



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeito das condições de cultura da microalga *Chlorella vulgaris* sobre a produtividade e produção de carotenoides

João Miguel Nunes Parente

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

Orientador: Prof. Doutor Rogério Simões
Coorientador: Prof^a. Doutora Paula Coutinho

Covilhã, outubro de 2018

Agradecimentos

A realização deste trabalho envolveu direta ou indiretamente várias pessoas às quais não posso deixar de expressar os meus profundos agradecimentos:

Ao prof. Doutor Rogério Simões pela ajuda que providenciou e por tudo o que me ensinou ao longo deste ano.

À Prof^a. Doutora Paula Coutinho e ao pessoal do IPG pela ajuda que providenciaram.

Ao pessoal do departamento de papel pela ajuda e pelo ambiente positivo que proporcionaram nos laboratórios.

Aos colegas de laboratório Vasco Lopes, Henrique Guilherme, Diogo Santos pela ajuda e companheirismo durante estes últimos anos.

Aos meus pais, avós e irmã, por me terem sempre incentivado, por todo o apoio que me deram ao longo de toda a minha vida. Obrigado por estarem aí, para tudo o que fosse necessário.

Resumo

O aumento da população mundial tem levado ao aumento do consumo de recursos, incluindo os energéticos e alimentares. Esta pressão torna urgente explorar e implementar alternativas assentes numa economia de base biológica, mais amiga do ambiente e sustentáveis. As microalgas, que podem ser usadas para alimentação humana e animal e ainda como fontes de biocombustíveis, constituem uma matéria-prima alternativa para as economias de base biológica. Apesar destes microrganismos apresentarem muitas vantagens como “fábrica biológica”, persiste a necessidade de melhorar e otimizar os processos de produção de biomassa, recolha de biomassa e extração de componentes de elevado valor acrescentado.

Nesta dissertação, foram realizados estudos nestas diferentes vertentes. Em relação à produção da biomassa (*Chlorella vulgaris*), utilizaram-se reatores air-lift cilíndricos, flat-plate em modo descontínuo e em modo contínuo, sob diferentes condições de operação, concluindo-se que os reatores em modo contínuo obtiveram um melhor crescimento específico da biomassa ($0,2 \text{ dia}^{-1}$), quando comparados com os reatores em descontínuo ($0,084 \text{ dia}^{-1}$).

No que respeita à recolha da biomassa produzida, explorou-se o potencial do amido catiónico, tendo-se comparado o seu desempenho com um floculante sintético, o polyDADMAC. Os ensaios mostraram que o amido catiónico pode ser uma boa alternativa ao uso de floculantes sintéticos. Na extração dos pigmentos foi usado um método referido na literatura, e fez-se a respetiva quantificação e caracterização com recurso à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). Os melhores resultados foram obtidos a partir do reator Flat-plate em modo de operação contínuo, tendo-se obtido 3,8 e 1,57 mg carotenoides/g (matéria seca) de luteína e β -caroteno, respetivamente.

Os resultados desta dissertação representam uma contribuição para a otimização da produção de microalgas e extração de produtos de valor acrescentado, reduzindo os custos de operação no futuro.

Palavras-chave

Chlorella vulgaris; fotobiorreatores air-lift; fotobiorreatores flat-plate; amido catiónico; luteína; β -caroteno.

Abstract

The increase in world population has led to increased consumption of resources, including energy and food. This pressure makes it imperative to explore and implement alternatives based on a bio-based, environmentally friendly and sustainable economy. Microalgae, which can be used for food and feed as well as biofuel sources, are an alternative raw material for bio-based economies. Although these microorganisms have many advantages as a "biological factory", there is still a need to improve and optimize biomass production processes, biomass collection and extraction of components with high added value.

In this dissertation, studies were carried out in these different aspects. Regarding to biomass production (*Chlorella vulgaris*), cylindrical air-lift reactors in discontinuous-mode and flat-plate reactors in both continuous and discontinuous mode were used under different operation conditions, and it was concluded that continuous-mode reactors obtained a better specific growth of biomass (0.2 day^{-1}) when compared to discontinuous-mode reactors (0.084 day^{-1}). With regard to the recovery of the produced biomass, the potential of the cationic starch was explored, comparing its performance with a synthetic flocculant, polyDADMAC. The tests showed that cationic starch might be a good alternative to the use of synthetic flocculants.

In the extraction of the pigments, a method referred to in the literature was used, and the respective quantification and characterization was done using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). The best results were obtained with the Flat-plate reactor in continuous-mode of operation, obtaining 3.8 and 1.57 mg carotenoids / g (dry matter) of lutein and β -carotene, respectively. The results of this dissertation represent a contribution to optimize the production of microalgae and extraction of value-added products, reducing the operating costs in the future.

Keywords

Chlorella vulgaris; air-lift photobioreactors; flat-plate photobioreactors; cationic starch; lutein; β -carotene.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Lista de acrónimos	xv
Capítulo 1- Introdução	1
1.1 Enquadramento do trabalho	1
1.2 Objetivo do trabalho	2
1.3 Estrutura do trabalho.....	3
Capítulo 2- Revisão bibliográfica	4
2.1 Microalgas	4
2.2 Produtos de elevado valor comercial.....	6
2.2.1 Carotenoides	6
2.2.2 Lípidos para Biocombustíveis	9
2.2.2 Outros produtos	10
2.3 Fotobiorreatores	11
2.3.1 Requisitos a satisfazer	11
2.3.2 Tipos de fotobiorreatores	13
2.3.3 Modos de operação	15
2.4 Extração de produtos.....	16
2.4.1 Recuperação da biomassa	16
2.4.2 Disrupção celular	19
2.4.3 Extração de compostos	20
Capítulo 3- Materiais e métodos	22
3.1 Materiais	22
3.1.1 Reagentes	22
3.1.2 Microalgas	22
3.1.3 Instalação	23
3.2 Métodos	23
3.2.1 Produção de biomassa algal	23
3.2.1.1 Produção de biomassa algal em reator cilíndrico air lift de 1L	24
3.2.1.2 Produção de biomassa algal em reator cilíndrico air lift de 5L	24
3.2.1.3 Produção de biomassa algal em reator de placas (“flat-plate”) descontínuo	25

3.2.1.4 Produção de biomassa algal em reator de placas (“flat plate”) contínuo	26
3.2.2 Controlo do processo	26
3.2.3 Calibração entre a densidade ótica e a concentração mássica	27
3.2.4 Consumo de azoto e fosforo	27
3.2.5 Recuperação da biomassa algal com recurso a amido catiónico.....	28
3.2.5.1 Preparação de amido catiónico	28
3.2.5.2 Comparação de diferentes tipos de amido catiónico	28
3.2.5.3 Comparação de diferentes idades de microalgas.....	29
3.2.5.4 Comparação entre amido catiónico e polyDADMAC	29
3.2.5.5 Cinética de sedimentação	29
3.2.6 Extração dos componentes da biomassa.	30
3.2.6.1 Extração de compostos.....	30
3.2.6.2 Identificação e quantificação de compostos	31
Capítulo 4- Resultados e discussão	35
4.1 Produção de biomassa algal	35
4.1.1 Produção de massa algal em fotobiorreatores air-lift.	35
4.1.2 Comparação do crescimento entre fotobiorreatores cilíndricos e flat-plate	39
4.1.3 Comparação do crescimento da biomassa em fotobiorreatores cilíndrico e flat-plate em modo contínuo	43
4.2 Avaliação do consumo de azoto e fosforo	45
4.3 Recuperação de biomassa algal com recurso a amido catiónico	47
4.3.1 Comparação de diferentes tipos de amido catiónico	47
4.3.2 Comparação entre amido catiónico e polyDADMAC	49
4.3.3 Cinética de sedimentação	54
4.4 Identificação e quantificação de compostos na biomassa	56
Capítulo 5- Conclusão e perspetivas futuras	65
Capítulo 6- Referências	67
Anexos.....	75

Lista de Figuras

Figura 2.1- *Estrutura dos principais tipos de carotenoides.*

Figura 2.2- *Modos de operação de reatores (volume vs tempo).*

Figura 2.3- *Neutralização da carga superficial das microalgas*

Figura 3.1 - Instalação do equipamento.

Figura 3.2 - Fotobiorreator cilíndrico de 1 L.

Figura 3.3 - Reator cilíndrico de 5L.

Figura 3.4 - Reator flat-plate.

Figura 3.5 - Kits de azoto e de fosforo.

Figura 3.6 - Espectrofotómetro para leitura dos kits.

Figura 3.7 - Extração e pellet no final da extração.

Figura 3.8 - Equipamento rotavapor.

Figura 3.9 - Equipamento LC-MS.

Figura 4.1 - Reta de calibração de biomassa.

Figura 4.2 - Crescimento da biomassa algal em reatores cilíndricos de 1L e em um reator cilíndrico de 4L.

Figura 4.3 - PH e temperatura ao longo do ensaio.

Figura 4.4 - PH e oxigénio dissolvido ao longo do ensaio.

Figura 4.5 - Evolução da biomassa algal em reatores cilíndricos e flat-plate (diluição 1:3 e espectrofotometria).

Figura 4.6 - Evolução da biomassa algal em reatores cilíndricos e flat-plate.

Figura 4.7 - Comparação entre a concentração de biomassa algal (determinação gravimétrica) e a concentração de células.

Figura 4.8 - Evolução temporal da concentração de biomassa, medida gravimetricamente e através de espectrofotómetro com diluição 2:30 em reatores cilíndricos e Flat-plate operados em modo contínuo.

Figura 4.9 - Evolução do crescimento da biomassa algal e consumo de azoto e fosforo.

Figura 4.10 - Evolução do potencial zeta com a adição de solução de amido AMD 163 AMD 168 (ambos à concentração de 0,02 g/ml).

Figura 4.11 - Evolução da sedimentação de uma amostra de microalgas com a adição de amido catiónico AMD 168.

Figura 4.12 - Comparação entre algas sedimentadas removidas há uma semana com algas removidas, há um dia, ao cabo de 24 horas de sedimentação.

Figura 4.13 - Comparação entre dois tipos de polyDADMAC.

Figura 4.14 - *Comparação da sedimentação das amostras de polyDADMAC. À esquerda polyDADMAC 100K-200K e ao centro e à direita polyDADMAC 400K-500K.*

Figura 4.15 - Evolução do potencial zeta com a adição de amido catiónico AMD 168 vs polyDADMAC 100k-200k, a 40 ml de suspensão de microalgas (0.9 g/L).

Figura 4.16 - Sedimentação da biomassa algal com amido catiónico

Figura 4.17 - Observação ao microscópio dos flocos no início da floculação. A-amostra de 10,8% de amido. B-amostra 13,8% amido. C- Amostra 166% polyDADMAC 100k-200k. D- polyDADMAC 27,7 % 400k-500K.

Figura 4.18 - Observação ao microscópio dos flocos no final da floculação. A-amostra de 10,8% de amido. B-amostra 13,8% amido. C- Amostra 166% polyDADMAC 100k-200k. D- polyDADMAC 27,7 % 400k-500K.

Figura 4.19 - Evolução da percentagem de sedimentação ao longo do tempo, para as cargas de 13.88% de amido catiónico AMD 168, 1,66% de polyDADMAC 100k-200k e 0,22% polyDADMAC 400k-500k.

Figura 4.20 - A-amostra antes da adição de floculante B- amostra com amido catiónico AMD 168 no final da sedimentação. C- amostra com polyDADMAC 100K-200K no final da sedimentação. D- amostra com polyDADMAC 400k-500k no final da sedimentação.

Figura 4.21 - Tempo de sedimentação de amostra para uma carga de amido AMD 168 de 11,1%.

Figura 4.22 - Espectro TIC para o extrato flat-plate em modo contínuo.

Figura 4.23 - Total diode array Scan para o extrato flat-plate em modo contínuo.

Figura 4.24 - Espectro para o comprimento de onda de 440 nm.

Figura 4.25 - Espectro para o comprimento de onda de 460 nm.

Figura 4.26 - Espectro para o comprimento de onda de 665 nm.

Figura 4.27 - Espectro de massa para o instante 36.33 minutos.

Figura 4.28 Espectro de massa para o instante 20.11 minutos.

Figura 4.29 - Espectro de massa para o instante 49.80 minutos.

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Quantidade de luteína por espécie de microalga.

Tabela 3.1 - Composição das soluções stock de nutrientes.

Tabela 3.2 - Composição do eluente.

Tabela 4.1 - Produtividade crescimento da biomassa algal.

Tabela 4.2 - Tamanho médio dos flocos de microalgas formados.

Tabela 4.3 - Reta de calibração da astaxantina.

Tabela 4.4 - Reta de calibração de β -caroteno.

Tabela 4.5 - Quantidade de luteína e β -caroteno extraído.

Lista de Acrónimos

BTU- Unidade térmica britânica

PolyDADMAC- Cloreto de polidialildimetilamónio

N- Azoto

P- Fosforo

C- Carbono

PUFA- Ácidos gordos polinsaturados.

DHA- Ácido docosa-hexaenóico.

GLA- Ácido gama-linolénico.

EPA- Ácido eicopentanóico.

RuBisCo- Ribulose-1,5-bisfosfato oxigenase.

DAF- Flotação com ar dissolvido.

DiAF- Flotação eletrolítica e de ar disperso.

1N1P- Condições de azoto e fosforo normais.

3N3P- Três vezes a concentração de azoto e fósforo normal.

2N2P- Duas vezes a concentração de azoto e fósforo normal.

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo apresenta-se o contexto do trabalho, nomeadamente a importância das microalgas como fonte alternativa de produtos naturais de elevado valor e utilidade, define-se o objetivo do trabalho e apresenta-se a estrutura do documento.

1.1 Enquadramento do trabalho

O aumento da população mundial, nomeadamente dos países em desenvolvimento, tem vindo a provocar um aumento do consumo dos recursos energéticos mundiais, esperando-se que até 2030 haja um consumo de 678×10^{15} BTU/ano, um aumento de 60% face aos níveis de 2011[1]. A grande maioria destes recursos energéticos, cerca de 80%, advém de combustíveis fósseis[2], um recurso finito sem possibilidade de renovação. Estes combustíveis, principalmente petróleo e carvão, vêm sendo apontados como os grandes causadores das alterações climáticas, libertando grandes quantidades de CO_2 e outros gases de efeito de estufa, levando à extinção de milhões de espécies animais e à morte de milhares de seres humanos[1]. Para além das questões energéticas, há a necessidade de alimentar um número crescente de seres humanos, nomeadamente com maior procura de fontes de proteína, o que coloca pressões adicionais sobre os recursos naturais, podendo as microalgas vir a desempenhar um papel relevante também neste contexto [1].

Como tal, é necessário desenvolver uma economia de base biológica, mais amiga do ambiente e que substitua a economia baseada no petróleo e na utilização intensiva dos recursos naturais. Esta economia deve basear-se no uso de matérias vegetais para a criação de produtos tais como combustíveis, produtos químicos, materiais, alimentos e ração para animais[3]. Contudo uma economia de base biológica pode não ser sustentável se depender exclusivamente de plantas terrestres. Espera-se que até 2030 sejam usados entre 285 e 792 milhões de hectares para este tipo de economia[4]. Este aumento de uso de terra arável pode trazer diversos problemas tais como desflorestação, erosão dos solos, perda de biodiversidade, poluição das águas, esgotamento dos nutrientes dos solos entre outros problemas[5].

Para minorar a exploração massiva das plantações terrestres, as microalgas surgiram como uma matéria-prima alternativa para as economias de base biológica. As microalgas são células eucarióticas fotossintéticas de pequena dimensão que convertem luz, água e CO_2 em biomassa. Estes microrganismos apresentam varias vantagens em relação à produção de plantas, tais como não necessitarem de terrenos aráveis para a sua produção, não competindo com os terrenos usados para a outras culturas, poderem (algumas espécies) usar água salobra em vez de água doce, serem mais eficientes que as plantas terrestres, serem mais fáceis de

transportar, terem uma boa capacidade de fixar CO₂ da atmosfera, contribuindo para a redução dos gases de efeito de estufa na atmosfera [1].

Hoje em dia as microalgas são usadas para produzir variados produtos de valor acrescentado, tais como carotenoides, lípidos, proteínas, glúcidos e vitaminas. Estes produtos são aplicados em diversas áreas tais como a alimentação humana e animal, cosméticos, produtos farmacêuticos e biodiesel[6].

Os carotenoides são um dos produtos mais importantes, e são usados em rações para animais, alimentação humana como suplemento e corante, e em cosméticos como pigmento[7]. Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis que fazem parte do sistema fotossintético das microalgas com funções de absorção de luz, dissipação de energia e eliminação de espécies de oxigénio reativas[8]. Esta última capacidade dá aos carotenoides, atividade antioxidante intrínseca, oferecendo benefícios para a saúde nas áreas da prevenção do cancro, degeneração macular, artrite e doenças cardiovasculares[8]. O mercado mundial de carotenoides ronda os 1,2 mil milhões de dólares, sendo os principais carotenoides produzidos pelas microalgas o β-caroteno, luteína e astaxantina, embora a sua produção por via das microalgas não seja ainda muito rentável. Por exemplo, o preço da astaxantina oscila entre os 1900 e os 2500 dólares por kg [7] [9]. Este preço para a forma sintética da astaxantina, é significativamente inferior ao dos carotenoides naturais extraídos de microalgas, que se situa entre os 1800 e os 7400 dólares por kg, dependendo da região da Europa[10]. Grande parte deste custo advém da produção de microalgas e da extração dos compostos, bem como da recolha da biomassa que representa 20 a 30% do custo total da produção[11].

Um dos métodos em estudo para maximizar o rendimento das microalgas é através do uso de fotobiorreatores. Estes consistem em recipientes fechados onde as condições de cultura são controladas, não havendo contaminações com espécies prejudiciais tais como predadores[12]. Devido ao facto de condições tais como luz, pH, nutrientes e O₂/CO₂ poderem ser controlados, possibilitam maior quantidade e qualidade de biomassa e seus dos compostos[12]. Tal facto faz com o uso destes tipos de reatores torne a produção mais rentável e sustentável.

1.2 Objetivo do trabalho

Face ao anteriormente exposto, nomeadamente os elevados custos de produção, e apesar da investigação realizada até à data, persiste a necessidade de melhorar e otimizar os processos de produção de microalgas, nomeadamente através do estudo dos parâmetros operatórios dos fotobiorreatores contínuos e descontínuos, e o processo de recolha da biomassa algal. No que respeita à produção da biomassa (*Chlorella vulgaris*), utilizaram-se três tipos de reatores:

air-lift, flat-plate em modo descontínuo e contínuo, sob diferentes condições operatórias. No que respeita à recolha da biomassa produzida, explorou-se o potencial do amido catiónico, um floculante natural com boas características para ser usado neste tipo de processos, tendo-se comparado o seu desempenho com um produto sintético, o polyDADMAC. Posteriormente, realizou-se a extração dos pigmentos, usando um método referido na literatura, e fez-se a respetiva quantificação e caracterização com recurso à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

1.3 Estrutura do trabalho

Para além deste capítulo introdutório, onde se faz o enquadramento do trabalho e se definem os seus objetivos, o documento é composto por: capítulo 2, onde se faz a revisão da literatura sobre os assuntos em estudo; capítulo 3, relativo aos materiais e métodos usados no trabalho; capítulo 4, onde se apresentam os resultados obtidos e se faz a respetiva discussão; capítulo 5, onde se retiram as principais conclusões e se indicam caminhos para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

Neste capítulo faz-se a revisão da bibliografia relativa aos aspetos com relevância para o trabalho a desenvolver no âmbito desta tese. Para além da importância das microalgas, analisam-se os aspetos relativos aos reatores, à recuperação da biomassa e aos produtos com maior interesse comercial.

2.1 Microalgas

As microalgas são seres unicelulares que surgiram pela primeira vez há cerca de 3 mil milhões de anos, evoluindo a partir de cianobactérias[13]. Nos dias de hoje estas dividem-se em 2 grupos, podendo pertencer ao grupo das microalgas procarióticas (Chloroxybacteria), ou eucarióticas onde se incluem as microalgas do tipo Diatomácea (Bacillariophyta), microalgas verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta)[14], podendo ser heterotróficos ou autotróficos.

Na exploração industrial são utilizadas principalmente microalgas do tipo autotrófico, que usam como fonte de carbono, o dióxido de carbono atmosférico, para além de azoto, enxofre e fosforo como nutrientes essenciais, para além da luz[14]. A sua natureza microscópica, bem como outras características biológicas, faz com que as microalgas possuam uma produtividade superior às plantas superiores, nomeadamente as plantas aquáticas, plantações agrícolas ou florestas convencionais[15]. A sua enorme variedade genética permite-lhes que produzam uma grande diversidade de produtos com diferentes aplicações comerciais, tais como: biocombustíveis, carotenoides, proteínas, ácidos gordos e ainda outros compostos usados na indústria alimentar[7].

As microalgas começaram a ser usadas há milhares de anos inicialmente pelos povos chineses, americanos e africanos como fonte de alimento; contudo a sua produção industrial apenas começou a ser investigada pela Alemanha durante a 2ª guerra mundial como alternativa aos alimentos que escasseavam. Contudo, as primeiras unidades comerciais apenas apareceram 30 anos depois, na Europa, Israel e Japão[16]. Com o aumento da poluição e das mudanças climáticas, este tipo de microrganismo começou a ser estudado com vista a produzir lípidos, posteriormente convertíveis em combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis[17]. Mais recentemente, a busca de produtos cosméticos e farmacêuticos de origem natural tem levado à investigação das microalgas como fonte de alguns produtos de valor acrescentado de interesse, tais como carotenoides, proteínas e vitaminas[6].

As principais vantagens das microalgas em relação às plantas terrestres para a produção de compostos de valor acrescentado são a não necessidade de usar terrenos aráveis para o seu crescimento, a possibilidade de implementação de sistemas de produção em áreas urbanas e no interior de edifícios, maiores crescimento e produtividade, capacidade de crescerem durante todo o ano, poderem usar águas residuais como meio de crescimento, além de captarem CO₂ da atmosfera[18][19]. Contudo, o uso destes microrganismos apresenta algumas limitações tais como o consumo de água, os elevados custos de recolha da biomassa, para além de algumas dificuldades na implementação de scale-up [20][21][22].

Neste tipo de organismos, os principais fatores que podem influenciar o seu crescimento são a presença de organismos tóxicos, as quantidades de nutrientes, luz, dióxido de carbono, temperatura e pH[23]. Para que ocorra um bom crescimento é necessário fornecer às microalgas macro e micronutrientes nas quantidades e condições apropriadas. Os principais macronutrientes necessários são: carbono, fosforo e azoto. Estes devem ser fornecidos nas proporções de C:N:P 106:16:1, e de maneira a que possam ser absorvidos pelas microalgas[24]. A velocidade de assimilação dos nutrientes vai depender do tipo de microalga[25]. Caso os rácios, ou condições do meio não sejam adequados pode existir uma diminuição da produtividade; contudo, condições adversas podem levar ao aumento da produção dos produtos de interesse, como por exemplo carotenoides[25].

- **Carbono**

O carbono é o principal nutriente das microalgas. Este é assimilado de diferentes formas, dependendo do mecanismo de produção de energia a ser usado pela célula. A maioria das microalgas são fotoautotróficas e como tal assimilam carbono na forma inorgânica para realizar esse processo. Como o ar atmosférico muitas vezes não contem a quantidade de CO₂ suficiente para as microalgas é necessário fornecer carbono artificialmente. Este carbono pode estar sob a forma de CO₂ ou bicarbonato (HCO₃⁻), sendo que a segunda forma necessita do uso de enzimas tais como anidrase carbónica para ser convertida em CO₂ como se pode ver pela fórmula abaixo[26].

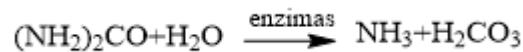


Em modo heterotrófico, a fonte de carbono vai ser orgânica. São usadas diversas fontes para fornecer carbono orgânico, tais como glucose, sacarose, acetato, etanol, entre outros[27]. Algumas espécies de microalgas têm a capacidade de usar ambos os tipos de carbono, orgânico ou inorgânico, como é o caso da espécie *Chlorella vulgaris*. Neste tipo de algas alterando a fonte de carbono usada é possível fazer com que a espécie recorra a fotoautotrofia ou heteroautotrofia[26].

- **Fósforo e azoto**

A seguir ao carbono, o fósforo e o azoto são os nutrientes mais importantes para as microalgas. No caso do azoto este representa 5 a 10% da massa total das microalgas e é

assimilado sob a forma de sais inorgânicos tais como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-)[28]. A forma de amônio é a preferida pelas microalgas, contudo o nitrato é a forma mais usada em meios para as microalgas, visto que os íons amônio podem causar toxicidade, dependendo do pH[24]. As microalgas podem também utilizar azoto proveniente de fontes orgânicas, tais como ureia e aminoácidos, embora esta última seja pouco utilizada. No caso da ureia esta é hidrolisada para amônia e ácido carbônico, sendo de seguida absorvida pelas microalgas, como se pode observar pela fórmula abaixo[24].



O fósforo representa 0,05 a 3,3% da biomassa total das microalgas e é absorvido sob a forma de ortofosfato, sendo necessário o gasto de energia para a assimilação[26]. São usados principalmente sais inorgânicos, tais como fosfato dipotássico (K_2HPO_4), fosfato monopotássico (KH_2PO_4), entre outros, nos meios de crescimento; contudo, as microalgas têm também a capacidade de assimilar fontes orgânicas de fosfato que são convertidas em ortofosfato sob a ação de enzimas fosfatases[24]. As microalgas têm a capacidade de armazenar fósforo no seu interior sob a forma de grânulos de polifosfato quando existe excesso no meio, sendo esses grânulos usados quando os níveis de fósforo estão baixos, sendo este processo chamado “luxury uptake” e é usado como mecanismo de tratamento de águas residuais[29].

2.2 Produtos de elevado valor comercial

As microalgas têm a capacidade de produzir diversos compostos de interesse e de elevado valor acrescentado, com diversas aplicações nas mais variadas indústrias. O mercado mundial de compostos de alto valor comercial encontrava-se na casa dos 1,2 mil milhões de dólares em 2010, sendo que a grande parte advém da produção de β -caroteno e astaxantina. Por outro lado, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem vindo a ser desenvolvida, esperando-se um aumento do valor comercializado nos próximos anos[30]. Os principais produtos obtidos pelas microalgas são carotenoides, lípidos para biocombustível, assim como, produtos de menor expressão comercial, como proteínas, vitaminas, glúcidos e ácidos gordos insaturados[31].

2.2.1 Carotenoides

Os carotenoides são compostos lipofílicos de cor amarela, laranja ou vermelho, constituídos por uma cadeia principal de 40 carbonos com oito unidades de isopreno dividindo-se em dois grupos, carotenos e xantofilas. Carotenos correspondem a carotenoides sem a adição de derivados oxigenados e xantofilas correspondem a carotenoides com a adição de grupos-OH (por exemplo luteína), grupos oxi (cantaxantina) ou uma combinação dos dois

(astaxantina)[8]. Os carotenoides têm a capacidade de absorver luz e diminuir o excesso de energia em metabolismos fotossintéticos, sendo divididos em dois grupos, consoante a sua função, neste caso carotenoides primários e secundários. Carotenoides primários, como é o caso do b-caroteno e da luteína, servem como pigmentos secundários com a capacidade de transferir a energia absorvida para a clorofila, expandindo o espectro de absorção de luz das algas. Carotenoides secundário tem a função de formar uma camada protetora nas células, protegendo-as quando expostas a condições de stress. Neste grupo encontramos carotenoides tais como astaxantina e cantaxantina, sendo distinguíveis pela sua coloração rosa ou vermelha[11]. Os carotenoides também têm capacidade antioxidante, protegendo contra o stress oxidativo[8].

Atualmente, os carotenoides são usados na indústria alimentar humana, alimentar animal, cosmética, nutracêutica e farmacêutica[32]. O mercado de carotenoides atualmente encontra-se nos 1,5 mil milhões de dólares em 2017[33], sendo a maior parte dos carotenoides no mercado de origem sintética. Contudo, o risco para a saúde da utilização de fontes sintéticas tem levado à busca de fontes naturais de carotenoides, onde as microalgas se apresentam como uma boa alternativa para a produção desses compostos[34]. Os principais carotenoides comercializados a partir de microalgas são: luteína, astaxantina e β-caroteno[11]. A figura 2.1 ilustra a estrutura de alguns dos principais carotenóides.

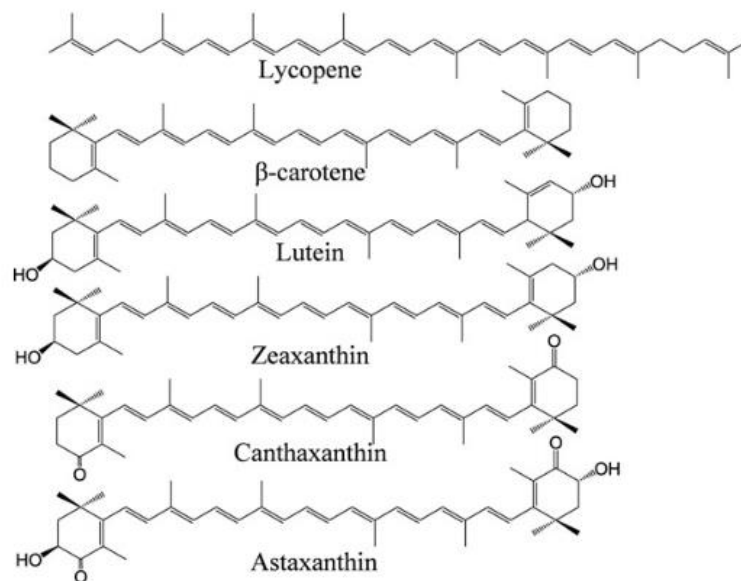


Figura 2.1 - Estrutura dos principais tipos de carotenoides. Adaptado de [11].

- **Luteína**

A luteína é um carotenoide primário com fórmula química $C_{40}H_{52}O_2$ produzido por frutos, vegetais e flores, sendo a flor de calêndula a principal fonte comercial deste composto. Nas microalgas é produzido principalmente pela microalga dos géneros *Chlorella* e *Dunaliella* como se pode observar na tabela 2.1[35]:

Tabela 2.1 - Quantidade de luteína por espécie de microalga.

Microalga	Quantidade (mg g ⁻¹)
<i>Chlorella protothecoides</i>	4,6
<i>Chlorella protothecoides</i>	5,2
<i>Dunaliella salina</i>	6,6 ± 0,9
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	5,3
<i>Galdieria sulphuraria</i>	0,4 ± 0,1

A luteína é usada como pigmento em alimentos, assim como na indústria dos produtos cosméticos e farmacêuticos. Demonstrou-se que este composto tem um papel na redução do desenvolvimento das cataratas, retinite pigmentosa e degeneração macular, mais comuns em idosos [36]. Outros benefícios deste composto incluem o abrandar de doenças crônicas, tais como aterosclerose e doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades antioxidantes e no estímulo da resposta imunitária[35]. Em 2018, o mercado mundial de luteína rondou os 309 milhões de dólares, com um crescimento anual de 3,6 %[9].

A produção de luteína em fotobiorreatores pode ser estimulada através do aumento da temperatura e da luminosidade. O pH pode ter um efeito positivo, dependendo do modo de operação do fotobiorreator; isto é, em operações em *batch*, níveis extremos de pH são benéficos para a produção de luteína, contudo em operações em contínuo níveis normais de pH tendem a surtir o mesmo efeito. O azoto parece não afetar a produção contudo concentrações mais elevadas deste nutriente devem ser fornecidas de modo a evitar diminuição da taxa de crescimento das microalgas[8].

A luteína é sensível à luz, temperatura e calor, sendo essencial realizar o seu armazenamento em condições apropriadas.

- **Astaxantina**

A astaxantina é um carotenoide secundário produzido principalmente por microalgas da espécie *Haematococcus pluvialis* quando se encontram em condições de stress, sendo por isso necessário usar sistemas em duas fases para produzir este composto. A primeira fase serve para assegurar o máximo crescimento da microalga e uma segunda fase para permitir a produção e acumulação da astaxantina, chamada de carotegénese[37]. A astaxantina é usada principalmente como pigmento para a indústria de aquacultura de salmão, sendo responsável pela pigmentação da sua carne, assim como por influenciar a taxa de sobrevivência de salmões jovens[38]. Para a saúde humana tem diversas vantagens, tais como efeito antioxidante, anticancerígeno, antidiabéticos e anti-obesidade e fornece proteção cardiovascular e neuronal[34]. A astaxantina é produzida comercialmente por microalgas, crustáceos ou por meios artificiais[31]. O mercado mundial de astaxantina encontrava-se aproximadamente nos 240 milhões de dólares em 2010 com o preço do quilo de astaxantina na ordem dos 1900 a 2500 dólares [9].

De modo a promover a acumulação de astaxantina em *Heamatococcus pluvialis* é necessário que na fase de carotogénese ocorra stress oxidativo, para tal os níveis de luminosidade e de CO₂ devem ser muito elevados, enquanto e os níveis de azoto devem permanecer baixos[8].

- **β-caroteno**

O β-caroteno foi o primeiro composto extraído a partir de microalgas a entrar no mercado; é um carotenoide primário produzido principalmente por microalgas do género *Dunaliella*. O β-caroteno é um análogo estrutural da vitamina A e é usado na indústria como agente corante na alimentação, fonte de pró-vitamina A na alimentação humana e animal e aditivo em cosméticos. Na saúde oferece benefícios tais como proteção contra a asma, tratamento de melasma ou da pele e protege contra degeneração macular[9]. A fonte sintética deste composto é a mais usada no mercado mundial, embora existam alternativas naturais, nomeadamente as microalgas. O mercado mundial deste composto ronda os 260 milhões de dólares, sendo o composto carotenoide com maior volume de mercado[31].

O modo de produção deste composto na *Dunilella* é semelhante ao da astaxantina, necessitando de duas fases, uma de crescimento e outra de carotogénese. Para este composto podemos aumentar a sua produção através do aumento dos níveis de Fe²⁺ no meio, assim como aumentando a incidência luminosa[8].

2.2.2 Lípidos para Biocombustíveis

Desde o início dos anos 80 que se tem procurado alternativas aos combustíveis fósseis, nomeadamente recorrendo ao uso de matéria vegetal, uma fonte renovável menos poluidora[1]. Estes biocombustíveis podem dividir-se em duas classes: primários e secundários[30]. Os biocombustíveis primários são compostos principalmente por matéria vegetal ou animal não processada, utilizada principalmente para aquecimento e produção elétrica, não sendo ideais como substitutos de combustíveis fósseis líquidos[30]. Os biocombustíveis secundários, também chamados de biocombustíveis sólidos, podem-se dividir em três categorias: primeira geração, segunda geração e terceira geração[1][39]. A primeira geração consiste no uso de espécies tais como o girassol, soja e colza, espécies que produzem óleos comestíveis e que foram as primeiras a ser convertidas em biodiesel. Contudo, estes combustíveis de primeira geração têm alguns problemas; a sua utilização para biocombustíveis compete com a sua utilização na alimentação, o que levou ao aumento do preço dos alimentos, para além de necessitarem de grandes áreas de terreno arável[1]. A segunda geração de biocombustíveis surgiu como uma tentativa de solução dos problemas dos combustíveis de primeira geração e utilizam culturas vegetais não usadas na indústria alimentar como a *Jatropha*, *Miscanthus* e *Panicum virgatum*. Ainda assim, competem por terreno arável[39]. A terceira geração veio tentar resolver os problemas das gerações anteriores; usa microalgas em vez de plantas superiores. As microalgas podem ter alto conteúdo lipídico, apresentam altas taxas de crescimento, a possibilidade de crescerem em

solos não aráveis, a possibilidade de usarem águas salinas, a possibilidade de absorverem altas taxas de CO₂ e não usarem herbicidas ou pesticidas[40].

Os maiores produtores mundiais de microalgas para a indústria dos biocombustíveis são os Estados Unidos com 74% da produção mundial, a Europa com 13% da produção mundial e os restantes países com 9 % [22]. O potencial mercado para a indústria de microalgas para biocombustíveis é de cerca de 35000 L/ha/ano[41].

Os biocombustíveis criados a partir de microalgas resultam da transesterificação de lípidos. Os lípidos estão presentes em todas as microalgas, sendo que a sua quantidade varia de espécie para espécie, representando entre 10 a 75% da massa total da microalga[15]. Os lípidos são compostos principalmente por ácidos gordos, e podem ser divididos em dois grupos: lípidos neutros, que são substâncias de reserva de energia para a célula, e lípidos polares que compõem a bicamada celular[42]. Destes dois tipos, o que é usado na produção de biodiesel são os lípidos neutros que contêm triacilglicerol, entre outras biomoléculas, sendo que é o triacilglicerol que é convertido nos processos de transesterificação[19].

Uma forma de aumentar a produção de lípidos neutros nas microalgas é através da diminuição de azoto e fosforo, assim como o aumento de salinidade e luz. Estas condições aumentam o stress das microalgas levando assim a um aumento da produção de lípidos[43].

2.2.3 Outros produtos

As microalgas também têm a capacidade de produzir outros tipos de compostos de alto valor comercial para uso em diversas áreas, tais como a alimentação, cosméticos, saúde, e outras áreas comerciais. Estes produtos têm ainda uma quota de mercado bastante baixa, embora a sua produção possa aumentar no futuro.

- **Glúcidos**

Glúcidos têm sido apontados como uma fonte alternativa aos lípidos na produção de biocombustível, designadamente aqueles que são compostos por ramosa, xilose e manose, servindo nas microalgas como componentes da estrutura celular, assim como armazenamento de energia. Representam entre 30 e 60% do conteúdo das microalgas. A sua produção e utilização industrial está ainda a ser alvo de estudo pois este tipo de compostos embora gerem um biocombustível já usado, o bioetanol, a sua extração é ainda bastante complicada e os custos de produção ainda muito elevados[44].

- **Ficobiliproteínas**

Ficobiliproteínas são pigmentos proteicos que atuam nos mecanismos de captura de luz nos processos fotossintéticos. Dependendo dos espectros de luz que absorvem, podem ser divididas em três grupos: ficocianina (cor azul), ficoeritrina (cor vermelha) e aloficocianina (cor azul claro). Estes compostos são utilizados na indústria farmacêutica e alimentar. Podem servir como marcadores de biomoléculas em citometria de fluxo e em outros métodos de

marcação de proteínas[45]. Também apresentam benefícios para a saúde, tais como atividade quimioprotetora e atividade antioxidante[9]. Podem ainda ser usados na indústria alimentar e cosmética como corante natural. Em 1997 o mercado mundial de ficobiliproteínas era de cerca de 50 milhões de dólares[45].

- **Vitaminas**

As vitaminas das microalgas têm sido alvo de interesse nos últimos anos devido às suas propriedades benéficas para a saúde. As microalgas contêm vários tipos de vitaminas, nomeadamente vitamina E, que tem efeitos benéficos no tratamento do cancro, doenças cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, entre outras [46]. Também podem produzir cobalamina (vitamina B₁₂) embora a sua absorção pelo organismo possa ser difícil [47]. As microalgas também podem produzir vitamina C que pode ser aplicado no tratamento do cancro e arteroesclerose[46].

- **Ácidos gordos polinsaturados**

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são compostos com vários benefícios para a saúde humana. São constituídos por compostos tais como ácido docosa-hexaenóico (DHA), Ácido gama-linolénico (GLA) e ácido eicopentanóico (EPA)[46]. As fontes naturais de PUFA são principalmente os peixes e óleos extraídos de peixe. Os animais não sintetizam os PUFA, sendo obtidos a partir de microalgas, o que faz com que a sua extração direta das microalgas seja interessante comercialmente[9]. O único composto produzido neste momento por algas e com exploração comercial é DHA. Este composto é importante no desenvolvimento do cérebro e olhos nas crianças, sendo aconselhado a sua incorporação nas fórmulas de leite infantil[9]. O mercado mundial de PUFA encontra-se nos 13 mil milhões de dólares [9].

2.3 Fotobiorreatores

A cultura de microalgas é realizada em fotobiorreatores; estes reatores têm diversas formas e desenhos e modos de operação que vão influenciar o crescimento microalgal e a acumulação de produtos de interesse na biomassa.

2.3.1 Requisitos a satisfazer

- **Luminosidade**

O fator mais importante na conceção dos fotobiorreatores e no crescimento das microalgas é a luminosidade. A luz tem um papel importante na fotossíntese e a sua intensidade pode afetar negativamente o crescimento das microalgas. Se a intensidade luminosa for muito elevada pode levar à fotoinibição celular, que pode ser reversível ou irreversível dependendo do tempo de exposição a essa intensidade luminosa[48]. Se a intensidade luminosa for muito baixa não ocorre fotossíntese, ou ocorre em reduzida extensão e não haverá crescimento

[49]. Outro aspeto a ter em conta é a diminuição da intensidade luminosa à medida que esta atravessa o meio de cultura, criando assim o chamado efeito de sombra que limita o crescimento das algas no meio do reator[50]. Este efeito pode ser combatido com a agitação do meio de cultura, mas constitui um fator determinante da conceção de fotobiorreatores[51].

A fonte de luz pode ser natural ou artificial; luz natural é menos dispendiosa, mas é afetada pelas condições climáticas e estações do ano, e os ciclos dia e noite não podem ser alterados [52]. A luz artificial, embora mais dispendiosa, pode ser controlada pelo operador permitindo a alteração dos ciclos dia e noite e mesma intensidade luminosa independentemente do clima e estação do ano.

- **Balanço CO₂/O₂**

As microalgas necessitam de realizar a fotossíntese, em algumas circunstâncias A fotorrespiração e em situações de escuridão realizam a respiração. Estes processos consomem CO₂ e O₂, pelo que é necessário que haja um controlo destes gases. É necessário que a concentração de CO₂ seja suficientemente alta para ocorrer fotossíntese, mas o seu nível não pode ser demasiado elevado pois a acidificação do meio pode levar à morte das células[53].

Também é importante controlar o O₂ pois este gás é utilizado durante a noite em processos de respiração ou durante o dia pela enzima ribulose-1,5-bisfosfato oxigenase (RuBisCo). Por outro lado, os níveis de oxigénio no meio não devem ser muito elevados pois podem causar inibição das microalgas, pois são formadas espécies reativas de oxigénio quando a intensidade luminosa é elevada[54].

Em ambos os casos é necessário uma boa mistura no meio de modo a evitar os efeitos negativos destes gases.

- **Controlo do pH**

O pH é um fator importante e específico para cada tipo de alga; grande parte das espécies suporta valores de pH entre 6 e 9. Por exemplo a espécie *Chlorella sorokiniana* tolera valores de pH entre 6,5 e 8,5[55], enquanto a espécie *Spirulina platensis* suporta valores entre os 8 e os 10[53]. O pH é controlado principalmente pela adição de CO₂ no meio, sendo por isso importante garantir um bom controlo do pH do meio. Podem ser aplicados outros métodos, tais como através da adição de ácidos ou bases[56].

- **Agitação e mistura**

Em fotobiorreatores é importante garantir a devida agitação e mistura das microalgas, porque enquanto na natureza estas se encontram espaçadas com distâncias de cerca de 1 cm entre elas e com baixas concentrações, em fotobiorreatores as microalgas estão muitíssimo mais concentradas, o que pode conduzir a aumento local da temperatura, carência de CO₂ e baixa incidência de luz. A agitação vai resolver/minorar os problemas acima mencionados, pois

promove a transferência de gases entre as células e o espaço exterior, a exposição à luz, reduz a sedimentação e a estratificação térmica.

Este processo de agitação e mistura pode ser realizado através do borbulhamento do ar e/ou CO₂ para o meio ou através de agitação mecânica. Em ambos os casos há que ter em conta os eventuais problemas de stress mecânico provocado pelo borbulhamento de ar, pelo colapso das bolhas na superfície do meio[57], ou, no caso da agitação mecânica, pelas tensões de cisalhamento provocadas pelas pás do agitador[58].

2.3.2 Tipos de fotobiorreatores

Uma vez que é impossível fazer crescer apenas as microalgas de interesse em lagoas naturais, é necessário desenvolver sistemas que simulem as condições naturais de desenvolvimento, mas onde também seja possível alterar e controlar as condições de cultura sempre que necessário, possibilitando que apenas seja produzida a microalga de interesse, protegendo-a da competição e dos predadores. Os sistemas de cultura podem ser de dois tipos: abertos e fechados. Os fotobiorreatores abertos são os mais usados industrialmente, mas estão sujeitos às condições meteorológicas e sazonais ao longo do ano [59]. Outras desvantagens incluem a baixa transferência de massa, elevada evaporação de água, fraca utilização de luz e a necessidade de elevadas áreas para as lagoas[16].

Os fotobiorreatores fechados foram desenvolvidos como resposta aos problemas dos sistemas abertos. Estes fotobiorreatores são completamente isolados, podendo ser usados por um maior número de espécies de microalgas e podem funcionar no interior de edifícios com luz artificial e com condições de temperatura controladas, não havendo tantas perdas de água, podendo funcionar durante longos períodos de tempo[18]. Existem três tipos principais de fotobiorreatores fechados: tubulares, flat-plate e coluna. São usados principalmente para a produção de produtos de elevado valor acrescentado, visto que para a produção de produtos mais baratos como biocombustíveis estes sistemas de maior custo de aquisição e operação não se apresentarem viáveis[60].

- **Tubulares**

Este tipo de sistema fechado é composto por tubos longos transparentes de vidro ou plástico em disposição vertical, horizontal ou inclinada, sendo os sistemas fechados mais usados industrialmente[50]. A agitação/arejamento pode ser realizada com uso de um sistema airlift ou por bombas centrífugas. Face aos sistemas abertos, os reatores tubulares permitem maior aproveitamento solar e, em consequência, maior produção de biomassa[18]. Este sistema geralmente apresenta problemas de elevada temperatura e acumulação de oxigénio no meio sendo por isso necessário o uso de desgaseificadores na sua conceção de modo a diminuir o oxigénio no meio e chuveiros para diminuir a temperatura[60].

- **Flat-plate**

Os sistemas flat-plate são geralmente compostos por paralelepípedos de vidro ou plástico transparente. Possuem um sistema de borbulhamento de ar a partir da parte inferior que permite a entrada de CO₂ no sistema, assim como permitem agitação do meio. Este tipo de fotobiorreator é desenhado de modo a obter o máximo de área iluminada por volume de reator, de modo a aumentar a eficiência fotossintética[61]. Para obter esse efeito o reator tem de ter uma distância lateral baixa, abaixo de 10 cm de modo a que a luz chegue à totalidade da biomassa, podendo ser orientados para o sol num sistema semelhante aos dos painéis solares de modo a obter o máximo de luz solar ao longo do ano[62]. Certos fotobiorreatores flat-plate possuem chicanas no seu interior de modo a fornecer rigidez estrutural, assim como permitirem que a luz solar chegue a todas as células, e assim aumentarem a sua distância lateral [61].

Estes fotobiorreatores apresentam vantagens face aos sistemas tubulares pois devido à sua menor altura não necessitam de desgaseificadores para diminuir o O₂ no meio. Contudo têm a desvantagem de ser difícil o controlo da temperatura no interior do fotobiorreator, o crescimento de biofilme nas paredes do reator e o elevado custo do scale-up necessitando de vários compartimentos para a produção industrial[63].

- **Coluna vertical**

Os sistemas em coluna são semelhantes aos sistemas flat-plate, mas com formato cilíndrico. São mais fáceis de produzir que os sistemas flat-plate e dividem-se em sistemas airlift e bubble-column[16]. São usados principalmente em edifícios fechados possuindo elevadas produtividades quando comparado com os sistemas abertos devido a utilização mais eficientes de ciclos de luz e escuro e a boa transferência de massa[63]. Devido ao seu formato são menos eficientes que os sistemas flat-plate pois apenas metade do fotobiorreator está exposto à luz, fazendo com que o seu scale-up seja de difícil execução[60].

- **Outros designs**

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos novos designs de forma a reduzir custos e aumentar a eficiência dos reatores. Um dos designs propostos é usar fibras óticas ou LEDS de modo a aumentar a área iluminada em fotobiorreatores cilíndricos. Esta opção permite também que se usem luzes com comprimentos de onda variados e assim facilitar o processo fotossintético[64]. Outro design envolve a integração de sistemas de ultrafiltração em fotobiorreatores contínuos de forma a recuperar mais facilmente as microalgas[65].

Uma grande aposta tem sido a criação dos chamados fotobiorreatores de saco de plástico; os reatores são sacos de polietileno descartáveis ao invés de vidro ou PVC transparente, reduzindo bastante os custos de construção, esterilização e manutenção. Permanece, no entanto, a elevada utilização de materiais com base no petróleo [53].

2.3.3 Modos de operação

Os fotobiorreatores podem funcionar de três formas diferentes, dependendo do objetivo, cada uma delas com as suas vantagens e desvantagens sendo elas: modo descontínuo, modo semi-descontínuo e contínuo. A figura 2.2 ilustra os vários modos de operação.

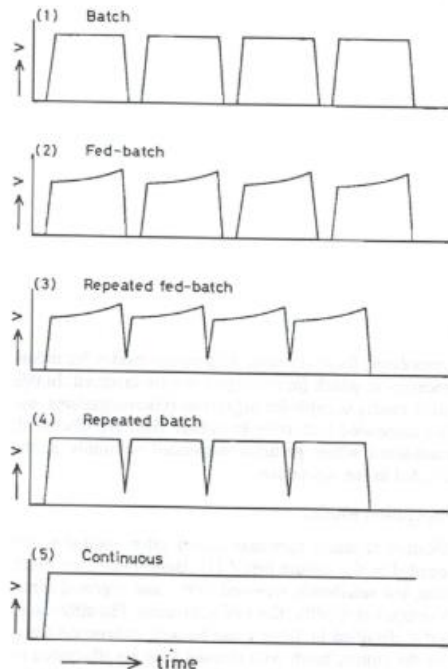


Figura 2.2 - Modos de operação de reatores (volume vs tempo). Adaptado de [66]

- **Descontínuo**

Nos sistemas descontínuos os nutrientes são introduzidos no início do processo de crescimento, diminuindo a sua concentração ao longo do ciclo de crescimento. O processo termina quando se esgotam os nutrientes ou quando os produtos inibitórios libertados atingem valores elevados, havendo cessação do crescimento das microalgas. Este processo tem a vantagem de ser de mais fácil controlo [66], no entanto as baixas produtividades atingidas, nomeadamente devido à não manutenção das idades das células, assim como aos elevados custos de recolha, fazem com que este modo de operação seja menos eficiente que os restantes[67].

- **Semi-descontínuo**

Nos sistemas semi-descontínuos, ao contrário dos sistemas descontínuos, é adicionado substrato de forma intermitente ao longo do tempo, assim como é retirado parte do caldo (produtos e meio) na mesma taxa [66]. Este sistema tem a vantagem de manter as microalgas em elevado estado multiplicativo, devido à contínua manutenção dos níveis de substrato no meio, permitindo maiores produtividades e diminuindo os custos operativos na fase de recolha[68].

- **Contínuo**

Nos sistemas contínuos os substratos são continuamente adicionado ao mesmo tempo que é retirado caldo na mesma proporção. Este modo de operação oferece vantagens em relação aos anteriores pois permite a obtenção de grandes produtividades 2,3 a 5 vezes superiores aos processos em *batch*. Isto deve-se ao facto de se conseguirem atingir elevadas densidades de biomassa durante longos períodos de tempo[67]. Este modo de operação também permite uma elevada automatização possibilitando a redução de custos durante o processo de crescimento[69].

2.4 Extração de produtos

Após o crescimento das microalgas em fotobiorreatores é necessário separar a biomassa do meio e proceder à extração dos componentes desejados. A recolha da biomassa é uma das mais dispendiosas e limitante da extração de produtos de interesse, tendo sido objeto de intensa investigação. A extração dos produtos desejados engloba as seguintes etapas: recuperação de biomassa, ruptura celular e extração de produtos.

2.4.1 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa é o passo mais dispendioso da extração, envolvendo 20 a 30% do custo total da produção[19]. Este envolve a separação da biomassa do meio, onde esta se encontra muito diluída ($0,5 \text{ kg/m}^{-3}$ de biomassa seca), o que obriga a remover grandes quantidades de água [70]. O método de recuperação depende muito das características da microalga, nomeadamente do tamanho e densidade da microalga, da carga de superfície das microalgas e do produto desejado[19]. Os métodos mais usados atualmente são sedimentação, floculação, flotação, centrifugação e filtração ou uma combinação destes. Independentemente do método usado, o importante é que no final da recuperação a percentagem de humidade seja baixa uma vez que alta humidade aumenta os custos *downstream* e pode induzir a degradação das microalgas.

- **Sedimentação**

Na sedimentação a biomassa é recuperada pela ação da gravidade, formando-se um bolo concentrado no fundo. De entre os processos de recuperação, é aquele que é mais favorável energeticamente, sendo usado com eficiência em microalgas de grande dimensão (por exemplo *Spirulina*). A taxa de sedimentação varia entre espécies, mas também varia dentro da mesma espécie dependendo da idade das algas. Para aumentar a velocidade de sedimentação, muitas vezes são adicionados floculantes, que serão descritos posteriormente. Os processos de sedimentação são muito lentos e as concentrações finais obtidas muito baixas entre 0,5 e os 3% (m/m)[19].

- **Floculação**

A floculação é um processo que é usado conjuntamente com outros processos de remoção da biomassa. É um método usado para agregar as microalgas, aumentando a sua dimensão, e assim facilitar os processos de sedimentação, flotação, centrifugação e filtração; tem interesse industrial, visto poder reduzir os custos dos processos de recuperação, assim como aumentar a qualidade dos efluentes[19]. O fundamento deste processo consiste na neutralização da carga negativa existente na superfície das microalgas, facilitando a sua aproximação e assim a floculação [71]. O floculante ideal deve ser barato, não tóxico, eficaz a baixa concentração, sustentável, reutilizável e que não interfira nos processos *dowstream* posteriores. Estes floculantes podem ser inorgânicos ou orgânicos[72].

Os floculantes inorgânicos mais comuns são sais metálicos, tais como o alumínio de potássio e o cloreto férrico, bastante usados no tratamento de águas. A sua eficácia depende da carga, aumentando com ela. A sua utilização na floculação de microalgas pode trazer problemas de contaminação no produto que se deseja extrair da biomassa. [19].

Os floculantes orgânicos com interesse na área das microalgas são polímeros catiónicos. A sua capacidade de agregação da biomassa depende de vários parâmetros, tais como o pH, a concentração da biomassa e a sua carga de superfície, bem como a própria carga do polímero[19]. São considerados os mais eficazes floculantes para recuperação de microalgas. O magnafloc LT25, magnafloc 1597 e Praestol são os floculantes mais usados em processos de recuperação de microalgas à escala industrial [72]. Recentemente têm sido desenvolvidos floculantes derivados de plantas e animais; têm a vantagem de serem matéria-prima renovável, tendo suscitado enorme interesse como alternativa aos floculantes tradicionais. Um exemplo é o quitosano, disponível nos crustáceos. Tem boa capacidade de floculação, mas requer dosagens mais elevadas que os polímeros tradicionais, sendo por isso pouco atrativo devido ao custo, nomeadamente para produtos de baixo valor acrescentado[70]. Outro exemplo é o amido catiónico. Este material é derivado principalmente de batata e tem vindo a ser cada vez mais usado na indústria do papel e tratamento de águas como alternativa a floculantes tradicionais. Tem boa capacidade de floculação, apesar de requerer maiores dosagens. Porém, o baixo custo e a compatibilidade biológica conferem-lhe elevado potencial. Um problema dos floculantes à base de amido prende-se com o facto de ainda não se ter desenvolvido produtos específicos para microalgas.

Outro possível método de floculação é a chamada auto floculação. Este processo pode ocorrer espontaneamente quando o pH das microalgas é superior a 9[71]. Este processo pode assim constituir uma alternativa à floculação externa, “bastando” ajustar os valores de pH através da limitação de CO₂ antes do processo de recuperação[73]. Contudo os seus efeitos na qualidade dos produtos recuperados e a sua eficiência precisam ainda de ser estudados.

A figura 2.3 ilustra a neutralização da carga superficial das microalgas.

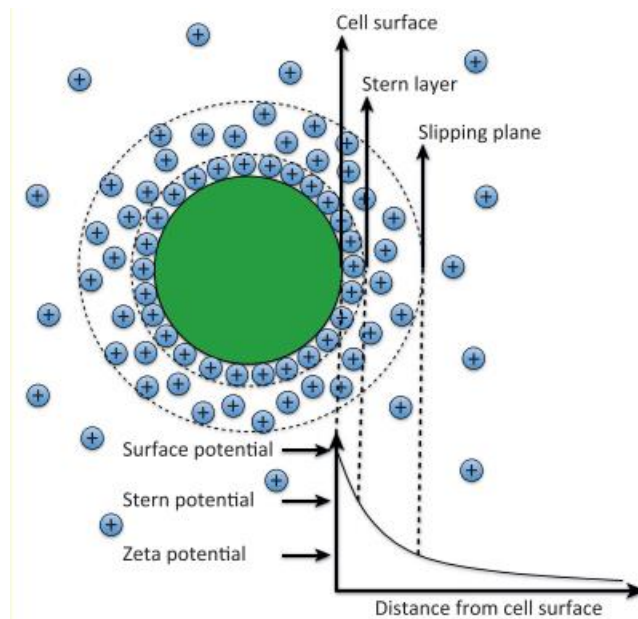


Figura 2.3 - Neutralização da carga superficial das microalgas. Adaptado de [71].

- **Flotação**

A flotação é o inverso da sedimentação. Neste método em vez de se promover a sedimentação das algas, o objetivo é fazer com que as microalgas flutuem atingindo a superfície. Este processo é realizado com o auxílio do borbulhamento de ar, mas muitas vezes é necessário a adição prévia de flocculantes para promover a flotação[72]. A flotação pode ser de três tipos: flotação com ar dissolvido (DAF), eletrolítica e de ar disperso (DiAF)[74].

- **Centrifugação**

A centrifugação é método mais usado na recuperação de biomassa algal. É um processo rápido e pode ser aplicado a todas as espécies de microalgas. Este processo consiste na aplicação de força centrífuga obrigando as partículas sólidas, ligeiramente mais densas do que o meio, a sedimentarem [75]. Industrialmente são usadas forças entre os 4000 e os 14000 g's, dependendo da espécie, e são conseguidas eficiências entre os 40 e os 90 %[72][70]. A grande desvantagem são os elevados custos de operação das centrífugas[72].

- **Filtração**

A filtração é um processo que usa um meio filtrante/membranas para separar a biomassa do meio. Este processo pode ser aplicado a algas de grandes dimensões, assim como a microalgas de menores dimensões, usando ultrafiltração. Existem diversos tipos de membranas, podendo estas classificar-se com base no tamanho de poro: macrofiltração se o tamanho dos poros é superiores a 10 μm ; microfiltração para membranas com tamanhos de poros entre 0,1 e 10 μm ; ultrafiltração para membranas com tamanhos de poros entre 0,02 e 0,2 μm [72]. Este processo tem diversos problemas, tais como a especificidade das membranas para cada tipo de microalgas, o entupimento das membranas e os custos energéticos da sua operação[72].

2.4.2 Disrupção celular

Apos a recuperação da biomassa é necessário destruir as paredes celulares que compõem as microalgas de modo a aceder aos compostos presentes no seu interior. As microalgas são compostas por duas camadas de parede celular, uma externa composta por polissacáridos tais como pectina, alginatos, agar ou algaenano, e uma interna composta por celulose microfibrilar, hemicelulose e glicoproteínas. As percentagens de cada um destes componentes, varia de espécie para espécie, ou da idade da microalga, dificultando o processo de disrupção celular e a posterior extração[76]. Considerando o elevado custo do processo e as implicações nas operações a jusante, esta área também tem sido objeto de intensa investigação. Os processos de disrupção podem ser divididos em mecânicos e não mecânicos.

- **Disrupção mecânica**

Os processos de disrupção mecânica consistem no uso de forças mecânicas, tais como forças de cisalhamento, correntes e ondas para provocar a disrupção não específica da parede celular das microalgas. Dentro desta categoria têm-se os moinhos de bolas, os homogeneizadores de alta velocidade, os homogeneizadores de alta pressão, os ultrassons, os micro-ondas e campos de pulsos elétricos.

A moagem por moinho de bolas consiste no uso de câmaras fechadas com esferas de aço, vidro ou cerâmica que vão provocar cisalhamento e rotura das microalgas. Este método é eficiente, simples (apenas uma operação) e apresenta boas taxas de recuperação de produto e bom scale-up. No entanto, podem atingir-se temperaturas que podem degradar alguns produtos sensíveis e formam-se resíduos celulares finos de difícil separação, o que aumenta os custos nas etapas a jusante[77].

O homogeneizador de alta pressão consiste no uso de altas pressões que submetem a biomassa a elevadas forças de cisalhamento e cavitação hidrodinâmica, levando à destruição da parede celular. Estas forças são geradas quando a suspensão de microalgas, sob alta pressão, passa através de uma ou mais válvulas e embate num anel de impacto. Este método proporciona boas taxas de recuperação e é um dos métodos mais usados; contudo, a operação a baixas concentrações e a libertação não seletiva de compostos leva ao aumento dos custos nas etapas subsequentes[77].

O homogeneizador de alta velocidade é do rotor/estator e funciona a altas rotações, forçando a suspensão através do estator a elevadas velocidades, provocando forças de cisalhamento entre a interface sólido líquido assim como cavitação hidrodinâmica. Este é o método mais simples. Contudo é um método com alto consumo de energia[77].

O equipamento de ultrassons gera ondas sonoras com frequências entre os 20 e os 100kHz, de modo a criar ciclos de altas e baixas pressões. Durante os ciclos de altas pressões as bolhas de vácuo criadas durante o ciclo de baixas pressões colapsam violentamente através de cavitação destruindo as paredes das microalgas[78]. Este fenómeno de cavitação pode levar à formação de radicais livres, assim como ao aumento da temperatura[77].

O método de micro-ondas consiste no uso de micro-ondas de modo a causar fricção entre as ligações intra e intermoleculares das moléculas polares como a água levando à sua quebra por ação do calor e da pressão provocados[79]. É um método bastante eficiente, contudo apresenta problemas como poder apenas ser aplicada para a extração de compostos não voláteis, levar a altas temperaturas e à formação de radicais livres[77].

Os pulsos elétricos funcionam através da aplicação de fortes pulsos elétricos que vão provocar a abertura de poros através de compressão e tensão. Este método é vantajoso quando se pretende extrair compostos tais como lípidos e pigmentos[80]. Os seus problemas advêm do aumento de temperatura e dos custos energéticos [77].

- **Disrupção não mecânica**

A disrupção não mecânica consiste no uso de químicos tais como antibióticos, agentes quelantes, caotrope, detergentes, solventes, bases e ácidos para degradar as paredes das microalgas. A escolha do tipo de disruptor não mecânico vai depender da composição da parede celular e do produto de interesse. Cada um destes compostos atua de maneira diferente; os antibióticos inibem a produção de componentes da parede celular, agentes quelantes ligam-se aos cátions que fazem a ligação entre as moléculas da parede celular, caotrope fazem com que o meio seja menos hidrofílico, os detergentes formam micelas juntamente com as moléculas da parede celular, os solventes dissolvem a parede celular, bases saponificam os lípidos da membrana e os ácidos provocam a poração, isto é a abertura de pequeno poros na parede celular que permitem a entrada e saída de compostos.

Mais recentemente têm sido desenvolvidos processos de disrupção através do uso de enzimas. Estas atuam através da digestão enzimática de componentes da parede celular. Podem ser usados diversos tipos de enzimas tais como lisozima e quitanase para atuar em diferentes regiões da parede[81]. A principal vantagem deste método é a utilização de condições de reação suaves quando comparado com outros métodos de disrupção não mecânica, a ausência de produtos não inibitórios e a elevada seletividade das reações. Contudo, a grande desvantagem deste método é o seu elevado custo[76].

2.4.3 Extração de compostos

A extração de compostos é a fase em que os produtos de interesse são separados do resto da biomassa. Esta fase é realizada muitas vezes em simultâneo com a fase de disrupção. O método de extração deve ser rápido, de fácil scale-up, eficaz, e específico para o tipo de produto desejado. Produto desejado ou tipo de produtos desejado

O método mais usado envolve solventes. Dependendo do tipo de produtos a extrair, a combinação de solventes vai variar. Os solventes devem ser baratos, voláteis e com boa capacidade de separar o produto desejado. Por exemplo, a extração de lípidos pode ser realizada através do método de Soxhelt ou Bligh and Dyer. O primeiro método envolve o uso de ciclo-hexano na fase de disrupção que é separado da biomassa por filtração e de seguida evaporado para se obter os lípidos[82]. Este método é bastante eficaz, mas como o ciclo-

hexano poder ser cancerígeno, deve ser evitado. O segundo método envolve o uso de clorofórmio e metanol para extrair os lípidos através da formação de bicamadas que são separadas[19]. Este método é o mais comum na extração de lípidos, contudo usa químicos prejudiciais para o ambiente. Já para carotenoides são usados solventes tais como acetona/hexano, acetona/metanol ou éter dietílico para separar os pigmentos do resto da biomassa, sendo os pigmentos purificados por cromatografia[83]. No entanto, a escolha dos solventes mais apropriados para a extração de carotenoides ainda está a ser alvo de estudos[84].

Mais recentemente têm sido investigados novos métodos de extração, tais como fluidos em estado supercrítico e os líquidos iônicos. O fluido em estado supercrítico (com pressão e temperatura acima do ponto crítico) mais usado é o CO₂[85]. Este método tem a vantagem de não usar solventes prejudiciais ao ambiente, poder operar a temperaturas moderadas e ser seletivo. Contudo tem elevados custos associados à criação do estado supercrítico do CO₂, e à impossibilidade de ser usado em modo contínuo[86]. Líquidos iônicos são sais orgânicos líquidos à temperatura ambiente visto terem uma temperatura de melting inferior a 100 °C. São compostos por cátions orgânicos de grandes dimensões e aniões orgânicos e inorgânicos mais pequenos. São também chamados de “green designer solvents” devido à possibilidade das suas propriedades serem ajustáveis consoante a utilização desejada e à sua capacidade de reutilização[87]. Têm a capacidade de quebrar a parede celular e separar compostos do resto da biomassa, levando por isso a que seja um método bastante eficaz[88]. Porém, tratando-se de um método ainda recente, a sua viabilidade técnico-económica para aplicação nas microalgas ainda carece de estudos[87].

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A água desmineralizada obtida no sistema RIOS™ 3 (Milipore, Estados Unidos). O CO₂ foi fornecido engarrafado pela empresa Praxair (Porto, Portugal) O metanol e a acetona foram fornecidos pela LabChem (Zelienople, Pensilvânia, E.U.A). O n-hexano foi fornecido pela empresa Scharlau (Barcelona, Espanha). O clorofórmio foi fornecido pela empresa Pronalab (Lisboa, Portugal). O amido catiónico ADM 163 e ADM 168 foram amavelmente cedidos pela empresa Mapril (Maia, Portugal) tendo por origem a empresa ADM (Decatur, Illinois, E.U.A). O polyDADMMAC e Astaxantina foram fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich (Missouri, E.U.A).

3.1.2 Microalgas

As microalgas utilizadas para a realização desta tese foram da espécie *Chlorella vulgaris* e foram fornecidas pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal).

O meio utilizado para o crescimento das microalgas foi o meio GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS), preparado a partir dos nutrientes fornecidos pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal). A partir dos nutrientes foram preparadas 4 soluções stock (soluções 1, 2, 3 e 4), com as concentrações que constam da tabela 3.1. Para as condições standard de cultura das microalgas, tomava-se 10 ml da solução stock da Tabela 3.1 para cada litro de meio final, conduzindo as concentrações finais de 70 mg N/L, 20,46 mg P/L, 14,8 mg Mg/L, 13,6 mg Ca/L, para além dos oligómeros e vitaminas. Este meio foi designado como 1N1P.

Tabela 3.1 - Composição das soluções stock de nutrientes.

Nutriente	Concentração (mg/L)	Solução
N na forma de NaNO ₃	7000	1
P na forma de KH ₂ PO ₄	2046	1
Mg na forma de MgSO ₄ .7H ₂ O	1480	2
CaCl ₂	1360	3
Oligómeros e vitaminas	1450	4

3.1.3 Instalação

As microalgas foram cultivadas em frascos “Schott” de 1L e em outros tipos de reatores numa estante de cultura de microalgas fornecida pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal), equipada com uma bomba modelo v-60 da hailea (Guangdong, China) para fornecimento de ar e com um controlador, nomeadamente para controlo dos ciclos de luz e escuro e controlo dos pulsos de dióxido de carbono. A estante dispõe de 4 lâmpadas fluorescentes LED, podendo ainda ser acoplada uma placa de LED modelo PL-600*600-CW de 40W da Lowcled (Shenzhen, China), colocada a cerca de 5 cm dos dois reatores. A instalação dispõe ainda de 3 medidores de caudal de ar com medidor de esfera de aço e 3 linhas de CO₂, 2 delas com electroválvula temporizada. Para o controlo de pH foi utilizado um titulador automático modelo 794 da Metrohm (Herisau, Suíça). A figura 3.1 representa uma imagem da instalação.



Figura 3.1 - Instalação do equipamento.

3.2 Métodos

3.2.1 Produção de biomassa algal

A produção de biomassa foi realizada em vários tipos de fotobiorreatores com vista a avaliar o efeito do tipo de reator sobre o crescimento.

Mantiveram-se fixos os tipos de nutrientes, o ar alimentado e o CO₂. O ar é fornecido por uma bomba de ar modelo V-60 da Hailea (Guangdong, China), sendo introduzido nos reatores através de dispersores, após filtração em filtros de nylon com tamanho de poro de 0,45 µm; o caudal de ar proporciona também a agitação necessária ao meio de cultura. A luminosidade foi fornecida através de lâmpadas fluorescentes LED colocadas numa das laterais da estante,

fornecendo cada uma 1600 lúmen, o que corresponde a 16985 lux (tendo em conta os 0.0942 m² de área exterior); tendo em conta o fator de conversão de 0.013 obtido na literatura[89], teremos uma intensidade da ordem dos 220 μmol fotões/(m².s) O pH foi mantido a 7.5 com recurso a H₂SO₄ 0.5M.

3.2.1.1 Produção de biomassa algal em reator cilíndrico air lift de 1L

O reator consiste em frascos cilíndricos do tipo “Schott” de 1l em sistema airlift. A geometria do vaso proporciona no máximo uma área/volume de 452 cm²/L. No entanto, considerando para este tipo de reator se usou iluminação de um dos lados, consideramos que a área efetiva para captação de luz é de 226 cm²/L. A concentração inicial da biomassa foi de aproximadamente 0,3 g/L a 0,5 g/L, sendo o meio de crescimento 1N1P.

O Caudal de ar alimentado foi de cerca de 0.5 L ar/ (L meio.min), sem adição suplementar de dióxido de carbono. A figura 3.2 mostra o fotobiorreator.

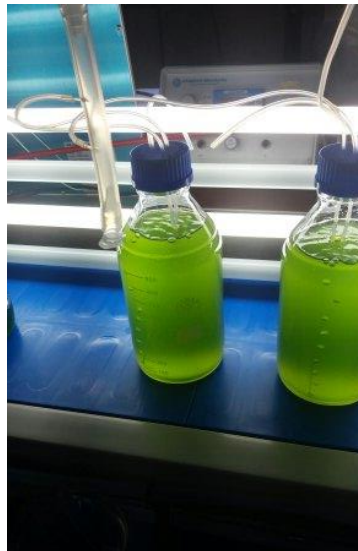


Figura 3.2 - Fotobiorreator cilíndrico de 1 L.

3.2.1.2 Produção de biomassa algal em reator cilíndrico air lift de 5L

O reator air lift cilíndrico de 5L consiste num frasco cilíndrico com 18 cm de diâmetro e um volume máximo de 5L, fornecendo uma área/volume de 222,8 cm²/L. Dependendo do ensaio, o reator pode ser apenas iluminada de um dos lados diminuindo a área/volume para 111,4 cm²/L. A concentração inicial de biomassa foi 0,03 g/l a 0,3 g/L dependendo do ensaio. O ar fornecido para este fotobiorreator foi cerca de 0,308 ar/ (L meio.min) através de um dispersor cerâmico com 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. O CO₂ foi fornecido em pulsos a cada 10 minutos durante 7 segundos com um caudal de 0.4L/min (0,28L/h). O fotobiorreator encontra-se na figura 3.3



Figura 3.3 - Reator cilíndrico de 5L.

3.2.1.3 Produção de biomassa algal em reator de placas (“flat-plate”) descontínuo

Na segunda série de testes pretendeu-se comparar o reator airlift tradicionais cilíndricos com o reator do tipo flat-plate. Para o efeito foi construído um fotobiorreator flat-plate de 7 litros, com volume útil de 5 L, usando placas de vidro na parte da frente e da retaguarda com dimensões de 28,6 cm de comprimento, 50 cm de altura e 0,5 cm de espessura, sendo a base e o topo constituído por duas placas de acrílico com dimensões 28,6 cm de comprimento, 8,5cm de largura e 1cm de espessura e duas laterais de acrílico com 1 cm de espessura e dimensões de 50cm de altura e 8,5cm de largura. Em resumo, trata-se de um vaso paralelepípedo com 8,5 cm de espessura, fornecendo uma área/volume total de 350 cm²/L. O ar e o CO₂ é alimentado ao fundo do fotobiorreator através de um dispersor modelo EW-700025-28 da marca Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos); o caudal de ar assegura também a agitação e mistura da biomassa. O caudal de ar fornecido foi de 0,308 L ar/ (L meio.min) e caudal de CO₂ foi de cerca de 0.4L/min durante 7 segundos a cada 10 minutos (0,28L/h). A concentração inicial da biomassa foi de 0,03 ou 0,5 g/L aproximadamente dependendo do ensaio.



Figura 3.4 - Reator flat-plate.

3.2.1.4 Produção de biomassa algal em reator de placas (“flat plate”) contínuo

Aos reatores descritos nas secções 3.2.1.2 e 3.2.1.3 foi anexada uma bomba peristáltica, marca Ismatec (Zurique, Suíça), alimentada de um depósito de 10 litros de capacidade contendo o meio; foram testados dois caudais, 0,5L/dia e 1L/dia, por forma alterar o tempo de residência médio nos reatores. A suspensão de biomassa removida com o mesmo caudal foi armazenada em gobelets de plástico com 3 litros de capacidade. O CO₂ foi fornecido a cada 8 minutos durante 10 segundos com um caudal de 0.4L/min (0.49L/h). O caudal de ar foi o mesmo utilizado nas secções 3.1.2.2 e 3.1.2.3.

3.2.2 Controlo do processo

De modo a monitorizar o crescimento da biomassa nos vários tipos de reatores foram utilizados três métodos diferentes. O primeiro método assenta na leitura da densidade ótica da suspensão, após a diluição adequada, usando um espectrofotómetro modelo Helios Omega (Thermo scientific, Inglaterra) fazendo um varrimento entre comprimento de onda de 400 a 800 nm. Esta determinação foi feita diariamente. O segundo método de avaliação do crescimento consistiu na contagem do número de microalgas por mililitro, usando para o efeito uma câmara de Neubauer, após as devidas diluições; a contagem é feita com o auxílio de um microscópio ótico sendo as contagens convertidas para as devidas unidades utilizando a fórmula apropriada. Estas contagens foram feitas a cada 48 horas. O terceiro método de avaliação de crescimento foi através da determinação da massa de microalgas (base seca). Tomam-se 100 ml de suspensão de algas de cada reator; centrifugou-se a 4500 rpm (numa centrífuga modelo Kn-70 da Kubota (Osaka, Japão), durante 30 minutos; retira-se o

sobrenadante e volta a suspende-se a biomassa em água destilada, procedendo a nova centrifugação durante 15 minutos. A biomassa é colocada em caixa de Petri devidamente tarada e colocadas numa estufa a 100°C durante 24h. Tendo em conta a massa seca recuperada e o volume de suspensão inicial, determina-se a concentração de biomassa no reator. Esta determinação foi realizada no início, meio e fim de cada ensaio.

De modo a monitorizar outros parâmetros, tais como a temperatura, o pH e o oxigénio dissolvido e a condutividade, utilizou-se em alguns dos reatores um sensor Aquaprobe AP2000 da Aquaread (Kent, Inglaterra).

3.2.3 Calibração entre a densidade ótica e a concentração mássica

Com vista a seguir a concentração de biomassa algal através de métodos óticos é necessário realizar uma calibração; isto é, foi necessário estabelecer a relação entre a concentração mássica e a absorvância a um determinado comprimento de onda. Para este efeito seguiram-se os procedimentos acima descritos para cada uma das determinações.

3.2.4 Consumo de azoto e fosforo

De modo a seguir a evolução das concentrações de azoto e fósforo ao longo dos ensaios foram usados kits de quantificação em cubete LCK 138 e LCK 348 (Hach, Estados Unidos) para azoto e fosforo respetivamente (figura 3.5); seguiu-se o procedimento indicado pelo fabricante. As leituras de absorvância das cubetes foram realizadas por um espectrofotómetro com tecnologia RFID modelo DR3900 (Hach, Estados Unidos da América) (figura 3.6).



Figura 3.5 - Kits de azoto e de fosforo.



Figura 3.6 - Espectrofotômetro para leitura dos kits.

3.2.5 Recuperação da biomassa algal com recurso a amido catiónico.

3.2.5.1 Preparação de amido catiónico

Preparou-se uma solução de 0,2 g/L de amido catiónico pesando 0,2g de amido catiónico em pó (ADM cationic starch 163, ADM cationic starch 168) e adicionando 1 litro de água a 60 °C, sob agitação, utilizando um agitador tipo rotor/stator; com vista a abrir as moléculas de amido, aumentou-se gradualmente a temperatura até aos 90°C, mantendo-a 15 minutos. Por fim, a solução foi arrefecida livre estabilizada à temperatura ambiente, sendo mantida com agitação constante com recurso a uma placa de agitação com agitador magnético, até a sua posterior utilização.

3.2.5.2 Comparação de diferentes tipos de amido catiónico

Para a primeira série de testes, colocaram-se 400 ml de suspensão de microalgas, com uma concentração de 0,9g/L, num gobelet de vidro, mantendo a suspensão sob agitação mecânica a 250 rpm (agitador Heidolph, Schwabach, Alemanha); passo-a-passo foi-se adicionando a solução de amido catiónico (AMD 163 ou AMD 168), dando entre cada adição 5 minutos de

espera sem agitação. Após cada adição, o potencial zeta foi medido com recurso a um medidor de potencial zeta da marca Mütek (Eclépens, Suíça). O ensaio foi terminado quando se verificou a floculação da biomassa.

3.2.5.3 Comparação de diferentes idades de microalgas

Neste ensaio foram utilizadas amostras de microalgas com diferentes idades, após recolha; mais concretamente, deixadas em repouso durante uma semana e amostras removidas 24 horas antes do ensaio, ambas com uma concentração de 0,9g/L. O restante procedimento foi semelhante ao descrito na seção anterior.

3.2.5.4 Comparação entre amido catiónico e polyDADMAC

Para esta série de testes preparou-se uma solução de amido AMD 168 e três soluções de cloreto de polidialildimetilamónio (polyDADMAC) com peso molecular de 100k–200k e 400k–500k. Cada uma das soluções foi adicionada passo-a-passo, tal como descrito acima, com exceção de neste caso se utilizar um agitador magnético (a 250 rpm) em vez do agitador mecânico, tendo em conta o baixo volume de amostra (40 ml de suspensão de microalgas com concentração de aproximadamente de 0,9g/l armazenadas há uma semana). As medições do potencial zeta da solução foram realizadas com recurso a um medidor de potencial PDC 02 da Mütek (Eclépens, Suíça).

Após floculação, uma alíquota da suspensão foi colocada num microscópico ótico munido de ocular micrométrica Nikon (Tóquio, Japão), usando uma ampliação total de 20, de forma a estimar o tamanho médio dos flocos formados logo após a floculação e depois da sedimentação total da biomassa.

3.2.5.5 Cinética de sedimentação

Nesta série de testes, as três soluções preparadas na série anterior (amido catiónico 168, polyDADMAC 100k–200k e polyDADMAC 400k–500k) foram adicionados passo-a-passo a um gobelet contendo 40 ml de suspensão de microalgas (concentração de 0,8g/L, em repouso há uma semana). As adições foram efetuadas sob agitação magnética (placa de agitação modelo MR 3001K da Heldolph (Schwabach, Alemanha), a 250 rpm durante 2,5 minutos, seguido de uma agitação a aproximadamente 150 rpm durante 2,5 minutos. As adições foram efetuadas até se verificar floculação. Após floculação, parou-se a agitação para permitir a sedimentação e registaram-se as absorvâncias na parte superior da suspensão, retirando a amostra com o auxílio de uma micropipeta inserida a 0,5 cm do topo da suspensão. As leituras de absorvância foram efetuadas durante 60 minutos, a um comprimento de onda de 685 nm, num espectrofotómetro modelo Helios Omega (Thermo scientific, Inglaterra).

3.2.6 Extração dos componentes da biomassa

3.2.6.1 Extração de compostos

Biomassa algal em suspensão com um teor de humidade da ordem dos 95%, equivalente a 200 mg secas, foi colocado num tubo de falcon de 25 ml coberto de alumínio e sujeita a centrifugação através de uma centrifugadora kn-70 da kubota (Osaka, Japão) a 3000 rpm. Após a centrifugação e remoção do sobrenadante, foi adicionado acetona e metanol nas proporções 6:3 v/v e sujeitaram-se as microalgas a disrupção celular, utilizando um homogeneizador rotor/stator (marca Ika, Staufen, Alemanha) a 17000 rpm durante 10 minutos. Após o processo de disrupção realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 10 min, de modo a separar a biomassa dos carotenoides, sendo o sobrenadante separado do pellet e colocado noutra tubo de falcon de 25 ml coberto com alumínio. O processo de disrupção e centrifugação foi repetido varias vezes até que os componentes de carotenoides fossem removidos, ficando o pellet com uma tonalidade esbranquiçada. A figura 3.7 mostra o processo e o pellet no final da extração.

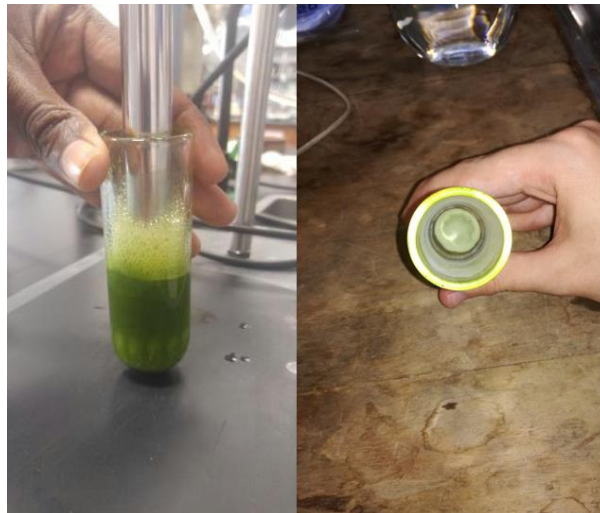


Figura 3.7 - Extração e pellet no final da extração.

Após este processo, os solventes que continham os carotenoides foram evaporados, utilizando um evaporador rotativo (Butchi, Flawil, Suíça) (figura 3.7) e o sólido resultante foi dissolvido em 15 ml de metanol de qualidade HPLC. No final do processo as amostras foram guardadas num congelador a -25 °C, até à sua posterior caracterização em HPLC.



Figura 3.8 - Equipamento rotavapor.

3.2.6.2 Identificação e quantificação de compostos

A identificação dos compostos foi realizada com recurso a cromatografia líquida acoplada a um sistema de espectrometria de massa (LC-MS), da marca Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). O sistema é constituído por quatro componentes: uma bomba Acella 600, um autosampler Acella, um detetor PDA Acella e um espectrofotómetro de massa LCQ Fleet.

A coluna usada para a separação foi do tipo C18, da marca Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), modelo HyperSil Gold com tamanho de partícula 5 μm e dimensões 150 x 4,6 mm (figura 3.8).



Figura 3.9 - Equipamento LC-MS.

As amostras foram diluídas em metanol 1:10 e filtradas com recurso a filtro de 0,25 μm de nylon antes de se proceder à análise em HPLC.

A cromatografia foi realizada em modo de gradiente, fazendo variar no tempo a composição do eluente (Ver tabela 3.2). A fase móvel foi composta pelos seguintes solventes: A contendo 0.5M de acetato de amónio em metanol e água nas proporções 85:15 v/v, o solvente B contendo acetonitrilo e água nas proporções 90:10 v/v e solvente C contendo acetato de amónio. O fluxo foi de 300 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabela 3.2- Composição do eluente.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>A%</i>	<i>B%</i>	<i>C%</i>
0	40	60	0
5	100	0	0
25	80	0	20
70	50	0	50
80	30	0	70
90	30	0	70
100	100	0	0
105	40	60	0
110	40	60	0

Os comprimentos de onda usadas na análise foram 440 nm para a luteína, 460 nm para o β -caroteno e 665 nm para a clorofila A.

Para a quantificação de alguns compostos, foi construída uma reta de calibração utilizando os correspondentes padrões comerciais. Como padrões foram usados o β -caroteno e a astaxantina. Para as retas de calibração explorou-se a gama 3,25–52 mg.ml⁻¹.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se e analisam-se os resultados obtidos relativos aos seguintes tópicos:

- Produção de biomassa algal em reatores com diferentes configurações, nomeadamente com diferentes relações de área de captação de luz por unidade de volume, diferentes concentrações de nutriente e diferentes modos de operação (descontínuo e contínuo);
- Processo de recuperação de biomassa algal através de sedimentação, utilizando amido catiónico e polyDADMAC como agentes de coagulação/floculação;
- Extração de carotenóides e sua identificação e quantificação através da técnica de LC-MS.

4.1 Produção de biomassa algal

4.1.1 Produção de massa algal em fotobiorreatores air-lift

A primeira serie de testes de produção de biomassa algal teve como objetivo comparar o crescimento das microalgas no mesmo tipo de reator cilíndrico, mas diferentes volumes e, em consequência, diferentes áreas de captação de luz/volume. O crescimento foi avaliado durante 20 dias, através da medição da densidade ótica, habitualmente utilizada para o efeito. A extensa utilização deste método decorre da facilidade de implementação e de requerer equipamento disponível em qualquer laboratório químico, o espectrofotómetro. No entanto, na maioria dos casos é necessário converter esta medida em concentração de biomassa. Para o efeito construiu-se a reta de calibração que relaciona a absorvância a um determinado comprimento de onda com a concentração de biomassa algal. A Figura 4.1 ilustra os resultados obtidos, tendo-se obtido a equação (1) seguinte:

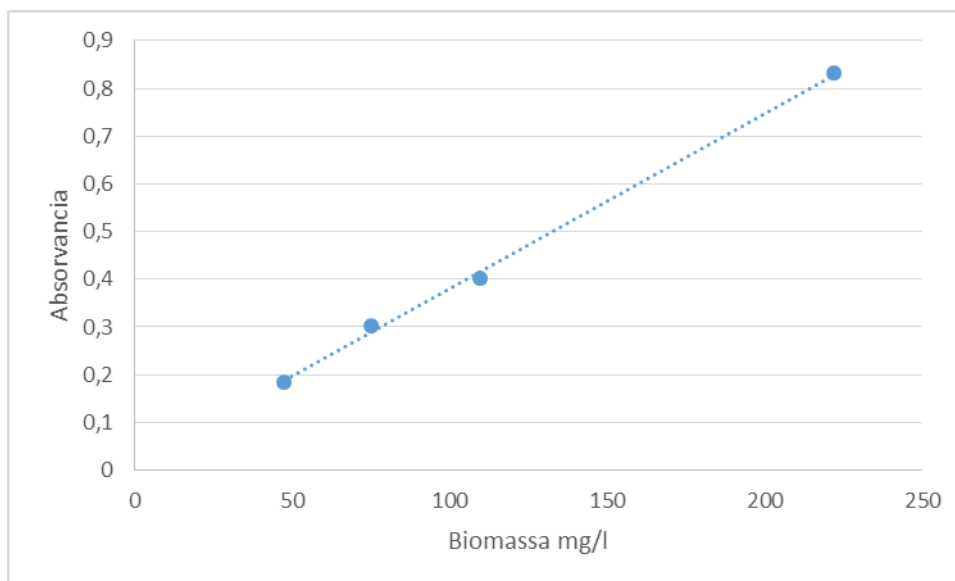


Figura 4.1 - Reta de calibração de biomassa.

$$[Biomassa] = 0,0037 * ABS + 0,0131 \quad R^2 = 0,9985 \quad (1)$$

Tendo em conta que o meio de cultura contém nutriente (sais) em concentrações significativas que podem ser tomados por biomassa, após a medida das absorvâncias, esta foi lavada através de centrifugações sucessivas com vista a assegurar a efetiva contabilização da biomassa algal. Numa fase posterior do trabalho, a determinação da concentração da biomassa foi realizada por filtração, utilizando filtro de microfibra de vidro com porosidade que veio a revelar-se adequada à recuperação da biomassa algal (embora exigindo elevados tempos de filtração (podendo chegar a horas) sob vácuo). A gama de concentrações utilizada para construir a reta de calibração está entre 48 mg/L e 222 mg/L.

Nesta 1ª série de ensaios foram usados Frascos “Scott” de 1L, com área superficial volumétrica de 226 cm²/L e duas concentrações iniciais de biomassa 300 mg/L e 600mg/L e um reator cilíndrico de 4L com área superficial volumétrica de 111.4 cm²/L com uma concentração inicial de 300 mg/L. Estas áreas consideram apenas metade da área superficial do vaso uma vez que nesta série de ensaios se utilizou apenas iluminação de um dos lados dos reatores. As concentrações de nutrientes e restantes condições foram mantidas constantes. Os resultados do crescimento encontram-se na figura 4.1

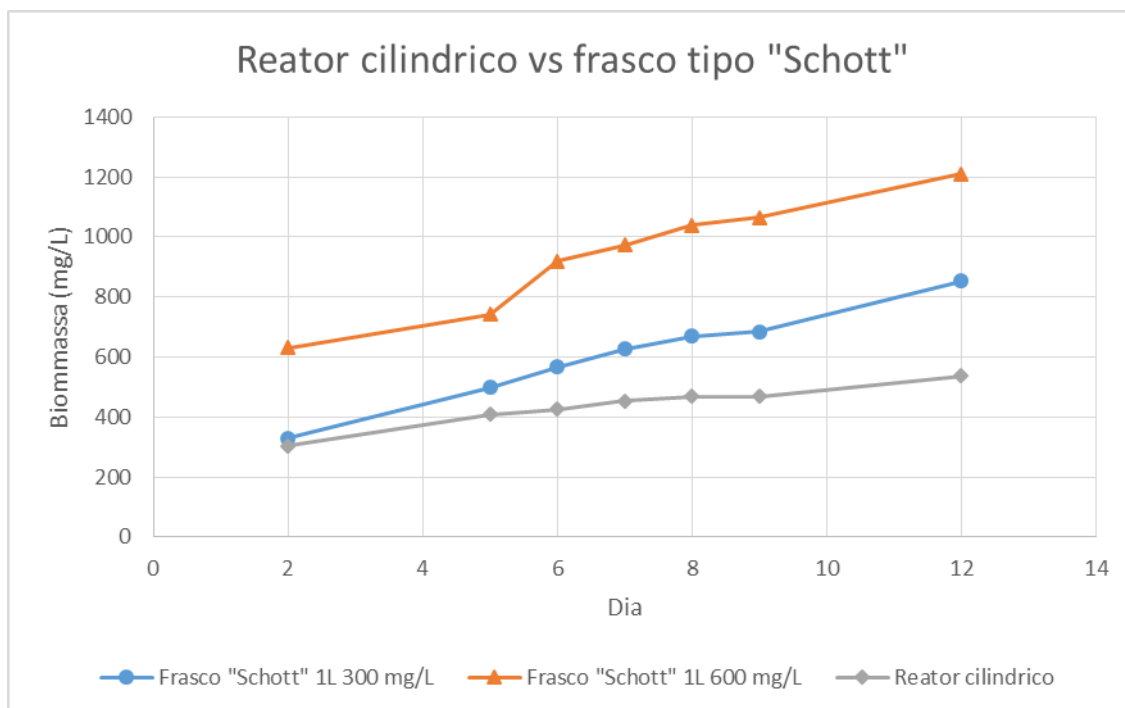


Figura 4.2 - Crescimento da biomassa algal em reatores cilíndricos de 1L e em um reator cilíndrico de 4L.

Observando o gráfico verifica-se que o reator cilíndrico obteve uma concentração final de 537,86 mg/L, enquanto o frasco tipo “Schott” com a mesma concentração inicial obteve 854,08 mg/L. Este resultado evidencia claramente o efeito da área/volume sobre a velocidade de crescimento, sugerindo que nas condições escolhidas a incidência luminosa é o fator limitante para o crescimento. De realçar que a intensidade luminosa disponibilizada pelas lâmpadas era da ordem dos 440 $\mu\text{mol fotões}/(\text{m}^2.\text{s})$. O frasco tipo “Schott” com uma concentração inicial mais elevada (600 mg/L) obteve uma concentração final 1210,03 mg/L. Com base nos dados da concentração foi possível determinar a produtividade média acumulada e o crescimento específico, obtendo-se os seguintes resultados.

Tabela 4.1 - Produtividade crescimento da biomassa algal.

Reator	Produtividade dia ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	Crescimento específico (dia^{-1})
Frasco “Schott” 1L; 600 mg/L	64,45	0,075
Frasco “Schott” 1L; 300 mg/L	58,31	0,11
Cilíndrico 5 L; 300 mg/L	25,90	0,06

Analisando os resultados, confirma-se que o reator cilíndrico de 4l teve o pior desempenho em termos de produtividade, assim como de crescimento específico. De notar que o frasco tipo “Schott” com concentração inicial de 600 mg/L obteve maior produtividade média acumulada, mas menor crescimento específico que o frasco equivalente com uma concentração de biomassa inicial mais baixa. Estes resultados são expectáveis, já que o frasco com mais baixa concentração de biomassa ao longo de todo o crescimento terá sido exposto a maior incidência luminosa que assegurou maior crescimento específico (0.11 g de biomassa nova/ (g de biomassa existente.dia). O frasco correspondente com maior concentração de biomassa ao longo de todo o ciclo de crescimento (ver fig. 4.2) apresenta menor irradiância e em consequência menor crescimento específico (0.075 dia⁻¹), mas como apresentava um inóculo inicial mais denso produz mais biomassa num dado período de tempo.

Comparando estes resultados com os da literatura pode-se observar que a produtividade deste ensaio foi semelhante aos obtidos por Pires et al. [23], contudo o crescimento específico foi inferior. Comparando com os resultados obtidos por Gonçalves et al. [90] foi possível obter um crescimento específico mais elevado contudo a produtividade média foi inferior. Observando a concentração de biomassa máxima produzida, é possível verificar que os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos por Pires et al.[23] e Chiu et al.[91], mas foram inferiores aos obtidos por Cheng et al.[92] e Yeh et al.[93]. Tal pode ser devido à estirpe utilizada nesta dissertação ser menos produtiva do que as utilizadas nos trabalhos de Cheng et al. e Yeh et al., que usaram estirpes de origem asiática.

Durante este ensaio foi colocado no reator cilíndrico de 4l uma sonda para monitorizar o pH, a temperatura e o oxigénio dissolvido, tendo-se registado os dados a cada 10 minutos num total de 309 horas. Os resultados estão representados na figura 4.2 e 4.3.

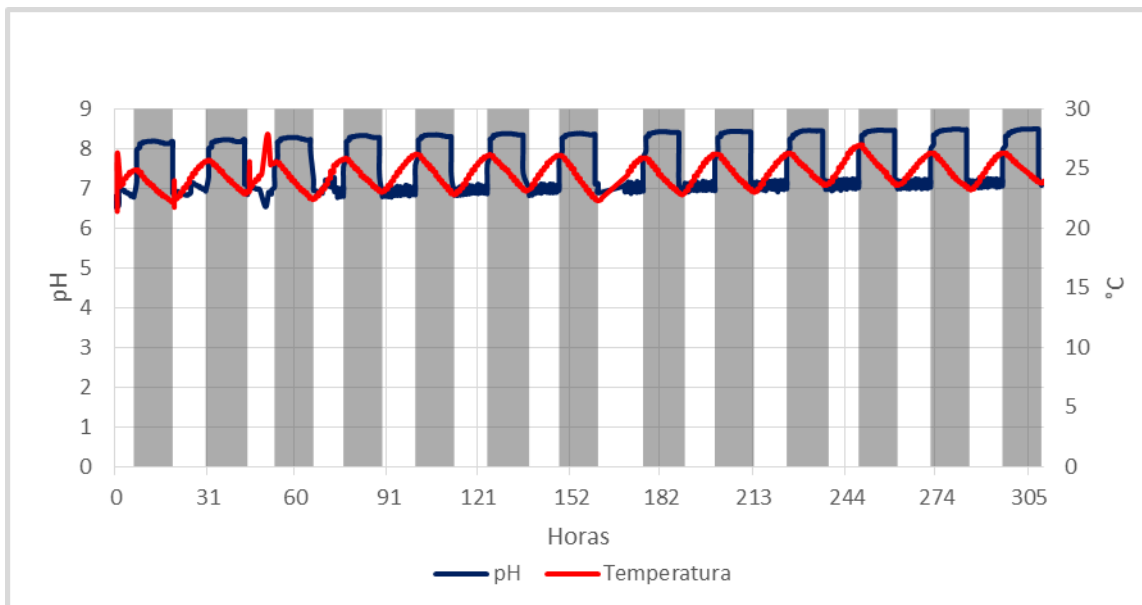


Figura 4.3 - PH e temperatura ao longo do ensaio.

Analisando o gráfico é possível observar que durante o dia (zona clara) o pH encontra-se num nível baixo comparado com o período noturno (zona sombreada). Em teoria durante o dia deveria ocorrer um aumento do pH devido ao processo de fotossíntese que produz O_2 e consome CO_2 . De facto não é isso que se observa. Este resultado deve ficar a dever-se a que durante o dia se faz injeção de CO_2 no meio, o que faz baixar o pH. Durante a noite não se injeta CO_2 e o pH sobe, apesar do processo de respiração, que faria descer o pH.

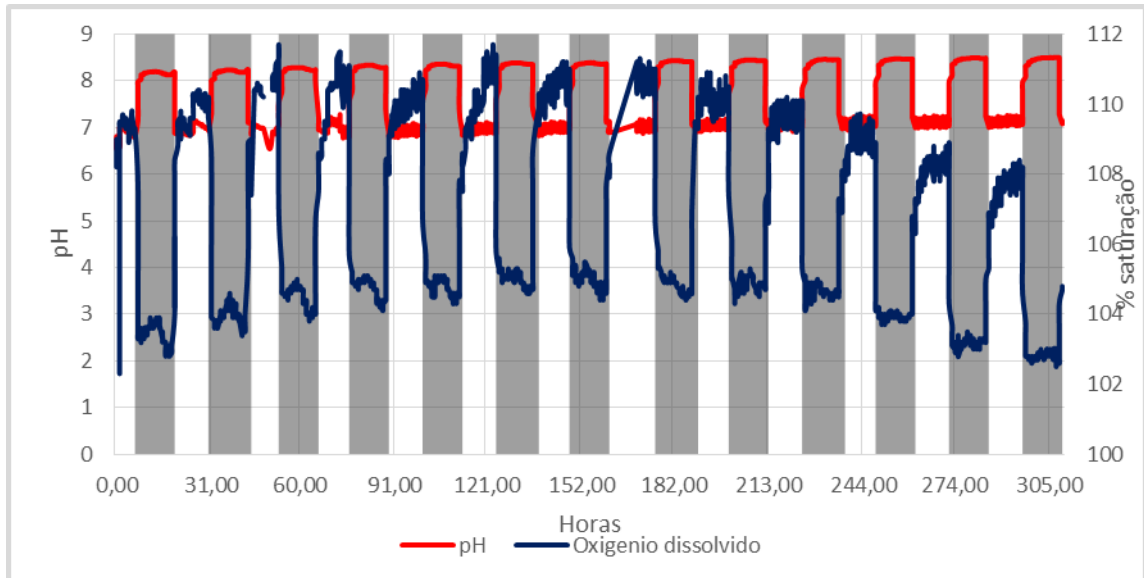


Figura 4.4 - PH e oxigénio dissolvido ao longo do ensaio.

Analisando a figura 4.3 verifica-se um fenómeno semelhante ao da figura anterior. Durante o dia ocorre atividade fotossintética e liberta-se oxigénio enquanto de noite há consumo de oxigénio e a sua concentração baixa.

4.1.2 Comparação do crescimento entre fotobiorreatores cilíndricos e flat-plate

Na segunda série de ensaios o objetivo foi comparar o crescimento de biomassa algal em fotobiorreatores cilíndricos e em fotobiorreatores flat-plate. O volume útil dos dois reatores foi de 5L. O reator cilíndrico apresenta uma área específica de iluminação de $222,8 \text{ cm}^2/\text{L}$ e o reator flat-plate de $350 \text{ cm}^2/\text{L}$, considerando que os reatores recebiam iluminação de dois lados. Neste ensaio foi aplicado uma fonte de luz extra proveniente de uma placa de Led's descrita no capítulo anterior. Este ensaio decorreu durante 65 dias, sendo monitorizado o crescimento das microalgas através de espectrofotometria e contagem de células. A escolha da contagem de células para monitorizar o seu crescimento deve-se ao facto de o uso do método de pesagem de biomassa levar a perdas de volume do meio bastante elevadas, não sendo por isso aconselhado o seu uso em processos descontínuos. Contudo, em alguns casos fez-se a determinação gravimétrica. Ao longo do período do ensaio foram alteradas as concentrações de nutrientes, tais como azoto e fósforo. O número de células inicial foi de $3,02 \times 10^7$ e $2,74 \times 10^7$ células/ml para o reator flat-plate e cilíndrico respetivamente,

correspondendo a uma concentração inicial da ordem dos 30mg/L para ambos os reatores. Os resultados desse crescimento encontram-se na figura 4.4 e 4.5, respetivamente para a concentração de biomassa e número de células por ml, para a período completo da série.

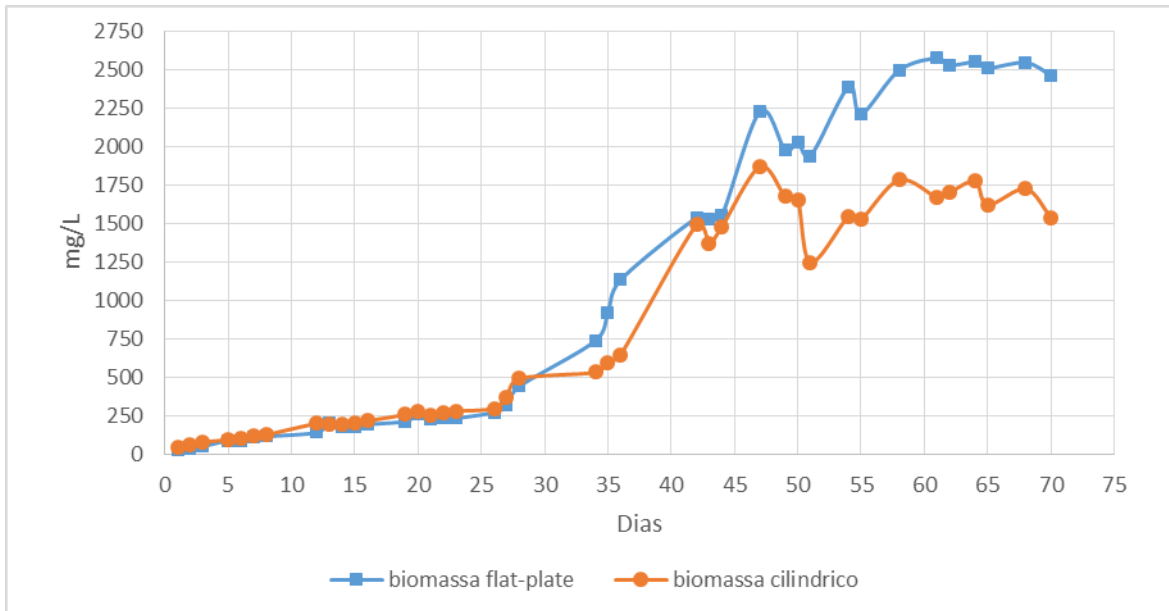


Figura 4.5 - Evolução da biomassa algal em reatores cilíndricos e flat-plate (diluição 1:3 e espectrofotometria).

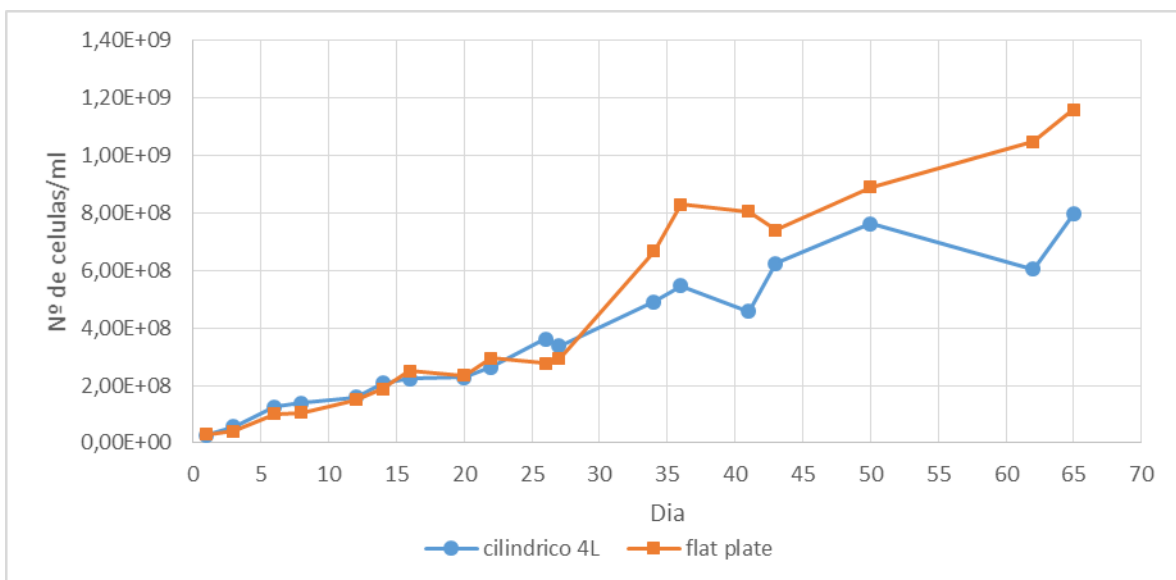


Figura 4.6 - Evolução da biomassa algal em reatores cilíndricos e flat-plate.

A análise dos resultados de crescimento pode ser dividida em três períodos. O primeiro período decorreu entre o dia 1 e o dia 26 do ensaio. Neste período as condições de nutrientes foram as normais (1N1P). No fim deste período o número de células no fotobiorreator flat-plate foi de $2,76 \times 10^8$ células/ml e para o reator cilíndrico foi de $3,61 \times 10^8$ células/ml. Este crescimento significa uma produtividade diária de $9,47 \times 10^6$ células. $\text{ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ que corresponde a $9,29 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para o reator flat-plate e $1,28 \times 10^7$ células. $\text{ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ correspondente a $10,25 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para o reator cilíndrico. Neste período o crescimento específico dos reatores flat-plate e cilíndrico foi $0,084 \text{ dia}^{-1}$ e $0,088 \text{ dia}^{-1}$. Em resumo, apesar das produtividades serem semelhantes, o reator flat-plate apresenta desempenho algo inferior provavelmente devido à elevada intensidade de radiação efetivamente sentida pelas microalgas, atendendo também à baixa concentração de biomassa. As produtividades médias acumuladas neste período são bastante inferiores às verificadas na 1ª série de ensaios, o que deve ter ocorrido devido à menor densidade populacional inicial neste ensaio, o que poderá ter resultado em fotoinibição. Para o reator cilíndrico, neste período a concentração de N e P desceu de 70 mg N/L e 20 mg P/L para 32.4 mg N/L e 3.15 mg P/L. No que diz respeito ao flat-plate as concentrações iniciais foram as mesmas e as finais foram 35.1 mg N/L e 6.11 mg P/L. Estes resultados são coerentes com a produção de biomassa.

A partir do dia 27 até ao dia 49 iniciou-se o segundo período. Neste período triplicou-se a concentração de azoto e fósforo, isto é 3N3P, para perceber a resposta das microalgas ao aumento dessa concentração de nutrientes. Para o fotobiorreator flat-plate, o número de células para o dia 27 foi de $2,93 \times 10^8$ células/ml, sendo que no final deste período, dia 50 do ensaio, o número de células era de $8,9 \times 10^8$ células/ml, obtendo uma produtividade de $2,60 \times 10^7$ células. $\text{ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, correspondendo a $75,22 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e a um crescimento específico de $0,09 \text{ dia}^{-1}$. Para o reator cilíndrico o número de células inicial foi de $3,38 \times 10^8$ células/ml, sendo no fim deste período $7,64 \times 10^8$ células/ml, com uma produtividade de $1,85 \times 10^7$ células. $\text{ml}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ equivalente a $59,26 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e a um crescimento específico de $0,06 \text{ dia}^{-1}$. Neste período, a produtividade do reator flat-plate foi muito superior à do reator cilíndrico. Tal pode ser explicado devido ao facto da concentração de microalgas ser mais elevado quando comparando com o 1º período que permitiu que as algas suportassem melhor a iluminação incidente levando a um maior crescimento. O aumento da produtividade do reator cilíndrico não foi tão elevado, quando comparado com o reator flat-plate, o que deve ficar a dever-se à menor área/volume para captar luz. Contudo, comparando a produtividade do reator cilíndrico neste período com período anterior, é possível verificar que a produtividade média é mais elevada. Este resultado decorre principalmente da maior concentração de biomassa suportado também pelo aumento da concentração de azoto e fósforo. Para o reator flat-plate, neste período os níveis de azoto variaram entre 258 mg N/L (início) e 73 mg N/L (final), o que corresponde a uma incorporação de 0,111 mg N/mg de biomassa. Para o fósforo os níveis variaram entre 43.29 mg P/L (início) e 15.36 mg P/L (final) correspondendo a uma incorporação de 0,016 mg P/mg de biomassa.

O terceiro período foi a partir do 50º dia do ensaio até ao último dia do ensaio (65º dia). Neste período a concentração de azoto e fosforo foi reduzida para 2N2P. O número de células para o fotobiorreator flat-plate passou de $8,9 \times 10^8$ células/ml para $1,16 \times 10^9$ células/ml, com uma produtividade média no período de $1,79 \times 10^7$ células.ml⁻¹.dia⁻¹ correspondendo a 32,25 mg.L⁻¹.dia⁻¹ e a um crescimento específico de 0,14 dia⁻¹. Para o reator cilíndrico de 4L o número de células passou de $7,64 \times 10^8$ células/ml para $7,97 \times 10^8$ no final do período, obtendo uma produtividade média no período de $2,22 \times 10^6$ células.ml⁻¹.dia⁻¹. Neste período a produtividade e o crescimento específicos do reator cilíndrico foram próximos de zero; o crescimento e morte celular equivaleram-se. Comparando este período com os dois anteriores, parece poder concluir-se que ao nível de concentração atingida (à volta de 1.5 g/L) a intensidade luminosa “sentida” pelas células é diminuta. Relativamente ao reator flat-plate, com maior área específica para captação de luz (350 cm²/L face a 222.8 cm²/L), a concentração de biomassa continua a subir, bem como o número de células, mas a produtividade (32.25 mg/L⁻¹ dia⁻¹) e crescimento específico (0.014 dia⁻¹) diminuem significativamente face aos períodos anteriores. Com os dados disponíveis, parece que o fator limitante do crescimento será a luz, mas o assunto tem de ser aprofundado. O N e P estão em excesso; o C é fornecido na forma de CO₂ à média de 0,28L/h, o que ultrapassa em muito as necessidades, mesmo assumindo uma eficiência de absorção inferior a 20%. O resumo da produtividade e crescimento encontram-se na tabela A1 em anexo.

No segundo e terceiro períodos foram retiradas amostras pontuais de biomassa para determinar a sua concentração por via gravimétrica. Na figura 4.7 comparam-se esses valores com as determinações do número de células contadas na câmara de Neubauer. Em geral, há uma boa concordância entre as medidas independentes, o que reforça os resultados experimentais apresentados ao longo desta seção.

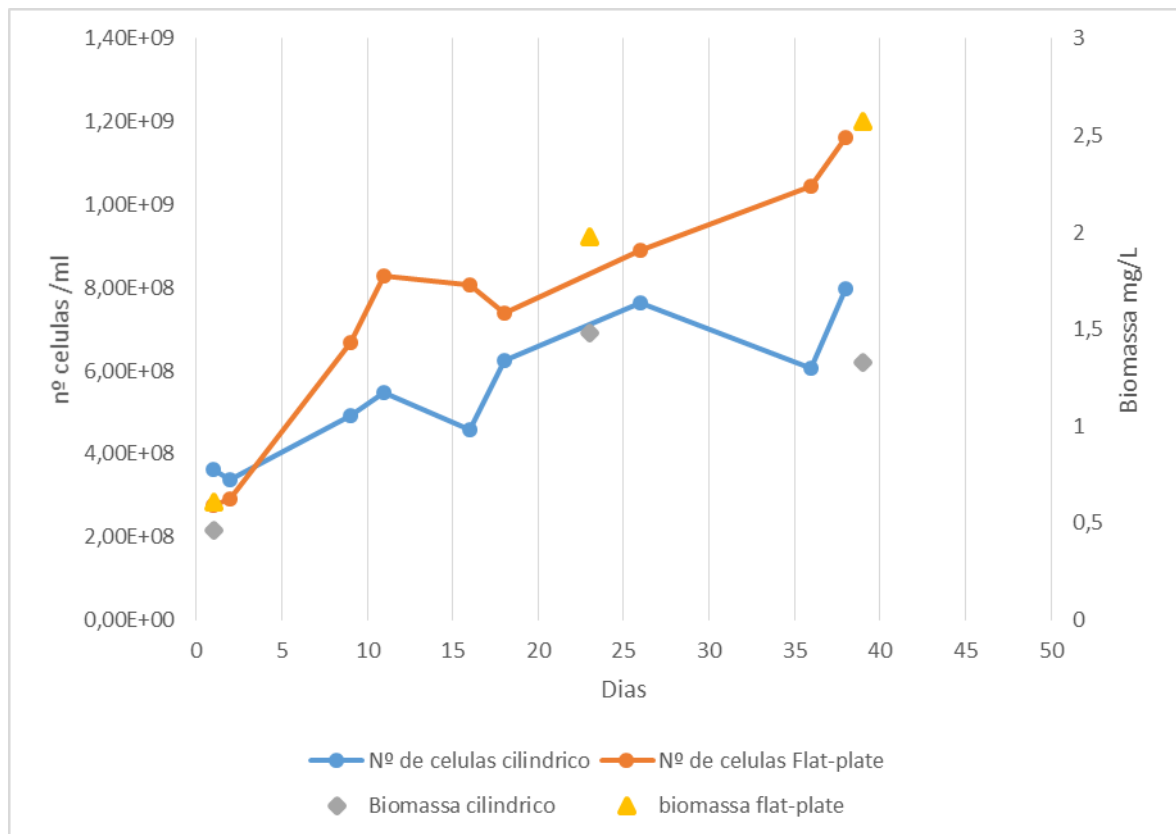


Figura 4.7 - Comparação entre a concentração de biomassa algal (determinação gravimétrica) e a concentração de células.

Em resumo, conclui-se também que a um excesso de irradiância luminosa nos momentos iniciais da fase de crescimento pode ter sido prejudicial à taxa de crescimento no reator flat-plate. No caso do reator cilíndrico a densidade celular elevada impediu que todas as células fossem expostas à mesma incidência luminosa levando a que no terceiro período se registasse a produção mais baixa quando comparado com os outros dois períodos. Concluindo-se que os efeitos limitativos da luz neste reator afetaram grandemente o crescimento das microalgas. Verificou-se também que o aumento da concentração de nutrientes tem um efeito positivo no crescimento da biomassa neste reator.

4.1.3 Comparação do crescimento da biomassa em fotobiorreatores cilíndricos e flat-plate em modo contínuo

Neste ensaio o objetivo foi comparar o crescimento da biomassa algal em fotobiorreatores airlift cilíndricos e em fotobiorreatores de placas, com as área específicas volumétricas de captação de luz de 222,8 cm²/L e 350 cm²/L, a funcionarem em modo contínuo, i.e., com alimentação contínua de meio de cultura com nutrientes, à concentração desejada, e com remoção da suspensão de biomassa do reator ao mesmo caudal. O ensaio decorreu durante 72 dias, por períodos, com alterações no caudal e na concentração de nutrientes ao longo dos diferentes períodos. A monitorização do crescimento foi realizada através de espectrofotometria e da determinação de massa algal por gravimetria. Neste ensaio as

concentrações iniciais de microalgas foram 0,45 g/L para o reator flat-plate e 0,24 g/L para o reator cilíndrico de 5L. A concentração mais baixa do reator cilíndrico serve para tentar minimizar de certa forma os efeitos limitativos referentes à baixa área superficial. Os resultados do crescimento da biomassa encontram-se na figura 4.8.

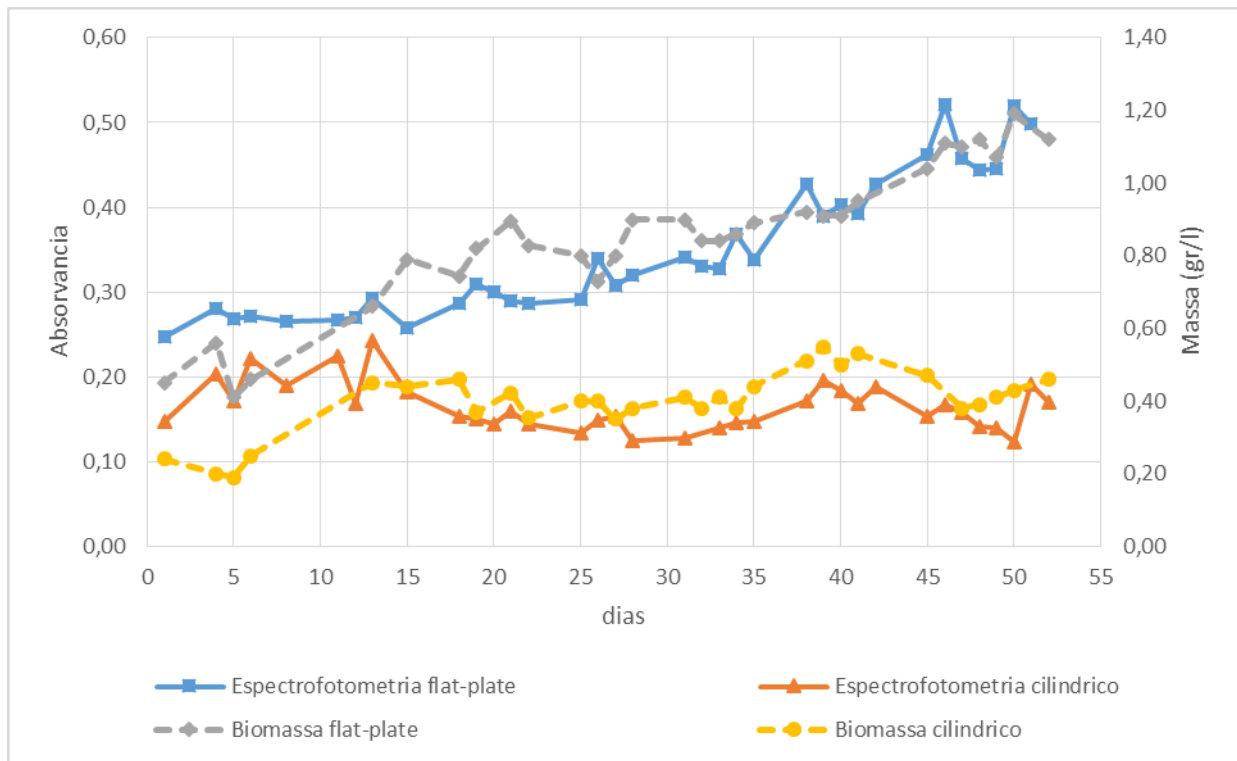


Figura 4.8 Evolução temporal da concentração de biomassa, medida gravimetricamente e através de espectrofotômetro com diluição 2:30 em reatores cilíndricos e Flat-plate operados em modo contínuo.

No primeiro período, que decorreu entre o 1º dia e o 15º dia, a concentração de nutrientes na alimentação foi mantida no valor de referência 1N1P e o caudal foi de 1 L/dia, o que corresponde a um tempo de residência médio de 5 dias. Os resultados sugerem que os 15 dias não foram suficientes para se atingir o estado estacionário, já que a concentração de biomassa não estabilizou ao fim deste período; pelo contrário, foi subindo até 0,79 g/L (partindo de 0,45 g/L) no caso do reator flat-plate e até 0,44 g/L (partindo de 0,24 g/L) para o reator cilíndrico. No final do período, a produtividade do reator flat-plate era de 0,158 g.L reator⁻¹.dia⁻¹ e o crescimento específico foi 0,2 dia⁻¹. Para o reator cilíndrico a sua produtividade foi 0,088 g.L reator⁻¹.dia⁻¹ e o seu crescimento foi de 0,2 dia⁻¹. Comparando os valores de produtividade e crescimento específico dos reatores em operação em contínuo com os de operação em descontínuo observa-se que a produtividade e o crescimento específico do reator flat-plate em contínuo foi muito superior (158 vs 75 mg.L⁻¹.dia⁻¹ e 0,2 vs 0,08 dia⁻¹) face ao mesmo reator operado em descontínuo. No reator cilíndrico observou-se a mesma tendência (88 vs 59 mg.L⁻¹.dia⁻¹ e 0,2 vs 0,07 dia⁻¹). Estes resultados devem decorrer da

estabilidade da concentração de nutrientes e principalmente da renovação da biomassa; i.e. da diminuição da idade média da população.

Entre o 15º e o 31º dia, o caudal foi reduzido para 0,5L/dia, mantendo a concentração de nutrientes na alimentação, o que aumenta o tempo de residência médio para 10 dias, fazendo com que a estabilidade tenha sido atingida. Isto levou a um aumento da concentração biomassa de 0,79 g/L para 0,9 g/L no reator flat-plate, representando uma produtividade de 0,090 g.L reator⁻¹.dia⁻¹ e crescimento específico de 0,1 dia⁻¹; para o reator cilíndrico os valores correspondentes são 0,041 g.L reator⁻¹.dia⁻¹ e crescimento específico de 0,1 dia⁻¹. Neste período houve um decréscimo da produtividade dos dois reatores, o que pode ser devido ao aumento do tempo de residência das microalgas com o consequente aumento da idade média da biomassa.

Entre o 31º e o 52º dia, a concentração de nutrientes foi triplicada, isto é 3N3P, mantendo-se o caudal em 0,5L/dia. Neste período o reator flat-plate registou um aumento de 0,90 g/L para 1,02 g/L, representando uma produtividade de 0,102 g.L⁻¹.dia⁻¹ e crescimento 0,1 dia⁻¹. De notar que durante este período foi atingido a concentração máxima de biomassa algal neste fotobiorreator de 1,19 g/l; contudo no final deste período ocorreu um decréscimo da concentração da biomassa. O reator cilíndrico aumentou de 0,41 g/L no início deste período, para 0,48 g/L no final, significando uma produtividade de 0,048 g.L reator⁻¹.dia⁻¹ e crescimento 0,1 dia⁻¹. Comparando este período com o período anterior verifica-se que houve um aumento, embora ligeiro, da produtividade diária nos dois reatores, não ficando claro o efeito positivo do incremento da concentração de nutrientes. Comparando a produtividade destes fotobiorreatores em modo contínuo com os do ensaio anterior em modo descontínuo verifica-se que para o caso do reator flat-plate a produtividade foi superior ao mesmo reator em modo descontínuo. Contudo comparando o reator cilíndrico em modo contínuo verifica-se que este obteve uma produtividade inferior em modo contínuo (48 mg.L⁻¹.dia⁻¹) do que em descontínuo (59,26 mg.L⁻¹.dia⁻¹). O resumo dos resultados da produtividade e crescimento específico encontram-se na tabela A2 em anexo.

Em resumo, pode afirmar-se que os fotobiorreatores operados de modo contínuo obtêm produtividades superiores aos correspondentes descontínuos. Conclui-se também que o uso de fotobiorreatores flat-plate é mais vantajoso que os reatores cilíndricos, devido à sua maior área superficial, contudo é necessário um maior controlo da luminosidade na fase inicial de crescimento com baixa concentração de biomassa.

4.2 Avaliação do consumo de azoto e fosforo

O objetivo deste ensaio foi avaliar com mais detalhe o consumo de azoto e fosforo em um fotobiorreator. Para tal foi preparado um fotobiorreator cilíndrico de 5 L com uma concentração inicial de biomassa de 0,1g/L. O tempo de ensaio foi 39 dias sendo que ao 28º

dia foi adicionado nova solução concentrada de N e P por forma repor a concentração de nutrientes iniciais. Os resultados dos ensaios encontram-se na figura 4.8. As concentrações de N e P foram determinadas no início e nas zonas de estabilização da biomassa.

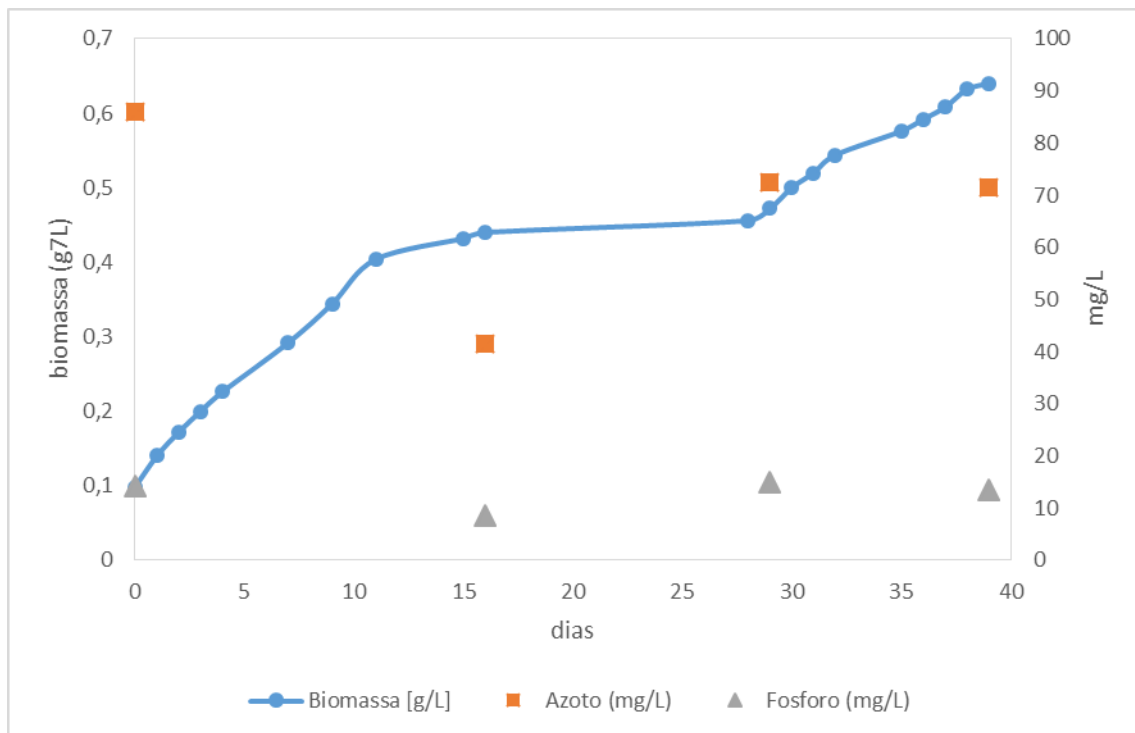


Figura 4.9 Evolução do crescimento da biomassa algal e consumo de azoto e fósforo.

Observando o gráfico é possível observar que a concentração de biomassa estabiliza num primeiro momento ao 16º dia com uma concentração que por volta dos 0,45 g/L (medida pelo procedimento de filtração e pesagem). Estes resultados correspondem a uma produtividade média acumulada de $22,19 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e um crescimento de $0,097 \text{ dia}^{-1}$. O valor do crescimento específico está em linha com os observados para a 2ª série de ensaios em reator equivalente. De notar que a produtividade decorre do crescimento específico e da concentração da biomassa ao longo do processo de crescimento.

O consumo estequiométrico de N foi de aproximadamente 132 mg de N/g de biomassa. O correspondente coeficiente estequiométrico para o P é 17 mg de P/g de biomassa.

A partir do dia 28, com a reposição dos nutrientes ocorre num novo crescimento, e ao 39º dia atingiu-se a concentração de 0,64 g/L. Este crescimento correspondeu a uma produtividade de $16,72 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e a um crescimento específico de $0,03 \text{ dia}^{-1}$. Tendo em conta que os níveis de azoto e fósforo foram repostos e que o caudal médio de CO_2 ao reator se manteve, pode concluir-se que outros fatores, nomeadamente a intensidade de radiação efetiva seja o fator limitante do crescimento. Nesta fase os consumos de N e P foram aparentemente marginais, dentro dos limites do erro experimental.

4.3 Recuperação de biomassa algal com recurso a amido catiónico

O custo de recuperação da biomassa algal é um dos pontos críticos na viabilidade técnico-económica da exploração industrial das microalgas. A baixa concentração a que é produzida a biomassa, tendo por consequência a necessidade de remover muita água, e baixa sedimentabilidade da biomassa são os aspetos críticos. Por um lado, durante a produção interessa manter a biomassa dispersa; por outro, para a sua recuperação interessa a sua coagulação/floculação. A utilização de agentes floculantes externos é uma das vias a explorar. Neste trabalho testaram-se duas amostras de amido com diferentes graus de cationicidade e um polímero sintético, o polyDADMAC.

4.3.1 Comparação de diferentes tipos de amido catiónico

De modo a perceber quais das amostras de amido fornecidas eram mais eficazes na neutralização da carga de superfície das microalgas, foram realizadas ensaios com recurso a um aparelho medidor do potencial zeta. Tomaram-se 400 ml de suspensão (0,9 g/L de biomassa) e utilizaram-se dois tipos de amido (com diferentes graus de cationicidade), após cozimento e preparação à concentração de 0,02 g/ml.

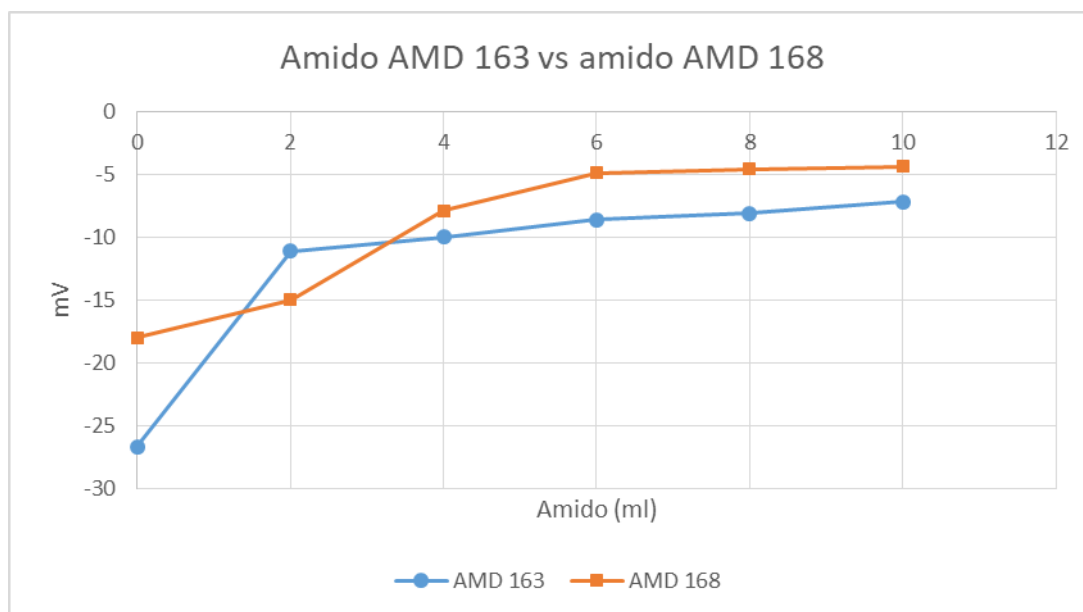


Figura 4.10 - Evolução do potencial zeta com a adição de solução de amido AMD 163 AMD 168 (ambos à concentração de 0,02 g/ml).

Como é possível observar pela figura 4.9, a amostra de amido catiónico com a designação AMD 168 conseguiu uma neutralização mais eficaz da carga de superfície da biomassa, comparativamente com a amostra AMD 163 de amido catiónico. Admitindo por exemplo um objetivo de -5 mV, são necessários 6 ml de solução de amido AMD 168, enquanto o amido AMD 163 não atinge o objetivo com os volumes testados. Segundo o fornecedor o AMD 168 tem uma carga catiónica superior ao AMD 163; assim, estes resultados estão de acordo com o esperado.

O maior grau de substituição do AMD 168 faz com que a eficiência de neutralização seja superior devido à maior presença de substituintes de carga de positiva[94]. Isto faz com que para cada molécula de amido que se liga à superfície da microalga a carga de superfície aumente mais comparativamente uma molécula menos substituída. Tendo em conta estes resultados, os ensaios posteriores foram realizados com a amostra de amido catiónico AMD 168. A figura 4.9 mostra o processo de sedimentação da amostra após tratamento com 10 ml de amido AMD 168. Tendo em conta os volumes de suspensão de microalga e amido, bem como as suas concentrações, calculou-se a carga de amido adicionada que deu cerca de 61% (m/m).

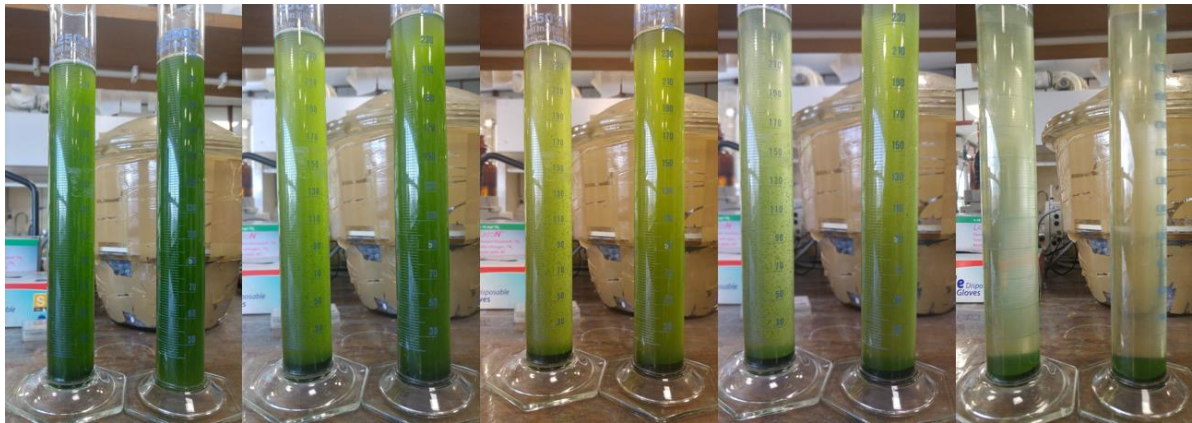


Figura 4.11 - Evolução da sedimentação de uma amostra de microalgas com a adição de amido catiónico AMD 168.

De seguida, para perceber se o tempo de repouso da biomassa entre o momento da sua remoção do reator e a adição de amido (com uma concentração de 0,2g/L) influenciavam os resultados, foram realizados ensaios comparando algas removidas uma semana antes do início do ensaio, estando em repouso durante esse tempo, e algas removidas no dia anterior à realização do ensaio.

Verificou-se que as algas que tinham estado em repouso (“a envelhecer”) durante uma semana necessitaram de 13,2 % (m/m) de amido face à biomassa seca tratada para que ocorresse floculação e posterior sedimentação da biomassa; neste caso este processo demorou cerca de 10 minutos. Na amostra em repouso há um dia não foi possível observar qualquer floculação da biomassa após a adição da mesma percentagem de amido, nem se observou essa floculação passadas 24 horas da adição do amido. Esse resultado indicam que o estado biológico das algas afeta a sua tendência para flocularem e sedimentarem. Este facto faz com que a sua carga de superfície seja mais estável do que as algas removidas há menos tempo, que se encontram com cargas mais instáveis devido à sua ainda elevada reprodutibilidade[95]. A figura 4.11 mostra o resultado do processo de sedimentação ao fim de 24 horas.



Figura 4.12 - Comparação entre algas sedimentadas removidas há uma semana com algas removidas, há um dia, ao cabo de 24 horas de sedimentação.

4.3.2 Comparação entre amido catiónico e polyDADMAC

O desempenho do amido catiónico, um polímero natural, foi comparado com um floculante sintético, o polyDADMAC, mas com diferentes massas moleculares. Utilizando um volume de biomassa algal de 40 ml (0,9 g/L), foi adicionando-se gradualmente solução de polyDADMAC com a concentração de 10 g/L, monitorando-se o potencial zeta. Os resultados relativos ao polímero sintético encontram-se na figura 4.12.

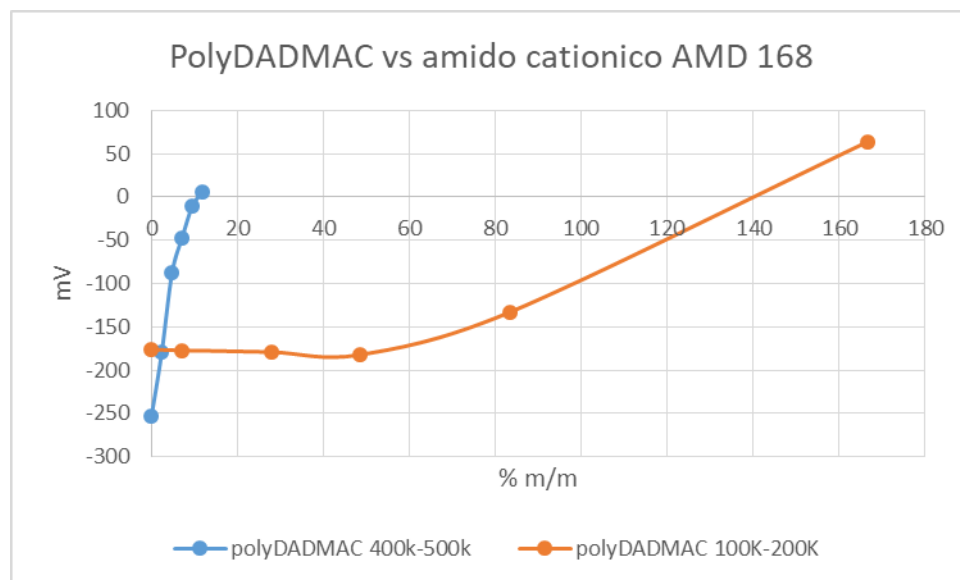


Figura 4.13 - Comparação entre dois tipos de polyDADMAC.

Como é possível observar pelos gráficos o melhor floculante corresponde ao polyDADMAC de maior massa molecular disponível, 400k-500k, sendo que neste caso foi necessário 11,85 % m/m para neutralizar a carga de superfície. Para a amostra 100k-200k foram necessários 139%

m/m. o resultado do polyDADMAC 100k-200k mostra que este é pouco eficaz na neutralização da carga de superfície. É de notar que usando este tipo de floculante é possível neutralizar completamente a superfície das microalgas e obter cargas positivas, algo que não é possível obter quando se usa amido catiónico. Por outro lado, assumindo que o polyDADMAC apresenta a mesma densidade de carga, os resultados indicam que o comprimento das cadeias poliméricas joga um papel muitíssimo importante no desempenho do polímero no processo de floculação, o que faz sentido. Sendo assim, uma possibilidade a explorar no futuro seria ter amidos com diferentes comprimentos de cadeia. A figura 4.13 mostra a sedimentação das microalgas após a adição de polyDADMAC, após 30 minutos.



Figura 4.14 - Comparação da sedimentação das amostras de polyDADMAC. À esquerda polyDADMAC 100K-200K e ao centro e à direita polyDADMAC 400K-500K.

De modo a comparar o amido catiónico com o floculante sintético preparam-se duas amostras de biomassa algal em que foi adicionado num amostra amido catiónico AMD 168 e em outra polyDADMAC 100K-200k e polyDADMAC 400k-500k. Foi realizada a comparação da percentagem de amostra de floculante necessária até a ocorrência de sedimentação nas duas amostras. Os resultados dessa comparação encontram-se na figura 4.13.

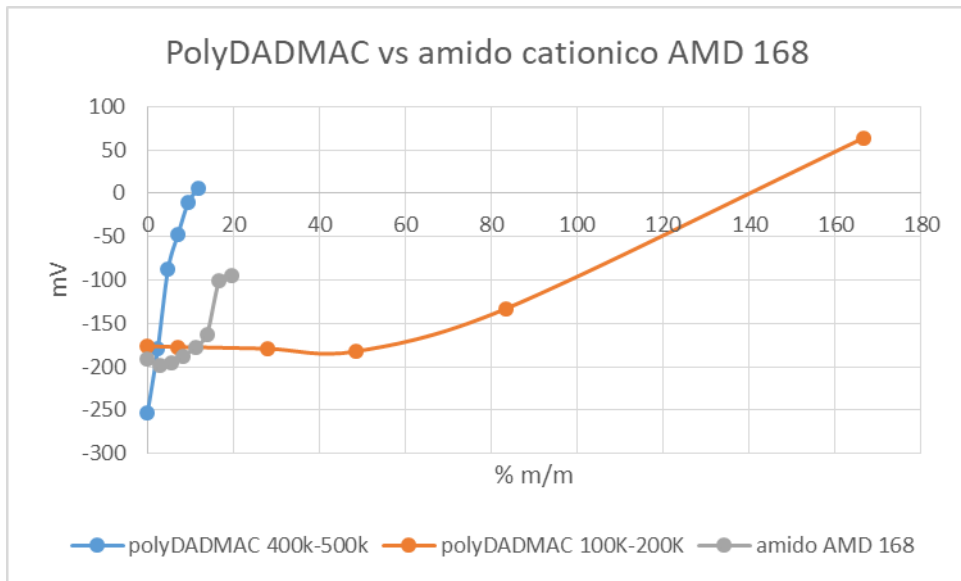


Figura 4.15 - Evolução do potencial zeta com a adição de amido catiônico AMD 168 vs polyDADMAC 100k-200k, a 40 ml de suspensão de microalgas (0.9 g/L).

Neste ensaio não se observou a mudança de polaridade na superfície das microalgas com a adição de amido catiônico; contudo ocorreu floculação. A percentagem de amido catiônico adicionado para ocorrer floculação flutuou entre 11 e 16%. Estes resultados mostram que não é necessário ocorrer a neutralização completa da carga de superfície de modo a ocorrer floculação. Comparando o amido catiônico com o polyDADMAC 400K-500K verifica-se que o amido catiônico necessita de uma percentagem maior de adição (11 a 16%), face a 10 % de polyDADMAC para obter o mesmo efeito.

Para esclarecer a possível influência do tipo de misturador sobre o processo de floculação, testou-se um agitador mecânico e um agitador magnético tentando manter a intensidade de agitação. Os resultados da sedimentação mostraram não haver diferenças significativas. A figura 4.16 mostra os resultados da sedimentação destas amostras.



Figura 4.16 - Sedimentação da biomassa algal com amido catiônico.

De modo a perceber se havia diferenças no tamanho dos flocos formados, algumas das amostras anteriores (amido 168, polyDADMAC 100K-200K e polyDADMAC 400K-500K) foram observadas ao microscópio logo após a ocorrência de floculação. Através da observação ao microscópio ótico é possível verificar que no início da floculação ocorre a formação de flocos de formato redondo e em formato filamentosos, como mostra a figura 4.17 em baixo.

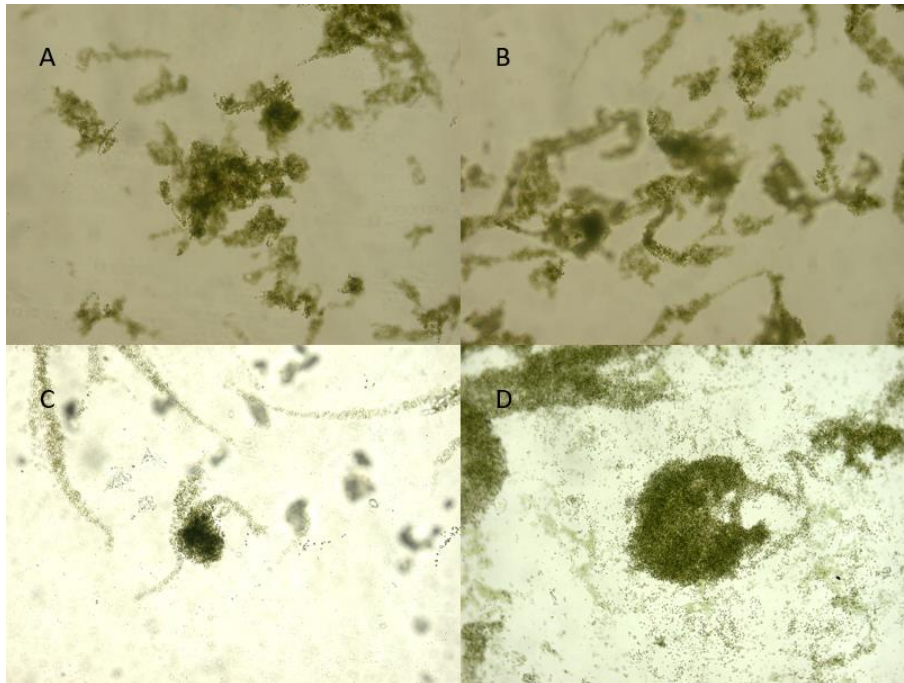


Figura 4.17 - Observação ao microscópio dos flocos no início da floculação. *A*-amostra de 10,8% de amido. *B*-amostra 13,8% amido. *C*- Amostra 166% polyDADMAC 100k-200k. *D*-polyDADMAC 27,7 % 400k-500K.

Após 30 minutos de floculação a observação ao microscópio mostra a união entre vários flocos através de estruturas semelhantes a filamentos, formando assim flocos de tamanho superior, tornando em certos casos difícil a distinção entre os diferentes flocos. A figura 4.18 em baixo mostra parte desse fenómeno.

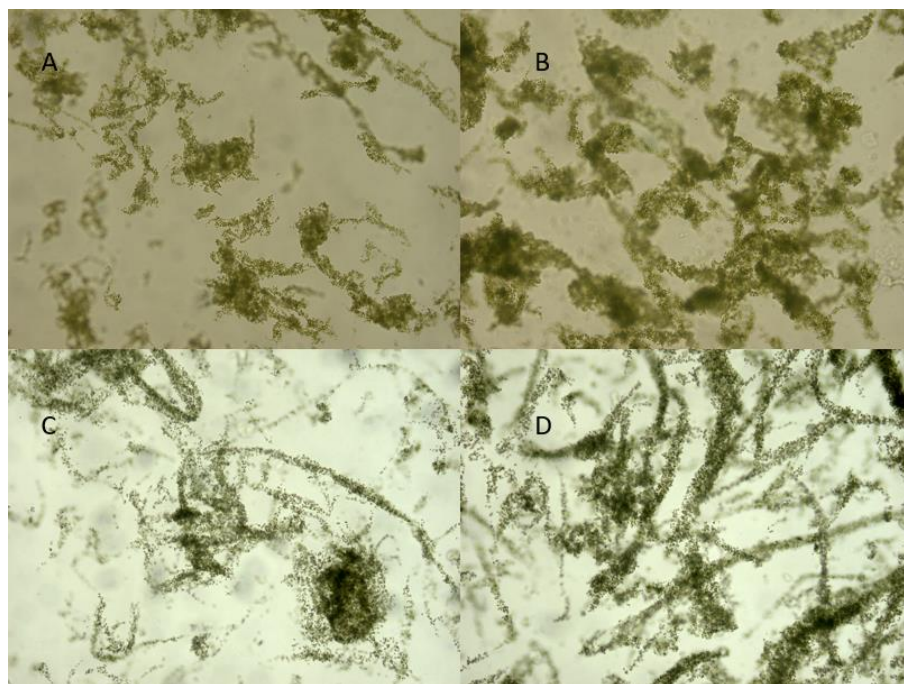


Figura 4.18 - Observação ao microscópio dos flocos no final da floculação. A-amostra de 10,8% de amido. B-amostra 13,8% amido. C- Amostra 166% polyDADMAC 100k-200k. D-polyDADMAC 27,7 % 400k-500K.

De notar que as amostras de amido mostraram mais tendência a formar flocos de formato redondo, enquanto as amostras de polyDADMAC mostraram maior tendência a formar flocos em forma de filamentos. Este resultado poderá ser devido ao maior comprimento efetivo das cadeias dos polímeros sintéticos, permitindo a formação mais extensa de pontes entre os flocos inicialmente formados. Comparando o tamanho médio dos flocos das diferentes amostras, os resultados são os seguintes.

Tabela 4.2 - Tamanho médio dos flocos de microalgas formados.

Amostra	Tamanho médio (μm)	
	Início	Fim
Amido AMD 168 (10,8%)	340	496
Amido AMD 168 (13,8%)	333	590
PolyDADMAC 100k-200K	462	466
PolyDADMAC 400k-500K	456	820

Como é possível observar as amostras contendo amido obtiveram inicialmente flocos de menor tamanho (340 e 333 μm) quando comparado com as amostras contendo polyDADMAC (462 e 456 μm). Contudo passados 30 minutos é possível observar que as amostras de amido obtiveram flocos de maior dimensão (496 e 590 μm), quando comparado com o floculante PolyDADMAC 100k-200k que obteve um tamanho medio de flocos de 466 μm . Neste ensaio a amostra contendo PolyDADMAC 400k-500k obteve o maior diâmetro de flocos com 820 μm .

4.3.3 Cinética de sedimentação

De modo a estudar a cinética de sedimentação do amido catiónico comparativamente ao polyDADMAC, foram preparadas três amostras de biomassa algal (40 ml) às quais foi adicionado suspensão de amido (0,2 g/L) correspondente a uma carga de 13,88% (correspondente a 25 ml de amido catiónico), 166% de polyDADMAC 100k-200k (6 ml de polyDADMAC 100k-200k para a segunda amostra) e 27,7% (1 ml) de polyDADMAC 400k-500k para a terceira amostra. Estes valores de carga foram escolhidos com base nos resultados anteriores. Os resultados da sedimentação das amostras de amido catiónico e polyDADMAC encontram-se na figura 4.19 e foram determinados tendo por base as medidas de absorvâncias das amostras tomadas na parte superior da proveta de sedimentação.

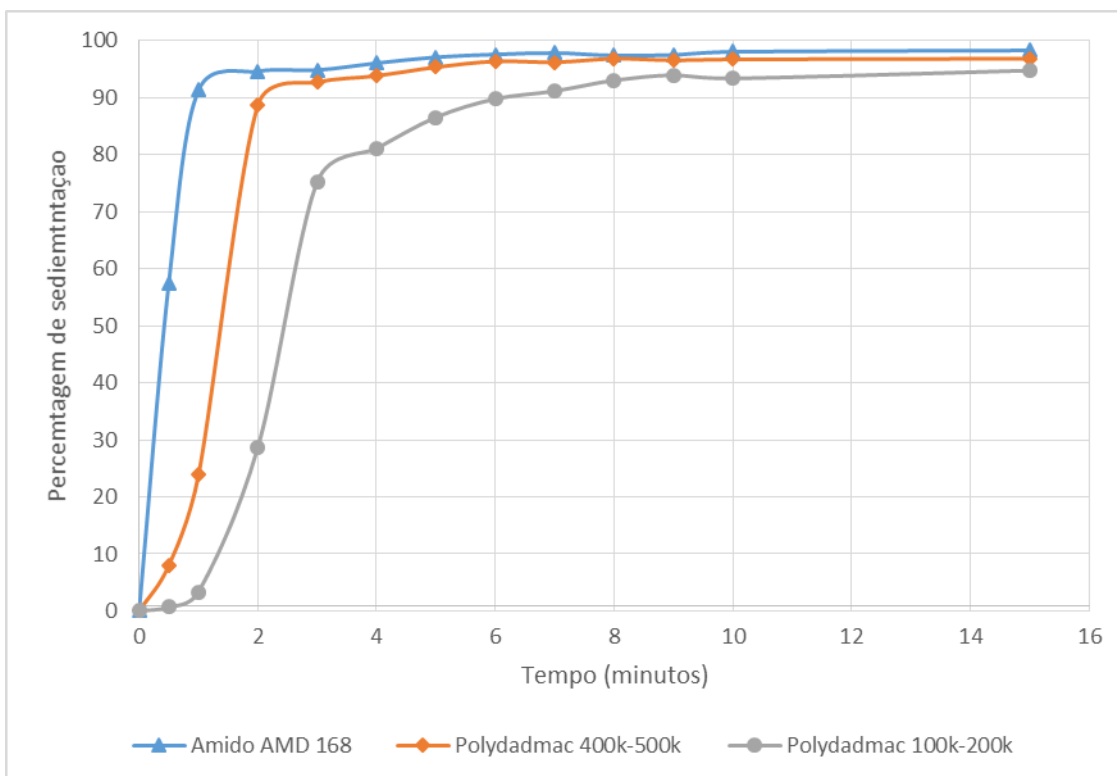


Figura 4.19 - Evolução da percentagem de sedimentação ao longo do tempo, para as cargas de 13,88% de amido catiónico AMD 168, 1,66% de polyDADMAC 100k-200k e 0,22% polyDADMAC 400k-500k.

Como é possível observar pelo gráfico, a amostra de amido é a mais rápida a sedimentar, atingindo 60 % de sedimentação após 30 segundos quando comparado com as amostras de polyDADMAC 400k-500k e 100k-200k que atingiram 0,7 e 8% de sedimentação respetivamente. Também é possível observar que as três amostras conseguiram valores na ordem dos 90% de sedimentação ao fim 10 minutos. No final do ensaio a amostra de amido obteve 98,6% de sedimentação a amostra de polyDADMAC 400k-500k obteve 96,9% e a amostra de polyDADMAC 100k-200k obteve 94,8% de sedimentação.

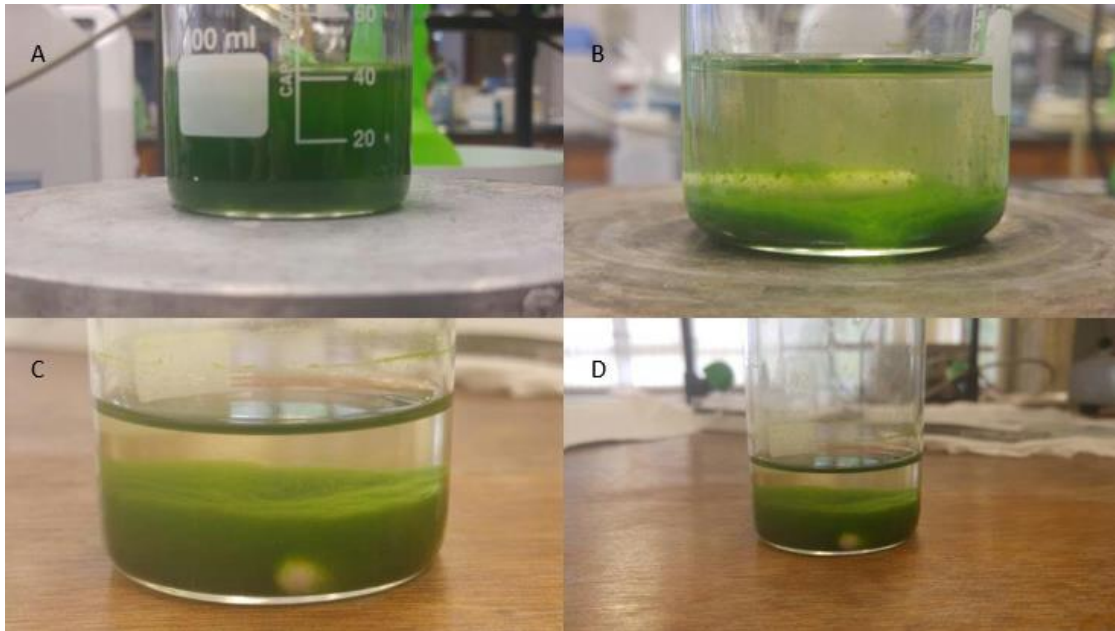


Figura 4.20 - A-amostra antes da adição de floculante B- amostra com amido catiónico AMD 168 no final da sedimentação. C- amostra com polyDADMAC 100K-200K no final da sedimentação. D- amostra com polyDADMAC 400k-500k no final da sedimentação.

Para determinar a influência da carga de amido adicionado na cinética de floculação foi adicionado 11,1% de amido catiónico face à biomassa algal e registado a sua percentagem de sedimentação ao longo do tempo. Os resultados desse ensaio encontram-se na figura 4.21.

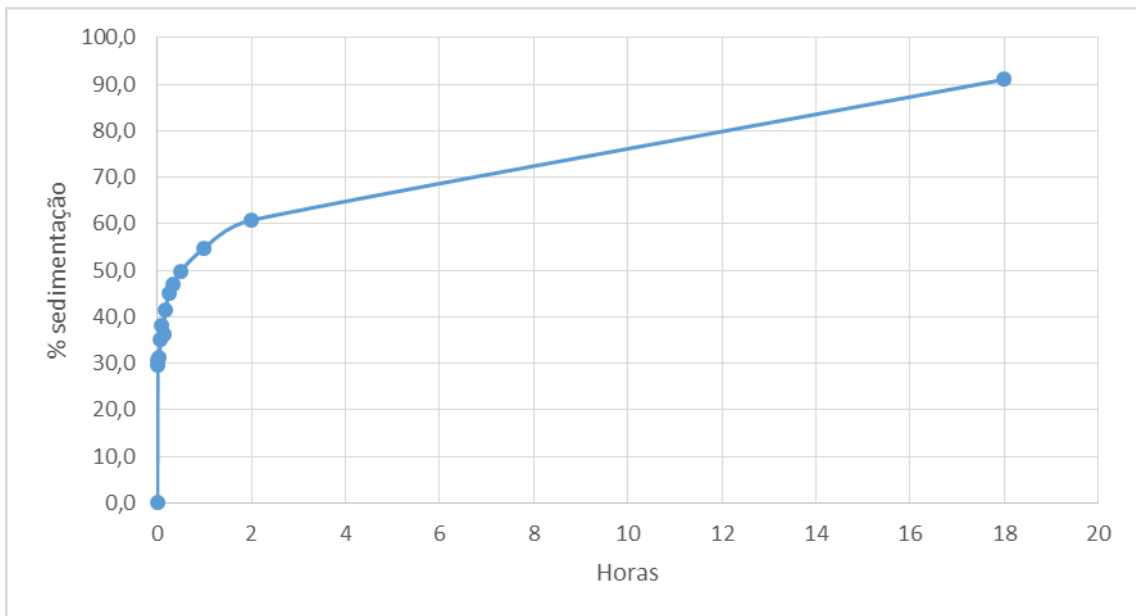


Figura 4.21 - Tempo de sedimentação de amostra para uma carga de amido AMD 168 de 11,1%.

Como é possível observar na figura 4.22, a velocidade de sedimentação é muito mais baixa pelo simples facto de se ter diminuído a carga de amido aplicada de 13.8% para 11.1%, o que evidencia a sensibilidade dos fenómenos de coagulação/floculação. Contudo, foi possível obter 90% de sedimentação ao fim de 18 horas. Isto mostra que a o volume adicionado tem bastante influência na velocidade de sedimentação.

Tendo em conta o muito menor custo do amido face ao do polyDADMAC, estes ensaios mostram que o amido catiónico pode ser uma boa alternativa ao uso de floculantes tradicionais, e se usado com os volumes adequados pode até ser mais eficaz que os floculantes tradicionais. Contudo, a otimizações do grau de substituição do amido, as condições da biomassa e as cargas a aplicar requerem estudos adicionais.

4.4 Identificação e quantificação de compostos na biomassa

Para além da produção da biomassa algal, o presente trabalho estabeleceu o objetivo da extração e quantificação dos pigmentos da biomassa, nomeadamente os carotenoides. Após extração, seguindo o procedimento descrito na parte experimental procedeu-se à identificação e quantificação dos componentes, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, para além de “díodo-array”. Neste monitoraram-se especificamente os seguintes comprimentos de onda: 440 nm, 460 nm e 665 nm, correspondentes a carotenoides e clorofila, para além do sinal global.

Extraíram-se e analisaram-se diferentes amostras de biomassa, nomeadamente do reator flat-plate, reator cilíndrico e reator flat-plate operado em modo contínuo, mas tendo em conta que o padrão do cromatograma era semelhante, esta seção centra-se nos resultados obtidos para a amostra de biomassa do fotobiorreator flat-plate operado em modo contínuo. A figura 4.22 ilustra o cromatograma obtido para o *total ion count* (TIC) do espectrómetro de massa e a figura 4.23 o total scan do díodo-array.

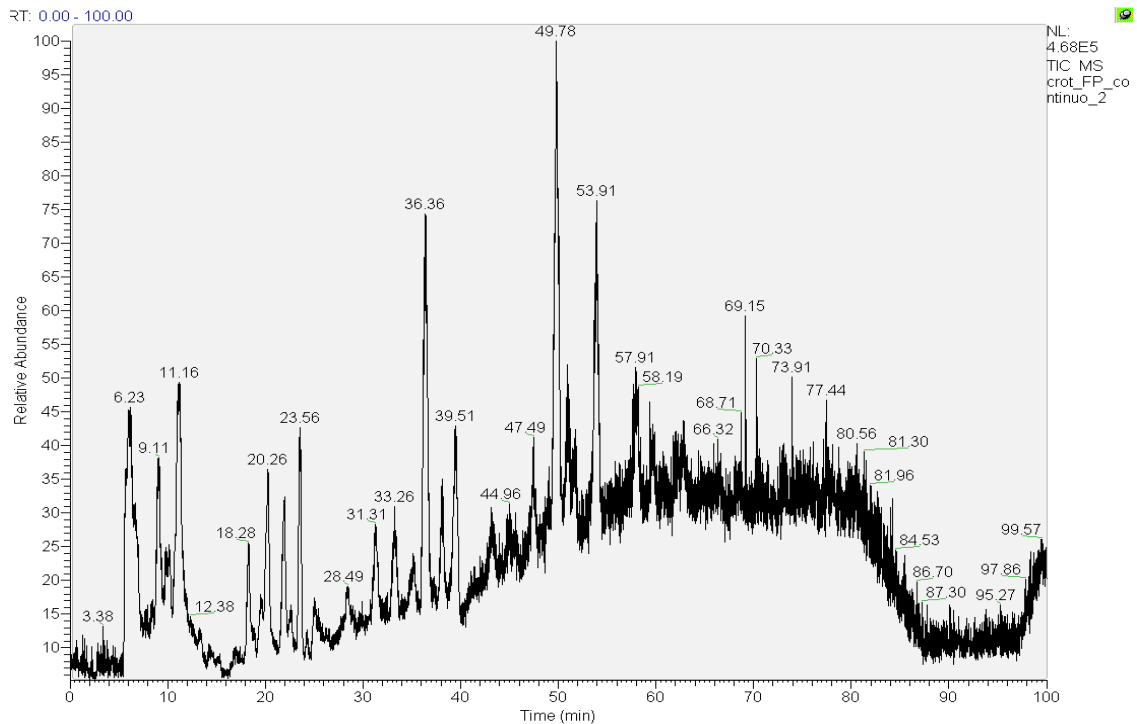


Figura 4.22 - Espectro TIC para o extrato flat-plate em modo contínuo.

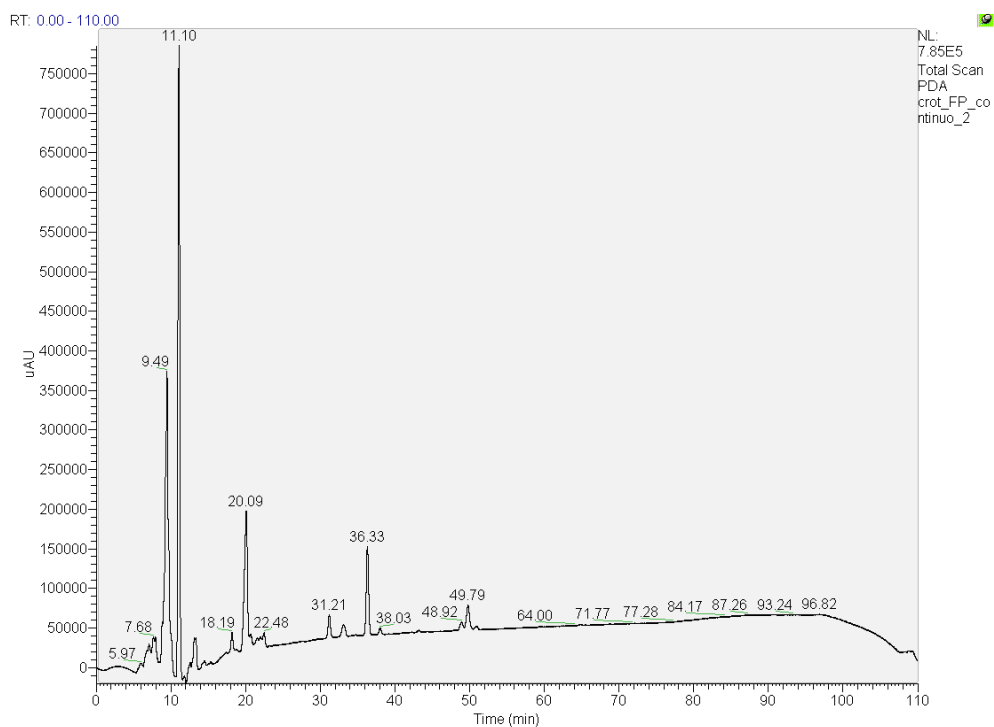


Figura 4.23 - Total diode array Scan para o extrato flat-plate em modo contínuo.

Observando o espectro do TIC é desde logo possível observar uma separação bastante efetiva dos componentes pela coluna, usando as condições de eluição definidas na parte experimental. Observa-se ainda que a linha de base apresenta uma evolução que coincide com a modificação da composição do eluente, notando-se um aumento da linha de base a partir dos 25 minutos a introdução do acetato de etilo, cuja qualidade não era a mais

apropriada, aumentando o TIC de fundo. As figuras 4.24, 4.25 e 4.26 ilustram o espectro a 440, 460 e 660 nm.

Analisando os gráficos para o comprimento de onda de 440 nm, é possível observar a presença de vários picos, sendo os mais intensos aos 9.49, 11.11, 20.11, 36.33 e 48.93 minutos; a partir dos 50 minutos não se observam picos.

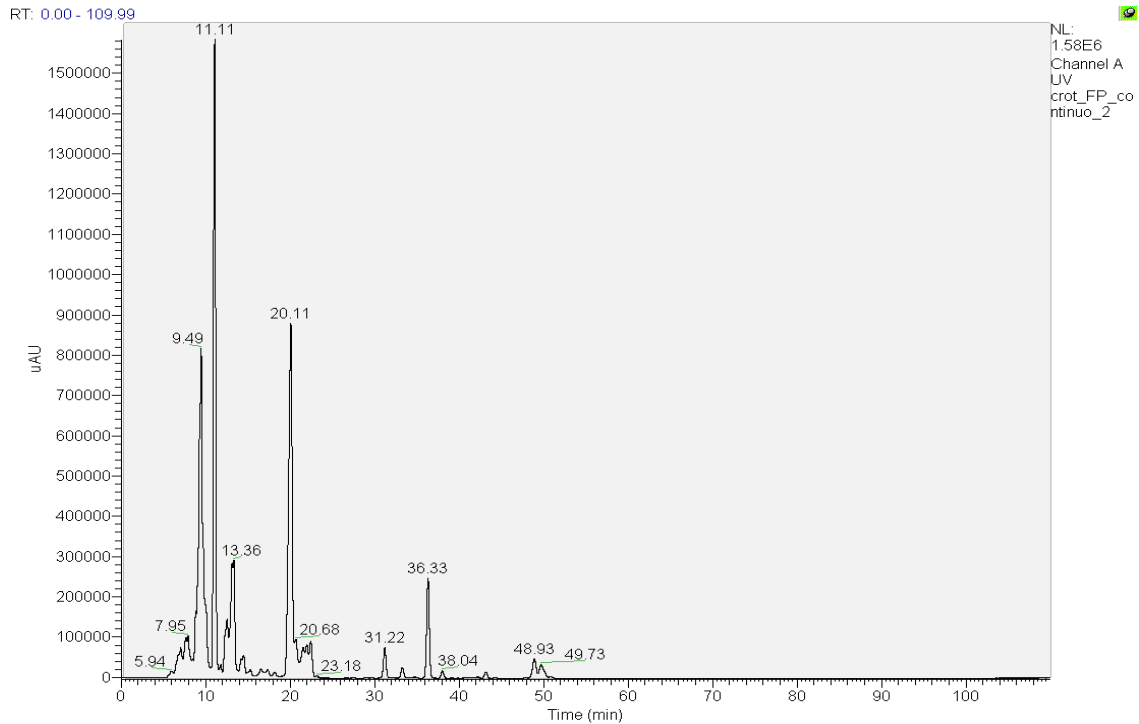


Figura 4.24 - Espectro para o comprimento de onda de 440 nm.

Observando o gráfico para o comprimento de onda de 460 nm, verifica-se que a esmagadora maioria dos picos têm correspondência com o cromatograma dos 440 nm, o que indica que os compostos em presença são maioritariamente os mesmos.

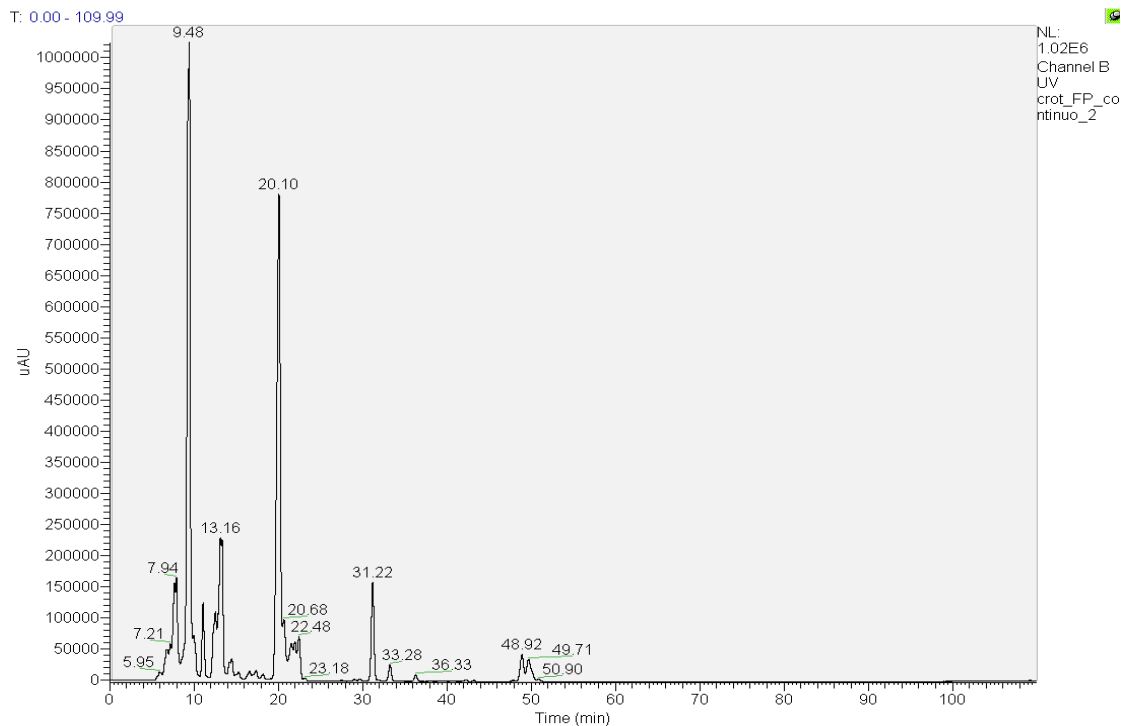


Figura 4.25 - Espectro para o comprimento de onda de 460 nm.

No gráfico para o comprimento de onda 660 nm é possível observar picos aos 9.50 minutos, 11.10 minutos, 36.33 minutos e 49,80 minutos, alguns coincidentes com os observados nos cromatogramas anteriores.

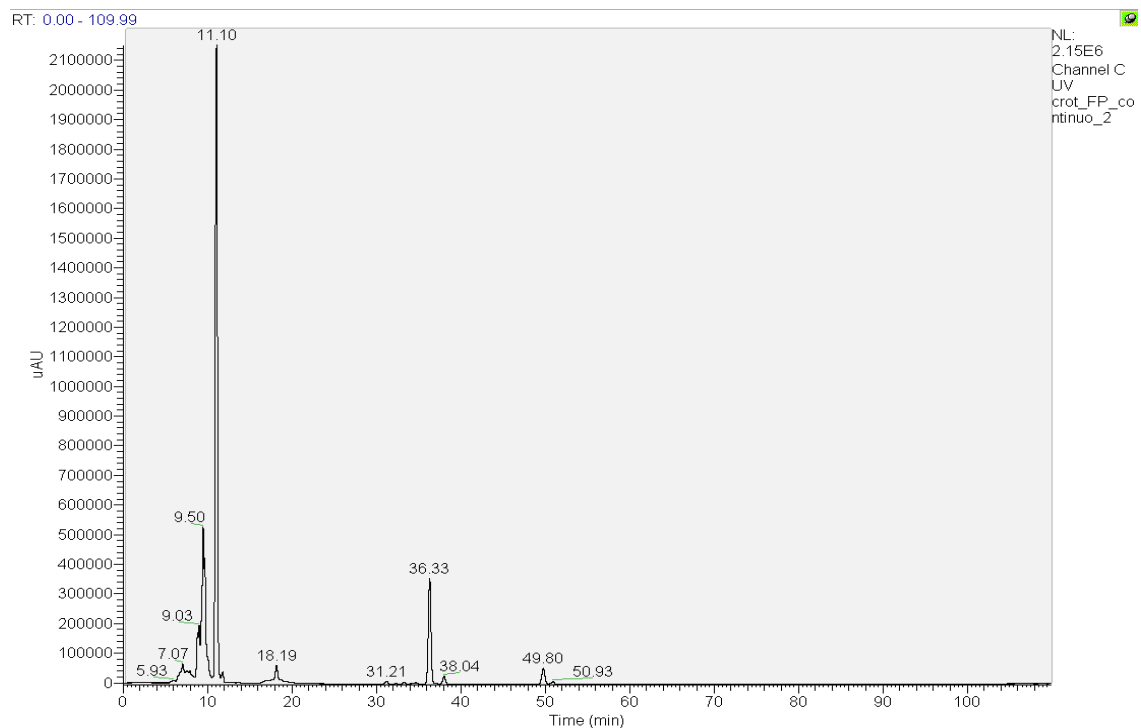


Figura 4.26 - Espectro para o comprimento de onda de 665 nm.

Fazendo a análise dos três gráficos e comparando com os dados na literatura, é possível identificar alguns compostos. Um desses compostos é a clorofila A, que é observável nos

gráficos de 440 e 665 nm aos minutos 11.10 e 36.33; a sua identificação é possível já que a literatura indica que a clorofila A apresenta dois picos de absorvância a 440 nm e a 670 nm não se verificando esse composto nos comprimentos de onda intermédios[96]. O composto foi confirmado analisando o seu espectro de massa e comparando com os valores tabelados por Rivera et al. [97]. O espectro de massa deste composto encontra-se abaixo, sendo que corresponde ao ião molecular 893 m/z.

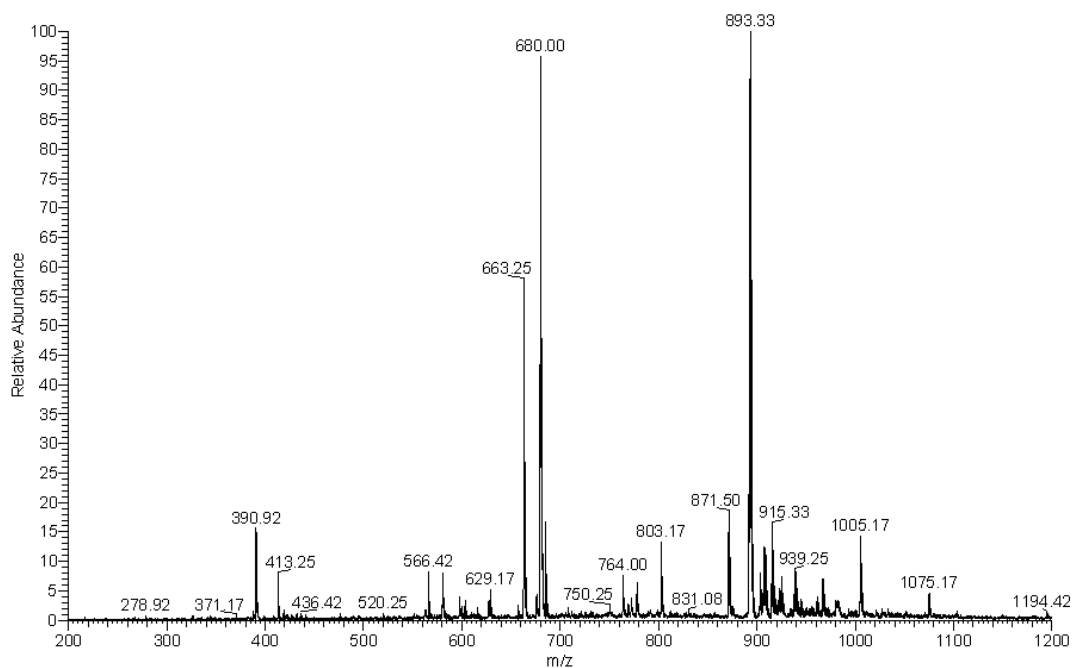


Figura 4.27 - Espectro de massa para o instante 36.33 minutos.

Aos 20.10 minutos é possível identificar o composto luteína. Este composto foi confirmado através dos resultados da espectrometria de massa. Na figura 4.28 encontra-se espectro de massa obtido no âmbito deste trabalho, com o ião molecular 568 m/z, fragmentos e adutos, que compara com os valores tabelados [97].

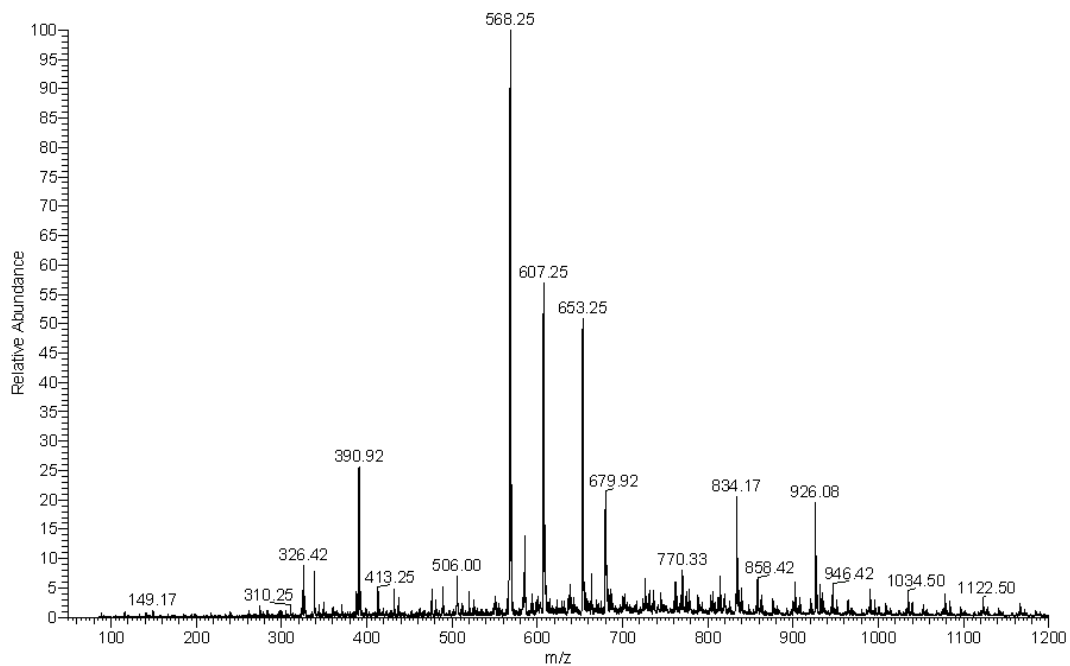


Figura 4.28 Espectro de massa para o instante 20.11 minutos.

Outro composto identificado foi o β -caroteno. Este composto é eluído ao minuto 48.92 dos três gráficos. A massa deste composto é 536.9 g/mol, que corresponde a um íon molecular da ordem dos 536 m/z. Este composto foi confirmado pela análise do seu espectro de massa nesse instante e confirmado com os valores de massa indicados na literatura [97]. Na figura 4.29 podemos encontrar o espectro de massa deste composto. Deve referir-se que o equipamento apresenta em geral um deslocamento sistemático no valor das massas entre 0.2 e 0.3 acima do verdadeiro, mesmo após calibração.

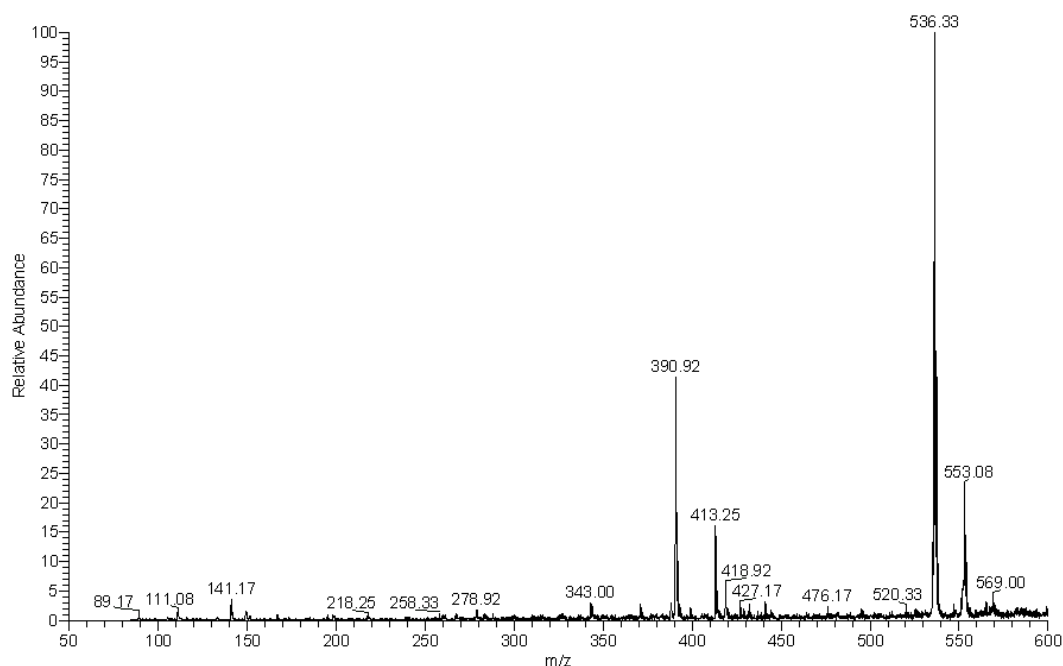


Figura 4.29 - Espectro de massa para o instante 49.80 minutos.

Aos 9.48 minutos é possível identificar um composto que possivelmente é fucoxantina e aos 31,22 minutos parece ser clorofila B. Contudo a confirmação deste composto não foi possível.

A partir dos dados obtidos foi possível realizar a quantificação de alguns destes compostos com recurso a reta de calibração de padrões comerciais. Neste caso foi possível realizar a quantificação de dois compostos, β -caroteno e Luteína através do uso de padrões astaxantina e β -caroteno comerciais. As retas de calibração para a astaxantina e β -caroteno encontram-se nas tabelas 4.3 e 4.4. Os gráficos das retas de calibração encontram-se nas figuras A1 e A2 em anexo.

Tabela 4.3 Reta de calibração da astaxantina.

<i>Retas Calibração</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada na origem</i>	<i>R²</i>
Calibração	0,0562	0,1971	0,9989

Tabela 4.4 Reta de calibração de β -caroteno.

<i>Retas Calibração</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada na origem</i>	<i>R²</i>
Calibração	0,1052	0,0623	0,9882

Os resultados da quantificação encontram-se na tabela 4.6.

Tabela 4.5 - Quantidade de luteína e β -caroteno extraído.

Reator	Luteína	β -caroteno
	mg carotenoides/g base seca	mg carotenoides/g base seca
Flat-plate	1,35	0,6
Cilíndrico	0,99	0,43
Flat-plate contínuo	3,8	1,57

Os resultados para a luteína assim como os valores de β -caroteno parecem estar dentro dos valores indicados na literatura[98]. No caso dos valores de luteína obtidos no reator Flat-plate em modo contínuo estes parecem estar dentro dos valores máximos obtidos experimentalmente para este composto na espécie *Chlorella Vulgaris*.

Dos resultados da tabela 4.5, observa-se que a biomassa produzida em diferentes condições conduz a diferenças muito significativas nos teores de carotenoides. O reator cilíndrico operado de forma descontínua para biomassa recolhida ao cabo de 70 dias de cultivo, com uma concentração de 1,33 g/L, é aquele que gera biomassa com menor quantidade de luteína e β -caroteno, obtendo 0,99 e 0,43 mg/g base seca respetivamente. Tal pode ser devido à menor luminosidade efetiva sentida pela biomassa neste fotobiorreator já que a sua área volumétrica de captação de luz é baixa (114,4 cm²/L) e a concentração de biomassa relativamente elevada, que conjuntamente com a limitação de azoto e fósforo levaram à produção de menores quantidades destes dois compostos[99][100]. O reator Flat-plate obteve 1,35 mg de luteína/g base seca e 0,6 mg β -caroteno /g base seca. Estes valores mais elevados, quando comparados com os do reator cilíndrico, advém do facto de este reator ter maior área/volume (350cm²/L) quando comparado com o reator cilíndrico (114,4 cm²/L) e também menor concentração de biomassa algal. O reator que obteve os melhores resultados foi o reator Flat-plate em modo de operação contínuo; este reator obteve 3,8 e 1,57 mg carotenoides/g base seca de luteína e β -caroteno respetivamente. Tal facto pode dever-se à não limitação de nutrientes no meio, tais como azoto e fósforo, quando comparando com os outros dois reatores, e de igual forma ao anteriormente regista para a produtividade de biomassa. Este facto parece ajudar à acumulação destes compostos como indicado por J. A. Del Campo et al.[101].

Capítulo 5

Conclusão e perspectivas futuras

As microalgas são organismos com potencial para serem usados na produção de produtos de valor acrescentado, tais como os carotenoides e os lípidos. Contudo, a sua viabilidade técnico-económica requer ainda estudos aprofundados nas fases de produção, recuperação e extração, com vista à redução dos custos em equipamento e operação.

Neste trabalho conclui-se que o uso de fotobiorreatores flat-plate é mais vantajoso que o uso de reatores cilíndricos, devido à sua maior área superficial; contudo é necessário um maior controlo da irradiância na fase inicial de crescimento em que as concentrações de biomassa podem ser baixas, e por isso estarem mais sujeitas a fenómenos de fotoinibição.

Concluiu-se também que os fotobiorreatores operados de modo contínuo obtêm produtividades de biomassa e de compostos de valor acrescentado superiores aos correspondentes descontínuos, tendo-se obtido um crescimento específico em modo contínuo de $0,2 \text{ dia}^{-1}$ comparado com $0,084 \text{ dia}^{-1}$ em modo descontínuo.

No que respeita à recuperação da biomassa, este trabalho mostrou que o amido catiónico pode ser uma boa alternativa ao uso de floculantes sintéticos (mais caros), tais como o polyDADMAC. Usado com as doses adequadas pode até ser mais eficaz que floculantes sintéticos.

Na extração de compostos concluiu-se que o reator que obteve os melhores resultados foi o reator Flat-plate em modo de operação contínuo, obtendo 3,8 e 1,57 mg carotenoides/g (matéria seca) de luteína e β -caroteno, respetivamente.

Como trabalho futuro seria interessante estudar o crescimento das microalgas com temperatura controlada no reator flat-plate em modo contínuo e descontínuo, de modo a estudar a influência deste parâmetro sobre a produtividade. Seria proveitoso monitorizar continuamente a luminosidade no interior dos fotobiorreatores cilíndrico e flat plate com equipamento adequado, de modo perceber a alteração da luminosidade no interior do fotobiorreator e eventualmente ajustar automaticamente a iluminação.

No que respeita à recuperação da biomassa seria interessante realizar a otimização do grau de substituição do amido, as condições da biomassa e as cargas a aplicar, bem como avaliar os custos. Na extração à necessidade de identificar e quantificar os compostos desconhecidos e analisar a sua sensibilidade às condições de operação.

Capítulo 6

Referências

- [1] A. L. Ahmad, N. H. M. Yasin, C. J. C. Derek, and J. K. Lim, “Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 584-593, 2011.
- [2] E. Henrich, N. Dahmen, E. Dinjus, and J. Sauer, “The role of biomass in a future world without fossil fuels,” *Chemie-Ingenieur-Technik*, vol. 87, no. 12, pp. 1667-1685, 2015.
- [3] R. N. Singh and S. Sharma, “Development of suitable photobioreactor for algae production - A review,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 2347-2353, 2012.
- [4] E. F. Lambin and P. Meyfroidt, “Global land use change, economic globalization, and the looming land scarcity,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 9, pp. 3465-3472, 2011.
- [5] “Hidden Costs of Industrial Agriculture | Union of Concerned Scientists.” [Online]. Available: https://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/our-failing-food-system/industrial-agriculture/hidden-costs-of-industrial.html#.W3yPl-hKjIU. [Accessed: 21-Aug-2018].
- [6] K. W. Chew *et al.*, “Microalgae biorefinery: High value products perspectives,” *Bioresour. Technol.*, vol. 229, pp. 53-62, 2017.
- [7] J. J. Milledge, “Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review,” *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 10, no. 1, pp. 31-41, 2011.
- [8] A. C. Guedes, H. M. Amaro, and F. X. Malcata, “Microalgae as sources of carotenoids,” *Marine Drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 625-644, 2011.
- [9] Z. Yaakob, E. Ali, A. Zainal, M. Mohamad, and M. S. Takriff, “An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture,” *J. Biol. Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 1-10, 2014.
- [10] G. Panis and J. R. Carreon, “Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line,” *Algal Res.*, vol. 18, pp. 175-190, 2016.
- [11] M. Gong and A. Bassi, “Carotenoids from microalgae: A review of recent developments,” *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 8. Elsevier Inc., pp. 1396-1412, 2016.
- [12] J. C. G. Cañedo and G. L. L. Lizárraga, “Considerations for Photobioreactor Design and Operation for Mass Cultivation of Microalgae,” *Algae - Org. Imminent Biotechnol.*, 2016.

- [13] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 35, pp. 265-278, 2014.
- [14] O. Pignolet, S. Jubeau, C. Vaca-Garcia, and P. Michaud, "Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 40, no. 8. pp. 781-796, 2013.
- [15] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217-232, 2010.
- [16] C. U. Ugwu, H. Aoyagi, and H. Uchiyama, "Photobioreactors for mass cultivation of algae," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 10, pp. 4021-4028, 2008.
- [17] M. A. Borowitzka and N. R. Moheimani, *Algae for biofuels and energy*. 2013.
- [18] F. Qiu, "Algae Architecture," 2013.
- [19] N. Pragma, K. K. Pandey, and P. K. Sahoo, "A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 24, pp. 159-171, 2013.
- [20] C. M. Galanakis, "Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 26, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 68-87, 2012.
- [21] R. Slade and A. Bauen, "Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects," *Biomass and Bioenergy*, vol. 53, no. 0, pp. 29-38, 2013.
- [22] T. S. Gendy and S. A. El-Temtamy, "Commercialization potential aspects of microalgae for biofuel production: An overview," *Egypt. J. Pet.*, vol. 22, no. 1, pp. 43-51, 2013.
- [23] J. C. M. Pires, A. L. Gonçalves, F. G. Martins, M. C. M. Alvim-Ferraz, and M. Simões, "Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*," *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.*, vol. 19, no. 7, pp. 1109-1117, 2014.
- [24] G. Markou, D. Vandamme, and K. Muylaert, "Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients," *Water Res.*, vol. 65, pp. 186-202, 2014.
- [25] S. Nagaraj, P. Arulmurugan, M. G. Rajaram, R. Sundararaj, and R. Rengasamy, "Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow," *Phykos*, vol. 42, no. 1, pp. 59-71, 2012.
- [26] K. Larsdotter, "Wastewater treatment with microalgae - a literature review," *Vatten*, vol. 62, pp. 31-38, 2006.
- [27] G. Venkata Subhash, M. Rajvanshi, B. Navish Kumar, S. Govindachary, V. Prasad, and S. Dasgupta, "Carbon streaming in microalgae: Extraction and analysis methods for high value products," *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 1304-1316, 2017.

- [28] D. J. Miller and D. Yellowlees, "Inorganic nitrogen uptake by symbiotic marine cnidarians: a critical review," *Proc. - R. Soc. London, B*, vol. 237, no. 1286, pp. 109-125, 1989.
- [29] J. Shi, B. Podola, and M. Melkonian, "Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: An experimental study," *J. Appl. Phycol.*, vol. 19, no. 5, pp. 417-423, 2007.
- [30] F. Alam, A. Date, R. Rasjidin, S. Mobin, H. Moria, and A. Baqui, "Biofuel from algae-Is it a viable alternative?," *Procedia Eng.*, vol. 49, pp. 221-227, 2012.
- [31] M. A. Borowitzka, "High-value products from microalgae-their development and commercialisation," *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, no. 3, pp. 743-756, 2013.
- [32] M. L. Bonet *et al.*, *Carotenoids in Nature*, vol. 79, no. August. 2016.
- [33] A. McWilliams, "The Global Market for Carotenoids," 2018. [Online]. Available: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids-fod025f.html>. [Accessed: 15-Aug-2018].
- [34] J. Zhang, Z. Sun, P. Sun, T. Chen, and F. Chen, "Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health," *Food Funct.*, vol. 5, no. 3, p. 413, 2014.
- [35] Z. Sun, T. Li, Z. G. Zhou, and Y. Jiang, "Microalgae as a source of lutein: Chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 153, no. July 2015, pp. 37-58, 2016.
- [36] I. D. Nwachukwu, C. C. Udenigwe, and R. E. Aluko, "Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 49, pp. 74-84, 2016.
- [37] J. C. Varela, H. Pereira, M. Vila, and R. León, "Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges," *Photosynthesis Research*, vol. 125, no. 3. Springer Netherlands, pp. 423-436, 2015.
- [38] A. Domínguez, M. Ferreira, P. Coutinho, J. Fábregas, and A. Otero, "Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain," *Aquaculture*, vol. 250, no. 1-2, pp. 424-430, 2005.
- [39] M. Mubarak, A. Shaija, and T. V. Suchithra, "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production," *Algal Res.*, vol. 7, pp. 117-123, 2015.
- [40] L. Zhu, Y. Nugroho, S. Shakeel, and Z. Li, "Using microalgae to produce liquid transportation biodiesel: What is next?," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 78, no. January, pp. 391-400, 2017.
- [41] F. G. Acién, J. M. Fernández, and E. Molina-Grima, "Economics of Microalgae Biomass Production," *Biofuels from Algae*, pp. 313-325, 2013.
- [42] R. Halim, M. K. Danquah, and P. A. Webley, "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 709-732, 2012.
- [43] J. R. Benavente-Valdés, C. Aguilar, J. C. Contreras-Esquível, A. Méndez-Zavala, and J. Montañez, "Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species," *Biotechnology Reports*, vol. 10. pp. 117-125, 2016.

- [44] G. Markou, I. Angelidaki, and D. Georgakakis, "Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 3, pp. 631-645, 2012.
- [45] T. Suganya, M. Varman, H. H. Masjuki, and S. Renganathan, "Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 55, pp. 909-941, 2016.
- [46] R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, and E. F. Abd_Allah, "Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine," *Saudi J. Biol. Sci.*, 2017.
- [47] F. Watanabe, "Vitamin B₁₂ Sources and Bioavailability," *Exp. Biol. Med.*, vol. 232, no. 10, pp. 1266-1274, 2007.
- [48] J. Kim, J. Y. Lee, and T. Lu, "A model for autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under photolimitation and photoinhibition in cylindrical photobioreactor," *Biochem. Eng. J.*, vol. 99, pp. 55-60, 2015.
- [49] B. M. Smith *et al.*, "Response of the Photosynthetic Apparatus in *Dunaliella salina* (Green Algae) to Irradiance Stress.," *Plant Physiol.*, vol. 93, pp. 1433-1440, 1990.
- [50] F. G. Ación *et al.*, "Photobioreactors for the production of microalgae," *Microalgae-Based Biofuels Bioprod. From Feed. Cultiv. to End-Products*, vol. 12, no. 2, pp. 1-44, 2017.
- [51] C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah, D. J. Lee, and J. S. Chang, "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 71-81, 2011.
- [52] S. Abu-Ghosh, D. Fixler, Z. Dubinsky, and D. Iluz, "Flashing light in microalgae biotechnology," *Bioresour. Technol.*, vol. 203, pp. 357-363, 2016.
- [53] B. Wang, C. Q. Lan, and M. Horsman, "Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 4, pp. 904-912, 2012.
- [54] J. C. Weissman, R. P. Goebel, and J. R. Benemann, "Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 31, no. 4, pp. 336-344, 1988.
- [55] R. Qiu, S. Gao, P. A. Lopez, and K. L. Ogden, "Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*," *Algal Res.*, vol. 28, no. November, pp. 192-199, 2017.
- [56] Q. Gong, Y. Feng, L. Kang, M. Luo, and J. Yang, "Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*," *Energy Procedia*, vol. 61, pp. 2012-2015, 2014.
- [57] M. Scarsella, G. Torzillo, A. Cicci, G. Belotti, P. De Filippis, and M. Bravi, "Mechanical stress tolerance of two microalgae," *Process Biochem.*, vol. 47, no. 11, pp. 1603-1611, 2012.

- [58] T. M. Sobczuk, F. G. Camacho, E. M. Grima, and Y. Chisti, "Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 28, no. 4, pp. 243-250, 2006.
- [59] M. R. Tredici and R. Materassi, "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, no. 3, pp. 221-231, 1992.
- [60] J. Ricardo, P. De Cabral, and J. R. P. de C. Miranda, "Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*," Universidade Nova de Lisboa Faculdade, 2011.
- [61] R. Reyna-Velarde, E. Cristiani-Urbina, D. J. Hernández-Melchor, F. Thalasso, and R. O. Cañizares-Villanueva, "Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 49, no. 1, pp. 97-103, 2010.
- [62] F. G. Acién *et al.*, *Photobioreactors for the production of microalgae*. 2017.
- [63] M. Faried, M. Samer, E. Abdelsalam, R. S. Yousef, Y. A. Attia, and A. S. Ali, "Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 79, no. February, pp. 893-913, 2017.
- [64] Y. WONG, "Effect of Different Light Sources on Algal Biomass and Lipid Production in Internal Leds-Illuminated Photobioreactor," *J. Mar. Biol. Aquac.*, vol. 2, no. 2, pp. 1-8, 2016.
- [65] N. Rossignol, T. Lebeau, P. Jaouen, and J. M. Robert, "Comparison of two membrane - photobioreactors, with free or immobilized cells, for the production of pigments by a marine diatom," *Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 5, pp. 495-501, 2000.
- [66] J. A. Asenjo, *Bioreactor system design*. 1994.
- [67] B. D. Fernandes, A. Mota, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, *Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends*, vol. 33, no. 6. Elsevier Inc., 2015.
- [68] R. Colet *et al.*, "Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 11, pp. 268-274, 2017.
- [69] F. E. Palmer, K. A. Ballard, and F. B. Taub, "A continuous culture apparatus for the mass production of algae," *Aquaculture*, vol. 6, no. 4, pp. 319-331, 1975.
- [70] E. Molina Grima, E. H. Belarbi, F. G. Acién Fernández, A. Robles Medina, and Y. Chisti, "Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics," *Biotechnol. Adv.*, vol. 20, no. 7-8, pp. 491-515, 2003.
- [71] D. Vandamme, I. Foubert, and K. Muylaert, "Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 4, pp. 233-239, 2013.
- [72] J. J. Milledge and S. Heaven, "A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 165-178, 2013.

- [73] C. González-Fernández and M. Ballesteros, "Microalgae autoflocculation: An alternative to high-energy consuming harvesting methods," *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, no. 4, pp. 991-999, 2013.
- [74] T. Ndikubwimana *et al.*, "Flotation: A promising microalgae harvesting and dewatering technology for biofuels production," *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 3, pp. 315-326, 2016.
- [75] G. Shelef, A. Sukenik, and M. Green, "Microalgae harvesting and processing: a literature review," 1984.
- [76] M. Demuez, A. Mahdy, E. Tomás-Pejó, C. González-Fernández, and M. Ballesteros, "Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, no. 10, pp. 1955-1966, 2015.
- [77] E. Günerken, E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, and R. H. Wijffels, "Cell disruption for microalgae biorefineries," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 2, pp. 243-260, 2015.
- [78] K. Yamamoto, P. M. King, X. Wu, T. J. Mason, and E. M. Joyce, "Effect of ultrasonic frequency and power on the disruption of algal cells," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 24, pp. 165-171, 2015.
- [79] M. Ali and I. a. Watson, "Microwave treatment of wet algal paste for enhanced solvent extraction of lipids for biodiesel production," *Renew. Energy*, vol. 76, pp. 470-477, 2015.
- [80] F. J. Barba, N. Grimi, and E. Vorobiev, "New Approaches for the Use of Non-conventional Cell Disruption Technologies to Extract Potential Food Additives and Nutraceuticals from Microalgae," *Food Engineering Reviews*, vol. 7, no. 1. pp. 45-62, 2014.
- [81] H. G. Gerken, B. Donohoe, and E. P. Knoshaug, "Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production," *Planta*, vol. 237, no. 1, pp. 239-253, 2013.
- [82] H. C. Kwang, H. J. Lee, S. Y. Koo, D. G. Song, D. U. Lee, and C. H. Pan, "Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 2, pp. 793-797, 2010.
- [83] R. K. Saini and Y. S. Keum, "Carotenoid extraction methods: A review of recent developments," *Food Chem.*, vol. 240, no. June 2017, pp. 90-103, 2018.
- [84] M. C. Chan, S. H. Ho, D. J. Lee, C. Y. Chen, C. C. Huang, and J. S. Chang, "Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N," *Biochem. Eng. J.*, vol. 78, pp. 24-31, 2013.
- [85] J. Campiol dos Santos, "Extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais," Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- [86] S. Millao and E. Uquiche, "Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 116, pp. 223-231, 2016.

- [87] R. Ranjith Kumar, P. Hanumantha Rao, and M. Arumugam, "Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review," *Front. Energy Res.*, vol. 2, no. January, pp. 1-9, 2015.
- [88] V. Piemonte, L. Di Paola, G. Iaquaniello, and M. Prisciandaro, "Biodiesel production from microalgae: Ionic liquid process simulation," *J. Clean. Prod.*, vol. 111, pp. 62-68, 2016.
- [89] Sylvania, "Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units," p. 46074, 2000.
- [90] A. L. Gonçalves, M. Simões, and J. C. M. Pires, "The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater," *Energy Convers. Manag.*, vol. 85, pp. 530-536, 2014.
- [91] S. Y. Chiu, C. Y. Kao, C. H. Chen, T. C. Kuan, S. C. Ong, and C. S. Lin, "Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 9, pp. 3389-3396, 2008.
- [92] J. Cheng, Y. Huang, J. Feng, J. Sun, J. Zhou, and K. Cen, "Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors," *Bioresour. Technol.*, vol. 144, pp. 321-327, 2013.
- [93] K. L. Yeh and J. S. Chang, "Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31," *Bioresour. Technol.*, vol. 105, pp. 120-127, 2012.
- [94] S. Bratskaya, S. Schwarz, T. Liebert, and T. Heinze, "Starch derivatives of high degree of functionalization: 10. Flocculation of kaolin dispersions," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 254, no. 1-3, pp. 75-80, 2005.
- [95] M. K. Danquah, B. Gladman, N. Moheimani, and G. M. Forde, "Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency," *Chem. Eng. J.*, vol. 151, no. 1-3, pp. 73-78, 2009.
- [96] A. Lababpour and C.-G. Lee, "Simultaneous measurement of chlorophyll and astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cells by first-order derivative ultraviolet-visible spectrophotometry," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 2, pp. 104-110, 2006.
- [97] S. M. Rivera, P. Christou, and R. Canela-Garayoa, "Identification of carotenoids using mass spectrometry in positive ion mode," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 33, pp. 353-372, 2014.
- [98] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 35, pp. 265-278, 2014.
- [99] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, "Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 48, no. 6, pp. 1146-1151, 2009.

- [100] J. Seyfabadi, Z. Ramezanpour, and Z. A. Khoeyi, "Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes," *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, no. 4, pp. 721-726, 2011.
- [101] J. A. Del Campo, H. Rodríguez, J. Moreno, M. Á. Vargas, J. Rivas, and M. G. Guerrero, "Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 6, pp. 848-854, 2004.

Capítulo 7

Anexo A

Tabela A-1-Produtividade e crescimento específico do reator flat-plate e cilíndrico em modo descontínuo.

Dias	Período	Flat-plate			Cilíndrico		
		Produtividade células.ml ⁻¹ .dia ⁻¹	Produtividade mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	Crescimento específico (dia ⁻¹)	Produtividade células.ml ⁻¹ .dia ⁻¹	Produtividade mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	Crescimento específico (dia ⁻¹)
1- 26	1°	9,47x10 ⁶	9,29	0,084	1,28x10 ⁷	10,25	0,088
27-49	2 °	2,60x10 ⁷	75,22	0,082	1,85x10 ⁷	59,26	0,068
50 -65	3°	1,79x10 ⁷	32,25	0,014	2,22x10 ⁶	-1,94	-3,90E-05

Tabela A-2-Produtividade e crescimento específico do reator flat-plate e cilíndrico em modo contínuo.

Dias	Período	Flat-plate		Cilíndrico	
		Produtividade mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	Crescimento específico (dia ⁻¹)	Produtividade mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	Crescimento específico (dia ⁻¹)
1 -15	1°	158	0,2	88	0,2
15-31	2 °	90	0,1	41	0,1
31-52	3°	102	0,1	48	0,1
52-72	4°	102	0,2	54	0,2

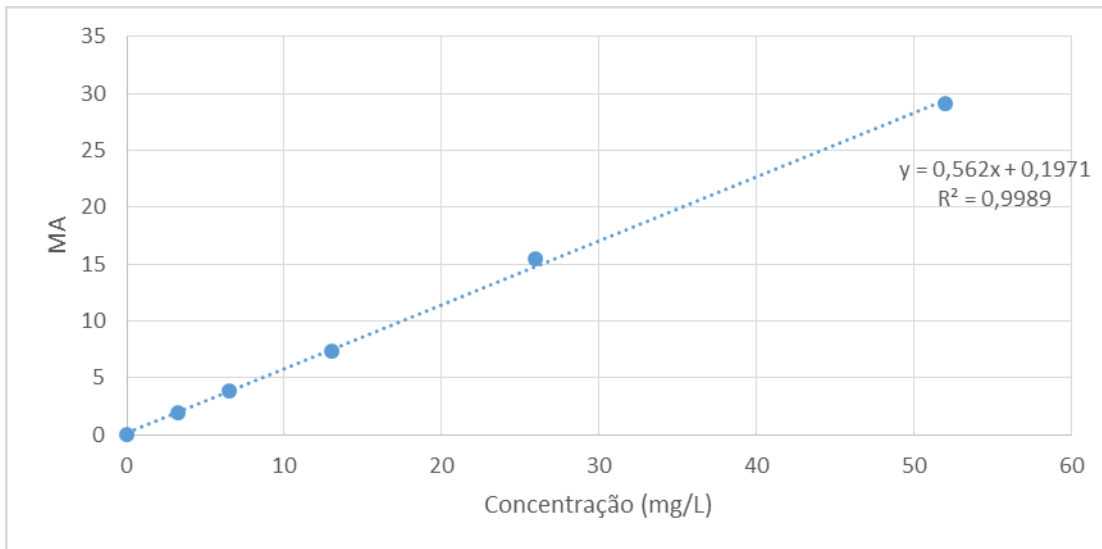


Figura A1- Reta de calibração de astaxantina.

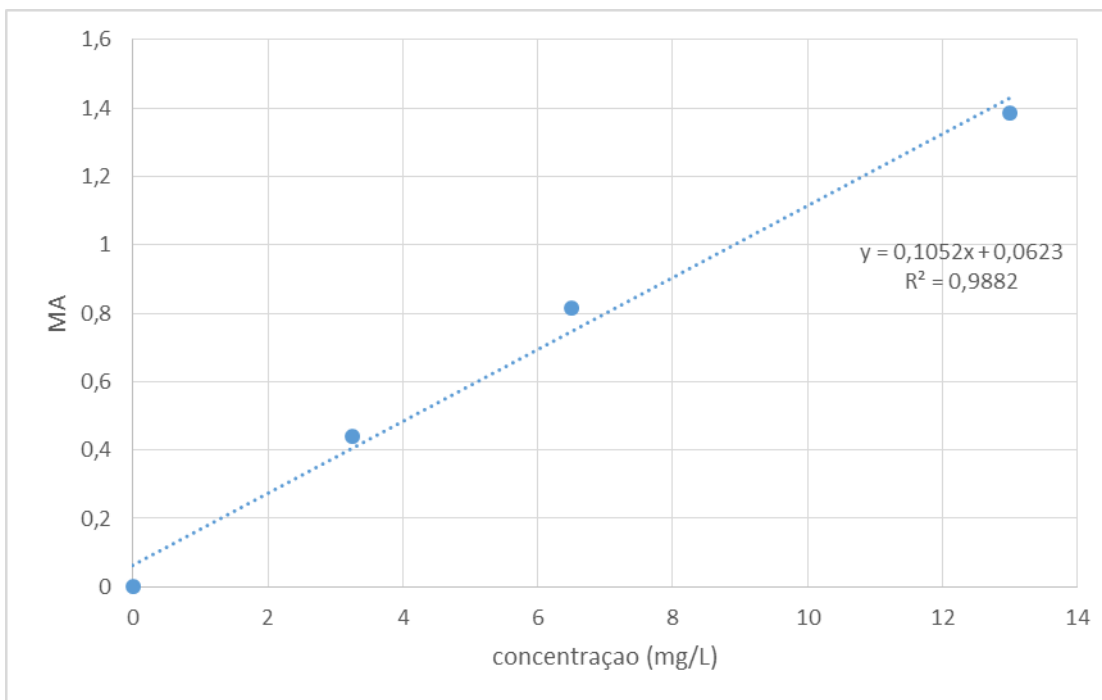


Figura A2- Reta de calibração de B-caroteno.