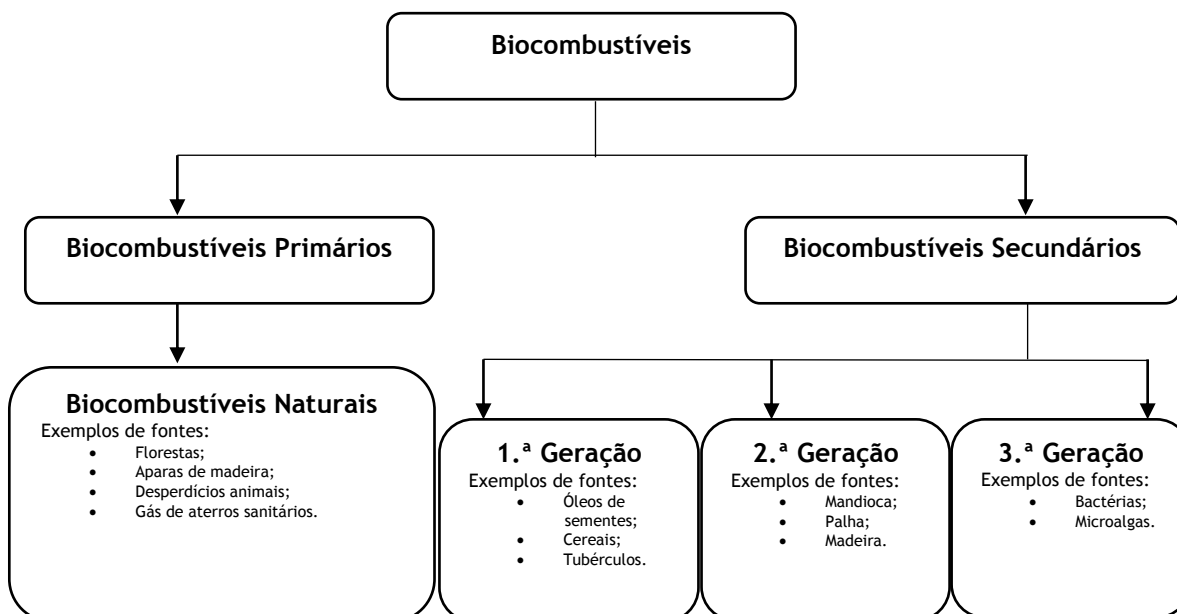
## Introdução

### 1.1 Biocombustíveis

O aumento constante da população mundial tem vindo a aumentar a procura dos recursos naturais, alimentares e energéticos, bem como os impactos ambientais da exploração desses recursos. Estima-se que a população mundial cresça dos atuais 7.3 biliões para 11.2 biliões até ao final do século XXI. O incremento muito significativo do consumo de recursos energéticos, nomeadamente carvão e petróleo em economias emergentes, tais como as da China e do Brasil, tem-se traduzido por libertações de dióxido de carbono, entre outros gases para a atmosfera, que a biomassa vegetal terrestre e aquática não está a assimilar e que se traduz num incremento não aceitável do nível de dióxido de carbono na atmosfera. Em 2013 consumiam-se por dia 91,2 milhões barris de petróleo em todo o mundo [1]. É neste contexto que se tem vindo a valorizar fontes alternativas de combustíveis, bem como as tecnologias menos intensivas em energia. Neste âmbito, as energias renováveis, tais como a biomassa, o vento e o sol, entre outras, têm um papel crucial a desempenhar.

Atualmente, os combustíveis fósseis representam cerca de 80% da produção energética global, sendo os restantes 20% referentes às energias alternativas. Este elevado consumo de combustíveis fósseis, tem levado a que os níveis de gases que contribuem para o efeito de estufa presentes na atmosférica têm vindo ao aumentar ao longo das últimas décadas e já contabilizam 400 ppmv de CO<sub>2</sub>. A biomassa vegetal das plantas terrestres é um elemento essencial para o sequestro de dióxido de carbono. No entanto, a biomassa algal, com a sua extremamente elevada área superficial específica para sequestro de CO<sub>2</sub> pode dar uma contribuição muito significativa no futuro. Por exemplo, 1 kg de biomassa algal acumula cerca de 1,83 kg de CO<sub>2</sub>, gerando, por outro lado, hidratos de carbono, lípidos, proteínas e outros compostos de alto valor acrescentado. A recuperação da biomassa algal não é, ainda, um processo trivial, mas avanços significativos têm vindo a ser dados [2,3].

Os biocombustíveis podem ser classificados como primários e secundários. Os primários são a biomassa vegetal e animal não processada, tal como a madeira, gases de aterros sanitários e desperdícios animais. A partir dos biocombustíveis primários podem obter-se os secundários, que correspondem a biomassa processada. Estes podem ser divididos em três subclasses que correspondem aos de 1.<sup>a</sup>, 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> geração [2,3] como se ilustra na figura 1.



**Figura 1** - Diversas fontes de biomassa e suas classificações (adaptado de [3]).

Os biocombustíveis primários têm maioritariamente aplicação no aquecimento ou na produção de energia elétrica, não sendo considerados ideais para a produção de combustíveis líquidos. Os biocombustíveis líquidos de 1.ª e 2.ª geração, nomeadamente o biodiesel e o bioetanol, apesar de permitirem uma produção elevada, competem por terrenos aráveis usados para a produção de alimentos, além de requererem tecnologias dispendiosas para a transformação da biomassa no produto final [3,4].

A 3.ª geração de biocombustíveis tem inúmeras vantagens em relação às anteriores e é vista como a aposta dos próximos anos, apesar de ainda existirem limitações que necessitam de ser ultrapassadas como o *scale-up*, a inovação dos processos de produção e recuperação de biomassa de modo a baixar o custo do produto. Neste grupo, as microalgas são o microrganismo que ganha maior evidência devido à sua capacidade de duplicar a concentração de biomassa num espaço de tempo reduzido e poderem apresentar, em algumas espécies, um conteúdo de óleo de 80% do seu peso seco; para além disso, produzem todo o ano, apresentando um potencial 15-300 vezes superior às culturas tradicionais por unidade de área. Não necessitam de terrenos aráveis e têm a capacidade de adquirir os nutrientes necessários ao seu crescimento a partir de efluentes líquidos e de gases industriais. Esta geração de combustíveis é considerada neutra em termos de gases de efeito de estufa devido à capacidade de fixação de CO<sub>2</sub> das microalgas, duas vezes superior à existente nas plantas, sendo biodegradável e não apresentando toxicidade [3,5,6].

No presente contexto, já existe alguma produção industrial de combustíveis derivados de algas, onde a grande maioria dos produtores estão situados nos Estados Unidos da América (78%) enquanto que a restante percentagem está localizada na Europa e no resto do mundo (22%), tal como é possível verificar na figura 2.

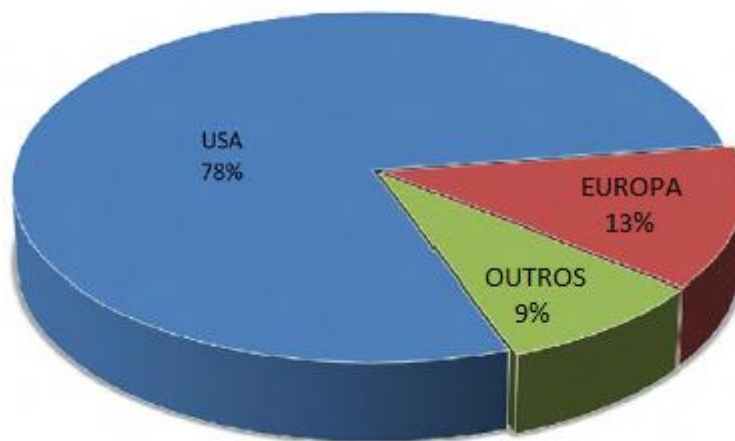


Figura 2 - Produtores de combustíveis derivados de algas (adaptado de [6]).

## 1.2 Algas

Estima-se que existam entre trinta a cinquenta mil espécies de algas, sendo que a grande maioria são microalgas. Podem ser pluricelulares, no caso das macroalgas, ou unicelulares, no caso das microalgas; podem ser procarióticas, como a cianobactéria (*Cyanophyceae*), ou eucarióticas como a microalga verde (*Chlorophyta*). Apresentam um metabolismo maioritariamente autotrófico, podendo também ser heterotrófico ou mixotrófico. Podem ou não apresentar mobilidade e são ainda capazes de sobreviver em condições ambientais extremas [4,7,8].

As algas são dos seres vivos mais antigos e podem ser classificadas em diferentes divisões em função da sua pigmentação, da natureza química do produto fotossintético, das características dos cloroplastos e da parede celular, do arranjo e estrutura flagelar assim como da genética ribossomal [7].

A microalga, ao contrário da macroalga, tem como vantagens uma maior capacidade de produção e armazenamento de óleo na sua estrutura, bem como de outros produtos de valor acrescentado, apresentando um crescimento populacional elevado [9].

Algumas espécies, devido ao seu valor nutricional, têm sido usadas desde a antiguidade como alimento por parte de povos da América Central e do Norte como os Aztecas e os mesoamericanos e é ainda hoje consumida como suplemento alimentar em todo o mundo. Alguns componentes das microalgas têm aplicações na indústria farmacêutica, na cosmética, na alimentação animal, na aquacultura, na coloração e como fertilizantes [6,10].

Os principais fatores que podem influenciar a cultura de microalgas são os perfis quantitativos e qualitativos dos nutrientes, a distribuição e saturação da luz, a temperatura, o pH, a salinidade, a concentração de oxigénio dissolvido e a presença de elementos tóxicos [11].

### 1.2.1 Remoção de nutrientes

Para crescerem de forma saudável, as microalgas necessitam de ter disponíveis macro- e micro-nutrientes que lhes permitam um desenvolvimento e multiplicação normal.

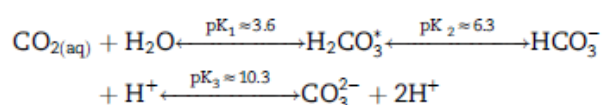
Em condições de autotrofia, além da luz, as algas necessitam de nutrientes, tais como o C, o N e o P em quantidades apropriadas para que não exista uma redução do seu crescimento, como é explicado pela lei do mínimo de Liebig, quando na presença de uma quantidade deficitária de um dos nutrientes [12]. Para além disso, como a presença de celulose nas microalgas vai ser bastante menor que em plantas terrestres, estas vão conter três vezes mais nutrientes na sua composição em relação às plantas terrestres e consequentemente vão precisar de assimilar mais nutrientes para a produção de biomassa [12,13].

- **Assimilação de carbono**

O carbono é o elemento com maior presença nas microalgas com um valor entre 17 e 65% do seu peso seco se as condições forem propícias, no entanto, mantem-se normalmente nos 50% [12,14]. Este é absorvido principalmente na sua forma inorgânica,  $\text{CO}_2$ , mas também pode ser capturado na sua forma orgânica, como é o caso da Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), do acetato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) e do ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) [12,14,15] no caso de o metabolismo ser heterotrófico ou mixotrófico.

Uma vez que o rácio C:N:P da biomassa algal (106:16:1) é bastante superior ao encontrado em efluentes e outros meios que permitam o crescimento das microalgas, a adição de  $\text{CO}_2$  atmosférico ou concentrado [14] é uma necessidade; por outro lado, constitui um grande benefício já que assimila o  $\text{CO}_2$ , que é um gás que contribui para o efeito de estufa.

Uma vez que as microalgas estão presentes em meio aquático, o  $\text{CO}_2$  atmosférico vai sofrer um processo de dissolução dando lugar a um sistema tampão ácido-base fraco, como explicado na figura 3.



**Figura 3** - Equilíbrio do sistema tampão ácido-base fraco do dióxido de carbono (adaptado de [11]).

Pela figura 3 é possível verificar que o pH tem uma influência no carbono inorgânico dissolvido (DIC). Assim sendo, a fonte de carbono que vai estar maioritariamente presente na gama de pH em que as microalgas sobrevivem (6,5-10) vai ser o bicarbonato [12]. Apesar de este ser o produto final de absorção, este composto só é assimilável através do ciclo de Calvin após a conversão do  $\text{CO}_2$  assimilado pelas vias fotossintéticas C3 e C4. Contudo, o  $\text{CO}_2$  presente no meio aquático é escasso, como tal, através do mecanismo de concentração do  $\text{CO}_2$  no cloroplasto (CCM), este tem um aumento do rácio  $\text{CO}_2:\text{O}_2$  junto da RuBisCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase) permitindo assim uma diminuição do desperdício aquando da fotorrespiração [12,16,17].

Esta captura de CO<sub>2</sub> pode ainda ser ampliada quando na presença de maiores intensidades e períodos de luz, o que vai resultar num aumento da taxa de crescimento específico e da sequestração deste gás, não influenciando a remoção do N e do P [18]. No entanto, limitações na concentração de N levam a um aumento da afinidade para o carbono inorgânico, a uma diminuição da presença de clorofila e ao aumento do rácio C:N na microalga [19].

Outra forma de assimilação de carbono é a injeção de CO<sub>2</sub> em maiores concentrações no meio aquático em que as microalgas estão a crescer. Contudo, cada espécie responde de uma forma diferente a essas concentrações. Nomeadamente, a *Chlorella* sp. consegue crescer na presença de concentrações entre 0,5-5% de CO<sub>2</sub> na fase gasosa, apesar de a taxa de fixação do CO<sub>2</sub> dissolvido (dCO<sub>2</sub>) tenha sido inferior na concentração de 5% [20]. Noutra situação, para as espécies *Desmodesmus* sp., *Kirchneriella cornuta* e *Acutodesmus* sp. verificou-se um aumento da concentração de biomassa, da taxa de crescimento específico e da taxa de fixação de CO<sub>2</sub> quando foram incrementadas as concentrações de CO<sub>2</sub> de 10, 20 e 30% na fase gasosa [21]. A espécie *Chlorella vulgaris* também apresentou aumento de biomassa quando foram aplicadas concentrações no intervalo entre 2-13% [19].

No entanto, a presença de CO<sub>2</sub> concentrado afeta não só o pH mas também a forma como os micronutrientes vão ser assimilados pelas algas. Na presença de maiores concentrações de CO<sub>2</sub>, o pH vai baixar devido à acidificação do meio; na ausência de alimentação de CO<sub>2</sub> resulta num aumento do pH (básico) [22]; assim, o CO<sub>2</sub> acaba também por ser usado para controlar o pH. Independentemente da concentração inicial dos elementos, quando há injeção contínua de ar comprimido ou CO<sub>2</sub>, os elementos Al, Cd, Mn e Zn vão apresentar uma menor disponibilidade para assimilação por parte das microalgas por alteração do pH no meio. Já os elementos Cr, Fe e Ni não são afetados pelo aumento dessa concentração de carbono inorgânico. Contudo, o Cu demonstra uma menor variação da sua disponibilidade relativamente à injeção ou não de ar comprimido ou CO<sub>2</sub> [23]. A desvantagem inerente à utilização de ar comprimido ou de CO<sub>2</sub> puro para misturar com ar está relacionado com o elevado custo associado. Como tal, a utilização de gases provenientes de centrais de combustão tem o potencial para baixar o custo de produção através do aproveitamento e tratamento desses gases. Os gases de combustão podem conter até 142 compostos diferentes, tais como óxidos de enxofre e azoto, dióxido de carbono, matéria particulada ou metais, dos quais alguns podem ser benéficos ao crescimento das algas e outros podem ser tóxicos [24]. Apesar de ser possível injetar este tipo de gás diretamente no meio de cultura das microalgas, o ideal é estes gases de combustão passarem primeiro por um pré-tratamento de forma a retirar alguns componentes tóxicos e o excesso de calor [24,25]. Por outro lado, devido às condições extremas em que as microalgas estarão expostas, devido aos elevados níveis de SO<sub>x</sub> e de NO<sub>x</sub> presentes, só algumas espécies são capazes de crescer neste ambiente, sendo a escolha da microalga bastante importante [26].

- **Assimilação de azoto e fósforo**

Tanto o azoto como o fósforo são, logo a seguir ao carbono, os nutrientes mais importantes para as microalgas e cianobactérias, sendo as suas biomassas constituídas por 1-10% de N e menos de 1% de P respetivamente, sendo que o fósforo é considerado o elemento limitante no meio ambiente [27].

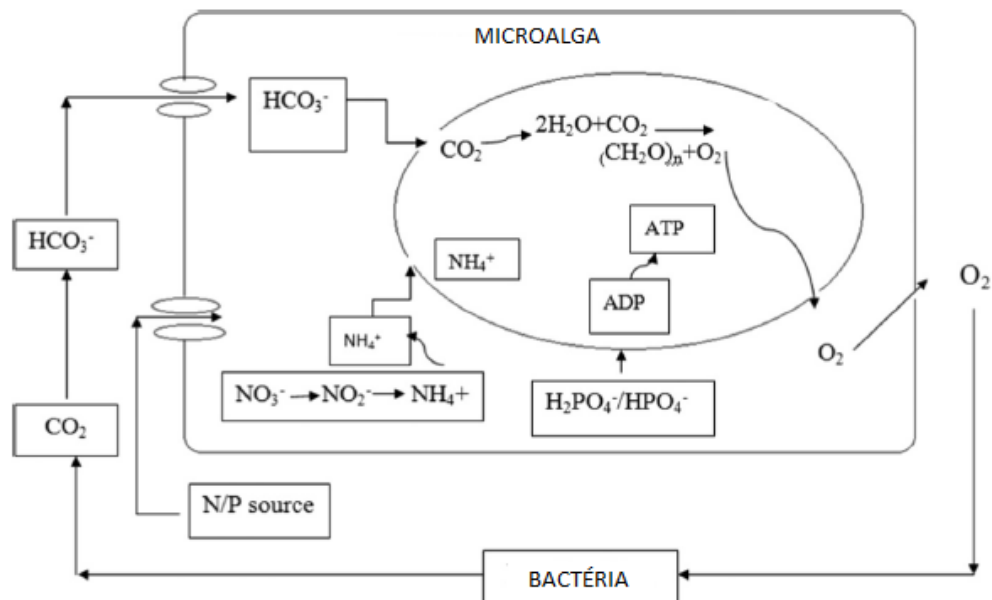
O nitrato é a forma mineral do azoto (o azoto entra na constituição dos ácidos nucleicos, aminoácidos e pigmentos) mais usada na cultura sintética de microalgas; não apresenta toxicidade para as células, podendo ser aplicadas concentrações até 100 mM [12,28]. No entanto, quando as concentrações são aumentadas para além de 100mM, o crescimento é afetado negativamente (mas não totalmente inibido), entrando em ação a enzima nitrato redutase, cujos produtos, nitrito e amónia, são tóxicos para o microrganismo [29]. Por outro lado, o défice de azoto e dos micronutrientes magnésio e ferro resultam na perda temporária de clorofila e no cessamento do ciclo celular na microalga, particularmente para elevadas concentrações celulares [30].

O fósforo é um elemento essencial para as moléculas envolvidas no metabolismo destes microrganismos, como os ácidos nucleicos, fosfolípidos membranares e ATP [28]. No meio ambiente natural e em águas residuais este elemento está presente na forma de ortofosfato, polifosfato, pirofosfato, metafosfato e na sua forma orgânica [12]. A assimilação deste nutriente está diretamente relacionada com o pH e não tanto com a temperatura do meio em que as células estão inseridas, pois aumenta quando o pH se encontra em valores superiores a 9,5 [31]; no entanto, estes seres crescem normalmente e de forma saudável na presença de pH mais neutros. As microalgas possuem um segundo mecanismo de assimilação de fósforo, denominado “*luxury uptake*”, que consiste no armazenamento deste na forma de polifosfatos [32,33].

Os nutrientes N e P estão disponíveis em efluentes industriais, pelo que a cultura de microalgas pode representar simultaneamente tratamento de efluentes e produção de biomassa algal. No caso do azoto isso vai ser possível por assimilação e pela volatilização da amónia que resulta de um aumento do pH causado pelo crescimento das microalgas, enquanto que a assimilação do fósforo resulta dos mecanismos anteriormente referidos [34]. Neste tipo de tratamentos, a remoção de azoto total e fósforo total podem atingir valores de 82-99% e 0,58-100% dependendo das espécies usadas, da sua imobilização ou não, e das concentrações iniciais [34,35]. No entanto, a remoção de nutrientes por imobilização celular tem desvantagens no que toca ao crescimento celular quando atinge concentrações elevadas, devido à atenuação acentuada da radiação que atinge a biomassa [36].

A cultura conjunta de microalgas e bactérias é outra possibilidade que alguns autores têm explorado. Este tipo de cultura apresenta inúmeras vantagens no que toca à robustez e resistência às adversidades ambientais, já que as diferentes vias metabólicas se complementam na remoção dos nutrientes, para além de apresentarem maior capacidade de resistência à invasão por outras espécies [37]. Este sistema apresenta uma simbiose benéfica já que a microalga (autotrófica) fornece O<sub>2</sub> à bactéria (heterotrófica), que por sua vez

fornece  $\text{CO}_2$  à microalga, potenciando assim o crescimento mútuo e evitando-se o consumo de energia extra no arejamento do reator [38]. Noutras situações, microalgas com deficiência em vitamina B12 podem ser suplementadas por bactérias enquanto as bactérias podem receber igualmente carbono orgânico por parte das microalgas, fazendo desta uma relação de simbiose como é possível verificar na figura 4 [39].



**Figura 4** - Simbiose nutricional entre microalgas e bactérias (adaptado de [40]).

Como foi referido acima, os gases de combustão podem constituir uma fonte interessante de C para as microalgas; além do  $\text{CO}_2$  presente, o gás pode fornecer às microalgas outros nutrientes necessários ao seu crescimento e que constituem poluentes quando descarregados na atmosfera. Compostos como os  $\text{NO}_x$  e o  $\text{SO}_2$  estão presentes nos gases de combustão e dependendo das espécies usadas, da densidade celular, da concentração destes compostos, do tipo de reator usado e do caudal injetado no meio, é possível às microalgas assimilá-los [24]. No entanto, dos  $\text{NO}_x$  presentes nos gases de combustão, o  $\text{NO}_2$  tem uma maior solubilidade na água (a  $25^\circ\text{C}$  e 1 atm) do que o  $\text{NO}$  [41], o que dificulta a assimilação deste último composto que representa 95% das emissões de  $\text{NO}_x$  [42]. Assim sendo, a adição de um agente quelante é uma solução que melhora a assimilação deste composto por parte das microalgas [43].

O enxofre entra na constituição de alguns aminoácidos e lípidos, representando este elemento 0,15-1,96% do peso seco das microalgas [24]. Este é assimilado para o citoplasma na forma de sulfato por sistemas de transporte sulfato/ $\text{H}^+$  e quando em excesso, pode ser armazenado em vacúolos [44]. No entanto, as formas sulfito e bissulfito podem apresentar toxicidade para as células consoante as suas concentrações e o pH do meio. Contudo, o bissulfito pode ser oxidado e convertido à forma de sulfato pela injeção de ar no meio e daí ser aproveitado pelas microalgas para o seu crescimento [45].

### 1.2.2 Produção de Carbohidratos

O potencial de produção de carbohidratos e consequentemente de etanol por parte das microalgas tem sido descrito como sendo superior aos restantes tipos de biomassa, como é possível verificar na tabela 1.

**Tabela 1** - Produção de etanol a partir de diferentes fontes de biomassa (adaptado de [46]).

<i>Fonte</i>	<i>Produção etanol (gal/acre)</i>	<i>Produção etanol (l/ha)</i>
<i>Folhas e Caules do Milho</i>	112-150	1050-1400
<i>Trigo</i>	277	2590
<i>Mandioca</i>	354	3310
<i>Sorgo</i>	326-435	3050-4070
<i>Milho</i>	370-430	3460-4020
<i>Beterraba</i>	536-714	5010-6680
<i>Cana-de-açúcar</i>	662-802	6190-7500
<i>Panicum virgatum</i>	1150	10760
<i>Microalgas</i>	5000-15000	46760-140290

Num estudo que visava determinar os carbohidratos presentes em 76 espécies de microalgas marinhas, obtiveram-se teores de açúcares entre 40-50% [47]; A tabela 2 apresenta esses teores para algumas espécies.

A composição do meio de crescimento vai influenciar não só o crescimento das microalgas mas também o seu metabolismo secundário. No caso da microalga *Chlorella vulgaris* foi possível extrair 37% de açúcares totais [48], mas em privação de azoto no meio de crescimento, na mesma espécie é possível extrair 41% apesar do menor crescimento celular [49].

Contrariamente, a privação de fósforo em conjunto com a privação de azoto em *Chlorella* sp. resultou numa menor acumulação de relativamente à privação de unicamente azoto, afetando negativamente na mesma o crescimento celular. No entanto, o aumento do teor em açúcares verificou-se em ambos os casos, face a uma concentração de nutrientes considerada suficiente para um crescimento saudável das células [50]. Isto acontece pois em privação de azoto, o fluxo de carbono vai ser direcionado para a produção de carbohidratos e lípidos, levando a uma menor produção de proteínas [51].

Contudo, o teor em açúcares contabilizados nas microalgas vai depender das espécies e dos métodos utilizados para a extração, que desta forma vai influenciar o custo de produção do produto associado. No entanto, há ainda muito trabalho a fazer nesta área, tanto na investigação em novas espécies com alto teor em açúcares, como nos métodos de extração.



**Tabela 2** - Teor de açúcares em microalgas (adaptado de [52]).

<i>Espécies de Algas</i>	<i>Teor em Açúcar (% peso seco)</i>
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogyra sp.</i>	33-64
<i>Dunaliella bioculata</i>	4
<i>Dunaliella salina</i>	32
<i>Euglena gracilis</i>	14-18
<i>Prymnesium parvum</i>	25-33
<i>Tetraselmis maculata</i>	15
<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57
<i>Spirulina platensis</i>	8-14
<i>Spirulina maxima</i>	13-16
<i>Synechococcus sp.</i>	15
<i>Anabaena cylindrica</i>	25-30

O consumo de energia na recuperação da biomassa e no processo de extração é outro fator associado que vai influenciar o custo final dos produtos extraídos, incluindo o bioetanol.

O bioetanol é obtido neste caso pela fermentação alcoólica dos carboidratos simples. Este processo pode seguir duas vias diferentes, a da fermentação em escuro, processo realizado em condições anaeróbicas pela própria microalga, e da fermentação realizada por leveduras que consegue obter melhores rendimentos de produção [52].

### 1.2.3 Produção de Lípidos

A capacidade de produção de lípidos por parte das microalgas varia de espécie para espécie. No entanto, algumas têm a capacidade de acumular até 60% (m/m) da sua massa em óleo, que pode ser utilizado para vários fins, nomeadamente o biodiesel, químicos, nutracêuticos, cosméticos e aditivos alimentares [53]. Na tabela 3 estão representadas algumas espécies e o seu respetivo intervalo de teor em óleos.

**Tabela 3 - Teor de lípidos em microalgas (adaptado de [54]).**

<i>Espécies de Algas</i>	<i>Teor em Lípidos (% peso seco)</i>
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptothecodinium 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
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Através da modificação dos nutrientes no meio providenciado às microalgas é possível aumentar a produção de lípidos por parte das microalgas. Desta forma, o rácio C:N deve ser diminuído durante a fase de crescimento celular mas aumentado aquando da fase de concentração de lípidos [55].

De modo a resistir a condições ambientais de *stress* ou não favoráveis ao seu crescimento, as microalgas tendem a acumular lípidos em diversos corpos intracelulares [56]:

- Plastoglóbulos, que são pequenos corpos com lípidos no cloroplasto que contêm uma ligação à lamela do tilacoide;
- Pequenos corpos  $\alpha$ -citoplasmáticos;
- Grandes corpos  $\beta$ -citoplasmáticos com ligação à membrana do retículo endoplasmático ou ao envelope membranar do cloroplasto;

Os triacilgliceróis (TAG) são compostos energeticamente ricos, que conseguem capturar o excesso de luz recebida pela microalga protegendo-a do *stress* causado pela fotoinibição. Quando armazenados na forma TAG, os lípidos podem ser utilizados no rearranjo da membrana celular de forma a resistir a condições extremas. Também a produção paralela de carotenoides secundários e o seu armazenamento em triacilgliceróis (TAG) protegem as células de condições adversas, como privação de nutrientes e excesso de luz, e levam à síntese de lípidos [56].

Além do azoto e da luz, também as baixas temperaturas, concentrações elevadas de sais no meio e de ferro vão potenciar a produção de lípidos por parte das microalgas. Contudo, o azoto é o que mais contribui para esse efeito [57].

A produção de biodiesel a partir dos lípidos acumulados na biomassa algal pode constituir uma alternativa aos combustíveis fósseis. Por um lado as algas captam CO<sub>2</sub>, o que reduz o efeito

de estufa, e por outro armazenam uma parte do carbono fixado na forma de lípidos facilmente convertíveis em biodiesel. O biodiesel obtém-se através de uma reação de transesterificação que consiste na substituição do glicerol presente nos triglicéridos por uma pequena cadeia de álcool presente durante o processo de catálise [58].

#### 1.2.4 Produção de Proteínas

A extensão da investigação dedicada às proteínas presentes nas microalgas e nas cianobactérias parece ter sido inferior à dedicada a outros produtos, apesar das suas potenciais aplicações. De facto, já existe a aplicação direta da biomassa algal na alimentação humana, de animais ou na aquacultura devido ao elevado teor proteico presente nestas células [59].

As proteínas têm um papel importante no crescimento, reparação, manutenção, na defesa contra invasores e na regulação da atividade celular das microalgas. O teor de proteína pode ser quantificado pelos métodos de análise elementar, método de Kjeldahl, método de Lowry e Bradford; os dois primeiros quantificam o azoto total, podendo contabilizar azoto de outras fontes que não as proteínas. Na *Chlorella vulgaris*, o teor em proteína é de 42-58% do peso seco; 20% do total de proteínas faz parte da parede celular e 50% está no interior da célula; 30% migra entre o meio intra e extracelular [10].

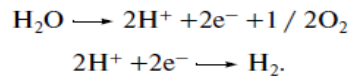
No caso da microalga *Porphyridium cruentum* foi possível extrair-se 56% do seu peso seco, sendo que 84% representam proteínas solúveis e 16% proteínas insolúveis. A qualidade destas proteínas para alimentação vai depender da composição dos seus aminoácidos. Neste caso, 38,7% representam aminoácidos essenciais e 61% não essenciais, enquanto 0,3% representam o aminoácido ornitina que não tem classificação mas que no entanto é importante para a dietética [60].

Contudo, devido aos processos de extração, as proteínas podem sofrer alterações na cor, sabor e estrutura. Desta forma, torna-se necessário implementar processos de isolamento deste constituinte sem alterações, de forma a potenciar a sua aplicação na área da alimentação [61] quando o objetivo é a comercialização.

#### 1.2.5 Outros produtos

As microalgas e as cianobactérias permitem obter produtos para além das proteínas para alimentação humana e animal, os lípidos para o biodiesel e os carboidratos para o bioetanol. Pode, ainda, produzir-se biogás através do processo digestão anaeróbia, que consiste numa mistura de 55-75% de metano e 25-45% de CO<sub>2</sub> que pode ser aplicado como gás para uso doméstico ou até mesmo na produção de eletricidade [62].

As microalgas, quando colocadas em condições anaeróbias durante várias horas, também podem produzir hidrogénio. No entanto, quando expostas à luz, estas células produzem O<sub>2</sub>, ou seja, através da fotossíntese é possível realizar fotólise da água, libertando hidrogénio e oxigénio através de duas reações químicas, tal como explicado na equação da figura 5 [63].



**Figura 5** - Reações de produção de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> por fotólise da água por parte das microalgas (adaptado de [63]).

Também é possível através de uma primeira fase em condições autotróficas produzir O<sub>2</sub> após fixação de CO<sub>2</sub>, e, numa segunda fase, o hidrogénio é produzido por degradação dos compostos orgânicos armazenados quando em privação de enxofre. A privação deste nutriente em algas verdes causa a inibição reversível do processo de fotossíntese por impedimento da síntese de proteínas [64].

O butanol tem sido apontado como uma alternativa ao etanol, podendo ser aplicado em mistura com a gasolina e o diesel. Tem maior conteúdo energético, menor solubilidade em água, é menos corrosivo e baixa higroscopia. Contudo, apresenta maior toxicidade e ponto de ebulição o que dificulta a purificação quando em comparação com o etanol. O butanol já foi produzido biologicamente pela bactéria *Clostridium acetobutylicum* após mutação destas por mutagenese convencional [65].

A clorofila, além das funções que exerce na microalga, pode adquirir atividade quelante, podendo ser usada em pomadas, em tratamentos farmacêuticos, de úlceras, de fígado, em reparação celular, no aumento do crescimento celular e da hemoglobina presente no sangue. Pode ainda ser usada como pigmento para a indústria dos cosméticos [62].

As microalgas e as cianobactérias têm a capacidade de produzir uma vasta gama de compostos bioativos. Além destes produtos já referenciados, são ainda capazes de produzir compostos como o *fucoïdan* no caso das algas castanhas, agar no caso das vermelhas e o *ulvano* no caso das verdes. Podem ainda produzir compostos com propriedades antioxidantes como o  $\alpha$ -caroteno e o  $\beta$ -caroteno, vitaminas como o ascorbato, fenóis como o ácido fenólico, flavonoides, taninos, hormonas e substâncias promotoras do crescimento em plantas como auxinas, giberelinas, betaínas e esteróis. Estes produtos são seguros para consumo e aplicação em humanos, plantas e animais [66].

### 1.3 Sistemas de produção de microalgas

A cultura de microalgas depende de inúmeros fatores, incluindo o desenho e modo de operação dos reatores, que influenciam diretamente o seu crescimento e os produtos acumulados.

- **Modo de operação de reatores biológicos**

Os reatores biológicos podem ser operados em três modos diferentes, apresentando cada um vantagens e desvantagens. Podem ser operados de forma descontínua, semi-descontínua e contínua.

As culturas que são operadas em descontínuo mantêm o meio inicial durante todo o processo de crescimento do microrganismo não havendo adição nem remoção deste. Funciona como um sistema fechado. Durante o processo, o substrato é esgotado e o produto é acumulado dentro do reator. Desta forma, a determinada altura, ocorre cessamento do crescimento das células por falta de nutrientes e pela presença de produtos inibidores do crescimento. Têm ainda a desvantagem da sua baixa produtividade, elevado custo de recolha da biomassa e respetivos produtos devido à baixa concentração celular e a qualidade e quantidade do produto pode ser baixa e incerta [67]. A composição da espécie utilizada por ainda variar devido a vários fatores, como a diferença dos fatores ambientais, a irradiação da luz, a taxa de crescimento específica, composição do meio, pH e estágio em que a célula é recolhida, podem levar a alterações bioquímicas na microalga e cianobactéria [68].

O sistema de operação em semi-descontínuo funciona com adição contínua ou intermitente de substrato de modo a fornecer determinados nutrientes à cultura. Desta forma é possível promover o crescimento celular e obter uma eficiência fotossintética próxima do máximo teórico; superior, portanto, à dos sistemas descontínuos [69].

Os sistemas contínuos podem ser definidos como sistemas abertos. Neste caso, substrato fresco é adicionado continuamente ao reator enquanto o caldo (biomassa e produtos) é retirado de igual forma do reator, mantendo um volume constante [67]. Este tipo de operação pode ser mais facilmente automatizado, reduzindo custos operacionais. Também providencia uma quantidade e qualidade de biomassa estável devido a uma maior facilidade de controlo ambiental de todo o sistema [70].

A produção em larga escala de biomassa algal é atualmente realizada em modo contínuo durante o dia e descontínuo durante a noite. Neste caso, 25% da biomassa produzida durante o dia pode ser perdida durante noite, o que vai depender de fatores como a luz irradiada e da temperatura durante o dia e da temperatura durante a noite. O método mais utilizado neste caso são as lagoas fotossintéticas e os fotobiorreatores tubulares [54].

- **Influência da luz na produção de biomassa**

A luz natural é economicamente mais viável mas também tem algumas desvantagens, nomeadamente a variação das condições atmosféricas, os ciclos de dia e noite (luz e escuro), as alterações sazonais, que afetam a sua intensidade luminosa e o respetivo espectro de luz [71].

A iluminação artificial, apesar de mais dispendiosa, permite uma melhor regulação da densidade de fluxo dos fótons fotossintéticos (PPFD) [71].

A intensidade luminosa diminui à medida que atravessa o meio de cultura, criando assim gradientes de luz e zonas escuras que limitam a fotossíntese [71]. Entre a zona de saturação de luz e a zona escura num reator biológico, as culturas estão expostas a um regime intermitente de luz (frequência), decorrente da agitação no reator, evitando assim que as células sofram de foto oxidação e fotoinibição causada pelo excesso de luz aquando da

fotossíntese, ou por inibição da RuBisCO por reações de oxidação-redução, quando na presença de  $O_2$  [72,73].

As microalgas e as cianobactérias na presença na presença de diferentes frequências de radiação (intermitente ou contínua) conseguem assimilar a mesma quantidade de carbono (inorgânico e orgânico). Aquando dos ciclos dia/noite, os carboidratos produzidos durante dia servem de substrato, por respiração endógena, durante a noite. Isto porque durante o dia o metabolismo é autotrófico e de noite é heterotrófico, uma vez que de noite a intensidade da luz é igual a zero [74,75].

A produção da biomassa depende da fonte de luz, a sua intensidade, distribuição, geometria dos raios de luz, frequência e ciclos de dia e noite. A luz é o principal fator limitante na projeção do tamanho máximo de um reator biológico [75].

- **Influência da agitação**

As microalgas e as cianobactérias no meio ambiente têm uma densidade celular baixa existindo uma distância entre células de cerca de 1cm. No entanto, em culturas em massa, onde há uma densidade celular elevada, a transmissão de luz vai ser negativamente afetada, o consumo de  $CO_2$  dissolvido ( $dCO_2$ ) vai aumentar, havendo um aumento da temperatura da cultura. A agitação pode ser mecânica, por arejamento ou por bombeamento. Este visa garantir que as algas não sedimentam, que existe uma distribuição de luz e nutrientes uniforme pela população de algas, evitando a estratificação e permitir as trocas gasosas e de calor no sistema [76].

A agitação vai ainda potenciar a transferência de massa gás-líquido, sendo que este é um dos fatores limitantes no *scale-up* em reatores biológicos. Uma fraca transferência de massa pode ser prejudicial para o resultado final do processo de crescimento de biomassa. Esta facilita a assimilação do  $CO_2$  e a remoção do  $O_2$  [75] que tem de ser elevada pois esta vai influenciar a fotossíntese. O sistema é complexo já que envolve três fases, o meio de cultura líquido, a biomassa suspensa e a fase gasosa [77].

A sedimentação poderá ocorrer nas zonas do reator onde existe uma menor agitação. A acumulação das células nas zonas mortas do reator pode levar ao deterioramento da célula, assim como a decomposição anaeróbia e afetar a qualidade do produto. Contudo, se a agitação for demasiado elevada, pode causar *stress* hidrodinâmico na cultura e desta forma restringir o crescimento celular e a atividade metabólica. Assim, para reduzir esse fator e manter uma agitação mais elevada, pode ser adicionado ao meio carboximetilcelulose (CMC) de modo a aumentar a viscosidade e desta forma diminuir a turbulência [78].

### **1.3.1 Sistemas abertos**

Os sistemas abertos (Fig. 6), também denominados de lagoas fotossintéticas, têm sido bastante usados desde os anos 1950 devido à facilidade de construção, operação e menor consumo energético. No entanto, existem diversas desvantagens neste tipo de sistema, principalmente nas diferenças de temperatura e de luz a que as culturas estão sujeitas [79], à

evaporação de água para a atmosfera, à chuva, que vão causar flutuações nas concentrações de nutrientes e biomassa, conduzindo a baixas produtividades [67].

As lagoas fotossintéticas são normalmente construídas em betão ou terra compactada e podem ser forradas com plástico branco. São sistemas pouco profundos (normalmente 30 cm de profundidade) onde a agitação é feita por pás durante todo o tempo de modo a permitir uma melhor difusão do CO<sub>2</sub>, evitar a sedimentação das células, e minimizando o gradiente vertical de nutrientes e gases (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) [54,80].



**Figura 6** - Sistema aberto circular (adaptado de [79]).

As contaminações mais difíceis de evitar nestes sistemas são as de outras microalgas competidoras devido à similaridade física e biológica com as utilizadas no sistema. Desta forma, por diferenças na sua composição as microalgas competidoras podem afetar a produtividade do produto de interesse. Quando se utilizam sistemas abertos deve-se utilizar o potencial para o produto de interesse por das espécies contaminantes e a de interesse, de modo a ser possível manipular as condições de crescimento (salinidade, pH, nutrientes disponíveis) e desta forma favorecer as espécies capazes de sobreviver as essas condições, extraíndo-se posteriormente a totalidade do produto de interesse [81].

Atualmente apenas existem alguns sistemas de produção em massa em sistemas abertos. São eles a produção de B-caroteno por parte da *Dunaliella salina* na Austrália, a astaxantina por parte da espécie *Haematococcus pluvialis* em Israel e de *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis* para alimentação humana, animal e cosméticos na Ásia e Estados Unidos da América [82].

### 1.3.2 Sistemas fechados

Os sistemas fechados permitem ultrapassar algumas das limitações inerentes aos sistemas abertos. Neste tipo de sistema é possível reduzir o risco de contaminação e desta forma cultivar apenas uma espécie de microalga ou cianobactéria. Reduz possíveis presenças de poluentes atmosféricos e de perdas de água. Permite reduzir os custos de recolha além de

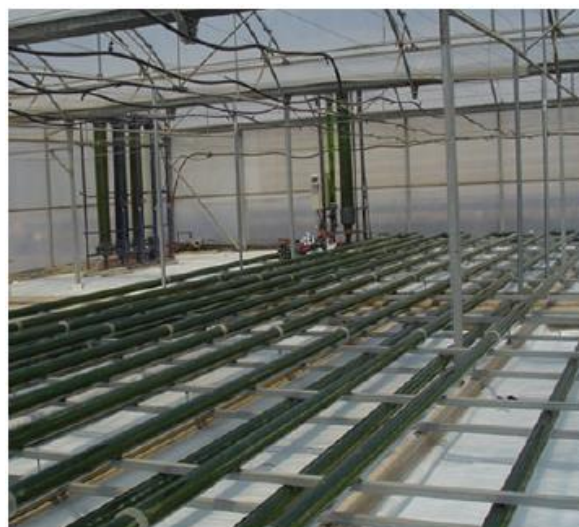
possibilitar uma maior produção de biomassa [4]. Os sistemas fechados podem apresentar três diferentes geometrias [83]: os *flat-plate*, os tubulares e os em coluna.

Os sistemas *flat-plate* (Fig. 7) consistem em paralelepípedos transparentes com alturas entre 10-150 cm sendo normalmente de vidro ou plástico. Tem um tempo de residência de  $O_2$  menor que os restantes e permite uma maior agitação por via do arejamento do sistema. Podem ser construídos orientados para o sol o que permite conjuntamente com o menor percurso da luz uma maior eficiência no aproveitamento da energia solar [84,85,86].



**Figura 7** - Sistema fechado *flat plate* (adaptado de [86]).

Os sistemas tubulares (Fig. 8) são os mais usados para a cultura de microalgas. As culturas circulam ao longo do sistema por agitação mecânica ou bombagem; de modo a ser retirado o  $O_2$ , as culturas passam por tanque ou coluna de bolhas onde ar é adicionado de modo a evitar danificação das células por níveis de  $O_2$  dissolvido ( $dO_2$ ) elevados. Uma das desvantagens deste sistema está relacionada não só com o  $dO_2$  mas também com as variações de pH e as limitações de  $CO_2$  ao longo dos tubos. Neste momento já existe em Espanha instalações com  $30\text{ m}^3$  de reatores para produção comercial de *S. almeriensis* [86].



**Figura 8** - Sistema fechado tubular (adaptado de [86]).



Os sistemas em coluna vertical são de fácil manuseio, compactos e de baixo custo. Providenciam uma mistura eficiente do meio, uma elevada taxa de transferência de gases em relação aos restantes e permite um bom controlo das condições de crescimento [67]. Este tipo de sistema tem ainda uma boa eficiência de utilização da luz e devido à sua boa exposição aos ciclos de luz/escuro, permite reduzir o risco de fotoinibição e foto oxidação. No entanto estes reatores têm uma área de iluminação limitada, tendo em conta a sua posição face à luz natural, um baixo rácio superfície/volume e é um sistema caro quando comparado com os sistemas abertos. Ainda assim, é um sistema promissor para *scale-up* não só devido às características anteriormente referidas mas também devido a ter uma baixa ocupação de terrenos [87].

Têm sido desenvolvidos outros sistemas como os *single use bioreactors* cujos materiais de que são construídos são polímeros esterilizados por raios gama. Podem ser usados num estágio de cultivo inicial reduzindo custos de esterilização e manutenção. Permitem uma agitação intensa e uma utilização eficiente e uniforme de luz, já que representam um rácio área de superfície/volume elevada [88].

No entanto ainda há muito trabalho a ser desenvolvido no desenvolvimento e otimização de sistemas que permitam aumentar a produtividade e ao mesmo tempo reduzir custos de produção.

## 1.4 Métodos de disrupção celular

A disrupção celular é uma etapa importante como processo *downstream* na indústria. No entanto, devido às características das microalgas, esta etapa tem limitado esta indústria devido aos gastos energéticos necessários para desconstruir as células. As diferenças entre as características de células de diferentes espécies, assim como as variações na estrutura celular causadas pelas condições de cultura torna a investigação desta etapa uma das prioridades de investigação. Um método ideal para causar a disrupção celular passará por ter um baixo custo de operação, possibilitar a recuperação de uma elevada percentagem de produtos e a garantia de preservação da sua qualidade.

A parede celular das microalgas pode ser dividida em duas camadas. Uma externa composta maioritariamente por uma matriz de polissacarídeos, como a pectina, alginato, agarose e *algaenans*. A camada interna é composta por celulose microfibrilar, hemicelulose e glicoproteínas. A composição, a proporção, a forma e o arranjo destes na parede celular vai depender da espécie da microalga [89]. Algumas microalgas podem ainda conter esporepolenina na sua parede celular que é um polímero altamente resistente a condições biológicas, físicas e químicas extremas [90].

Existem diferentes métodos de disrupção celular que se dividem em dois grupos: os métodos mecânicos e os métodos não-mecânicos [91].

- **Métodos mecânicos**

Os métodos mecânicos são caracterizados por causar a ruptura das células de forma não específica pela ação de forças de tensão de cisalhamento por ação de sólidos, de líquidos, correntes ou transferência de energia [91].

Os métodos que fazem parte deste grupo são a moagem em moinho de bolas, a homogeneização a alta pressão ou velocidade, aplicação de ultrassons, aplicação de micro-ondas, aplicação de pulsos elétricos e tratamento térmico em autoclave [92].

O moinho de bolas é um método com elevada eficiência causada por tensões de cisalhamento e compactação causadas por pequenas esferas, necessitando apenas de uma operação, que leva a uma elevada recuperação do produto, para além de ser fácil o *scale-up*. Contudo, a elevada temperatura a que a amostra é sujeita durante o processo, pode causar degradação dos produtos. A formação de um fino resíduo sólido e a distribuição não seletiva de compostos bioquímicos vai levar a um aumento do custo de operação *downstream* [91].

As homogeneizações a elevadas pressões ou velocidades funcionam através da aplicação de elevadas tensões de cisalhamento e cavitação sobre as células.

A suspensão passa através de uma, ou várias válvulas, embatendo num anel de impacto, fragmentando-a. Apesar de ter uma elevada recuperação de produtos e ser juntamente com os moinhos de bolas o método mais usado, opera a baixas concentrações células secas (0,01-0,85 % m/m) para ter uma elevada eficiência, o que leva a um elevado consumo de água e energia. Associada a esta desvantagem está a libertação não seletiva de compostos, que leva a um aumento de custo na purificação do composto de interesse [91].

Um processo alternativo são as elevadas velocidades, geradas por um impulsor de rpm elevadas. O método permite ter um baixo tempo de operação e funciona a concentrações de células secas elevadas (2-6 % m/m) o que vai reduzir o gasto em água. No entanto, este método requer o gasto de muita energia e leva à desnaturação proteica afetando a viabilidade dos produtos [91].

O método onde são aplicados ultrassons leva à desintegração celular por cavitação. Este fenómeno é explicado por pressões sónicas elevadas em células em suspensão, que originam microbolhas que explodem violentamente levando à quebra da parede e membrana celular, e de ligações covalentes [92]. No entanto, devido à cavitação, vai haver a formação de radicais livres por termólise da água. Este método também pode levar ao aumento da temperatura, necessitando deste modo de um sistema de arrefecimento para manter a viabilidade dos produtos [91].

As micro-ondas aplicadas a suspensões celulares causam o aquecimento local através da interação das micro-ondas com moléculas dielétricas ou polares, como a água. Como existe água numa célula, a eficiência deste método vai ser potenciada, resultando numa elevada recuperação de produtos, um baixo consumo energético e um tempo reduzido de operação [91,93]. Contudo, quando aplicado em conjunto com solventes polares, pode levar a uma reação do solvente com as células dificultando a ruptura. O aumento da temperatura, a

formação de radicais livres e a conversão química de compostos podem interferir com a recuperação de determinados produtos [91,93].

Os pulsos elétricos funcionam através da aplicação externa de um campo elétrico que vai induzir um potencial elétrico crítico na membrana e parede celular, levando à formação de poros, cujo tamanho e número vai depender da intensidade usada. Este método potencia a extração de lípidos e proteínas. No entanto, o aumento da temperatura pode levar a uma perda do valor nutricional proteico e o consumo de energia vai depender da concentração celular na suspensão [91].

- **Métodos não mecânicos**

Os métodos não mecânicos levam à lise celular por ação de agentes químicos, agentes enzimáticos, pressões osmóticas ou agentes biológicos. São métodos que muitas vezes não causam a desintegração celular mas sim a perfuração ou permeabilização da parede celular [89,91].

A aplicação de agentes químicos vai depender da composição da parede celular do microrganismo. Podem ser agentes quelantes, solventes, antibióticos, detergentes, hipocloritos, alcalinos ou ácidos.

Das inúmeras técnicas de ruptura celular químicas que existem, a que mais tem sido utilizada e com maior eficiência em microalgas tem sido a hidrólise ácida recorrendo a  $H_2SO_4$  ou HCl. Esta tem obtido teores de açúcares totais com 32%, quando utilizado  $H_2SO_4$  2N a 121°C numa autoclave com *S. obliquus* [92], 54% com um duplo tratamento com  $H_2SO_4$  72 e 4% (m/m) durante 30 minutos a 30°C e 20 minutos a 121°C respetivamente em *C. vulgaris* [94]. No entanto, este último método de ruptura leva à decomposição da celulose e hemicelulose em carboidratos de baixo peso molecular, como a glucose e galactose. No entanto, estes monómeros podem ser degradados em outros produtos, como o ácido acético, o furfural ou o HMF [92].

A eficiência do processo de hidrólise é afetada pela composição em polissacarídeos das microalgas podendo requerer otimização, ainda assim, este processo possibilita a quebra de carboidratos mais complexos em monómeros que facilitam deste modo no processo de fermentação dos açúcares no seu produto final, o etanol [95]. A desvantagem da aplicação da hidrólise ácida pode ser a degradação de pigmentos e quando usadas concentrações elevadas a degradação de produtos mais frágeis [91].

Já a ruptura por atividade enzimática pode ser aplicada através de uma ou misturas de enzimas ou extratos enzimáticos de outros microrganismos [89].

A maior vantagem deste método é a seletividade das enzimas na degradação da parede celular. No entanto, o custo das enzimas é, em geral, elevado [89].

A utilização de microrganismos predadores de microalgas é um outro método alternativo emergente para a ruptura celular. Bactérias e vírus têm sido aplicados onde microalgas têm proliferado de forma descontrolada e nociva para os ecossistemas costeiros. Este método

resulta no aproveitamento de um mecanismos de defesa das plantas, das macro e microalgas, das cianobactérias, das bactérias e dos vírus denominado *allelopathy* [96]. Este fenómeno resulta na excreção de metabolitos secundários para o meio que circunda o organismo, influenciando de forma positiva e negativa os organismos que o rodeiam. Desta forma pode inibir-se o crescimento celular ou causar a morte ou disrupção celular das microalgas. As desvantagens deste método são: a espécie a usar, a dosagem de inóculo a aplicar na cultura de microalgas que vai influenciar a eficácia do método e o tempo de disrupção que necessita de controlo por parte do operador [96].





# Capítulo 2

## Objetivos

O presente trabalho de investigação visa numa primeira etapa estudar o crescimento de microalgas em diferentes meios e desta forma tentar potenciar a produção de biomassa. Posteriormente, pretende-se otimizar o processo de desconstrução da biomassa algal, com vista à sua caracterização e ao desenvolvimento de processos que permitam uma maior recuperação de produtos de valor acrescentado, para além da redução de custos.





# Capítulo 3

## Materiais e métodos

### Materiais

#### 3.1.1 Reagentes

Água destilada de um sistema RIOs™ 3 (Milipore, Waters) foi utilizada para preparar os meios, tampões e soluções. O hidrogenofosfato dipotássio, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para o meio de crescimento, a L-arabinose, a D-glucose, a L-ramnose monohidratada, a D-manose, a D-xilose, o hidrogenotartarato de potássio e o reagente Folin foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Missouri, E.U.A). O cloreto de cálcio dihidratado, o sulfato de magnésio heptahidratado, o cloreto de sódio, o molibdato de sódio dihidratado, o sulfato de cobalto heptahidratado, o sulfato de ferro heptahidratado, o óxido de alumínio e o carbonato de sódio foram fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O nitrato de sódio, o metanol, hidróxido de sódio e o clorofórmio foram fornecidos pela Pronalab (Lisboa, Portugal). A albumina de soro bovino e a D-celobiose foram fornecidos pela Fluka Chemicals (Buchs, Suíça). O dihidrogenofosfato de potássio e o ácido sulfúrico foram fornecidos pela Panreac Applicham (Barcelona, Espanha). O sulfato de zinco heptahidratado e o sulfato de cobre pentahidratado foram fornecidos pela Riedel-de Hoën® (Hanôver, Alemanha). O ácido bórico foi fornecido pelo Grupo Montedison (Milão, Itália). O cloreto de manganês tetrahidratado foi fornecido pela BDH Chemicals Ltd. (Poole, Inglaterra).

#### 3.1.2 Microalgas

A microalga utilizada para esta dissertação pertence à espécie *Chlorella vulgaris*, adquirida à Algoteca de Coimbra, do Departamento de Ciências da vida (Botânico) da Universidade de Coimbra.

Esta foi mantida no meio de cultura mineral Bristol modificado, cuja composição está presente na tabela 4, em fermentadores Schott de 250 mL com agitação magnética, à temperatura ambiente e a uma intensidade luminosa de  $2231 \text{ lm.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , num ciclo luz/escuro, 12:12, fornecida por uma placa de luz LED modelo PL-600\*600-CW de 40W da Lowcled (Shenzhen, China). Os fermentadores constam da figura 9.

**Tabela 4** - Composição do meio Bristol modificado.

<i>Nutrientes</i>	<i>Concentração</i>
<i>Nitrato de sódio</i>	250 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Hidrogenofosfato de potássio</i>	75 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Cloreto de cálcio dihidratado</i>	33 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Sulfato de magnésio heptahidratado</i>	75 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Dihidrogenofosfato de potássio</i>	175 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Cloreto de sódio</i>	25 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Sal de sódio do ácido etilenodiaminatetracético</i>	60 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Ácido bórico</i>	2,86 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Cloreto de manganês tetrahidratado</i>	1,9 mg.L <sup>-1</sup>
<i>Sulfato de zinco heptahidratado</i>	20 µg.L <sup>-1</sup>
<i>Sulfato de cobre pentahidratado</i>	78 µg.L <sup>-1</sup>
<i>Molibdato de sódio dihidratado</i>	70 µg.L <sup>-1</sup>
<i>Sulfato de cobalto heptahidratado</i>	80 µg.L <sup>-1</sup>
<i>Sulfato de ferro heptahidratado</i>	35 µg.L <sup>-1</sup>

Com vista à manutenção das microalgas, foi também criado um banco celular em tubos de ensaio rolhados com algodão e gaze nos quais o volume útil foi de 15 e 20 mL e onde a concentração de células utilizada foi de 0,04 g.L<sup>-1</sup>. A intensidade luminosa e a temperatura foram as mesmas do sistema anterior. A agitação foi manual, uma vez por dia, exceto aos fins-de-semana. O pH inicial em todas as culturas foi de 6,5 e foi mantido a 7,5 recorrendo a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH 1 e 2M.



**Figura 9** - Fermentadores Schott com as culturas de algas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Produção de biomassa algal

A biomassa algal foi produzida em duas séries de ensaios de crescimento e visa o estudo do efeito das condições de crescimento sobre o crescimento da biomassa. Nestes testes foram usados sistemas “air-lift” compostos por frascos lavadores (Simax, República Checa) previamente esterilizados, nos quais o carbono inorgânico foi entregue pelo bombear de ar

atmosférico através de bombas de ar, modelo Tetrattec AP80 de 220-240V (Tetrattec®, Alemanha) ou por ar comprimido. Antes de entrar nos reatores, o ar foi filtrado numa membrana de *nylon* com porosidade 0,45 µm (Membrane solutions, E.U.A.). A intensidade de luz aplicada durante os dois ensaios de crescimento foi de 3331 lm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

A temperatura em ambas as séries de ensaios foi mantida a 25°C, usando um banho de água GLS Aqua 18 Plus Grant (Biosan, Riga, Letónia) que também forneceu agitação horizontal aos reatores. A luz foi fornecida pela mesma placa de luz LED usada para a manutenção das microalgas (secção 3.1.2). O pH em ambas as séries de ensaios foi mantido a 7,5 recorrendo a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH 1 e 2M.

A avaliação da produção da biomassa foi efetuada através da leitura da densidade ótica num espectrofotómetro modelo Helios gama (Thermo Electron Corporation, Inglaterra) num comprimento de onda de 683 nm a cada 24 horas com as diluições adequadas. No final de cada série de ensaios, foi feita a relação entre o valor da densidade ótica a 683 nm e a concentração de biomassa (base seca) presente nos fotobiorreatores. Para determinar o peso seco de biomassa presente nos fotobiorreatores num dado volume de meio usaram-se dois métodos diferentes aquando da realização das duas séries de ensaios de crescimento. Na primeira série de ensaios filtrou-se, sob vácuo, um volume conhecido de amostra numa membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 µm (Membrane solutions, E.U.A.) previamente tarada. A amostra foi lavada com água destilada e em seguida levada a uma estufa a 100°C durante 48 horas e pesou-se. A amostra foi levada novamente à estufa até peso constante. Na segunda série de ensaios de crescimento, um volume conhecido foi centrifugado a 3500 RPM. A biomassa húmida foi lavada três vezes com água destilada por centrifugação. Em seguida foi colocada num vidro de relógio previamente tarado e levada durante 48 horas a uma estufa a 100°C até peso constante. A utilização deste procedimento em vez do primeiro (filtração) minimiza as eventuais perdas de biomassa através da membrana. Ambos os métodos permitiram determinar a concentração de biomassa algal.

Na primeira série de ensaios de crescimento da biomassa algal, pretendeu-se estudar o efeito dos diferentes meios de cultura sobre o crescimento da biomassa, não se tendo utilizado duplicados em virtude do espaço limitado do banho. Destes meios, um foi o meio Bristol modificado já apresentado anteriormente na tabela 4 (secção 3.1.1) e os dois restantes meios Bristol modificados continham ambos uma concentração de azoto cinco vezes superior ao meio de referência enquanto um tinha uma concentração de fósforo três vezes superior à referência e outro a concentração de referência (meios Bristol 5N3P e 5N1P). Neste sistema, o carbono inorgânico foi entregue na forma de ar atmosférico a um caudal de 1,5 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e serviu para agitar as culturas, além de fonte de nutriente. Usaram-se ainda cabeças de frasco de lavador com placa porosa de 2 µm. O volume útil nos reatores foi de 400 mL de um total de 500 mL e a densidade ótica inicial foi de 0,1. O pH inicial neste ensaio foi de 6,5.

Na segunda série de ensaios de crescimento, pretendeu-se estudar em duplicado a influência dos meios Bristol modificado (tabela 4) e do meio Bristol modificado 5N3P. Também se pretendeu estudar a influência de um borbulhamento com maior caudal, bem como o sistema

de dispersão de gás. O carbono inorgânico foi entregue recorrendo a ar comprimido a um caudal equivalente de  $3 \text{ L.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para os diversos reatores. A comparação entre os dois meios foi realizada em reatores de 500 mL e 1000 mL, com 400 mL e 800 mL de volume útil, respetivamente. A densidade ótica inicial foi de 0,1 para todos os sistemas e o pH inicial foi de 7,0.



**Figura 10** - Primeira série dos ensaios de crescimento com *C. vulgaris*.



**Figura 11** - Segunda série dos ensaios de crescimento com *C. vulgaris*.

### 3.2.2 Recuperação da biomassa algal

A biomassa resultante de ambas as séries de crescimento e dos Schott de manutenção foi recolhida por centrifugação a 3500 RPM durante 15 min e posteriormente lavada três vezes com água destilada repetindo-se de cada vez o procedimento de centrifugação.

A biomassa húmida recolhida foi armazenada numa arca congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$  enquanto o sobrenadante foi armazenado numa arca frigorífica a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

A biomassa utilizada na avaliação da performance dos diferentes métodos de lise celular, incluindo a realização da desconstrução em estado seco e em estado húmido, foi a proveniente de 10 frascos de Schott utilizados para manutenção da biomassa algal.

A biomassa recuperada da primeira série de ensaios de crescimento foi seca a 100°C numa estufa e caracterizada.

### **3.2.3 Avaliação de diferentes métodos de lise celular**

#### **3.2.3.1 Avaliação de diferentes métodos de rutura celular em biomassa**

Foram realizados ensaios em duplicado de rutura celular utilizando 190,84 mg de biomassa húmida correspondente a 20 mg de biomassa seca com diferentes métodos de lise. Estes foram a hidrólise ácida, a moagem seguida de hidrólise ácida, os ultrassons seguidos de hidrólise ácida e uma hidrólise ácida seguida de uma segunda hidrólise ácida.

No método de hidrólise ácida, às cerca de 190 mg de amostra húmida foi adicionado 10 mL de água destilada onde depois se reduziu o pH das amostras a 1 com recurso a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6M. Em seguida a amostra foi autoclavada numa autoclave, modelo 2540ML (Tuttnauer, Alemanha) a 121°C durante uma hora. Após o procedimento estar concluído, as amostras foram armazenadas numa arca frigorífica a 4°C até posterior caracterização.

No método de moagem seguido de hidrólise ácida, pesou-se a biomassa húmida para um cadinho de porcelana previamente tarado e adicionou-se 10 mg de óxido de alumínio de modo a aumentar a fricção e desta forma potenciar a rutura celular. A moagem manual realizou-se durante 5 minutos, com recurso a uma manta de gelo de modo a minimizar o aumento da temperatura nas amostras. Após a moagem, lavou-se a amostra com 10 mL de água destilada e procedeu-se à hidrólise ácida.

No método dos ultrassons, pesou-se a biomassa húmida para copos de vidro e adicionou-se 10 mL de água destilada à amostra. Em seguida recorreu-se a um equipamento modelo VC 600-2 de 600W (Sonics & materials inc., Danbury, Connecticut, E.U.A.) para sonicar as amostras em dois ciclos de 5 minutos com um intervalo de 2 minutos. Por fim, executou-se o procedimento da hidrólise ácida onde já não foi necessário adicionar os 10 mL de água destilada.

Ao método da hidrólise ácida seguida de uma segunda hidrólise, recuperou-se a fase líquida da primeira hidrólise por centrifugação a 3500 RPM durante 25 min; ao sólido foram adicionados 10 mL de água destilada cujo pH foi reduzido a 1 tal como na primeira hidrólise. O restante processo foi uma repetição do primeiro. Este procedimento decorreu da identificação de um resíduo sólido no hidrolisado do processo de extração de lípidos. De facto, observou-se a presença de material não hidrolisado, procedemos à limpeza do recipiente onde foi realizada a hidrólise com água destilada e procedeu-se à sua filtração numa placa porosa nº 4 de modo a determinar o peso seco deste material em relação ao peso seco inicial.

#### **3.2.3.2 Avaliação da influência da humidade na rutura celular**

Apesar de do ponto de vista operacional e de rentabilidade não ser aconselhável processar a biomassa em estado seco, alguns autores testaram este caminho. Desta forma, procedeu-se ao método de disrupção celular por hidrólise ácida em biomassa seca e húmida. Pesou-se

primeiro 20 mg de biomassa seca e 190,84 mg de biomassa húmida (correspondente a 20 mg seca), ambos em duplicado. Após o procedimento estar concluído, o hidrolisado foi armazenado numa arca frigorífica a 4°C até posterior caracterização.

### **3.2.3.3 Avaliação da influência das condições de crescimento na composição da biomassa**

Como já foi testado por alguns autores que a composição das microalgas vai ser influenciada pelas condições de crescimento, nomeadamente, a escassez de nutrientes, optámos por testar a composição das biomassas recuperadas na primeira série de ensaios de crescimento. Como a biomassa recuperada era escassa e tinha sido seca procedemos à disrupção celular pelo método da hidrólise ácida em duplicado (secção 3.2.3.1). Após o ensaio estar concluído, armazenaram-se as amostras numa arca frigorífica a 4°C até posterior caracterização de açúcares e proteínas.

### **3.2.4 Caracterização das amostras lisadas**

As amostras lisadas foram caracterizadas quanto ao teor de açúcares totais e produtos de degradação por cromatografia líquida de alta pressão HPLC (secção 3.2.4.1) e quanto ao teor em proteínas totais pelo método colorimétrico de Lowry (secção 3.2.4.2). O teor em lípidos não foi avaliado nestas amostras uma vez que necessita de concentrações mais elevadas de biomassa, não havendo biomassa disponível. O teor em pigmentos também não foi avaliado nestas amostras uma vez que o método de avaliação do seu teor não implica um método de rutura celular.

#### **3.2.4.1 Avaliação do teor em açúcares totais e dos açúcares de degradação**

O teor em açúcares totais e produtos de degradação e a sua identificação nos hidrolisados foi analisado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) equipado com uma bomba “Binary LC Pump 250” (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, E.U.A.), um forno “LC oven 101” (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, E.U.A.), um detetor do índice de refração HP 1047A (Hewlett Packard, Palo Alto, Califórnia, E.U.A.) e um detetor de UV-Vis LC290 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, E.U.A.).

As amostras hidrolisadas foram previamente filtradas recorrendo a filtros de 0,25 µm *nylon* antes de se proceder à sua análise no HPLC.

Foi utilizada uma coluna “Aminex® HPX87H ion exclusion column” para análise de ácidos orgânicos (Aminex®, Londres, Inglaterra) e uma pré-coluna de resina de troca catiónica “Aminex® cation H<sup>+</sup> guard cartridge” (Aminex®, Londres, Inglaterra). A análise foi realizada com o forno à temperatura de 60°C e o detetor do índice de refração a 35°C. O detetor de UV-Vis foi fixado no comprimento de onda de 280 nm. As amostras foram eluídas numa solução de ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>.

Para todos os compostos a analisar, foram preparados padrões para calibração do sistema. As retas de calibração usadas para o ácido fórmico, ácido acético, furfural e

hidroximetilfurfural, encontram-se na gama de 1-4 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,05-5 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,00057-0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente e foram obtidas pelo grupo de trabalho pela Vera Costa.

Para a glucose, a xilose, a celobiose, a ramnose e a arabinose realizaram-se curvas de calibração na gama de 0-1 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.4.2 Avaliação do teor em proteínas**

O teor em proteínas foi avaliado pelo método colorimétrico de Lowry. Este método permite quantificar as proteínas presentes numa solução ou que são facilmente solubilizadas em meio alcalino diluído.

Para tal, foi necessário a calibração do método, recorrendo às concentrações de 0 a 100 mg.L<sup>-1</sup> com proteínas de soro de albumina bovina.

A solução de Lowry foi preparada recorrendo à junção de três soluções A, B e C. A solução A contém NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nas seguintes proporções: NaOH 0,143 N e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,135 N. A solução B foi preparada recorrendo a CuSO<sub>4</sub>.5(H<sub>2</sub>O) 0,057M. A solução C recorrendo a KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub> 0,124M.

Aquando da realização do método, os materiais e a água destilada utilizada foram previamente esterilizados para diminuir o risco de contaminação. Em seguida, as amostras foram retiradas da arca frigorífica em que estavam a 4°C até atingir a temperatura ambiente. Depois, procedeu-se a uma agitação vigorosa num vortex e às diluições necessárias. Em seguida preparou-se a solução de Lowry pela junção de 50 mL de solução A e 500 µL de cada uma das soluções B e C tendo-se obtidos as seguintes concentrações: NaOH 0,14N, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,132N, CuSO<sub>4</sub>.5(H<sub>2</sub>O) 0,00056M e KC<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub> 0,00121M.

Depois procedeu-se à adição de 200 µL de amostra e 1 mL de solução de Lowry a um eppendorf e em seguida levou-se a agitar vigorosamente e a incubar 20 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Antes dos 20 minutos terminarem, preparou-se a solução diluída do reagente Folin (1:1). Terminado o tempo de incubação, adicionou-se 100 µL da solução de Folin diluída às amostras e levou-se a agitar vigorosamente para depois incubar 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Por fim, mediu-se a absorvência das amostras num espectrofotómetro modelo Helios gama (Thermo Electron Corporation, Inglaterra) ao comprimento de onda de 750 nm.

#### **3.2.4.3 Avaliação do teor em lípidos**

A avaliação do teor de lípidos presentes na amostra de biomassa algal foi avaliado pelo método de Bligh and Dyer com algumas modificações.

Em primeiro lugar foram pesadas 1,9084 g de biomassa húmida, equivalentes a 200 mg de biomassa seca, às quais foram adicionados 20 mL de água destilada. Estas foram processadas pelo método de hidrólise ácida (secção 3.2.3.1). Aos 20 mL de amostra, foram adicionados 20 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (1/1 v/v) que foi levada a agitar vigorosamente durante 1 hora. Em seguida a amostra foi deixada a decantar durante 2 horas e recolheu-se a fase orgânica da amostra. O processo de adição dos solventes, agitação e decantação repetiu-

se três vezes com os tempos de 30 minutos até a fase orgânica não evidenciar a presença de lípidos.

A fase orgânica foi então levada a evaporar no rotavapor modelo RE111 (Buchi, Flawil, Suíça) a 30°C com uma bomba de vácuo acoplada, modelo Vacuum Pump V-700 (Buchi, Flawil, Suíça). Para se retirar qualquer humidade presente na amostra, esta foi colocada numa estufa a 100°C durante 24 horas. Por fim pesou-se o balão de evaporação, determinou-se a massa de óleo recuperada e com base na biomassa (base seca) inicial, determinou-se o teor de óleo da amostra.

#### **3.2.4.4 Avaliação e pesagem dos resíduos sólidos não hidrolisados**

O procedimento usado para determinar os lípidos na biomassa obrigou a utilizar uma maior massa de amostra, face aos procedimentos para determinar os açúcares e as proteínas. Neste caso, foi então possível verificar que restava uma parte de material não hidrolisado. Este resíduo foi recuperado da ampola de decantação utilizando água destilada. Em seguida foi filtrado a vácuo numa placa porosa nº 4 previamente pesada. A placa porosa foi levada a uma estufa durante 24 horas a 100°C em seguida foi pesada.

O teor de resíduo não hidrolisado corresponde à relação entre a diferença de pesos na placa porosa e o peso de amostra que foi levado a hidrolisar.







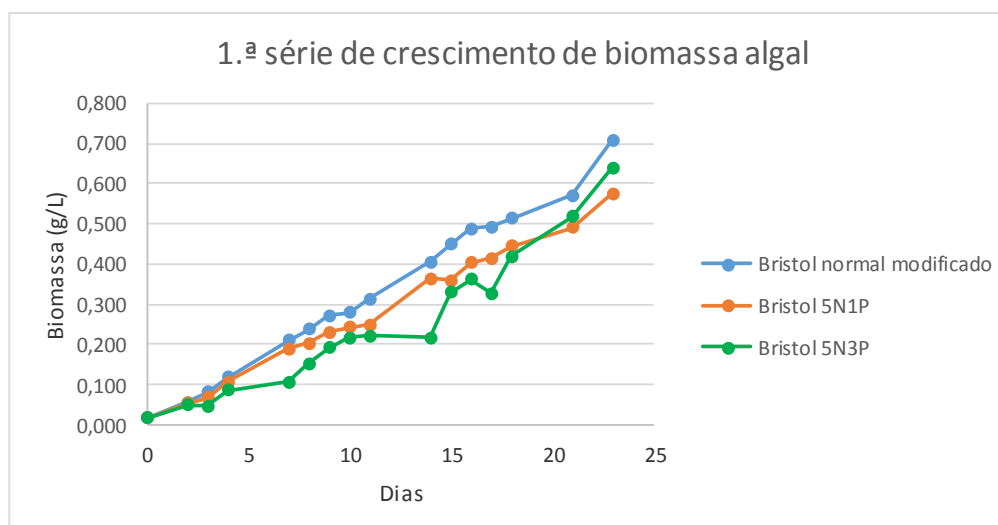
# Capítulo 4

## Resultados e discussão

### 4.1 Produção de biomassa algal

#### 4.1.1 1ª Série de crescimento algal

Como foi descrito anteriormente, as condições de crescimento das microalgas determinam a produção de biomassa, o tipo e quantidade de produtos de valor acrescentado acumulados. Os nutrientes disponíveis para a biomassa são um dos fatores que mais afeta a produção e performance e por isso quisemos testar se o aumento da concentração de um, ou dois nutrientes, em relação ao valor referência, iria resultar num aumento da produção da biomassa. A figura 12 ilustra a evolução temporal da concentração de biomassa, para diferentes concentrações de nutrientes, concretamente de azoto e fósforo.



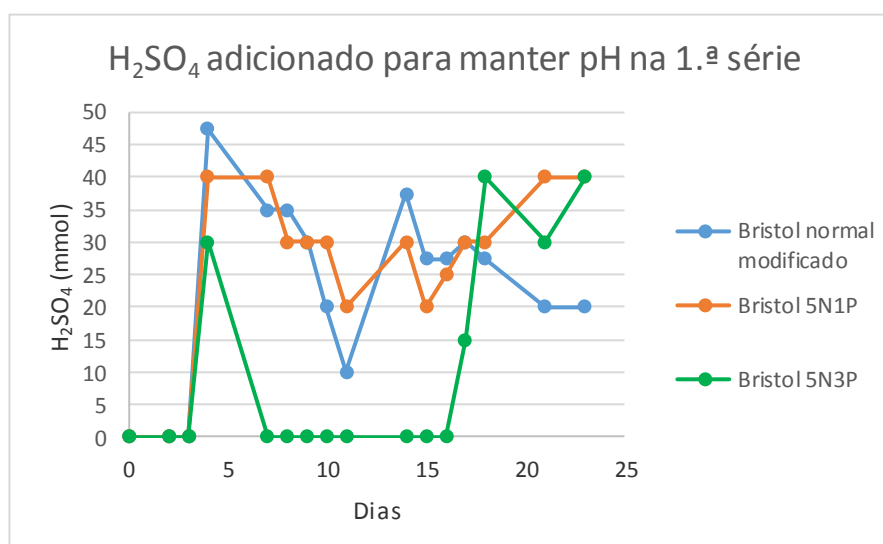
**Figura 12** - Concentração de biomassa algal produzida ao longo do tempo na 1ª série de crescimento.

Como é possível verificar na figura 12, o aumento de nutrientes (N e P) no meio de crescimento não resultou num aumento significativo da produção de biomassa; pelo contrário, parece ter induzido inibição de crescimento. De facto, as condições de referência conduziram ao melhor valor de concentração,  $0,708 \text{ g.L}^{-1}$  relativamente às restantes condições, com valores de  $0,641$  e  $0,575 \text{ g.L}^{-1}$  para os meios 5N3P e 5N1P respetivamente. É possível observar que apesar do meio 5N3P ter inibido algo o crescimento entre os 5 e 15 dias, foi possível obter no final (23 dias) um valor de concentração próximo do valor referência. É importante referir que a proporção C:N:P no meio é relevante para o crescimento algal. É de salientar,

no entanto, que os nutrientes são um de muitos fatores que influenciam o crescimento algal. Silva et al. (2015), operando em condições similares às usadas no presente trabalho, atingiram uma concentração de 0,636 e 0,64 g.L<sup>-1</sup> com um ciclo de luz/escuro 24:0 e uma intensidade de luz entre 2500 e 3000 lum.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, na presença de concentrações de azoto entre 200 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, respetivamente. A intensidade da luz e o ciclo luz/escuro utilizado pode ser insuficiente para a realização de fotossíntese se usarmos ciclos de luz/escuro curtos e intensidades baixas, mas também pode levar à fotoinibição se forem usados ciclos longos em conjunto com intensidades altas. No nosso caso, o ciclo de iluminação foi de 12:12 luz/escuro com uma intensidade de aproximadamente 3330 lum.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e a nossa concentração de azoto, expresso como nitrato de sódio, foi entre 250 e 1250 mg.L<sup>-1</sup> para os meios referência e 5N, respetivamente.

O caudal de ar que utilizámos foi de 1,5 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, enquanto Silva et al. (2015) indica que o caudal utilizado no seu trabalho é de 3 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. A quantidade de ar atmosférico que é inserida num sistema é importante pelo carbono inorgânico que é dado às células. Neste caso o caudal utilizado foi metade do utilizado por Silva et al. (2015) e Pires et al. (2014). Neste caso foi então introduzido metade do carbono orgânico para alimentar as células. No entanto, não obtivemos uma grande disparidade entre os nossos valores e os deles, sendo que a nossa produção máxima atingiu valores superiores aos referidos por estes investigadores.

O borbulhamento de ar atmosférico serviu não só para fornecer carbono atmosférico mas também para agitar as células e desta forma protege-las dos efeitos nocivos da luz através da criação de ciclos de luz/escuro com frequência elevada. O ar atmosférico também devia permitir manter o pH no valor de crescimento apropriado, neste caso 7,5. No entanto, tal não aconteceu e foi necessário a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de forma a baixar o pH.



**Figura 13** - Concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionado ao longo do tempo para manter o pH a 7,5.

Na figura 13 é possível observar que a adição de ácido foi superior para o meio de referência (meio Bristol normal modificado) e para o meio 5N1P com um total de 365,5 e 405 mmol

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionados, respetivamente. A necessidade de uma maior adição de ácido nas culturas com meio 5N1P pode decorrer da maior libertação de produtos metabólicos que tornem o meio mais alcalino. No entanto, maior concentração de azoto, neste caso na forma de nitrato, não equivale necessariamente a um maior crescimento celular. Grandes concentrações de nitrato provocam um aumento da atividade na nitrato redutase que libertam nitrito e amónia nas células, ambos tóxicos para as microalgas, como já foi referenciado anteriormente [12]. Já nas condições de crescimento 5N3P, foi adicionado apenas um total de 155 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao meio de modo a manter o pH. De salientar que a maioria do ácido adicionado foi a partir do décimo sétimo dia. A menor necessidade de adição de ácido pode estar relacionada com a elevada concentração de fósforo que pode ter criado um efeito tampão no meio e desta forma manter durante mais tempo o valor do pH, mesmo com a libertação de produtos metabólicos alcalinos.

Relativamente à cor da biomassa, deve referir-se que enquanto a cultura de referência e 5N1P mantiveram um tom verde ao longo de todo o ciclo de crescimento, as algas da cultura 5N3P ganharam um tom esbranquiçado, parecendo indicar perda de clorofila, mantendo no entanto a produtividade das células. Como entre meios de referência, 5N1P e 5N3P, aumenta sucessivamente a concentração de fósforo, pode sugerir-se que a presença deste composto em altas concentrações pode levar a uma inibição da produção de clorofila por parte desta espécie de microalga. Esta alteração da cor pode também interferir com a leitura da absorvância a 683 nm (zona do vermelho) no espectrofotómetro. A intensa cor verde vai corresponder a uma absorção de luz visível vermelho e azul. Uma vez que a cor verde não se encontra presente, pode existir interferência na leitura das amostras e consequentemente na concentração de biomassa presente na amostra.

Nesta primeira série de ensaios, atendendo à sua natureza exploratória, não se fizeram duplicados. Por outro lado, utilizaram-se bombas de aquário para alimentar ar ao meio. Atendendo a que com as bombas de aquário o caudal de ar é bastante inferior ao referido em alguma literatura de referência (Pires et al. (2014)), optou-se por alimentar ar comprimido numa segunda série de ensaios de crescimento, com um caudal de 3 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (semelhante ao referido por Pires et al. (2014)). Por outro lado, a placa porosa dos tubos de borbulhamento usados na primeira série de ensaios fechavam frequentemente por agregação de células. Decidiu-se utilizar tubos de borbulhamento sem placa porosa no seguinte ensaio de crescimento. Desta forma procedemos a uma segunda série de ensaios de crescimento em duplicado, onde decidimos adotar algumas condições diferentes, que achamos pertinentes, como o aumento do caudal para um valor aproximado do aplicado por Pires et al. (2014), a utilização dos dois meios que obtiveram melhores valores finais de biomassa, a aplicação de dispersores de ar sem placa porosa e a utilização de um duplicado de meio referência em frascos de 1 L para avaliar a geometria do frasco podia influenciar o crescimento das células.

#### 4.1.2 2ª Série de crescimento algal

Na segunda série de crescimento algal ocorreram alterações das condições de operação face à primeira série de ensaios. Na primeira série, a entrada de ar nos reatores foi realizada por uma placa porosa de 2  $\mu\text{m}$  o que permitia que o tamanho das bolhas de ar entregues no meio fossem mais pequenas. Alterando a entrada do gás no reator e o caudal pretendeu-se estudar de que forma estes parâmetros iriam influenciar o crescimento celular. Como o meio 5N3P na primeira série de ensaios demonstrou-se promissor quanto ao gasto de ácido no controlo de pH e no crescimento algal, voltou a ser testado neste estudo de crescimento. A figura 14 ilustra a evolução da concentração de biomassa (duplicado) ao longo do tempo para diferentes concentrações dos nutrientes azoto e fósforo, e em frascos de cultura com volumes totais diferentes, 0,5 e 1 L.

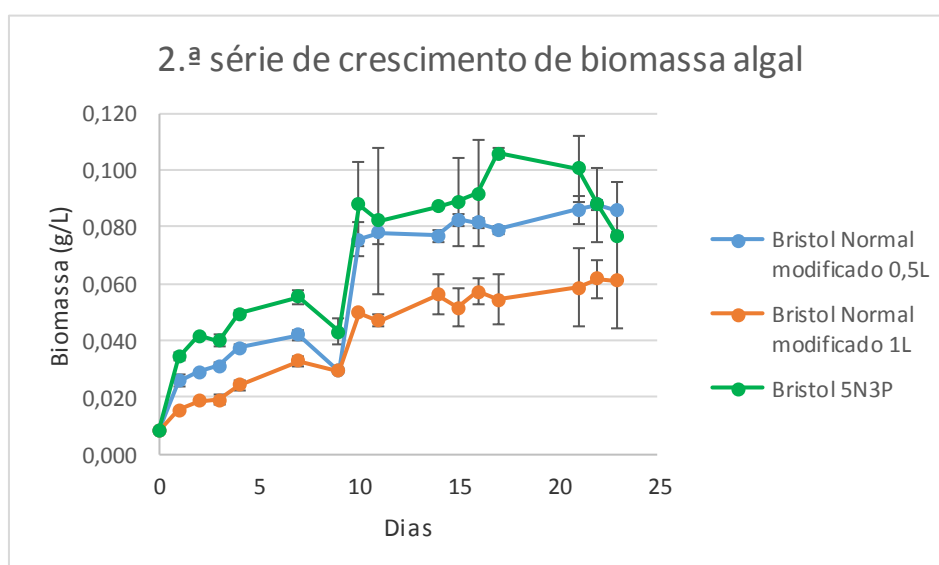
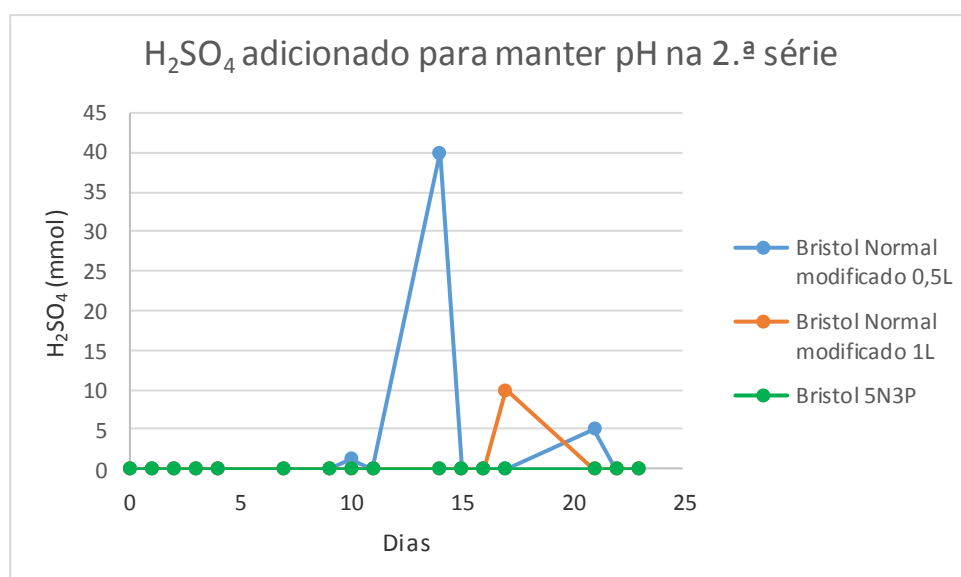


Figura 14 - Concentração de biomassa algal produzida ao longo do tempo na 2ª série de crescimento.

Como é possível verificar na figura 14, o meio 5N3P obteve o melhor resultado de produção, de  $0,106 \text{ g.L}^{-1}$ , num reator de 0,5L, em comparação com os resultados obtidos nas condições de referência em 0,5 e 1L, que foram  $0,088$  e  $0,062 \text{ g.L}^{-1}$  respetivamente. De salientar a descida de concentração nas três condições ao sétimo dia, seguida da retoma do crescimento ao nono dia. Tudo indica que se trata de um problema de agregação da biomassa que está a afetar a medida. Esta agregação das células será uma forma de proteção das mesmas às condições mais adversas a que estavam sujeitas. De forma a ultrapassar esta anomalia experimental, as microalgas recolhidas para medição da densidade ótica foram levadas a sonicar durante 30 segundos de forma a desagregar as células e a proceder a uma correta leitura das amostras.

A figura 14 também permite concluir que a produção de microalgas nestas condições foi bastante inferior à observada na primeira série de ensaios de produção; diminuiu de  $0,7 \text{ g/L}$  para  $0,1 \text{ g/L}$ . Uma causa aparente para este resultado foi o aumento do caudal de ar em conjunto com o aumento do tamanho das bolhas. Na primeira série de ensaios o sistema de

dispersão tinha na extremidade de saída uma placa porosa com poros de 2  $\mu\text{m}$  enquanto na segunda série de ensaios a saída do ar era livre, através de um tubo de diâmetro 5 mm. O diâmetro das bolhas não foi medido em nenhuma das séries de ensaios, mas era visível, tal como esperado, que as bolhas apresentavam dimensões médias muito diferentes. Esta alteração no sistema de dispersão do ar tinha como objetivo reduzir a discrepância na repetibilidade do método causada por esta anomalia. Assim, apesar de na segunda série de ensaios se ter duplicado o caudal (face à primeira série de ensaios) é possível que a área interfacial específica ( $\text{m}^2/\text{m}^3$  de meio) para a transferência de massa tenha efetivamente diminuído. Resulta claro, portanto, que será necessário, em trabalhos futuros, estudar com maior detalhe os aspectos da transferência de massa. Acresce que a maior dimensão das bolhas de ar altera a hidrodinâmica do sistema, provocando stress mecânico o que pode ter levado à aglomeração da biomassa (coerente com o aumento da concentração medida por aplicação de ultrassons para provocar desagregação). Este stress mecânico pode inibir o crescimento da biomassa. A importância relativa dos vários fatores referidos carece de investigação complementar.



**Figura 15** - Concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionado ao longo do tempo para manter o pH a 7,5.

A figura 15, relativa à quantidade de ácido requerida para manter o pH dentro dos limites apropriados à biomassa, evidencia o seu baixo consumo, coerente com a baixa produção de biomassa algal.

## 4.2 Calibração dos métodos de caracterização

### 4.2.1 Calibração do método de HPLC

A coluna cromatográfica “Aminex® HPX87H ion exclusion column” utilizada na avaliação do teor em açúcares totais e nos seus produtos de degradação é constituída por uma resina que

permite a identificação e quantificação de carboidratos e ácidos orgânicos, tais como ácidos carboxílicos, ácidos gordos voláteis, álcoois e cetonas. A preparação das amostras para análise nesta coluna é simples, pois as amostras precisam apenas de apresentar pH entre 1 e 3, para além de serem filtradas. A concentração da fase móvel mantém-se inalterada durante a análise da amostra, pelo que o método é denominado de isocrático.

De modo a determinar a concentração e identificar os constituintes das amostras injetadas, procedeu-se à preparação de retas de calibração com cinco pontos através da injeção de padrões dentro de um intervalo de concentrações determinado. Para a calibração da galactose, xilose e manose, utilizou-se apenas a reta de calibração da xilose uma vez que estes três açúcares apresentam o mesmo tempo de retenção no sistema cromatográfico. As calibrações para os ácidos orgânicos, foram obtidas pelo grupo de trabalho tal como referido anteriormente (secção 3.2.4.1). A tabela 5 contém o declive e a ordenada na origem da relação entre a área do pico (Y, em unidades arbitrárias) e a concentração do padrão em g/L (X).

**Tabela 5** - Retas de calibração para os carboidratos.

<i>Retas Calibração</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada na origem</i>	<i>r<sup>2</sup></i>
<i>Celobiose</i>	2031,8	0	0,9984
<i>Glucose</i>	1982,3	0	0,9998
<i>Xilose</i>	1885,5	0	1
<i>Ramnose</i>	1767,7	0	0,9994
<i>Arabinose</i>	1867,6	0	0,9998

Como é possível confirmar pelos valores do  $r^2$  apresentados na tabela 5, as retas apresentam um coeficiente de correlação elevado e permitem quantificar os diferentes carboidratos que possam estar presentes nas amostras.

#### 4.2.2 Calibração do método de Lowry para proteínas

O método de Lowry tem sido desde 1951 um dos métodos mais usados na quantificação de proteínas presentes em amostras biológicas. Para que a quantificação fosse possível, foi preparada uma reta de calibração de 6 pontos no intervalo de concentrações anteriormente referido (secção 3.2.4.2).

**Tabela 6** - Reta de calibração para o método de Lowry.

<i>Retas Calibração</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada na origem</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
<i>Calibração</i>	0,0024	0,0319	0,9918

Como é possível confirmar pelo valor de  $r^2$  apresentado na tabela 6, o ajuste tem a qualidade que permite a quantificação das proteínas presentes nas amostras biológicas.



## 4.3 Avaliação de diferentes métodos de lise celular

### 4.3.1 Biomassa húmida

Os diferentes métodos de rutura celular foram avaliados com base na quantificação dos açúcares e proteínas libertadas da biomassa. Esta quantidade é calculada tendo em conta a concentração do componente e o volume de água em que a biomassa foi suspensa antes de começar o seu processamento. A seleção dos métodos de rutura celular teve-se em conta os trabalhos já realizados por outras equipas de investigação, mas também a redução de custos e recursos associados ao processo. Assim, os métodos aplicados foram a hidrólise ácida, a moagem seguida da hidrólise ácida e ultrassons seguidos de hidrólise ácida, como é possível observar na tabela 7.

**Tabela 7** - Açúcares presentes nas amostras nos diferentes métodos de lise celular (mg.mg<sup>-1</sup>). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente.

Açúcares	Hidrólise ácida	Moagem + Hidrólise ácida	Ultrassons + Hidrólise ácida
<i>Celobiose</i>	0,085 ± 0,004	0,000 ± 0,000	0,016 ± 0,023
<i>Glucose</i>	0,161 ± 0,013	0,095 ± 0,028	0,115 ± 0,001
<i>X.M.G.</i>	0,051 ± 0,004	0,046 ± 0,008	0,046 ± 0,003
<i>Total</i>	0,297 ± 0,021	0,141 ± 0,036	0,177 ± 0,027

A hidrólise ácida é um método que envolve a aplicação de temperaturas elevadas (121°C) e um pH de 1, durante 1 hora.

Neste ensaio, o método que obteve melhor teor em açúcares foi a hidrólise ácida com um teor total de aproximadamente 29,7% da massa seca de microalgas usadas. Os outros dois métodos, em que o material em suspensão é sujeito previamente a ultrassons ou moagem, apresentam valores inferiores ao ensaio só com hidrólise ácida; 17,8% e 14,1% respetivamente. O não aumento do teor de açúcares totais pode parecer não expectável, mas poderá hipoteticamente ser atribuído à degradação de açúcares em produtos com alguma volatilidade que não são detetados pelo sistema analítico usado.

Os carboidratos detetados no cromatograma foram a glucose, a xilose, a manose e a galactose e por vezes a celobiose. Estes são os carboidratos reportados por outros investigadores, sendo que a glucose é o constituinte maioritário [94]. Dependendo da composição do meio, Ho et al. (2013) detetaram teores de açúcares entre 43,9% e 51% de açúcares em *C. vulgaris*. A ramnose e a arabinose não foram detetadas nas nossas amostras, enquanto nos trabalhos dos investigadores acima referidos estes açúcares apareceram ainda que em baixas concentrações. É de salientar que o método de hidrólise usado foi diferente, assim como as condições de crescimento e a estirpe usada, o que pode influenciar a composição das células.

A celobiose é um produto da hidrólise ácida incompleta da celulose das microalgas. Este polissacarídeo e o amido vão dar lugar aos carboidratos acima detetados.

Como a hidrólise ácida é um processo que submete as amostras a condições relativamente severas, o aparecimento de ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e do furfural foi observado, ainda que em concentrações negligenciáveis. Estas duas últimas moléculas são o resultado da degradação de monossacarídeos causados pelo calor e pH.

As proteínas são muito sensíveis à ação de temperaturas e pressões elevadas, podendo perder a sua conformação nativa. De facto, a concentração de ácido utilizada nos nossos ensaios de hidrólise foi inferior à usada nos ensaios de Miranda et al. (2012) e Ho et al. (2013), que foi de 6 M, reduzindo assim o risco de perda de atividade por parte de moléculas mais frágeis a condições extremas. O método de Lowry, no entanto, permite a quantificação de proteínas solúveis de amostras biológicas, podendo estas estar ou não na sua conformação nativa. A tabela 8 compila a informação relativa aos açúcares, proteínas e produtos de degradação dos açúcares.

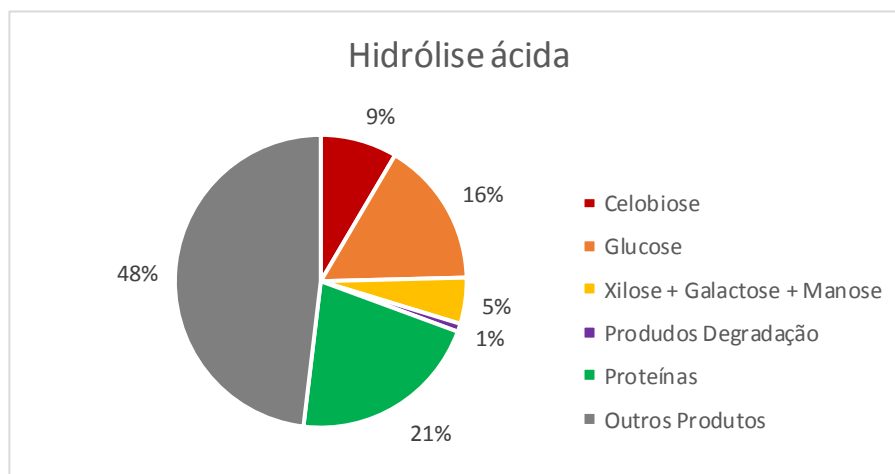
**Tabela 8** - Composição da biomassa húmida aquando dos diferentes métodos de lise celular (mg.mg<sup>-1</sup>).

<i>Composição</i>	<i>Hidrólise ácida</i>	<i>Moagem + Hidrólise ácida</i>	<i>Ultrassons + Hidrólise ácida</i>
<i>Açúcares</i>	0,297 ± 0,021	0,141 ± 0,036	0,178 ± 0,027
<i>Produtos Degradação</i>	0,009 ± 0,004	0,006 ± 0,002	0,007 ± 0,000
<i>Proteínas</i>	0,213 ± 0,006	0,185 ± 0,008	0,224 ± 0,006
<i>Total Produtos</i>	0,519 ± 0,031	0,332 ± 0,046	0,409 ± 0,032

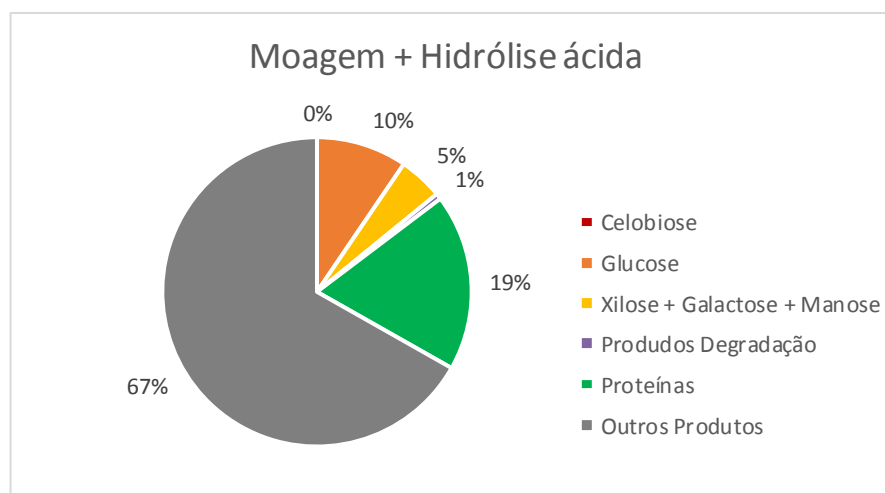
Como é possível observar pelos resultados apresentados na tabela 8, o método de hidrólise ácida individual foi o que obteve o melhor teor de extração tanto em açúcares, como em produtos de degradação e proteínas, mostrando também maior repetibilidade. Estes resultados demonstraram que a combinação de diferentes métodos mecânicos e não mecânicos, em nada contribuíram para o processo de hidrólise ácida acabando por ter um efeito negativo em vez promover efeitos sinérgico. Não é possível descartar completamente a hipótese de ter havido alguma perda de biomassa aquando da moagem manual e da aplicação de ultrassons à suspensão de células. No entanto, tudo indica que a haver ganhos, esses são muito limitados.

A microalga *C. vulgaris* tem na sua constituição 42-58% de proteínas, das quais 89% são insolúveis. De salientar que o nosso método analítico só permite a quantificação de proteínas solúveis, daí a necessidade do método de hidrólise ácida, para assegurar a sua libertação. No presente estudo recuperou-se como proteína 21,3% da biomassa algal. Este valor é inferior aos 37,38-51,62% presentes nesta espécie [10]. O resultado pode ser explicado por possíveis perdas deste produto ou por insuficiência do método de disrupção na sua recuperação.

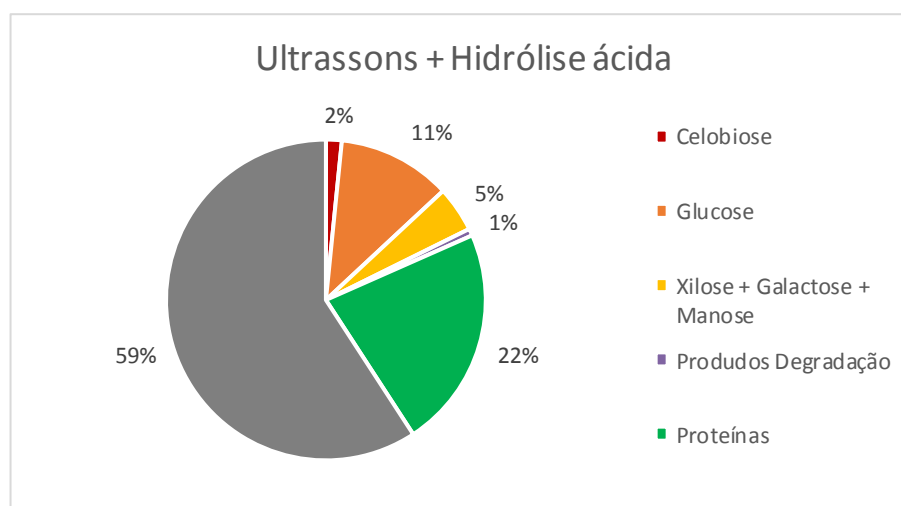
Nesta fase do processo de desconstrução da biomassa não se recuperou os lípidos já que o método selecionado para os lípidos é gravimétrico e com a massa de amostra utilizada nesta fase do trabalho o método não seria fiável. No entanto, deve referir-se que até ao momento apenas se recuperou de 52% da massa da biomassa processada.



**Figura 16** - Composição da biomassa húmida após hidrólise ácida.



**Figura 17** - Composição da biomassa húmida após moagem mais hidrólise ácida.



**Figura 18** - Composição da biomassa húmida após ultrassons mais hidrólise ácida.

As figuras 16, 17 e 18 ilustram a composição percentual dos produtos extraídos das microalgas, bem como a percentagem que representa o material não recuperado, quando aplicados diferentes métodos de ruptura celular, a hidrólise ácida, a moagem mais a hidrólise ácida e os ultrassons mais a hidrólise ácida, respetivamente. É possível verificar nas figuras 16 e 18 a presença de celobiose na amostra, o que indicia alguma incapacidade destes métodos para hidrolisar completamente a amostra.

#### 4.3.2 Influência da humidade na rutura celular

A existência de humidade nas amostras é um fator importante quando se aplica um método de lise celular. A organização supramolecular dos componentes da parede celular das células é fortemente afetada pelo teor de humidade.

Uma vez que aquando da lise celular em biomassa húmida o método da hidrólise ácida proporcionou o maior teor de produtos extraídos, foi também este o método escolhido para testar a influência da humidade.

**Tabela 9** - Açúcares presentes nas amostras de biomassa húmida e seca (mg.mg<sup>-1</sup>). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente.

<b>Açúcares</b>	<b>Biomassa Húmida</b>	<b>Biomassa Seca</b>
<b>Celobiose</b>	0,085 ± 0,004	0,104 ± 0,016
<b>Glucose</b>	0,161 ± 0,013	0,152 ± 0,001
<b>X.M.G.</b>	0,051 ± 0,004	0,046 ± 0,000
<b>Total</b>	0,296 ± 0,021	0,302 ± 0,017

Como é possível verificar na tabela 9, não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos com biomassa húmida e seca. Segundo a literatura, a microalga *C. vulgaris* tem na sua parede celular um carotenoide polimerizado, a esporepolenina, que lhe confere uma enorme resistência a tratamentos físicos, químicos e biológicos [10,90]. A temperatura pode provocar alterações na estrutura do polímero [92]. No entanto, face aos resultados obtidos, não há qualquer justificação para secar a biomassa antes de a submeter à hidrólise ácida. Fica no entanto em aberto estudar o efeito da moagem após secagem sobre a extração dos componentes da biomassa.

**Tabela 10** - Composição da biomassa húmida e da biomassa seca (mg.mg<sup>-1</sup>).

<b>Composição</b>	<b>Biomassa Húmida</b>	<b>Biomassa Seca</b>
<b>Açúcares</b>	0,296 ± 0,021	0,302 ± 0,017
<b>Produtos Degradação</b>	0,009 ± 0,004	0,022 ± 0,021
<b>Proteínas</b>	0,213 ± 0,006	0,209 ± 0,002
<b>Total Produtos</b>	0,518 ± 0,031	0,533 ± 0,040

A tabela 10 resume os resultados obtidos para os açúcares, produtos de degradação dos açúcares e proteínas. Apesar de uma ligeira vantagem do processo envolvendo a secagem prévia da amostra de biomassa, os resultados não permitem retirar a conclusão de que a

secagem tenha um efeito estatisticamente significativo. Face aos custos envolvidos nos processos de secagem, o ganho observado não justifica a inclusão desta operação unitária adicional.

#### 4.3.3 Influência das condições de crescimento na composição da biomassa

Como referido anteriormente, os nutrientes presentes no meio de crescimento celular vão influenciar não só a produção de biomassa mas também a sua composição. Neste contexto, decidiu-se avaliar o impacto do aumento da concentração de azoto e fósforo, em relação ao meio de referência, sobre a composição da biomassa.

**Tabela 11** - Açúcares presentes nas amostras das diferentes condições de crescimento ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). X.M.G. representa os açúcares xilose, manose e galactose respetivamente.

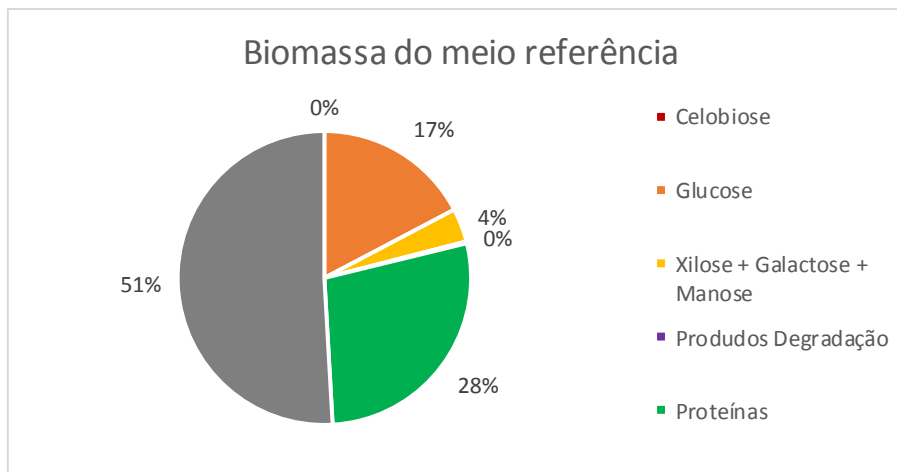
<i>Açúcares</i>	<i>Meio referência</i>	<i>Meio 5N1P</i>	<i>Meio 5N3P</i>
<i>Celobiose</i>	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
<i>Glucose</i>	$0,173 \pm 0,014$	$0,072 \pm 0,016$	$0,038 \pm 0,003$
<i>X.M.G.</i>	$0,037 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,006$	$0,083 \pm 0,008$
<i>Total</i>	$0,210 \pm 0,016$	$0,107 \pm 0,022$	$0,121 \pm 0,011$

Como se pode observar na tabela 11, os teores de açúcares recuperados das biomassas produzidas nos diferentes meios são bastante diferentes. Os valores obtidos para os açúcares totais foram 21,0%, 10,7% e 12,1%, respetivamente para o meio de referência, meio 5N1P e 5N3P, indicando claramente que o reforço das concentrações de azoto e fósforo nos meios de cultura conduziu a menor recuperação de açúcares. Esta menor recuperação pode ser devida a uma maior resistência à desconstrução celular ou a um menor teor efetivo de açúcares nesta biomassa ou a ambos os mecanismos.

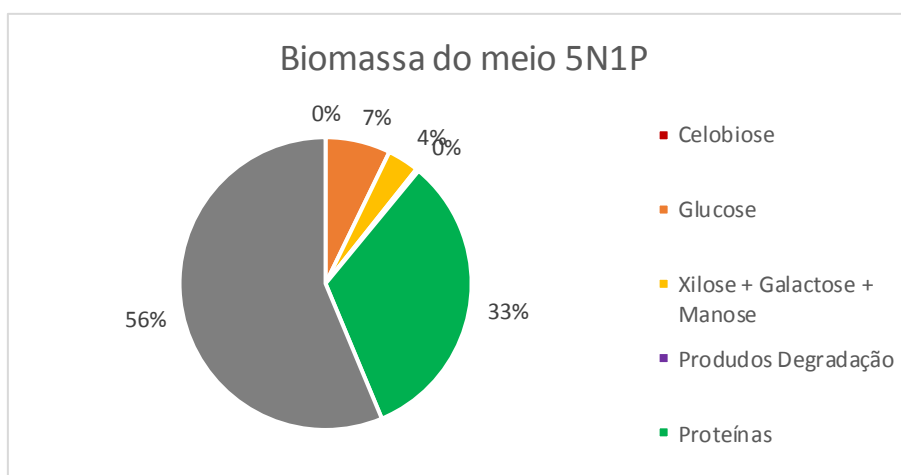
**Tabela 12** - Composição da biomassa nas amostras das diferentes condições de crescimento ( $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

<i>Composição</i>	<i>Meio referência</i>	<i>Meio 5N1P</i>	<i>Meio 5N3P</i>
<i>Açúcares</i>	$0,210 \pm 0,016$	$0,107 \pm 0,022$	$0,121 \pm 0,011$
<i>Produtos Degradação</i>	$0,002 \pm 0,000$	$0,003 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$
<i>Proteínas</i>	$0,279 \pm 0,001$	$0,327 \pm 0,036$	$0,383 \pm 0,004$
<i>Total Produtos</i>	$0,491 \pm 0,017$	$0,437 \pm 0,059$	$0,506 \pm 0,016$

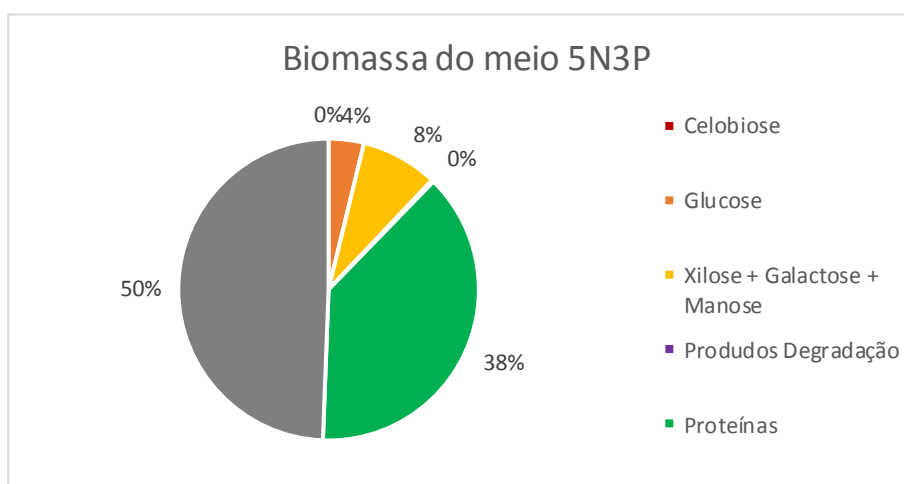
A tabela 12 integra a informação relativa às proteínas, para além dos açúcares e produtos de degradação. Os resultados obtidos parecem demonstrar claramente que o teor de proteínas nas amostras de biomassa 5N1P e 5N3P é significativamente superior ao da amostra de biomassa produzida com o meio de referência (i.e. com menos azoto e fósforo). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura (Fernandes et al. (2013)) e indicam que as microalgas direcionam o seu metabolismo em função da composição do meio; neste caso aumentando o mecanismo de síntese de proteínas e reduzindo o de produção de carboidratos.



**Figura 19** - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações referência.



**Figura 20** - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações 5N1P.



**Figura 21** - Composição da biomassa produzida em meio com concentrações 5N3P.

As figuras 19, 20 e 21 ilustram a distribuição dos componentes, mas realçam, sobretudo, a existência de cerca de 50% de material não identificado. Uma parte será lípidos, que serão objeto de análise na seção seguinte.

#### 4.3.4 Avaliação do teor em lípidos nas células

Como explicado anteriormente, devido à elevada concentração de biomassa (10 g/L) requerida para realizar o ensaio da determinação do teor em lípidos, este não pôde ser realizado em conjunto com o da determinação das proteínas e dos açúcares. Em condições favoráveis, as microalgas podem produzir até 60% de lípidos (m/m), através do direcionamento da via de síntese de lípidos para a produção de lípidos polares à base de glicerol enquanto em condições desfavoráveis vão produzir lípidos neutros, os triacilgliceróis.

**Tabela 13** - Lípidos e resíduos presentes na biomassa húmida após hidrólise ácida ( $\text{mg.mg}^{-1}$ ).

<i>Composição</i>	<i>Massa</i>
<i>Lípidos</i>	$0,215 \pm 0,014$
<i>Resíduo sólido</i>	$0,200 \pm 0,049$

A tabela 13 indica-nos que a percentagem de lípidos presentes na amostra foi de 21,5%, um valor inferior ao máximo acima referido, o que pode indicar que as condições de crescimento não eram as mais favoráveis para a produção de lípidos. No entanto, o valor encontra-se no centro do intervalo de 5 e 40% de lípidos recuperados a partir de *C. vulgaris* [10]. Por outro lado, foi possível identificar visualmente um resíduo sólido mesmo após a extração dos lípidos (fig. 22), o que não era visível nos ensaios com muito menos biomassa.



**Figura 22** - Separação de 3 fases pelo método de quantificação de lípidos Bligh and Dyer.

Os resíduos sólidos não hidrolisados representam uma percentagem de 20% face ao valor total de biomassa que foi usada. Conjugando os diferentes componentes recuperados e identificados com este teor de resíduo sólido não identificado o balanço de massa fica praticamente fechado; recuperou-se  $93,3 \pm 9,5\%$  de produtos, dos quais 73,3% estão identificados como açúcares, proteínas e lípidos, como é possível visualizar na figura 23.

Os 7% perdidos podem ser proteínas, lípidos ou açúcares das microalgas cuja recuperação não foi possível por perdas durante a realização do método. Também é necessário ter em conta que a espécie *C. vulgaris* tem uma percentagem de pigmentos de 1 a 2% do seu peso seco [10], cuja quantificação não necessita de um método de disrupção e como tal, não foi testado.

Os 20% de resíduos sólidos recuperados após extração de lípidos e açúcares são biomassa que o método de hidrólise aplicado não hidrolisa e que necessita possivelmente de um posterior tratamento de disrupção. Este material pode ser constituído por polímeros da parede celular resistentes às condições de hidrólise aplicadas. O *algaenan* e a esporepolenina podem ser esses polímeros. O resíduo sólido obtido foi sujeito a uma segunda hidrólise ácida (pH 1, 121°C, 1h) e o hidrolisado obtido sujeito a análise por HPLC com vista a identificar eventuais compostos. Os resultados do HPLC não permitiram identificar qualquer composto, pelo que o processo de hidrólise pode não ter sido suficientemente drástico para degradar o resíduo sólido que restou no fim do processo de extração dos lípidos.

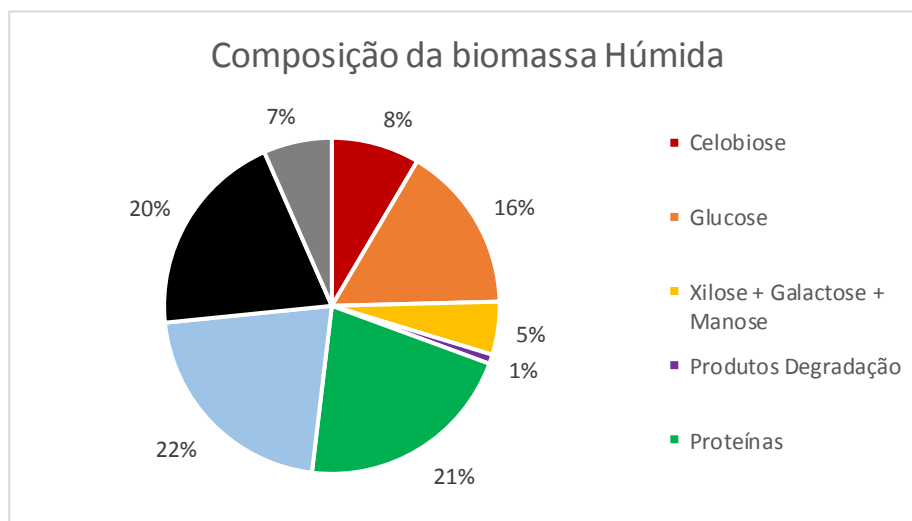


Figura 23 - Composição da biomassa no método da hidrólise ácida.







# Capítulo 5

## Conclusões

A biomassa algal tem o potencial de num futuro próximo vir a ser uma alternativa para a obtenção de produtos de valor acrescentado e ao mesmo tempo mitigar as emissões de gases de efeito estufa, tais como o CO<sub>2</sub>. No entanto, existe ainda trabalho a ser realizado nas várias áreas ligadas à produção e disrupção deste microrganismo até que a sua utilização plena à escala industrial seja uma realidade.

Utilizando meios de cultura com diferentes concentrações de N e P, foi possível concluir que o meio de cultura de referência, cujas concentrações de nutrientes foram inferiores aos restantes (5N3P e 5N1P), produz uma maior concentração de biomassa; 0,7 g/L ao cabo de 23 dias. Por outro lado, o aumento do caudal de ar de 1,5 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para 3 L.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> diminuiu muito significativamente a produção de biomassa, ao contrário do esperado. Este resultado pode ter ficado a dever-se ao menor tamanho das bolhas para a situação de maior caudal, ao stress mecânico ou à conjugação dos dois.

Quanto à disrupção celular, o método que evidenciou melhores resultados foi a hidrólise ácida quando comparada com a combinação dos outros três métodos testados, a moagem mais a hidrólise ácida, os ultrassons mais a hidrólise ácida e uma hidrólise ácida dupla. Para as condições de hidrólise ácida (pH: 1, temperatura: 121°C, tempo: 1h), obteve-se uma recuperação total de 93,3% ± 9,5 de produtos, dos quais 29% são açúcares, 21% são proteínas solúveis, 22% são lípidos e 20% são resíduos sólidos. Também foi possível concluir que para a espécie utilizada neste trabalho, a secagem da biomassa não compensa o gasto energético e de recursos em relação à utilização de biomassa húmida aquando da sua desconstrução.

Foi ainda possível concluir que o meio de cultura influencia muito significativamente a composição da biomassa algal. Verificou-se que o teor de açúcares diminui e o de proteínas aumenta quando se aumenta a concentração dos nutrientes azoto e fósforo no meio de crescimento.



# Capítulo 6

## Perspetivas de trabalho futuras

Para trabalho a desenvolver posteriormente seria interessante testar o comportamento e composição das microalgas quando aplicadas ao tratamento de efluentes líquidos industriais, prejudiciais ao ambiente, se possível, em combinação com gases de combustão. Testar a combinação das microalgas com outros sistemas biológicos de tratamento de efluentes que possam ter uma ação de *allelopathy* com estas, proporcionando uma relação sinérgica na remoção de compostos poluentes no meio ambiente. Testar a operação a maiores concentrações de biomassa, reduzindo assim o custo e energia necessários para a sua recuperação e no método de disrupção celular.

Estudar a área interfacial específica ( $\text{m}^2/\text{m}^3$  de meio) para a transferência de massa com diferentes caudais de ar comprimido e diferentes difusores. Era ainda interessante a identificação dos constituintes presentes no resíduo não hidrolisado e determinar a resistência destes a várias condições de T e pressão adversas.



# Capítulo 7

## Referências

- [1] <https://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=5&pid=5&aid=2&cid=ww,&syid=2010&eyid=2014&unit=TBDP> acessado no dia 11.04.2016, às 11 horas
- [2] Henrich, E., Dahmen, N. & Dinjus, E. "The Role of Biomass in a Future World without Fossil Fuels.," *Chem. Ing. Tech.*, vol. 87, no. 12, pp. 1667-1685 (2015).
- [3] Alam, F., Date, A., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H. & Baqui, A. "Biofuel from Algae - Is It a Viable Alternative?," *Procedia Eng.*, vol. 49, pp. 221-227 (2012).
- [4] Brennan, L. & Owende, P. "Biofuels from microalgae -A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.," *Renew. Sustain. Energy Ver.*, vol. 14, pp. 557-577 (2010).
- [5] Show, K.-Y., Lee, D.-J. & Mujumdar, A. S. "Advances and Challenges on Algae Harvesting and Drying.," *Dry. Technol.*, vol. 33, pp. 386-394 (2015).
- [6] Gendy, T. S. & El-temtamy, S. A. "Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production : An overview.," *Egypt. J. Pet*, vol. 22, pp. 43-51 (2013).
- [7] Gualtieri, P. "Morphology of photoreceptor systems in microalgae.," *Micron.*, vol. 32, pp. 411-4826 (2001).
- [8] Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, pp. 217-232 (2010).
- [9] Hossain, A.B.M., Aishah, S., Boyce, A. N., Chowdhury, P. & Naqiuddin, M., "Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy.," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 4, no. 3, pp. 250-254 (2008).
- [10] Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y. & Vaca-Garcia, C. "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review.," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 35, pp. 265-278 (2014).

- [11] Pires, J. C. M., Gonçalves, A. L., Martins, F. G., Alvim-Ferraz, M. C. M. & Simões, M. "Effect of light supply on CO<sub>2</sub> capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*," *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.*, vol. 19, pp. 1109-1117 (2014).
- [12] Markou, G., Vandamme, D. & Muylaert, K. "Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients.," *Water Res.*, vol. 65, pp. 186-202 (2014).
- [13] Elser, J. J., Fagan, W. F., Denno, R. F., Dobberfuhl, D. R., Folarin, A., Huberty, A., Interlandi, S., Kilham, S. S., McCauley, E., Schulz, K. L., Siemann, E. H. & Sterner, R. W., "Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs.," *Nature*, vol. 408, pp. 578-580 (2000).
- [14] Xu, X., Shen, Y. & Chen, J. "Electronic Journal of Biotechnology Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production.," *EJBT*, vol. 18, pp. 46-50 (2015).
- [15] Van Wageningen, J., De Francisci, D. & Angelidaki, I. "Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*," *J. Appl. Phycol.*, vol. 27, pp. 1775-1782 (2014).
- [16] Roberts, K., Granum, E., Leegood, R. C. & Raven, J. A. "C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control.," *Plant Physiol.*, vol. 145, pp. 230-235 (2007).
- [17] Xu, J. F., Zhang, X., Ye, N., Zheng, Z., Mou, S., Dong, M., Xu, D. & Miao, J., "Activities of principal photosynthetic enzymes in green macroalga *Ulva linza*: Functional implication of C<sub>4</sub> pathway in CO<sub>2</sub> assimilation.," *Sci. China Life Sci.*, vol. 56, pp. 571-580 (2013).
- [18] Gonçalves, A. L., Simões, M. & Pires, J. C. M. "The effect of light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater.," *Energy Convers. Manag.*, vol. 85, pp. 530-536 (2014).
- [19] Clément-Larosière, B., Lopes, F., Gonçalves, A., Taidi, B., Benedetti, M., Minier, M. & Pareau, D., "Carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities.," *Eng. Life Sci.*, vol. 14, pp. 509-519 (2014).



- [20] Ryu, H. J., Oh, K. K. & Kim, Y. S. "Optimization of the influential factors for the improvement of CO<sub>2</sub> utilization efficiency and CO<sub>2</sub> mass transfer rate.," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 15, pp. 471-475 (2009).
- [21] Swarnalatha, G. V., Hegde, N. S., Chauhan, V. S. & Sarada, R. "The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae.," *Algal Res.*, vol. 9, pp. 151-159 (2015).
- [22] Lohman, E. J., Gardner, R. D., Pedersen, T., Peyton, B. M., Cooksey, K. E. & Gerlach, R., "Optimized inorganic carbon regime for enhanced growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, pp. 82-95 (2015).
- [23] Roberts, D. A. de Nys, R. & Paul, N. A. "The effect of CO<sub>2</sub> on algal growth in industrial waste water for bioenergy and bioremediation applications.," *PLoS One* 8, vol. 8, no. 11, e81631 (2013).
- [24] Van Den Hende, S., Vervaeren, H. & Boon, N. "Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, pp. 1405-1424 (2012).
- [25] Li, F.-F., Yang, Z.-H., Zheng, R., Yang, G., Chang, X., Yan, J.-B. & Hou, Y.-L., "Microalgae capture of CO<sub>2</sub> from actual flue gas discharged from a combustion chamber.," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, pp. 6496-6502 (2011).
- [26] Kao, C. Y., Chen, T.-Y., Chang, Y.-B., Chiu, T.-W., Lin, H.-Y., Chen, C.-D., Chang, J.-S. & Lin, C.-S., "Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 166, pp. 485-493 (2014).
- [27] Richmond, A. "Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology." *Blackwell Science*, pp. 102-105 (2004).
- [28] Geider, R. & La Roche, J. "Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis." *Eur. J. Phycol.*, vol. 37, pp. 1-17 (2002).
- [29] Jeanfils, J., Canisius, M. & Burlion, N. "Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells." *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, no. 3, pp. 369-374 (1993).

- [30] Mandalam, R. K. & Palsson, B. Ø. "Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures." *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 59, pp. 605-611 (1998).
- [31] Lodi, A., Binaghi, L., Solisio, C., Converti, A. & Del Borghi, M. "Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, pp. 656-660 (2003).
- [32] Silva, N. F. P., Gonçalves, A. L., Moreira, F. C., Silva, T. F. C. V., Martins, F. G., Alvim-Ferraz, M. C. M., Boaventura, R. A. R., Vilar, V. J. P. & Pires, J. C. M., "Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study." *Algal Res.*, vol. 11, pp. 350-358 (2015).
- [33] Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y. & Pratt, S. "Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics." *Water Res.*, vol. 43, pp. 4207-4213 (2009).
- [34] Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G. & Simões, M. "Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture." *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 20, pp. 5096-5105 (2013).
- [35] Zhu, L. D. & Hiltunen, E. "Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework." *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 54, pp. 1285-1290 (2016).
- [36] Jiménez-Pérez, M. V., Sánchez-Castillo, P., Romera, O., Fernández-Moreno, D. & Pérez-Martínez, C. "Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure." *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 34, pp. 392-398 (2004).
- [37] Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M. & Simões, M. "Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production." *Bioresour. Technol.*, vol. 200, pp. 279-286 (2016).
- [38] Oron, G., Shelef, G., Levi, A., Meydan, A. & Azov, Y. "Algae/Bacteria Ratio in High-Rate Ponds Used for Waste Treatment." *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 38, pp. 570-576 (1979).
- [39] Santos, C. A. & Reis, A. "Microalgal symbiosis in biotechnology." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, pp. 5839-5846 (2014).

- [40] Abinandan, S. & Shanthakumar, S. "Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review." *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 52, pp. 123-132 (2015).
- [41] J. Dora, M. A. Gostomczyk, M. Jakubiak, W. Kordylewski, W. Mista, M. T. "Parametric Studies of the effectiveness of oxidation of NO by ozone." *Chem. Process Eng.*, vol. 30, pp. 621-634 (2009).
- [42] Fritz, A. & Pitchon, V. "The current state of research on automotive lean NO<sub>x</sub> catalysis." *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 13, pp. 1-25 (1997).
- [43] Jin, H. F., Santiago, D. E. O., Park, J. & Lee, K. "Enhancement of nitric oxide solubility using Fe(II)EDTA and its removal by green algae *Scenedesmus* Sp." *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 13, pp. 48-52 (2008).
- [44] Giordano, M., Norici, A. & Hell, R. "Sulfur and phytoplankton: Acquisition, metabolism and impact on the environment." *New Phytol.*, vol. 166, pp. 371-382 (2005).
- [45] Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z. & Ouyang, F. "Effects of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii*." *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, pp. 46-50 (2004).
- [46] Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L. & Teixeira, J. A., "Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production." *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, pp. 817-830 (2010).
- [47] Matsumoto, M., Yokouchi, H., Suzuki, N., Ohata, H. & Matsunaga, T. "Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production." *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 105-108, pp. 247-254 (2003).
- [48] Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S. & Ogushi, Y. "CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation." *Energy*, vol. 22, no. 2/3, pp. 137-142 (1997).
- [49] Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A. & Teixeira, J. A. "Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae." *Appl. Energy*, vol. 88, pp. 3331-3335 (2011).

- [50] Zhu, S., Wang, Y., Xu, J., Shang, C., Wang, Z., Xu, J. & Yuan, Z., "Luxury uptake of phosphorus changes the accumulation of starch and lipid in *Chlorella* sp. under nitrogen depletion." *Bioresour. Technol.*, vol. 198, pp. 165-171 (2015).
- [51] Cheng, Y. S., Labavitch, J. & VanderGheynst, J. S. "Organic and Inorganic Nitrogen Impact *Chlorella variabilis* Productivity and Host Quality for Viral Production and Cell Lysis." *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 176, pp. 467-479 (2015).
- [52] Miranda, J. R., Passarinho, P. C. & Gouveia, L. "Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, pp. 555-564 (2012).
- [53] Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Přibyl, P., Zachleder, V. & Vítová, M., "Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*." *Bioresour. Technol.*, vol. 144, pp. 268-274 (2013).
- [54] Chisti, Y. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, pp. 294-306 (2007).
- [55] Cooney, M., Young, G. & Nagle, N. "Extraction of bio-oils from microalgae." *Sep. Purif. Rev.*, vol. 38, pp. 291-325 (2009).
- [56] Přibyl, P., Cepák, V. & Zachleder, V. "Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*." *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, pp. 545-553 (2013).
- [57] Hsieh, C. H. & Wu, W. T. "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation." *Bioresour. Technol.*, vol. 100, pp. 3921-3926 (2009).
- [58] Antolin, G., Tinaut, F. V., Briceño, Y., Castaño, V., Pérez, C. & Ramírez, A. I., "Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification." *Bioresour. Technol.*, vol. 83, pp. 111-114 (2002).
- [59] Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C. & Michaud, P. "Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 40, pp. 781-796 (2013).
- [60] Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Pontalier, P.-Y. & Vaca-Garcia, C. "Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*." *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, pp. 497-501 (2012).

- [61] Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A. & Gruppen, H. "Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp." *Bioresour. Technol.*, vol. 102, pp. 9121-9127 (2011).
- [62] Harun, R., Singh, M., Forde, G. M. & Danquah, M. K. "Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products." *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, pp. 1037-1047 (2010).
- [63] Varfolomeev, S. D. & Wasserman, L. A. "Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines." *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 47, pp. 789-807 (2011).
- [64] Alalayah, W. M., Alhamed, Y. A., Al-zahrani, A. & Edris, G. "Influence of Culture Parameters on Biological Hydrogen Production using Green Algae *Chlorella Vulgaris*." *Rev. Chim.*, vol. 66, pp. 788-791 (2015).
- [65] Fortman, J. L., Chhabra, W., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T. S., Steen, E. & Keasling, J. D., "Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well." *Trends Biotechnol.*, vol. 26, pp. 375-381 (2008).
- [66] Michalak, I. & Chojnacka, K. "Algae as production systems of bioactive compounds." *Eng. Life Sci.*, vol. 15, pp. 160-176 (2015).
- [67] Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A. & Vicente, A. A. "Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends." *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, pp. 1228-1245 (2015).
- [68] Bougaran, G., Déan, L. Le, Lukomska, E., Kaas, R. & Baron, R. "Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis Tahiti." *Aquat. Living Resour.*, vol. 16, pp. 389-394 (2003).
- [69] García-Cañedo, J. C., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortiz, C. M., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F. & Cañizares-Villanueva, R. O., "Batch and fed-batch culture of *Scenedesmus incrassatulus*: Effect over biomass, carotenoid profile and concentration, photosynthetic efficiency and non-photochemical quenching." *Algal Res.*, vol. 13, pp. 41-52 (2016).
- [70] Marchetti, J., Bougaran, G., Dean, L. L., Mégrier, C., Lukomska, L., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R. Robert, R. & Cadoret, J. P., "Optimizing conditions for the continuous culture of

Isochrysis affinis galbana relevant to commercial hatcheries.” *Aquaculture*, vol. 326-329, pp. 106-115 (2012).

[71] Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z. & Iluz, D. “Flashing light in microalgae biotechnology.” *Bioresour. Technol.*, vol. 203, pp. 357-363 (2016).

[72] Raven, J. A. “The cost of photoinhibition.” *Physiol. Plant.*, vol. 142, pp. 87-104 (2011).

[73] Nikolaou, A., Hartmann, P., Sciandra, A., Chachuat, B. & Bernard, O. “Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth.” *J. Theor. Biol.*, vol. 390, pp. 61-72 (2016).

[74] Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Bernard, O. & Steyer, J. P. “Mathematical modeling of unicellular microalgae and cyanobacteria metabolism for biofuel production.” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 33, pp. 198-205 (2015).

[75] Nauha, E. K. & Alopaeus, V. “Modeling outdoors algal cultivation with compartmental approach.” *Chem. Eng. J.*, vol. 259, pp. 945-960 (2015).

[76] Wang, B., Lan, C. Q. & Horsman, M. “Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses.” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, pp. 904-912 (2012).

[77] Pirouzi, A., Nosrati, M., Shojaosadati, S. A. & Shakhesi, S. “Improvement of mixing time, mass transfer, and power consumption in an external loop airlift photobioreactor for microalgae cultures.” *Biochem. Eng. J.*, vol. 87, pp. 25-32 (2014).

[78] Suh, I. S. & Lee, C.-G. “Photobioreactor Engineering Design and Performance.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 8, pp. 313-321 (2003).

[79] Tredici, M. R. & Materassi, R. “From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms.” *J. Appl. Phycol.*, vol. 4, pp. 221-231 (1992).

[80] Murphy, T. E., Kapili, B. J., Detweiler, A. M., Bebout, B. M. & Prufert-Bebout, L. E. “Vertical distribution of algal productivity in open pond raceways.” *Algal Res.*, vol. 11, pp. 334-342 (2015).

- [81] Mooij, P. R., Stouten, G. R., van Loosdrecht, M. C. M. & Kleerebezem, R. "Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation." *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 33, pp. 46-51 (2015).
- [82] Apel, A. C. & Weuster-Botz, D. "Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments." *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, pp. 995-1008 (2015).
- [83] Gupta, P. L., Lee, S.-M. & Choi, H.-J. "A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation." *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, pp. 1409-1417 (2015).
- [84] Richmond, A. & Cheng-wu, Z. "Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors." *J. Biotechnol.*, vol. 85, pp. 259-269 (2001).
- [85] Zhang, Q. H., Wu, C., Xue, S. Z., Wang, Z. H., Yan, C. H. & Cong, W., "Hydrodynamic characteristics and microalgae cultivation in a novel flat-plate photobioreactor." *Biotechnol. Prog.*, vol. 29, pp. 127-134 (2013).
- [86] Acien Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M. & Molina Grima, E. "Photobioreactors for the production of microalgae." *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 12, pp. 131-151 (2013).
- [87] Yadala, S. & Cremaschi, S. "Design and optimization of artificial cultivation units for algae production." *Energy*, vol. 78, pp. 23-39 (2014).
- [88] Ojo, E. O., Auta, H., Baganz, F. & Lye, G. J. "Engineering characterisation of a shaken, single-use photobioreactor for early stage microalgae cultivation using *Chlorella sorokiniana*." *Bioresour. Technol.*, vol. 173, pp. 367-375 (2014).
- [89] Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C. & Ballesteros, M. "Enzymatic Cell Disruption of Microalgae Biomass in Biorefinery Processes." *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, pp. 1955-1966 (2015).
- [90] Meuter-gerhards, A., Riegert, S. & Wiermann, R., "Studies on Sporopollenin Biosynthesis in *Cucurbita maxima* (OUCH.) - II. The Involvement of Aliphatic Metabolism." *J. Plant Physiol.*, vol. 154, pp. 431-436 (1999).
- [91] Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K. & Wijffels, R. H., "Cell disruption for microalgae biorefineries." *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, pp. 243-260 (2015).

- [92] Miranda, J. R., Passarinho, P. C. & Gouveia, L. "Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production." *Bioresour. Technol.*, vol. 104, pp. 342-348 (2012).
- [93] Cheng, J., Sun, J., Huang, Y., Feng, J., Zhou, J. & Cen, K., "Dynamic microstructures and fractal characterization of cell wall disruption for microwave irradiation-assisted lipid extraction from wet microalgae." *Bioresour. Technol.*, vol. 150, pp. 67-72 (2013).
- [94] Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A. & Chang, J.-S., "Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E." *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 157-165 (2013).
- [95] Tan, I. S. & Lee, K. T. "Comparison of different process strategies for bioethanol production from *Eucheuma cottonii*: An economic study." *Bioresour. Technol.*, vol. 199, pp. 336-46 (2016).
- [96] Demuez, M., González-fernández, C. & Ballesteros, M. "Algicidal microorganisms and secreted algicides : New tools to induce microalgal cell disruption." *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, pp. 1615-1625 (2015).







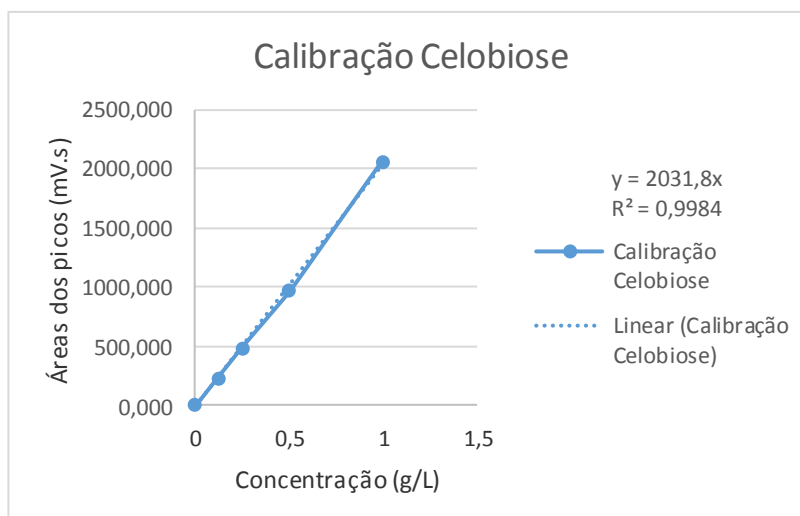
# Capítulo 8

## Apêndices

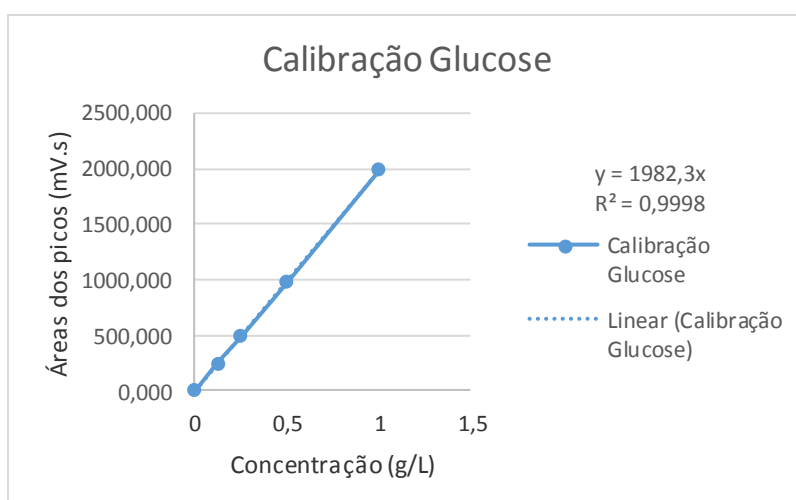
Apêndice I - Lista de todos os reagentes utilizados durante a dissertação.

Reagentes	Fórmula	PM (g/mol)	Pureza	Marca
Hidrogenofosfato dipotássio	$\text{HK}_2\text{PO}_4$	174,18	98%	Sigma
Ácido etilenodiaminotetracético	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	292,24	$\geq 99\%$	Sigma
L-arabinose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150,13	98%	Sigma
D-glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	99%	Sigma
L-ramnose monohidratada	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	182,17	99%	Sigma
D-manose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180,16	99%	Sigma
D-xilose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150,13	$\geq 99\%$	Sigma
Hidrogenotartarato de Potássio	$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_6\text{K}$	188,177	-	Sigma
Reagente Folin	$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{NaO}_5\text{S}$	260,192	-	Sigma
Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,01	99,5%	Merck
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	-	Merck
Cloreto de sódio	$\text{NaCl}$	58,44	99,5%	Merck
Molibdato de sódio dihidratado	$\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,95	99,5%	Merck
Sulfato de cobalto heptahidratado	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	281,10	99%	Merck
Sulfato de ferro heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,02	99,5%	Merck
Óxido de alumínio	$\text{Al}_2\text{O}_3$	101,96	-	Merck
Carbonato de sódio	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	105,99	99,5%	Merck
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3$	84,995	99,5%	Pronalab
Metanol	$\text{CH}_4\text{O}$	32,04	-	Pronalab
Hidróxido de sódio	$\text{NaOH}$	39,997	-	Pronalab
Clorofórmio	$\text{CHCl}_3$	119,38	-	Pronalab
Albumina Soro Bovino	-	-	99,4%	Fluka
D-celobiose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342,30	$\geq 99\%$	Fluka
Dihidrogenofosfato de potássio	$\text{H}_2\text{KPO}_4$	136,08	99%	Panreac
Ácido sulfúrico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	98,079	96%	Panreac
Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	161,454	99,5%	Riedel
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,69	99%	Riedel
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,83	99,8%	Montedison
Cloreto de manganês tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,90	95%	BDH

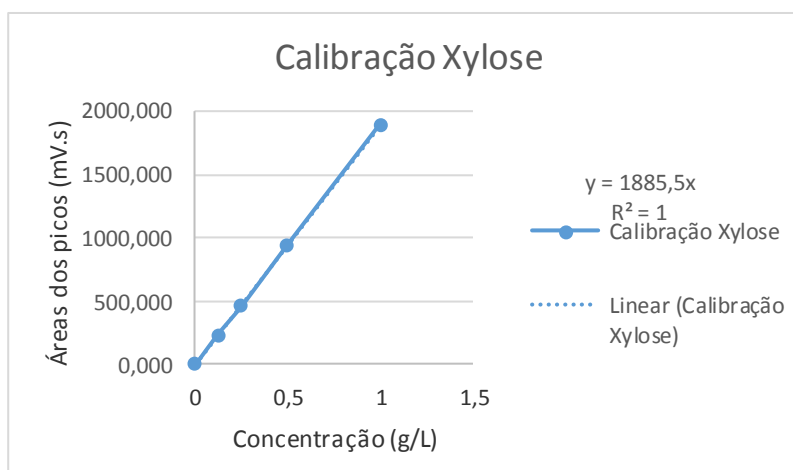
Apêndice II.a - Gráfico da calibração da celobiose para HPLC.



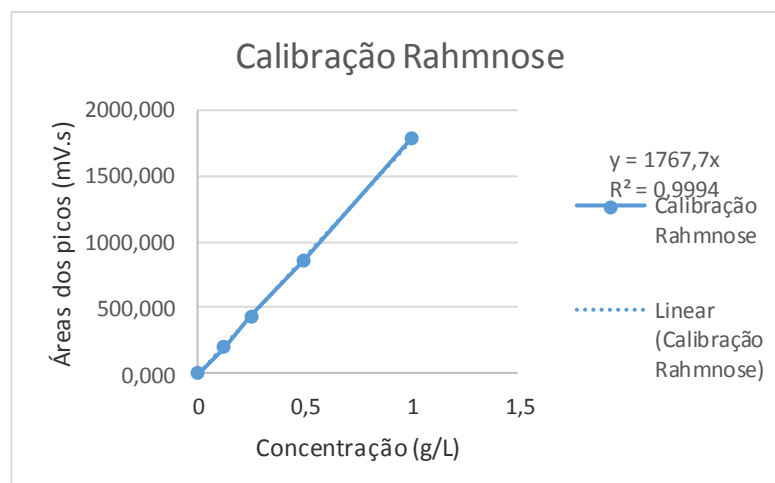
Apêndice II.b - Gráfico da calibração da glucose para HPLC.



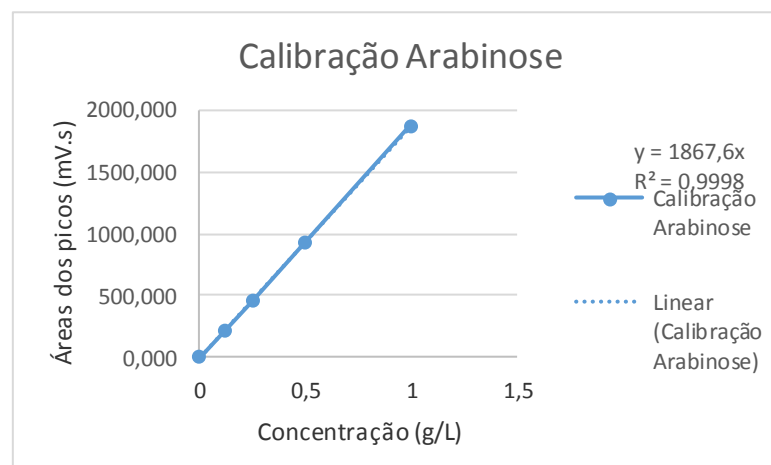
Apêndice II.c - Gráfico da calibração da Xilose para HPLC.



**Apêndice II.d - Gráfico da calibração da ramnose para HPLC.**



**Apêndice II.e - Gráfico da calibração da arabinose para HPLC.**



**Apêndice III - Gráfico da calibração do método de Lowry.**

