



necton

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Tese de mestrado

Mestrado em Aquacultura e Pescas

Desenvolvimento e optimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala

Orientador interno: Prof.^ª Dra. Maria Teresa Dinis
(Universidade do Algarve)

Orientador externo: Dra. Teresa Lamela
(Necton S.A.)



Autor: Hugo Pereira nº 24986

(2009)

Agradecimentos

À Dr.^a Teresa Lamela por toda a orientação dada, apoio e motivação. Mas acima de tudo, por todo o conhecimento transmitido e pela incansável ajuda no decorrer deste trabalho.

À Prof.^a Maria Teresa Dinis por me ter dado a conhecer o tema e ter tornado esta tese possível, agradeço também por toda a disponibilidade, ajuda, orientação e motivação em todas as fases desta dissertação.

Ao Dr. João Navalho, ao Dr. Vítor Verdelho e ao Eng. Nuno Coelho pela oportunidade que me facultaram. Agradeço também a todos os colaboradores da Necton e Algafuel com os quais tive oportunidade de conviver no decurso deste trabalho, travando diversas amizades.

À Prof.^a Luísa Barreira e ao Prof. João Varela por terem tornado a fase do biodiesel possível, agradecendo também a colaboração, apoio, orientação e esclarecimentos no decorrer desta fase.

À Prof.^a Conceição Mateus e ao Prof. José Paulo pela disponibilidade e ajuda na utilização do GC-MS. À Eng.^a Catarina, à Dr.^a Rosário, e ao Dr Hélio por toda a ajuda prestada numa primeira tentativa de extracção do óleo da biomassa.

À Prof.^a Sara Raposo pelos esclarecimentos sobre os métodos de extracção.

A todos os membros do grupo de aquacultura (AQUA) pela colaboração e ajuda em diversos momentos deste trabalho.

A toda a minha família, gostaria de deixar um agradecimento especial por todo o apoio ao longo destes anos e por serem de grande importância para mim, em particular aos meus tios que me disponibilizaram a sua casa.

Aos meus amigos e ao GEAQUA, por todos os bons momentos passados ao longo destes seis anos.

À Mónica por todo o seu carinho e atenção, mas também pela paciência e apoio nesta fase complicada.

Aos meus pais e ao meu irmão, a quem gostaria de dedicar esta tese, por terem sempre acreditado em mim e por me terem dado tudo o que podiam, mas mais que tudo por serem o pilar da minha vida.

A todos, muito obrigado!

Resumo

O meio de cultura apresenta um custo significativo no cultivo de diversas espécies de microalgas. Com o intuito de reduzir os custos finais de todo o processo de produção de biomassa algal, desenvolveu-se e optimizou-se um meio de cultura para duas espécies de ambientes aquáticos distintos: *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp. Este meio foi constituído por três soluções: solução de macronutrientes, solução comercial concentrada de oligoelementos (AM), e suplementação de ferro. Uma vez optimizado o meio de cultura, com as concentrações ideais dos seus constituintes, procedeu-se ao teste, no exterior, em fotobiorreactores do tipo “Green Wall”.

Constatou-se com este trabalho que o meio desenvolvido registou sempre melhores resultados que o meio de Walne, o meio de referência. No entanto, os resultados obtidos mostram que a solução AM não apresenta benefícios significativos no crescimento das culturas de ambas as espécies. Porém, a suplementação de ferro em *Chlorella* sp registou diferenças significativas na taxa de crescimento, mostrando a importância deste nutriente nos cultivos desta espécie. Verificou-se ainda que os oligoelementos existentes nos meios de cultura testados não apresentam benefícios significativos no crescimento de ambas as espécies. Assim sendo, nos cultivos de *N. oculata*, pode-se utilizar apenas a solução de macronutrientes, suplementada com a solução de ferro nos cultivos de *Chlorella*, permitindo assim reduzir os custos finais de produção e operação.

Realizou-se também uma avaliação e comparação do perfil de ésteres metílicos dos ácidos gordos (EMAG), obtidos após esterificação do óleo de ambas as espécies estudadas para produção de biocombustíveis. Conclui-se que ambas as espécies apresentam um perfil de EMAG com boa capacidade para produção de biocombustíveis, nomeadamente biodiesel e bioquerosene. Embora a estirpe de *Chlorella* estudada apresente um perfil preferível quanto à composição química dos seus EMAG, *N. oculata* revela maior potencial na sua produção em larga escala, registando uma concentração de EMAG totais significativamente superior na produção de ambos os biocombustíveis.

Palavras-chave: Microalgas, meio de cultura, cultivo em larga escala, biocombustíveis, EMAG

Abstract

Culture medium represents a significant cost in the production of many microalgae species. Within the effort of reducing the final costs in all the processes of microalgae production, a culture medium was developed and optimized in two species of different aquatic environments: *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella* sp.

The developed culture medium was constituted by three solutions: macronutrients solution, commercial solution of concentrated micronutrients (AM), and iron supplementation. Once the culture medium was optimized with the ideal concentration of each solution, it was tested on “GreenWall” photobioreactors. The photobioreactors tests were performed only on *Chlorella* sp, since it was the species with the most promising results.

The developed culture medium always performed better than the Walne medium, the standard medium used in this work. The AM solution, however, does not significantly improve culture growth in both species. As for the iron supplementation, it was responsible for significant differences in the growth rate of *Chlorella* sp, demonstrating the importance of this nutrient in the cultures of this species. The data suggests that the micronutrients composing the culture mediums did not significantly affect the growth of both species, demonstrating that in large scale production the cultures of *N. oculata* only need the macronutrients solution, supplemented with iron solution in the cultures of *Chlorella*, thus resulting in lower final production costs.

During this work the fatty acid methyl esters (FAME) profile of both species in the production of biofuels was also compared and evaluated. The results showed that both species have a profile with high potential for the production of biofuels, mainly biodiesel and kerosene. The strain of *Chlorella* used in the present work had a better profile regarding the chemical composition of the produced FAME's; however, *N. oculata* has a higher potential for large scale production of biofuels, due to a significantly higher production of total FAME's in the production of both biofuels.

Key-Words: Microalgae, culture medium, large scale production, biofuels production, FAME

Glossário

ABS – Absorvância

AM – Solução comercial concentrada de oligoelementos (Necton S.A.)

ANOVA – Análise de variância

B.S.A. – Albumina do Soro Bovina (Bovine Serum Albumin)

DHA – Ácido docosahexaenóico

D.O. – Densidade óptica

EMAG - Ésteres metílicos dos ácidos gordos

EPA – Ácido eicosapentaenóico

Fe – Solução de ferro

GC-MS - Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa

G.W. – Fotobiorreactores do tipo “Green Wall”

HMF – Biocombustível obtido a partir de hidratos de carbono – Hidroxymethylfurfural

I&D – Investigação e desenvolvimento

Macro – Solução de macronutrientes do meio Walne

P.S. – Peso seco

R² – Coeficiente de correlação

Valor p – Nível de significância

Índice

1 Introdução	1
2 Objectivos	3
3 Microalgas	4
3.1 Propriedades bioquímicas	4
3.2 Sistemas de produção em grande escala	5
3.2.1 Tanques abertos	5
3.2.2 Fotobiorreactores	5
3.3 Aplicações das microalgas	6
3.3.1 Produção de biocombustíveis	7
3.3.1.1 Extracção do óleo	9
3.3.1.2 Processos finais de transformação	10
3.3.1.3 Propriedades dos lípidos para biocombustíveis	12
3.3.2 Sequestração de CO ₂	12
3.4 Espécies estudadas	13
3.4.1 <i>Nannochloropsis oculata</i>	13
3.4.2 <i>Chlorella</i> sp	14
3.5 Necton S.A.	16
4 Metodologia experimental	18
4.1 Fase laboratorial	18
4.1.1 Sistema de cultivo	18
4.1.2 Preparação dos meios de cultura	19
4.1.3 Ensaio realizados	20
4.1.3.1 Optimização da solução comercial de oligoelementos (AM)	20
4.1.3.2 Optimização da solução de ferro (Fe)	21
4.1.4 Inoculação das culturas	21
4.2 Fase piloto	22
4.2.1 Fotobiorreactores	22
4.2.2 Testes realizados	23

4.3 Determinação de parâmetros bióticos e bioquímicos	24
4.3.1 Parâmetros bióticos	24
4.3.2 Parâmetros bioquímicos	25
4.4 Determinação do perfil lipídico das microalgas	26
4.5 Tratamento estatístico dos dados	29
5 Resultados	31
5.1 Fase laboratorial	31
5.1.1 Optimização da concentração da solução de oligoelementos AM	
5.1.1.1 <i>Nannochloropsis oculata</i>	31
5.1.1.2 <i>Chlorella</i> sp	33
5.1.2 Optimização da solução de ferro	35
5.1.2.1 <i>Nannochloropsis oculata</i>	35
5.1.2.2 <i>Chlorella</i> sp	37
5.2 Fotobiorreactores – “Green Wall”	39
5.2.1 Solução de oligoelementos AM	40
5.2.2 Meio completo Macro + AM + Fe	41
5.3 Identificação e quantificação dos ésteres metílicos	42
6 Discussão	49
6.1 Crescimento	49
6.2 Proteínas	52
6.3 Produção de lípidos	52
6.4 Produção de ésteres metílicos para biocombustíveis	55
7 Conclusões	59
8 Perspectivas futuras	62
9 Bibliografia	63

1 Introdução

As microalgas apresentam propriedades únicas, as quais permitem converter o dióxido de carbono em matéria orgânica, utilizando como fonte de energia a radiação solar. A matéria orgânica produzida pode ser utilizada em diversas aplicações, tais como: produção de biocombustíveis, compostos bio-activos, alimentação humana e animal (Chisti, 2007), entre outros. Um dos principais sectores de procura é também a aquacultura, uma vez que as microalgas são a base da cadeia trófica da maioria dos seus sistemas (Otero & Fabregas, 1997).

Para a produção de elevadas quantidades de óleo e sequestração de CO₂, é necessário o cultivo de biomassa em grande escala, que depende essencialmente do meio de cultura, temperatura, salinidade e intensidade luminosa (Su *et al*, 2007). O desenvolvimento da indústria de biocombustíveis e sequestração de CO₂ está dependente de melhorias significativas em todo o processo de produção, que possam tornar o custo final mais competitivo. Actualmente o custo dos biocombustíveis obtidos a partir de microalgas é ainda bastante superior aos obtidos a partir de combustíveis fósseis. Torna-se assim essencial otimizar todos os processos de produção e transformação em biocombustíveis para rentabilizar a produtividade e reduzir os custos de produção. Tendo o meio de cultura um peso significativo nos custos de produção de diversas espécies de microalgas, é extremamente importante a sua optimização.

O meio de cultura assume um papel preponderante no sucesso dos cultivos algais, devendo fornecer todos os nutrientes necessários para o seu crescimento. Portanto, as culturas algais têm de ser enriquecidas de forma a compensar as deficiências de nutrientes existentes na água (Reitan *et al*, 1997). As diferentes espécies têm necessidades de nutrientes distintas, sendo necessário ajustar e otimizar o meio de cultura de acordo com a espécie a cultivar, e dependendo da composição bioquímica final desejada. A composição bioquímica das microalgas varia com diferentes concentrações de certos nutrientes (Fábregas *et al*, 1984), sendo este aspecto posteriormente abordado neste trabalho. O meio de cultura e a composição bioquímica estão assim directamente relacionados, sendo possível perceber qual o meio que favorece maior produção de óleo.

Os meios de cultura são normalmente constituídos por três soluções stock: solução de macronutrientes, solução de oligoelementos e solução de vitaminas, para evitar erros nas sucessivas pesagens (Andersen, 2005). Entende-se por macronutrientes, os nutrientes de que necessitam em maior concentração como nitratos, fosfatos e, em algumas espécies, sílica (Chisti, 2007). A solução de oligoelementos (micronutrientes) deve fornecer os nutrientes vestigiais necessários, em baixa concentração, principalmente metais, que estas utilizam no seu crescimento, como zinco, ferro, cobre, magnésio, entre outros. As vitaminas, apesar de aumentarem o custo de produção, melhoram a produtividade das culturas, registando-se por norma taxas de crescimento superiores. No entanto, existem espécies que não necessitam de vitaminas nos cultivos, ou estas não contribuem para melhorias significativas na sua produção, como, por exemplo, o género *Phaeodactylum* (Lamela T., comunicação pessoal). Os cultivos em larga escala, por norma, não utilizam vitaminas, por estas serem bastante dispendiosas.

A nível laboratorial, o meio de cultura deve ter o menor número de compostos químicos possível, para poupar na sua produção, sendo também necessário nos cultivos em larga escala ter em conta o preço dos seus constituintes para rentabilizar as diversas aplicações comerciais (Spaargaren, 1995). As soluções comerciais de oligoelementos foram especialmente desenvolvidas para cultivos em larga escala com o intuito prático de substituir a tradicional solução de oligoelementos, que apresenta custos significativos e tem uma elaboração morosa, uma vez que é constituída por diversos compostos químicos.

2 Objectivos

Esta tese de mestrado teve como objectivo desenvolver e optimizar um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala para produção de biocombustíveis e sequestração de CO₂, entre outras aplicações.

Pretendeu-se com este trabalho determinar a concentração óptima dos constituintes do meio relativamente à taxa de crescimento das culturas. Testou-se a eficiência de uma solução comercial concentrada de oligoelementos (AM) desenvolvida pela Necton S.A. e o efeito da suplementação com ferro. Com este meio de cultura pretendeu-se ainda reduzir os custos de produção, optimizar a produção de biomassa, determinar a influência dos diferentes meios na composição bioquímica das microalgas e optimizar a produtividade de lípidos em duas espécies: *Chlorella* sp e *Nannochloropsis oculata*. Posteriormente foram efectuadas uma avaliação e comparação do perfil de EMAG obtido após esterificação do óleo de ambas as espécies para produção de biocombustíveis.

3 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares e fotossintéticos. Sendo produtores primários, constituem a base da cadeia alimentar de diversos organismos aquáticos. Podem ser encontradas em todos os tipos de ambientes, desde nascentes de água doce, lagos extremamente salinos ou nas zonas polares. Apresentam forma de vida planctónica ou bentónica, vivendo em suspensão nas zonas fóticas ou junto ao fundo, no meio dos sedimentos, estando neste caso limitadas às zonas costeiras devido à rápida atenuação da luz com a profundidade (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Existem diversas espécies de microalgas, estando actualmente descritas cerca de 40 000 espécies (Barsanti & Gualtieri, 2006), embora o seu número exacto seja ainda desconhecido (Derner *et al*, 2006). Desconhecem-se também as propriedades e potencialidades de algumas microalgas, devendo-se tão elevada diversidade sobretudo à sua variada composição bioquímica (Pulz & Gross, 2004).

3.1 Propriedades bioquímicas

A composição bioquímica das microalgas varia entre as diferentes espécies e dentro da mesma espécie, visto poder ser modificada com a alteração dos parâmetros de cultura, ainda que os efeitos variem de espécie para espécie (Brown *et al*, 1997). Por esse motivo o método de cultivo e o meio de cultura assumem um papel preponderante nos cultivos. Factores como a concentração e composição dos nutrientes, intensidade luminosa, concentração de CO₂, salinidade, temperatura, entre outros, podem ter uma influência mais significativa na composição bioquímica final da biomassa obtida, do que a espécie seleccionada (Fábregas *et al*, 1984).

As microalgas apresentam elevados valores de proteínas, nomeadamente aminoácidos essenciais para humanos e animais, representando em média valores entre 30 a 50% do peso seco (Sargent *et al*, 1997). Quanto aos polissacáridos, que se caracterizam geralmente por uma elevada digestibilidade, podem apresentar valores entre 5-15% (Brown, 2002). Em relação aos lípidos, os valores podem variar entre 1 a 70%, dependendo das condições de cultivo (Spolaore *et al*, 2006). São também uma fonte valiosa de vitaminas essenciais (Spolaore *et al*, 2006). Relativamente aos pigmentos, eles são diversos e com vários campos de interesse; por exemplo,

astaxantina, β -caroteno, luteína, entre outros, são acumulados por diversas espécies, tais como, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e *Muriellopsis* sp (Derner et al, 2006).

3.2 Sistemas de produção em grande escala

Existem dois sistemas principais de produção de microalgas em grande escala: tanques abertos (sistemas abertos) e fotobiorreactores (sistemas fechados).

3.2.1 Tanques abertos

Apesar da maioria da investigação se realizar em sistemas fechados, existem diversas companhias mundiais a produzir biomassa em larga escala em tanques abertos. A grande vantagem destes sistemas é unicamente económica, visto que os sistemas fechados são bastante mais dispendiosos e, por vezes, difíceis de operar. No entanto, apenas é possível cultivar um pequeno grupo de microalgas em sistemas abertos (Borowitzka, 1999). Estes sistemas registam produtividades bastante inferiores às obtidas em sistemas fechados. O controlo dos parâmetros ambientais é bastante mais difícil, pois as culturas estão sujeitas a factores externos, existindo assim uma grande dificuldade na suplementação de CO₂ nos sistemas de cultivo, o que faz com que seja deficientemente utilizado neste tipo de sistemas (Chisti, 2007). Por outro lado, existe uma elevada probabilidade de contaminação com outras espécies e outros organismos que se alimentam das microalgas. As espécies cultivadas têm que apresentar uma característica que dificulte o crescimento de outros organismos, como, por exemplo, a *Dunaliella salina*, que cresce com salinidade muito elevadas, ou a *Spirulina*, que cresce em ambientes com grandes concentrações de bicarbonato e pH elevado (Borowitzka, 1999).

3.2.2 Fotobiorreactores

A principal vantagem dos sistemas fechados (Fig. 1) é permitirem o cultivo de culturas axénicas durante períodos prolongados, sendo as contaminações facilmente controladas nestes sistemas (Ugwu, 2008). Outra vantagem é o cultivo de espécies sensíveis, já que o controlo dos parâmetros ambientais num sistema fechado é bastante mais fácil de efectuar. Existem diversos tipos de fotobiorreactores, cilíndricos, painéis, tubulares, descartáveis, entre outros, parecendo contudo os fotobiorreactores

tubulares os mais promissores (Molina-Grima *et al*, 2000). Estes sistemas podem ser iluminados por luz solar, artificial ou ambas. A concentração final obtida nestes sistemas é bastante superior à obtida nos sistemas abertos, podendo atingir produtividades entre 1.20 e 2.70 g l⁻¹ d⁻¹ (Molina-Grima *et al*, 2000; Ugwu, 2008).

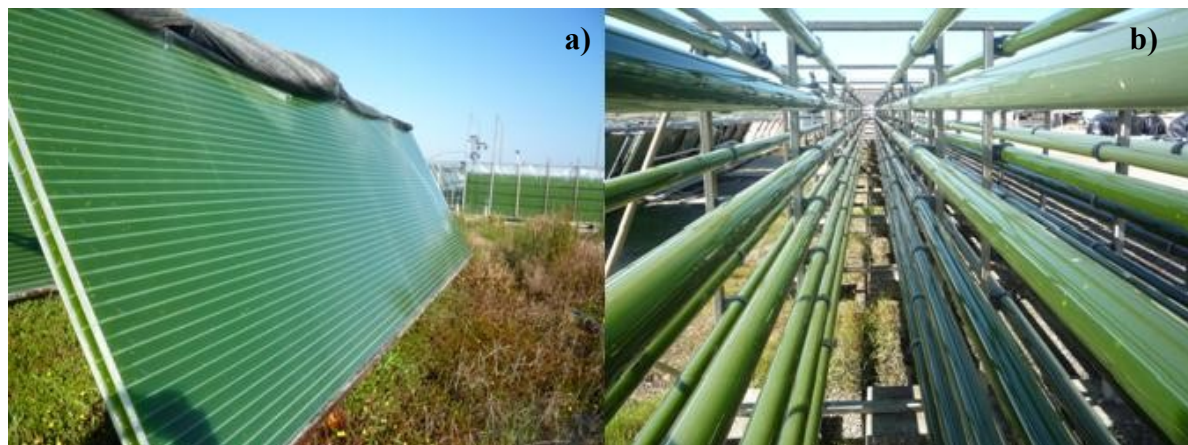


Fig. 1 – Exemplos de fotobiorreactores para cultivo em larga escala de biomassa algal nas instalações da Necton S. A.; a) Fotobiorreactor de painel; b) Fotobiorreactor tubular

3.3 Aplicações das microalgas

As microalgas são utilizadas como alimento vivo para animais filtradores, nomeadamente no cultivo de moluscos bivalves (Morales, 1982) e na fase larvar de algumas espécies de crustáceos e peixes, constituindo a principal dieta do zooplâncton que serve de alimento nestas primeiras fases (Brown *et al*, 1997). A elevada concentração de ácidos gordos polinsaturados presentes em algumas espécies de microalgas principalmente marinhas, nomeadamente de EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosaheptaenóico) são essenciais ao desenvolvimento de diversas larvas (Brown, 2002). São estes ácidos gordos que, juntamente com os fosfolípidos, contribuem para a formação das membranas celulares e fornecem energia metabólica (Sargent *et al*, 1995). A presença de microalgas nas fases larvares tem ainda a vantagem de ajudar a manter a qualidade da água devido ao consumo de amónia (Reitan *et al*, 1997).

Podem também ser utilizadas como suplementos nutricionais, inseridas nos alimentos (alimentos funcionais), devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, sendo variados os benefícios conhecidos associados ao seu consumo (Becker *et al*, 1994). Os pigmentos carotenóides, como por exemplo astaxantina, β -caroteno, ficobiliproteínas e luteína são usados na indústria farmacêutica, medicina e

alimentação humana, como compostos bioactivos devido às suas propriedades terapêuticas (Derner *et al*, 2006).

Nos últimos anos aumentou o interesse pelo uso de microalgas para tratamento de águas residuais, uma vez que estas podem ser utilizadas com o objectivo de remover ou transformar os poluentes existentes nas águas, como excesso de nutrientes, xenobióticos e metais pesados, podendo a biomassa servir posteriormente para outra aplicação (Carlsson *et al*, 2007).

A utilização de microalgas para a produção de biodiesel e sequestração de CO₂ são outras das aplicações que irão ser discutidas mais detalhadamente nos pontos seguintes.

3.3.1 Produção de biocombustíveis

Com a crescente preocupação com o aquecimento global em resultado da exploração de combustíveis fósseis, e com o contínuo aumento do preço do crude (Chisti, 2007), cresceu também o interesse no potencial das microalgas para produção de biocombustíveis, nomeadamente biodiesel, bioquerosene, biohidrogénio, biometano, entre outros.

As principais alternativas aos combustíveis fósseis existentes são actualmente os chamados biocombustíveis de 1ª geração, produzidos a partir do óleo obtido de colheitas vegetais, gorduras animais e desperdícios domésticos, mas que não conseguem suportar as exigências do mercado, satisfazendo apenas 0.3% da procura de combustíveis para transporte (Shenk *et al*, 2008). O uso de colheitas vegetais está ainda associado a um grave problema a nível da segurança alimentar. O preço de vários cereais tem aumentado devido à competitividade que estes biocombustíveis exercem no mercado alimentar, colocando a segurança alimentar dos países menos desenvolvidos em causa.

A 2ª geração de biocombustíveis não tem qualquer impacto no mercado alimentar, pois não são obtidos através de colheitas vegetais, permitindo assim uma maior sustentabilidade e eficiência na sua produção, e ainda com vantagens a nível ecológico (Fonseca, 2008). É neste quadro que se colocam as microalgas. A utilização de microalgas tem diversas vantagens nesta indústria em relação às tradicionais oleaginosas, nomeadamente:

1 – Uma maior eficiência na conversão de luz, conseguindo duplicar a biomassa em apenas 24 horas e permitindo o fornecimento de óleo durante todo o ano (Shenk *et al*, 2008);

2 - O conteúdo lipídico pode exceder 70% da biomassa seca (Chisti, 2007);

3 - Os biocombustíveis obtidos são altamente biodegradáveis (Shenk *et al*, 2008);

4 - O resíduo de biomassa depois da extracção do óleo pode ser reutilizado como alimento, fertilizante, ou fermentado para produzir metanol e etanol (Rodolfi *et al*, 2009);

5 - Os cultivos podem ser efectuados em água salgada e de desperdícios, reduzindo a utilização do uso de água doce (Shenk *et al*, 2008), principalmente preocupante nos países com mais população (Li *et al*, 2008);

6 – Podem ser cultivadas em terrenos áridos (p.ex. desertos), que não são adequados para a agricultura (Converti *et al*, 2009).

7 - Necessitam de bastante menos área de cultivo, com potencial de produção em fotobiorreactores de 100 000 a 300 000 litros de óleo de microalgas por hectare por ano (Brown *et al*, 1994).

8 - Têm ainda maior eficiência na extracção de CO₂ (Chisti, 2007).

Segundo Chisti (2007), a produção de biodiesel a partir de microalgas parece ser a única energia alternativa renovável capaz de competir com os combustíveis fósseis, e de suportar as exigências do mercado. No entanto, os custos de produção e extracção do óleo para a síntese de biodiesel são ainda elevados comparativamente com os combustíveis fósseis: 2.80 \$/L para os biocombustíveis obtidos a partir de microalgas e 0.49 \$/L para os combustíveis obtidos a partir de combustíveis fósseis. Este preço final tem que ser necessariamente mais baixo para que os biocombustíveis obtidos se possam tornar competitivos com os combustíveis fósseis, sendo hoje em dia aplicado elevado investimento nesta área para reduzir os custos finais de produção de todo o processo. Actualmente, os estudos nesta área incidem principalmente nos seguintes tópicos: aumento da produção de lípidos; modificações genéticas nas estirpes; melhor eficiência dos fotobiorreactores, bem como nas novas tecnologias de recolha de biomassa, extracção do óleo, e ainda na transformação da biomassa em

biodiesel. A contínua optimização de todos estes processos poderá permitir a redução dos custos finais de produção dos biocombustíveis obtidos, tornando possível a industrialização desta tecnologia.

Os processos pós-produção de biomassa, recolha das culturas, extracção do óleo e transformação em biodiesel representam cerca de 50% do preço final, sendo um dos entraves ao desenvolvimento desta tecnologia em larga escala (Chisti, 2007).

3.3.1.1 Extracção do óleo

A extracção do óleo nas microalgas é efectuada com os métodos normalmente utilizados para extracção do óleo de sementes, tais como: prensas, extracção com solventes e extracção supercrítica. As prensas aplicam elevada pressão nas células provocando a lise celular e conseqüente libertação do óleo, conseguindo no entanto apenas extrair entre 70 e 75% dos óleos (Demirbas, 2009). A nível industrial, a extracção mecânica predomina, seguida da extracção química com solventes para extracção do restante óleo (Ferrentino, 2007).

A extracção com solventes pode ser utilizada após a extracção física ou isoladamente, tendo como principal vantagem o facto de resultar em elevadas percentagens de extracção dos óleos. No entanto, o simples uso de solventes não é suficiente para extrair totalmente o óleo das microalgas. A parede celular das microalgas exige a utilização de métodos que provoquem a ruptura celular, para libertar os óleos, sendo necessária tecnologia apropriada. Segundo Ferrentino (2007), existem dois métodos que conseguem efectivamente destruir a membrana celular das culturas algais: a utilização de trituradores e os ultrasons. Os trituradores ocupam cerca de 80% do volume da câmara de trituração, registando bons resultados na destruição da membrana celular. Os ultrasons formam bolhas nas culturas que produzem ondas de choque, sendo estas responsáveis pela ruptura das células. Após a extracção, os solventes são recuperados por evaporação, obtendo-se apenas o óleo. No entanto, os resíduos algais obtidos após este tipo de extracção não podem ser reaproveitados devido ao uso de solventes químicos, uma vez que ocorrem sempre perdas de solventes que contaminam os resíduos finais, ficando estes inutilizados para diversas aplicações.

A extracção supercrítica, só pode ser realizada em laboratório, devido aos elevados custos a que está associada, sendo no entanto esta a extracção mais eficiente, pois permite extrair 100% dos óleos. Nestes sistemas, o CO₂ é colocado a alta pressão, ganhando propriedades de líquido e gás, funcionando como solvente (Demirbas, 2009).

3.3.1.2 Processos finais de transformação

O principal problema associado à utilização de óleos vegetais é a sua alta viscosidade e baixa volatilidade. Desta forma, os processos finais de transformação da biomassa algal servem essencialmente para baixar a viscosidade dos óleos e melhorar a combustão nos motores a diesel (Basha *et al*, 2008).

O óleo produzido pelas microalgas pode ser transformado em biocombustíveis, dependendo das suas propriedades, por dois processos: transesterificação e hidrotratamento. O processo de hidrotratamento produz diesel sintético a partir da mistura de fracções de óleo com hidrogénio, na presença de um catalisador, parecendo este processo mais promissor (Fonseca, 2008). Neste momento é apenas utilizado a nível laboratorial, mas existem grandes expectativas em relação a esta tecnologia, uma vez que os custos de transformação do óleo são sensivelmente metade dos registados para a transesterificação (Huber *et al*, 2006). É, no entanto, o processo de transesterificação que predomina a nível industrial, estando bastante estudado e optimizado para diferentes tipos de oleaginosas. A figura 2 mostra a reacção típica de transesterificação para triacilgliceróis.



Fig. 2 – Reacção de transesterificação para triacilgliceróis (adaptado de Demirbas, 2009)

Neste processo, os triacilgliceróis, na presença de um catalisador, reagem com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), para produzir biodiesel (mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos) e glicerol (Majewsky, 2003). Existem vários tipos de transesterificação: básica, ácida, enzimática ou com metanol super-crítico. A

transesterificação varia com o catalisador utilizado na reacção, sendo a transesterificação básica principalmente utilizada na indústria de biodiesel (Robles-Medina *et al*, 2009). Neste tipo de transesterificação utiliza-se normalmente NaOH ou KOH como catalisador. Devido à presença de um catalisador básico na presença de água, esta reacção tem tendência a formar sabão, pois os catiões Na^+ e K^+ presentes na solução originam a reacção de saponificação. Assim, no caso das microalgas, a transesterificação básica, pode estar limitada inicialmente, uma vez que em termos industriais não é viável eliminar toda a água da biomassa, sendo aconselhável a utilização de outro tipo de transesterificação (Ferrentino, 2007). A transesterificação nas microalgas pode ser efectuada *in-situ*, evitando o dispendioso e tóxico processo de extracção dos óleos. Segundo resultados obtidos em trabalhos anteriores, com este processo observou-se um aumento de 150% na produção de ésteres metílicos a partir de *Chlorella*, aquando comparado com a tradicional extracção com solventes e posterior transesterificação básica (Ferrentino, 2007). Este processo já tinha provado bons resultados noutras plantas oleaginosas.

Na Figura 3 podemos ver um exemplo de um esquema representativo de todo o processo de produção de biodiesel a partir de microalgas.

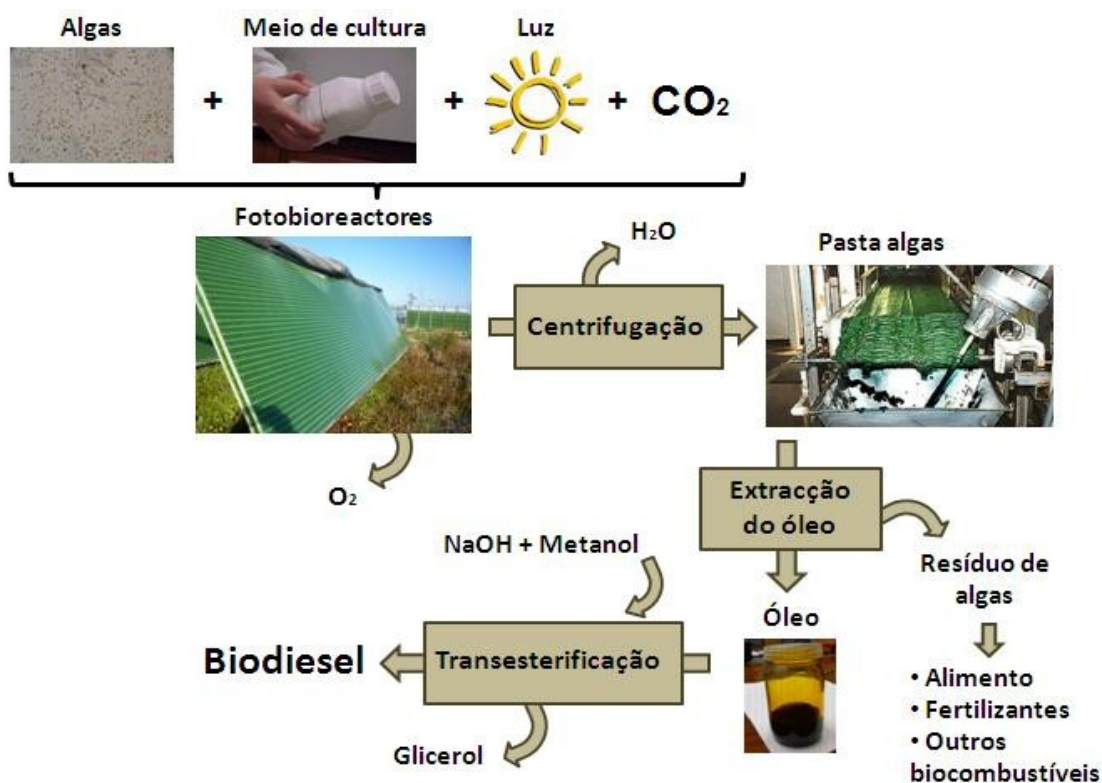


Fig. 3 – Representação esquemática da produção de biodiesel a partir de microalgas

3.3.1.3 Propriedades dos lípidos para biocombustíveis

Na maioria dos organismos oleaginosos, os lípidos estão presentes na membrana celular e citosol (Somashekar *et al*, 2001). Os lípidos existentes nas microalgas podem ser divididos em duas classes: polares (fosfolípidos) ou apolares (triacilgliceróis). Os triacilgliceróis são considerados a principal fonte de biodiesel das tradicionais oleaginosas, sendo estes lípidos que são de maior interesse obter a partir de biomassa algal, apesar de os lípidos polares também poderem ser transformados em biodiesel (Ferrentino, 2007). Os lípidos polares são responsáveis pela formação da célula e das membranas dos cloroplastos, acumulando-se quando existe a necessidade de formar novas membranas durante os estágios de desenvolvimento. Os lípidos apolares são usados como armazenamento de fonte de carbono e energia, estando a acumulação destes lípidos associada à reserva de energias antes da divisão celular (Guckert & Cooksey, 1990). É este facto que demonstra a relação inversa entre a produção de lípidos e o crescimento das culturas, pois existe a acumulação lipídica antes da divisão celular, mas esta não acontece quando as condições de cultivo não são favoráveis. Elevada produtividade e elevado conteúdo lipídico, duas das características essenciais para a produção de biodiesel a partir de microalgas são mutuamente exclusivas (Sheehan *et al*, 1998). Espécies com elevadas taxas de crescimento como, por exemplo, a *Chlorella*, registam por norma uma baixa produção lipídica. O contrário sucede com espécies com elevado conteúdo lipídico como, por exemplo, *Botryococcus braunii*, que regista uma elevada quantidade de óleos, entre 25 e 75% do peso seco, apresentando no entanto uma taxa de crescimento baixa. Se tivermos em conta o tempo, certas espécies com elevada produção de lípidos como *B. braunii*, apresentam, em função do tempo, uma produtividade lipídica bastante inferior à obtida com a *Chlorella*.

3.3.2 Sequestração de CO₂

O CO₂ é o principal gás de estufa. Os seus níveis têm vindo a aumentar desde o início da industrialização, sendo hoje em dia aplicado grande investimento e investigação no armazenamento e fixação deste gás. As microalgas são consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2004), utilizando o CO₂ como fonte de carbono no seu crescimento, podendo o gás ser

facilmente incorporado nos sistemas de cultivo (Carvalho *et al.*, 2006). O cultivo de microalgas foi sugerido por diversos autores como um método alternativo para reduzir a quantidade de CO₂ presente na atmosfera (Carlsson *et al.*, 2007), uma vez que aproximadamente 50% do peso seco das microalgas é carbono derivado do dióxido de carbono utilizado para crescerem. Na produção de 100 toneladas de biomassa algal são fixadas aproximadamente 183 toneladas de dióxido de carbono (Chisti, 2007). Devido ao seu rápido crescimento, as microalgas conseguem incorporar o CO₂ eficazmente durante o crescimento fotoautotrófico. No entanto, apesar de essencial para o crescimento das microalgas, o aumento de CO₂ tem uma influência negativa nos cultivos a partir de determinadas concentrações (Lee & Lee, 2003). De qualquer forma, as vantagens do uso de microalgas para mitigação de CO₂ são evidentes, pois enquanto as plantas absorvem normalmente CO₂ de atmosferas que contenham entre 0.03-0.06% de CO₂, as microalgas conseguem crescer com percentagens de saturação de CO₂ até 15%, com uma percentagem de mitigação de CO₂ entre 10-50% (Li *et al.*, 2008).

3.4 Espécies estudadas

Neste trabalho utilizaram-se duas espécies de ambientes aquáticos distintos: uma de ambiente marinho e outra dulçaquícola, *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella* sp., respectivamente.

A espécie *Nannochloropsis oculata* esteve durante bastante tempo incorrectamente inserida no grupo das *Chlorellas* marinhas. Estas espécies são bastante semelhantes entre si, nomeadamente no aspecto e forma, existindo contudo diferenças a nível estrutural e bioquímico que colocam estas microalgas em classes distintas (Muruyama *et al.*, 1997).

3.4.1 *Nannochloropsis oculata*

Esta espécie, pertencente ao filo Heterokontophyta, classe Eustigmathophyceae (Graham & Wilcox, 2000), é geralmente considerada de águas marinhas, mas pode também ocorrer em ambientes de água doce (Fig. 4A). É constituída por organismos unicelulares com forma esférica de 2 a 4 µm de comprimento. Ao contrário da maioria das microalgas, esta espécie não possui clorofila

b ou *c*, sendo a violoxantina o principal pigmento acessório. Esta espécie não apresenta pirenóide (Graham & Wilcox, 2000).

Segundo Muruyama *et al*, 1997, a quantidade de proteínas, perfil de aminoácidos, vitaminas e minerais é de maneira geral semelhante à *Chlorella*. No entanto, quanto aos lípidos e perfil de ácidos gordos existem diferenças notórias. O conteúdo lipídico é superior para *Nannochloropsis oculata* e o perfil de ácidos gordos desta espécie apresenta quantidades elevadas de EPA (ácido eicosapentaenóico), ao contrário do que se verifica com a *Chlorella vulgaris* que carece de EPA ou está presente numa proporção muito pequena, apresentando elevada concentração de ácidos gordos insaturados, principalmente ácido linoléico (C18:2n6) e linolénico (C18:3n3).

Em aquacultura, esta espécie é bastante utilizada nas fases larvares de peixes, na técnica da água verde, um procedimento bastante usado em larvicultura que melhora o crescimento, a sobrevivência e a ingestão de alimento (Naas *et al*, 1992; Reitan, *et al*, 1997; Cahu *et al*, 1998; Dinis *et al*, 2000; Skiftesvik *et al*, 2003; Faulk & Holt, 2005; Rocha *et al*, 2008). É uma espécie com bastante interesse em biotecnologia marinha devido ao seu elevado conteúdo lipídico (Chiu *et al*, 2009). Actualmente é considerada uma das espécies com potencial para a indústria de biocombustíveis.

3.4.2 *Chlorella* sp

A estirpe de *Chlorella* utilizada no decorrer deste trabalho foi previamente isolada nas instalações da Necton S.A., a partir de uma amostra de água de furo fornecida por uma empresa privada (Fig. 4B).

Esta espécie pertence ao filo Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, sendo conhecida por tolerar variadas condições ambientais, habitando ambientes de água doce e marinha (Graham & Wilcox, 2000). Esta classe é constituída por organismos unicelulares, planctónicos com forma esférica ou elipsoidal com 2-10 µm de comprimento, sem flagelo, com presença de pirenóide em algumas espécies. Pode apresentar dois tipos de parede celular: uma parede celular constituída por glucose e manose, ou um segundo grupo de espécies em que a parede celular é constituída por glucosamina (Takeda, 1991).

O cultivo em grande escala da espécie *Chlorella* está bastante desenvolvido principalmente no Japão, Taiwan e Alemanha, sendo produzidas anualmente cerca de 2000 toneladas (peso seco) para alimentação e aquacultura (Spolaore *et al*, 2006). Pode ser cultivada fotoautotrófica ou heterotrófica, dependendo das condições de cultivo. Os cultivos heterotróficos utilizam glucose, acetato ou outros compostos orgânicos como fonte de carbono, no seu crescimento (Wu *et al*, 1994). Esta espécie tem recebido mais atenção nos últimos anos na indústria de biocombustíveis e sequestração de CO₂ devido ao fácil cultivo e às elevadas taxas de crescimento que permitem atingir elevadas concentrações celulares em cultivos exteriores. No entanto, é uma espécie que regista baixo conteúdo lipídico quando cultivada em condições fotoautotróficas. A menor quantidade de lípidos está associada a uma maior concentração de polissacáridos, coincidente com a existência de grãos de amido nos cloroplastos (Graham & Wilcox, 2000).

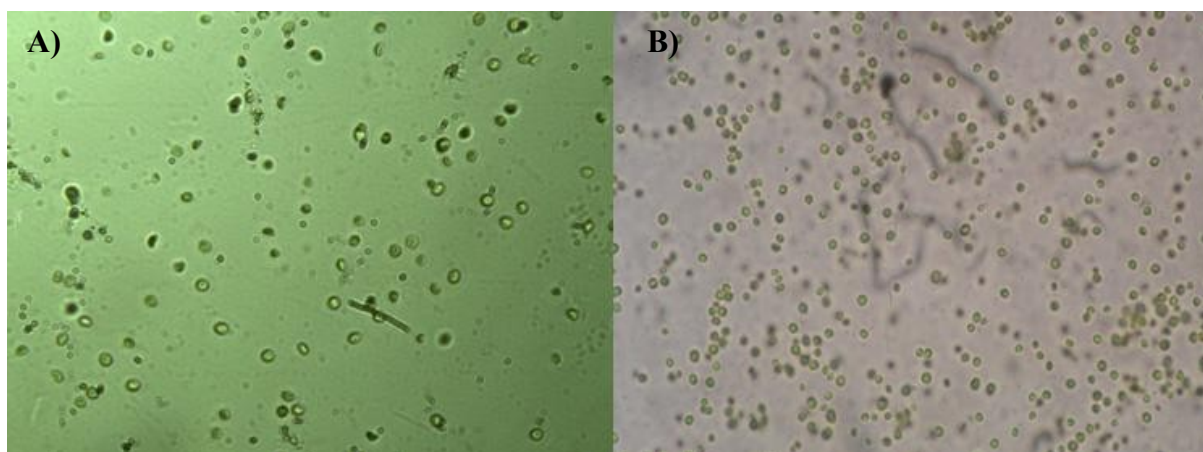


Fig. 4 – A) *Nannochloropsis oculata*; B) *Chlorella spp* (Fotos: Necton; Ampl. 60 x)

A tabela 1 mostra um resumo das características taxonómicas das espécies *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris*.

Tabela 1 – Características taxonómicas de *N. oculata* e *C. vulgaris*; (Adaptado de Maruyama *et al*, 1997)

	<i>Nannochloropsis oculata</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
Dimensão da célula	2-4 μm	2-10 μm
Formato da célula	Esférica/ovóide	Esférica/elipsoidal
Cloroplastos	Forma de copo ou ovóide	Forma de copo ou cinta
Reprodução	Fissão binária	2-16 autoesporos
Pirenóide	Ausente	Presente
Cloroplasto ER	Presente	Ausente
Disposição dos tilacóides	3 Bandas de tilacóides	Fundidos
Pigmentos predominantes	Clorofila <i>a</i> Carotenóides Violoxanthina Ester de vaucherixantina	Clorofila <i>a</i> Clorofila <i>b</i> Carotenóides Luteína

3.5 Necton S. A.

A Necton - Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas, S.A. foi fundada em 1997, a partir de um projecto da Escola Superior de Biotecnologia, do Porto. Sediada no Parque Natural da Ria Formosa, em Belamandil, desenvolve a sua actividade na área da biotecnologia marinha. Tendo-se especializado na produção de sal marinho e microalgas, é detentora de um vasto *know-how* na produção em larga escala de biomassa algal, participando activamente em diversos projectos de I&D relacionados com diferentes aplicações de microalgas.

A área de produção de microalgas dedica-se principalmente ao fornecimento e optimização de soluções concentradas de microalgas, estando estas disponíveis sob diferentes formas: PhytoBloom Green Formula[®], PhytoBloom Ice[®] e PhytoBloom Prof.[®]. Os produtos desenvolvidos são exportados para toda a Europa, principalmente para os sectores da Aquacultura e Cosmética. Sendo a produção de biomassa algal efectuada em fotobiorreactores, as soluções concentradas de microalgas assim obtidas apresentam custos significativamente inferiores, o que representa uma vantagem em relação aos métodos tradicionais de cultivo de microalgas, nas maternidades de empresas de aquacultura.

Em 2007, foi formada a Algafuel, resultante de um *spin-out* da Necton S. A. Esta empresa dedica-se ao desenvolvimento e implementação de projectos para a

produção industrial de microalgas, especializada nas tecnologias de sequestração de CO₂ e na produção de matéria-prima algal para produção de biocombustíveis.

4 Metodologia experimental

O trabalho a que se refere o presente relatório foi realizado nas instalações da empresa Necton S.A., e nos laboratórios de Aquacultura e Biotecnologia Marinha da UALG, no período compreendido entre 10/09/08 e 17/06/09, e está dividido em três fases distintas:

- 1) Fase laboratorial
- 2) Fase piloto
- 3) Determinação do perfil lipídico das microalgas

4.1 Fase laboratorial

No decorrer desta fase, pretendeu-se desenvolver e otimizar um meio de cultura, com o objectivo de produzir biomassa em larga escala. Pretendeu-se também avaliar o efeito de ambas as soluções testadas na composição bioquímica das espécies estudadas.

4.1.1 Sistema de cultivo

O sistema de cultura (Fig. 5) consistiu em dois suportes de aço inoxidável para tubos de ensaio (37 x 16 x 22.5 cm), com capacidade para 42 tubos de ensaio de 80 ml. Contudo, nos quatro ensaios realizados, utilizaram-se apenas entre 15-18 tubos de ensaio distribuídos pelos dois suportes, de forma a permitir não só uma maior entrada de luz, como também uma distribuição mais homogénea desta ao longo de todos os tubos. Os suportes foram colocados em cima de uma prateleira onde existia incidência de luz natural por ambos os lados.

Foram utilizados tubos de ensaio de 80 ml com rolhas de borracha. As rolhas foram perfuradas com duas agulhas para permitir a entrada e saída de ar. A entrada de ar no exterior do tubo encontrava-se ligada por uma mangueira ao sistema de ar do laboratório, e no interior possuía um capilar que permitiu o arejamento constante desde o fundo do tubo, mantendo as culturas em suspensão. Ambos os suportes sofreram uma rotação diária de 180°.

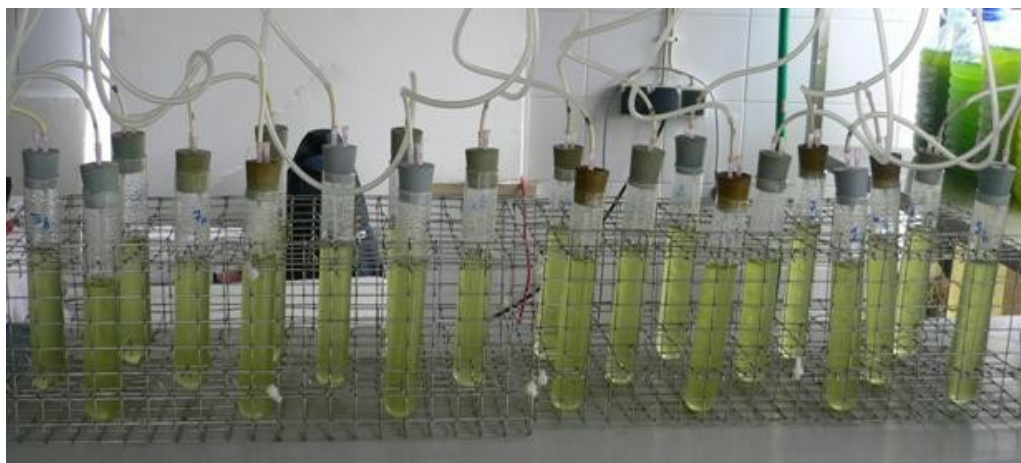


Fig. 5 – Sistema de cultivo utilizado no decorrer de todos os ensaios na fase de laboratório

4.1.2 Preparação dos meios de cultura

O meio desenvolvido e optimizado no decorrer deste trabalho **Macro + AM + Fe** foi realizado com base no meio de cultura Walne, sendo constituído por três soluções:

1. Solução de macronutrientes do meio de Walne (**Macro**), cuja concentração foi definida no início da experiência de 1 ml/l e não foi alterada durante o decorrer dos ensaios.

2. Solução comercial concentrada de oligoelementos (**AM**) desenvolvida pela Necton S.A. que foi testada em dois ensaios para optimização da concentração óptima de cultivo.

3. Suplemento de ferro (**Fe**), o qual foi efectuado com a solução de ferro a uma concentração de 20 μM , e que também foi optimizado em dois ensaios com diferentes concentrações.

Quanto ao meio de Walne, este é constituído por três soluções: solução de sais principais, solução A (oligoelementos) e solução de vitaminas. Para preparar a solução de sais principais, utilizou-se uma solução com EDTA-Na, 0.12 M; NaNO_3 , 1.18 M; H_3BO_3 , 0.54 M; KH_2PO_4 , 0.17 M; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0018 M; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0048 M; mais 1 ml da solução A. A solução A foi preparada com ZnCl_2 , 0.15 M; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.08 M; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.007 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 M. Quanto à solução de vitaminas, continha tiamina, 0.012 M e vitamina B_{12} , 0.00015 M. Para preparar a solução de macronutrientes do meio Walne, preparou-se o meio apenas com os reagentes constituintes do meio que fornecem nitratos e fosfatos às microalgas, NaNO_3 e KH_2PO_4 respectivamente.

Para preparar a solução de ferro, usou-se perclorato de ferro a 20 mM e EDTA-Na a 20 mM.

A solução AM, testada neste trabalho e fornecida pela Necton S.A, é um concentrado de diferentes oligoelementos, pronto a utilizar, para a cultura de microalgas.

Todas as soluções foram esterilizadas na autoclave, a 120 °C, durante 20 minutos.

4.1.3 Ensaio realizados

Foram realizados quatro ensaios com duas espécies de microalgas, de ambientes aquáticos distintos, *Nannochloropsis oculata* (água salgada) e *Chlorella* sp (água doce) para otimizar as soluções constituintes do meio, Macro + AM + Fe.

A solução de macronutrientes do meio não foi otimizada no decorrer deste trabalho, tendo sido mantida a mesma concentração de 1ml/l (1.18 mM) em todos os ensaios.

4.1.3.1 Optimização da solução comercial oligoelementos (AM)

Nos primeiros dois ensaios, pretendeu-se otimizar a concentração óptima da solução AM em ambas as espécies. Foram testados cinco meios de cultura distintos, sendo o meio Walne e a sua solução de macronutrientes (Macro) utilizados como controlos. Nos tratamentos, manteve-se a concentração da solução de macronutrientes nos diferentes meios, e testou-se a suplementação com a solução de oligoelementos AM a diferentes concentrações: 50, 100 e 200 µl/l, respectivamente.

Controlos:

1. Walne 1 ml/l
2. Macro 1 ml/l

Tratamentos:

3. Macro 1 ml/l + **AM 50 µl/l**
4. Macro 1 ml/l + **AM 100µl/l**
5. Macro 1 ml/l + **AM 200 µl/l**

4.1.3.2 Optimização da solução de ferro (Fe)

Uma vez optimizada a concentração de AM, efectuaram-se mais dois ensaios para optimizar a concentração da solução de ferro em ambas as espécies. Como controlos, utilizou-se o meio Walne e o meio composto pela solução de macronutrientes mais a solução AM (Macro + AM), com a concentração de AM optimizada nos ensaios anteriores (50 µl/l). Nestes ensaios, manteve-se a mesma concentração do meio Walne, e do meio Macro + AM 50 µl/l, e variou-se a concentração da solução de ferro, nos diferentes tratamentos: 0.5, 1, 1.5 e 2 ml/l.

Controlos:

1. Walne 1 ml/l
2. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l

Tratamentos:

3. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l + Fe 500 µl/l
4. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l + Fe 1 ml/l
5. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l + Fe 1.5 ml/l
6. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l + Fe 2 ml/l

4.1.4 Inoculação das culturas

Antes de se proceder à inoculação das culturas, foi determinada a concentração de nitratos na cultura a utilizar como inóculo, e apenas se procedeu à inoculação uma vez confirmada a não existência de nutrientes na cultura de origem.

Um inóculo de 10 ml de cultura de algas foi adicionado a cada tubo de ensaio. Seguidamente foram adicionadas as soluções stock constituintes dos diferentes meios de cultura com as respectivas concentrações descritas anteriormente, sendo posteriormente adicionada água doce esterilizada (para a cultura de *Chlorella* sp) ou salgada (para a cultura de *N. oculata*) até perfazer o volume de 80 ml. Todos os dias foi adicionada água doce esterilizada aos diferentes tubos para compensar a evaporação. Os ensaios decorreram com temperatura ambiente e fotoperíodo natural. Todo o material utilizado nesta experiência foi previamente esterilizado a 120 °C.

4.2 Fase piloto

Uma vez optimizado o meio de cultura, este foi testado ao ar livre em fotobiorreactores descartáveis do tipo “Green Wall” (Fig. 6). Os testes foram apenas realizados para a cultura da espécie *Chlorella* sp, uma vez que foi a espécie na qual se registaram melhores resultados durante a Fase Laboratorial.

4.2.1 Fotobiorreactores (Green Wall)

As experiências nestes sistemas decorreram durante os meses de Fevereiro e Março de 2009, nas instalações da Necton S.A.



Fig. 6 - Fotobiorreactor do tipo “Green Wall” utilizado no decorrer deste trabalho no exterior

Os fotobiorreactores do tipo “Green Wall” (Fig. 6) são principalmente utilizados nos cultivos de microalgas que devido à sua fragilidade não podem ser cultivadas em fotobiorreactores com bombas centrífugas. Contudo, estes sistemas recebem agora mais atenção devido ao baixo custo de construção e operação (Rodolfi *et al*, 2008), com o intuito de reduzir de maneira significativa os custos de construção das unidades piloto.

Nestes sistemas, a câmara de cultura é constituída por um saco impermeável rectangular com 0.3 mm de espessura, feito de plástico tipo LDPE, suportado por uma estrutura de ferro (Tredici & Rodolfi, 2004). Os sacos utilizados têm capacidade para 200 L. Cada saco possui no fundo um tubo com pequenas perfurações, ligado a um sistema de ar, que permite o arejamento constante das culturas, mantendo-as em suspensão. O fornecimento de CO₂ foi realizado com difusor próprio por meio de um

sistema de injeção manual, de modo a que o pH das culturas se mantivesse próximo de 9. A fim de controlar a temperatura das culturas, utilizou-se um sistema de aspersão de água semelhante a um sistema de rega tradicional, que se ligava manualmente quando a temperatura das culturas atingia os 22 °C.

Diariamente, efectuou-se uma análise de nitratos às culturas, de forma a efectuar os ajustes necessários, para manter na cultura a concentração de nitratos pretendida.

4.2.2 Testes realizados

Neste sistema, utilizou-se um saco com a solução de macronutrientes do meio de Walne como controlo (Macro) e dois sacos com os tratamentos testados como descrito em baixo. Não foi possível utilizar triplicados por dificuldades de fornecimento dos sacos por parte do fabricante.

Foram realizados dois testes com o meio de cultura desenvolvido e optimizado na fase de laboratório:

1) Primeiro pretendeu-se testar apenas a influência da solução comercial de oligoelementos AM no crescimento das culturas. Como controlo, utilizou-se a solução de macronutrientes do meio de Walne e, como tratamentos, foram usados dois sacos com a solução de macronutrientes mais a suplementação com a solução de oligoelementos AM.

Controlo:

1. Macro 1 ml/l

Tratamento:

2. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l

2) No segundo teste, utilizou-se o mesmo controlo que no primeiro (Macro). Como tratamento, foram usados dois sacos com o meio completo Macro + AM + Fe com as concentrações dos seus constituintes optimizadas para esta espécie na Fase Laboratorial.

Controlo:

1. Macro 1 ml/l

Tratamento:

2. Macro 1 ml/l + AM 50 µl/l + Fe 500 µl/l

4.3 Determinação de parâmetros bióticos e bioquímicos

4.3.1 Parâmetros bióticos

Densidade óptica

Para a determinação da densidade óptica das culturas, retirou-se 1 ml de cultura de cada tubo de ensaio. Em seguida, realizou-se uma diluição de acordo com a concentração da cultura. A leitura de absorvância no espectrofotómetro deve-se encontrar entre 0 e 1. As leituras foram obtidas a 540 nm utilizando um espectrofotómetro BOECO S-22 UV/VIS.

Concentração celular

A concentração celular das culturas foi registada no primeiro e no último dia dos ensaios utilizando uma câmara de Neubauer. Foi necessário realizar uma diluição de acordo com a concentração da cultura, de maneira que, por cada campo, contando com 1 mm², se encontrassem entre 30 a 300 células. A concentração celular foi obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Concentração celular (cel/ml)} = n^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{diluição}$$

Peso seco

O peso seco (P.S.) foi determinado no primeiro e no último dia de cada ensaio segundo o protocolo utilizado nas instalações da Necton S.A. Os filtros utilizados foram previamente lavados num sistema de filtração por vácuo com 10 ml de formiato de amónio a 31,5 g/l, de maneira a retirar as impurezas existentes. Foram colocados numa caixa de papel de alumínio própria e colocados na estufa a 50 °C durante 24 horas. Passadas 24 horas, os filtros foram colocados no excicador durante 10 minutos e foram pesados em conjunto (filtro mais a caixa de papel de alumínio).

De cada réplica foram retirados 10 ml de amostra e filtrados, utilizando os filtros previamente tratados. Após a filtração, os filtros foram novamente lavados com 10 ml da solução de formiato de amónio, colocados na estufa com as respectivas caixas de alumínio durante 72 horas e foram novamente pesados. O peso seco em g/l é obtido através da diferença entre os pesos registados a dividir pelo volume da amostra.

4.3.2 Parâmetros Bioquímicos

Proteínas

A análise de proteínas foi efectuada segundo o método de Lowry. Este método baseia-se na redução com Folin & Ciocalteu a azul de molibdeno que pode ser determinado colorimetricamente no espectrofotómetro. A recta de calibração foi obtida utilizando o método abaixo descrito com diferentes concentrações de BSA. Obteve-se uma recta com a seguinte equação, na qual o y representa a absorvância registada no espectrofotómetro e o x a concentração de proteínas: $y = 0.0029x + 0.077$.

Retiraram-se 10 ml de amostra de cada meio e centrifugaram-se durante 10 minutos, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 2 ml de NaOH (1 N). As amostras foram posteriormente colocadas em banho-maria a 100 °C, durante uma hora, para hidrolisar as proteínas. Centrifugaram-se novamente as amostras e retirou-se em duplicado 100 µl do sobrenadante para tubos de ensaio novos. Adicionou-se, de seguida, a todos os tubos 300 µl de água destilada, 400 µl de NaOH e 2 ml de uma solução constituída por uma diluição Na₂CO₃ a 5%, segundo a razão de 50:2 numa solução com CuSO₄* 5H₂O a 0.5% e tartarato de potássio a 1%. O branco foi efectuado com 400 µl de água destilada e 400 µl de NaOH. Esperaram-se 10 minutos e adicionou-se 400 µl da solução de Folin & Ciocalteu diluída segundo uma razão de 1:1 em água destilada. As amostras permaneceram à temperatura ambiente, em repouso, durante 30 min. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 750 nm no espectrofotómetro.

Lípidos totais

Os lípidos totais foram determinados segundo o método de Bligh & Dyer, modificado por Herbert. Os tubos de pesagem de lípidos foram primeiro colocados no banho seco a 60 °C, durante pelo menos 3 horas. Foram de seguida colocados no excicador para arrefecer, sendo posteriormente pesados na balança de precisão. As amostras obtidas nos ensaios foram liofilizadas durante 24 horas.

Pesaram-se entre 5 e 20 mg de peso seco, para os tubos de extracção de lípidos e adicionou-se 0.8 ml de água destilada a cada amostra. As amostras passaram a ser tratadas individualmente quando foi necessário utilizar o triturador Ultrathurrax.

Adicionou-se a cada amostra 2 ml de metanol, 1 ml de clorofórmio e levou-se a homogeneizar em gelo no Ultrathurrax durante 60 segundos. De seguida, adicionou-se 1 ml de clorofórmio e levou-se novamente a homogeneizar ao Ultrathurrax durante 30 segundos. Por fim, adicionou-se 1 ml de água destilada e homogeneizou-se em gelo no Ultrathurrax durante 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas durante 10 minutos a 2000 g. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi retirada a fase orgânica para tubos limpos. Foi pipetado um volume conhecido de clorofórmio (1 ml) para os tubos de pesagem de lípidos, previamente pesados. Os tubos foram então colocados no banho seco a 60 °C, e depois de todo o clorofórmio estar completamente evaporado, colocaram-se os tubos no excicador para arrefecer, sendo posteriormente pesados na balança de precisão. A percentagem de lípidos existente em cada amostra foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Lípidos totais} = \left[\frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) * \text{volume total de clorofórmio (2 ml)}}{\text{volume clorofórmio evaporado (1 ml)}} \right] \frac{1}{\text{peso seco amostra}}$$

4.4 Determinação do perfil lipídico das microalgas: viabilidade para produção de biocombustíveis

Para se proceder à extracção do óleo, usou-se o método de Bligh & Dyer modificado. As amostras utilizadas de ambas as espécies nesta fase não foram liofilizadas, apresentando a pasta uma composição de água de 67% para *Nannochloropsis oculata* e de 78% para a *Chlorella*. As extracções foram realizadas em quintuplicado, em ambas as espécies. Todo o material de vidro utilizado nesta fase foi previamente descontaminado com uma solução de Extran MA01 a 2% (detergente alcalino). A determinação do perfil lipídico de ambas as espécies foi efectuada no Laboratório do grupo de investigação MARBIOTECH (Marine Biotechnology) do CCMAR, na Universidade do Algarve.

Pesou-se 0.1 g de biomassa fresca e adicionou-se 1.5 ml de uma solução de derivatização composta por metanol e cloreto de acetilo (20:1). De seguida, provocou-

se a disrupção das células num homogeneizador UltraThurrax, perfazendo três ciclos de 30 segundos em gelo. Adicionou-se 1 ml de hexano e 20 µl de uma solução de padrão interno composta por ácido hexacosáenico (C23:0) 1 mg ml⁻¹ em hexano. Os vials foram de seguida colocados num banho a 100 °C durante 1 hora para completar a derivatização. Deixaram-se a arrefecer em gelo e foram transferidos para novos tubos de centrífuga. Acrescentou-se 1 ml de água destilada e agitou-se no vortex durante 1 minuto. As amostras foram então centrifugadas a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C, para separação das fases aquosa e orgânica. A fase orgânica foi removida com uma micropipeta para novos vials. Este processo foi repetido mais três vezes com 4 ml de hexano. Adicionou-se sulfato de sódio anidro em excesso para remover alguma água que ainda se pudesse encontrar na mistura. Filtraram-se posteriormente as amostras com uma seringa com filtro próprio de 0.45 µm de poro, para vials de cromatografia previamente pesados. As amostras foram então concentradas com um jacto suave de azoto gasoso. Estando todo o hexano completamente evaporado, pesaram-se novamente os vials (fracção total de lípidos).

A identificação e quantificação dos ésteres metílicos foram realizadas por GC-MS (Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa) “Agilent Technologies 6890 Network GC System, 5973 Inert Mass Selective Detector”. A separação dos diferentes compostos foi obtida através da utilização de um programa de temperatura específico para ésteres metílicos descrito no gráfico.

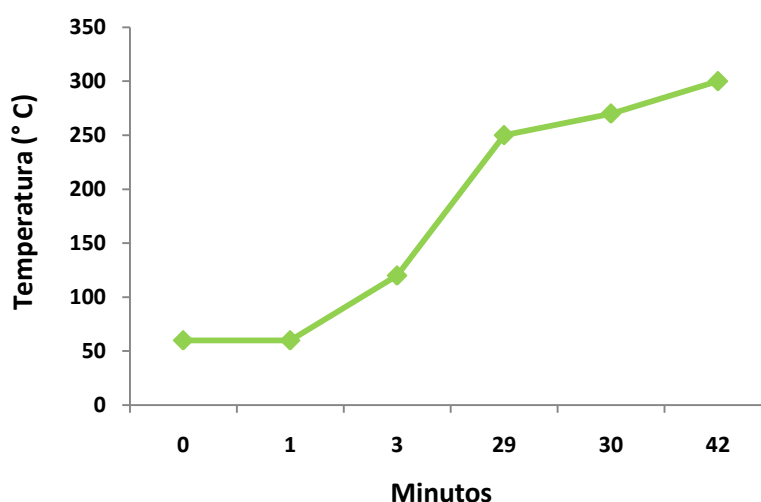


Fig. 7 – Programação da temperatura do forno no GC-MS para separação dos ésteres metílicos

O forno do aparelho foi programado para iniciar e manter-se um minuto a 60 °C, aumentando até aos 120 °C em dois minutos, continuando a aumentar durante 26 minutos até aos 250 °C. Posteriormente eleva-se para 270 °C em 1 minuto aumentando por fim até aos 300 °C durante 12 minutos (Fig. 7).

Como padrão foi utilizada uma solução vendida comercialmente composta por uma mistura de 37 ésteres metílicos (Supelco 37 Comp. FAME Mix). A figura 8 mostra o cromatograma obtido para o padrão, com os diferentes picos bem definidos e os respectivos tempos de retenção.

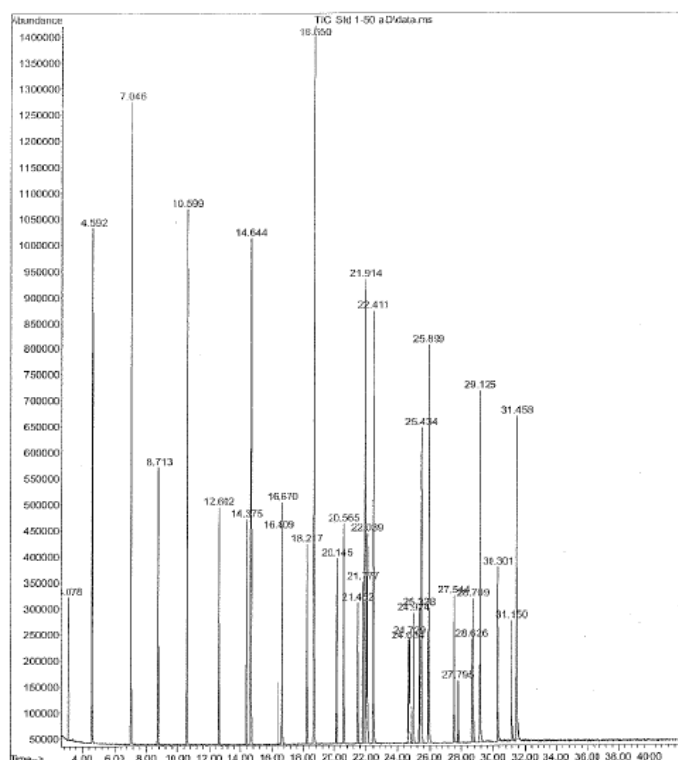


Fig. 8 – Cromatograma do padrão constituído por uma mistura de 37 ésteres metílicos

As amostras foram ressuspendidas com 500 µl de hexano, sendo injectado 1 µl de cada amostra numa coluna Agilent Tech, DB-5MS (L. 25m, I.D. 0.250mm, Film 0.25µm). A temperatura de injeção foi de 300 °C e o gás arrastador utilizado foi o Hélio, a 0.8 ml/min. A identificação dos diferentes compostos foi obtida através dos tempos de retenção e espectros de massa registados para os diferentes picos obtidos. A quantificação dos ésteres metílicos foi realizada a partir de rectas de calibração para os 37 ésteres metílicos (Tab. 2). Os EMAG identificados que não constavam no padrão,

foram quantificados conforme a recta de calibração do composto mais semelhante quanto à sua composição química.

Tab. 2 – Curva de calibração, coeficiente de correlação e tempo de retenção registados para cada composto

Composto	Curva de calibração	R ²	Tempo de retenção (min)
C6:0	$y = 2 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.991	3.070
C8:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	4.592
C10:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.994	7.045
C11:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.993	8.714
C12:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.993	10.598
C13:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.993	12.601
C14:1	$y = 4 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	14.373
C14:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.994	14.642
C15:1	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	16.409
C15:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.994	16.669
C16:1	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	18.215
C16:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 8 \cdot 10^6$	0.995	18.650
C17:1	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	20.145
C17:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.995	20.566
C18:3n6	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.993	21.453
C18:2n6	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	21.777
C18:3n3/C18:1n9	$y = 1 \cdot 10^9 x - 1 \cdot 10^6$	0.994	21.910
C18:1n9 c	$y = 2 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.994	22.039
C18:1n9 t	$y = 4 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.994	22.039
C18:0	$y = 4 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.994	22.412
C20:4n6	$y = 2 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.993	24.636
C20:5n3	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	24.730
C20:3n3/C20:3n6	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	24.973
C20:2n6	$y = 3 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.996	25.331
C20:1n9	$y = 6 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.994	25.433
C20:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 5 \cdot 10^6$	0.993	25.898
C21:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.993	27.544
C22:6n3	$y = 2 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.991	27.786
C22:2	$y = 2 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.995	28.626
C22:1n9	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.995	28.711
C22:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.994	29.126
C23:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 3 \cdot 10^6$	0.997	30.301
C24:1	$y = 3 \cdot 10^9 x - 4 \cdot 10^6$	0.996	31.150
C24:0	$y = 3 \cdot 10^9 x - 6 \cdot 10^6$	0.993	31.457

4.5 Tratamento estatístico dos dados

Foram realizados testes estatísticos de modo a verificar a existência de diferenças significativas nos diferentes parâmetros calculados entre os meios de cultura utilizados. Foi primeiro efectuado um teste de homogeneidade de variâncias,

com o intuito de perceber se os dados obtidos apresentavam distribuição normal. Quando o valor registado neste teste foi superior a 0.05, realizou-se o teste de análise de variância de um factor (ANOVA); quando o valor obtido neste teste foi inferior a 0.05, realizou-se o teste de Kruskal Wallis. Uma vez comprovada a existência de diferenças significativas, realizaram-se testes, *a posteriori*, Tukey HSD e Dunn, que comparam os diferentes meios entre si. Na fase de determinação do perfil de ésteres metílicos, realizou-se um teste *t-student*, que compara as médias com o desvio padrão obtido. Todos os testes realizados neste trabalho foram efectuados com o programa SPSS 15.0 para Windows.

5 Resultados

5.1 Fase laboratório

5.1.1 Optimização da concentração da solução de oligoelementos AM

5.1.1.1 *Nannochloropsis oculata*

O 1º ensaio foi mantido durante 17 dias, apresentando as culturas uma cor amarela no final da experiência. O pH final manteve-se entre 8.4 e 8.9 em todos os meios de cultura e a salinidade permaneceu estável ao longo de todo o ensaio, mantendo-se em todos os meios de cultura em 35 ‰.

No gráfico seguinte (Fig. 9) estão representadas as curvas de crescimento das culturas obtidas a partir das leituras de densidade óptica, com a absorvância em função do tempo para os diferentes meios de cultura testados.

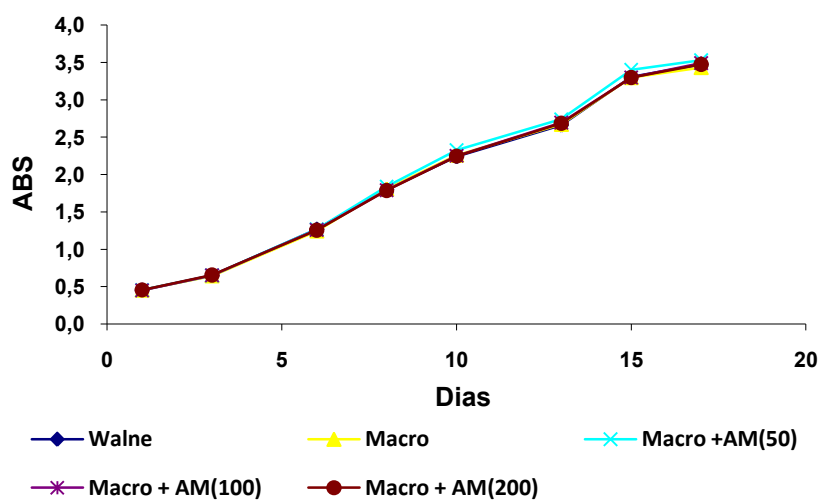


Fig. 9 – Representação gráfica das curvas de crescimento das culturas de *N. oculata* no 1º ensaio em condições laboratoriais, seguidas através das leituras de D.O._{540 nm}

Como se pode verificar no gráfico, não se registaram diferenças significativas entre os diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.097). Contudo, o tratamento com 50 µl/l da solução AM registou valores de absorvância ligeiramente superiores.

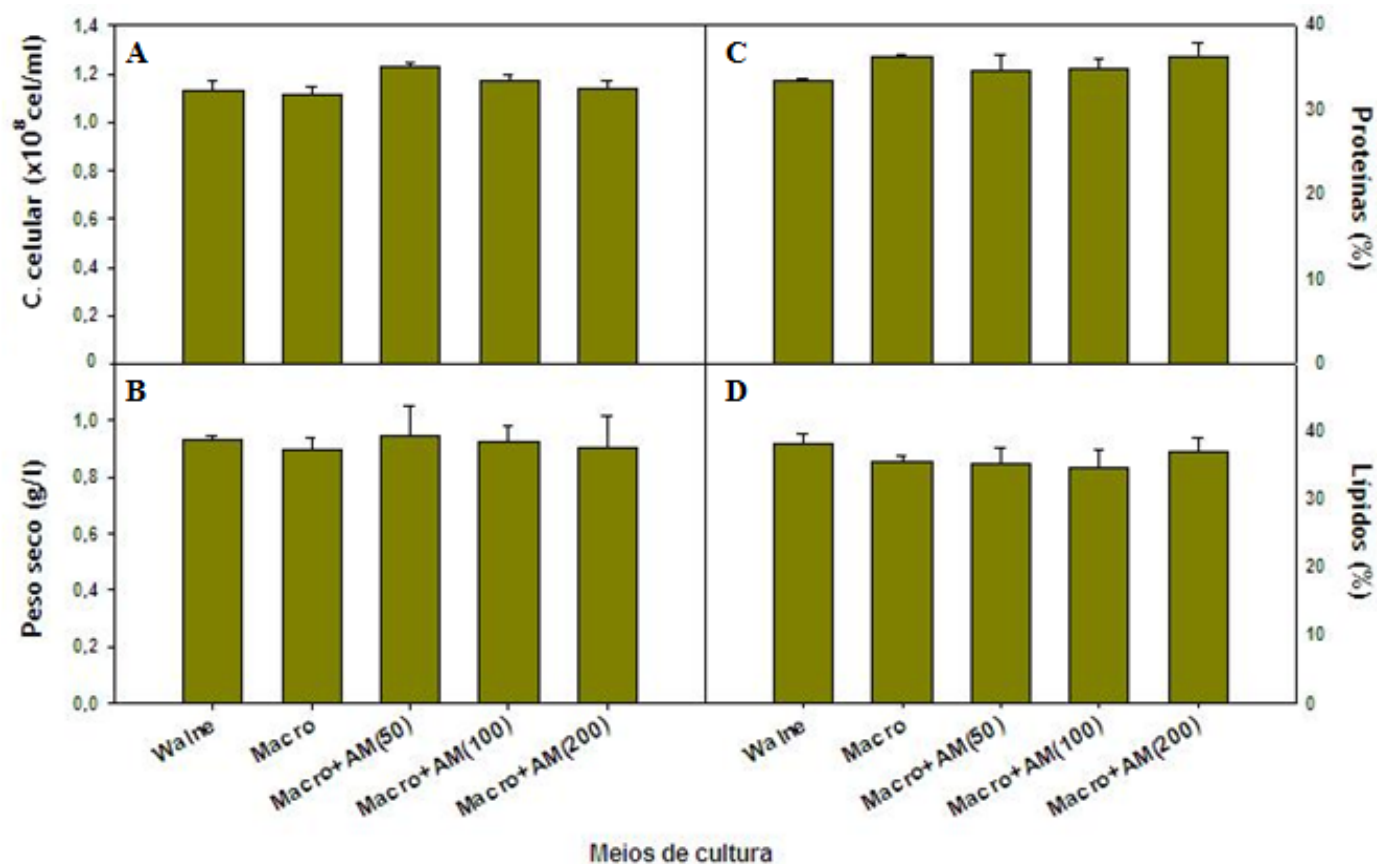


Fig. 10 – Representação gráfica dos valores obtidos no 1º ensaio nos parâmetros bióticos e bioquímicos calculados; A) Concentração celular final; B) Peso seco final; C) Percentagem de proteínas; D) Percentagem de lípidos

Nos parâmetros de crescimento, concentração celular e peso seco final (Fig. 10A; 10B), também não se registaram diferenças significativas entre os diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.274, 0.936).

Quanto às proteínas (Fig. 10C), a percentagem registada no final da experiência não sofreu alterações significativas (Kruskal Wallis, valor p: 0.093). O controlo com a solução de macronutrientes e o tratamento com suplementação de AM com 200 μ l/l apresentaram uma percentagem proteica de 36.2 e 36.3%, respectivamente, os restantes meios registaram perto de 35% de conteúdo proteico.

Relativamente à produção de lípidos totais (Fig. 10D) não se verificaram novamente diferenças significativas entre os diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.117). A percentagem de lípidos totais registada neste ensaio, nos 5 tratamentos, variou entre 35 e 38% do peso seco.

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados finais obtidos nas diferentes análises que foram efectuadas e os valores p obtidos nos testes estatísticos realizados, com intervalo de confiança de 95%, para os diferentes meios de cultura testados.

Tab. 3 – Resumo dos valores obtidos nos diferentes parâmetros bióticos e bioquímicos e nos testes estatísticos realizados

Meios de cultura	Densidade óptica (540 nm)	Concentração celular ($\times 10^8$ cel/ml)	Peso seco (g/l)	Proteínas (% P.S.)	Lípidos (% P.S.)
Walne	3.48	1.13	0.93	33.5	38.2
Macro	3.43	1.12	0.90	36.2	35.5
Macro + AM (50)	3.53	1.23	0.95	34.5	35.3
Macro + AM (100)	3.49	1.17	0.92	34.9	34.7
Macro + AM (200)	3.47	1.14	0.91	36.3	36.9
Valor p	0.097 ¹	0.274 ¹	0.936 ¹	0.093 ²	0.117 ¹

¹ ANOVA; ² Kruskal Wallis

5.1.1.2 *Chlorella* sp

Neste ensaio, as culturas foram mantidas 17 dias e, ao contrário do ensaio anterior, as culturas apresentavam no final do ensaio uma cor verde escura. O pH registado no final do ensaio variou de 8.3 a 8.7. A salinidade manteve-se neste ensaio em 2 ‰.

No gráfico seguinte está representada a evolução do crescimento das culturas de *Chlorella* sp através das leituras de densidade óptica (Fig. 11).

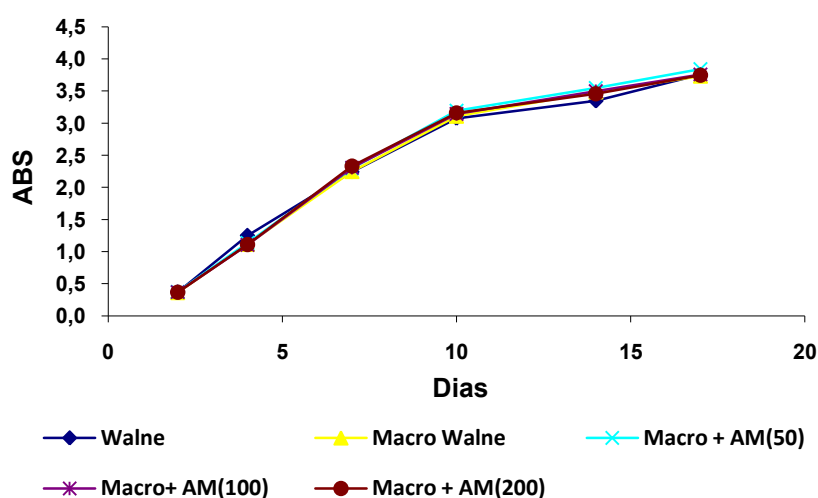


Fig. 11 – Curvas de crescimento obtidas na *Chlorella* sp para os diferentes meios testados através das leituras de densidade óptica no 2º ensaio na fase laboratorial

Em consonância com o ensaio anterior, não se verificaram diferenças significativas nos diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.542). Verificou-se novamente que o tratamento com concentração de 50 $\mu\text{l/l}$ da solução de oligoelementos AM, foi o meio que registou valores de absorvância mais elevados.

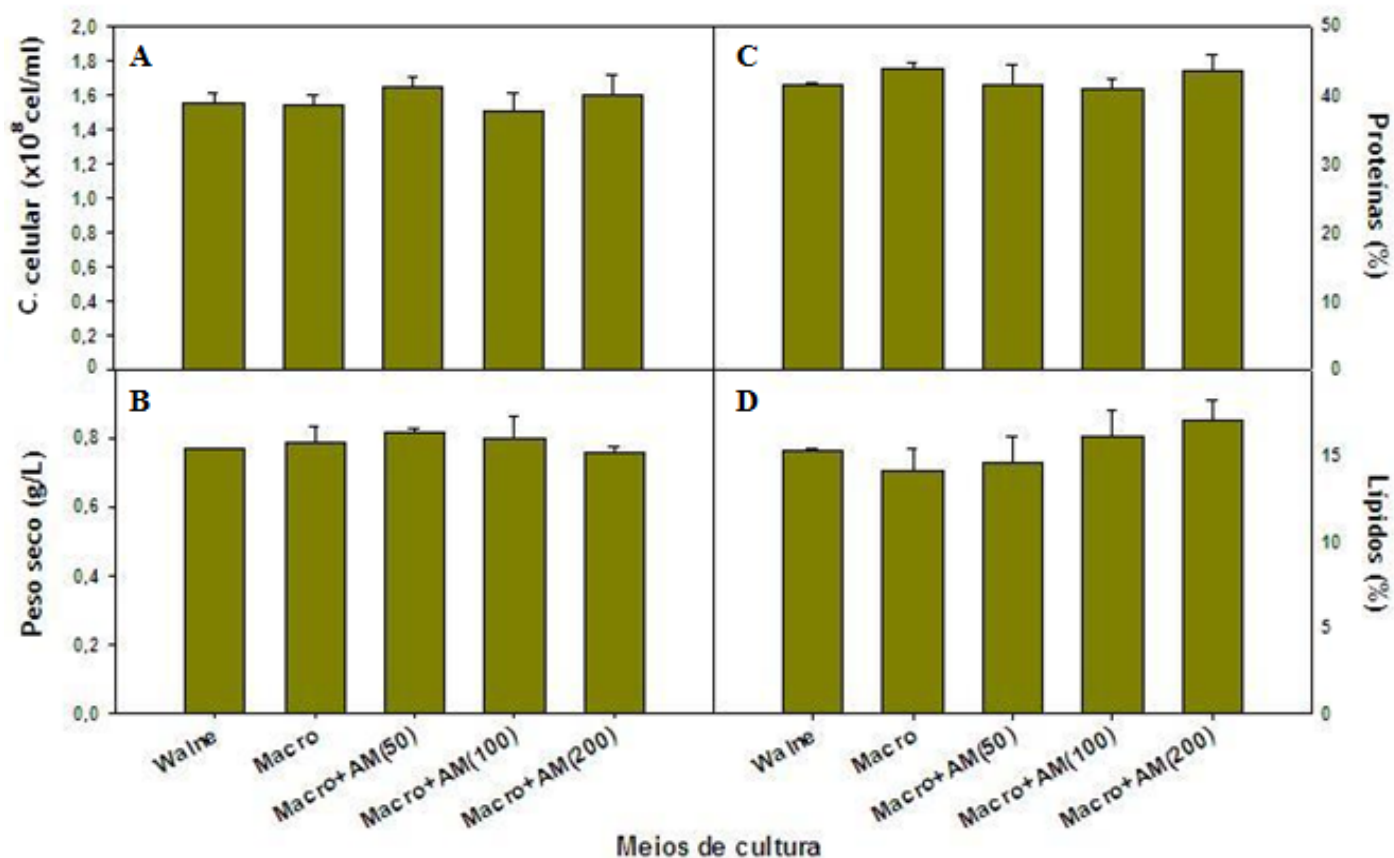


Fig. 12– Gráficos obtidos nos parâmetros calculados no decorrer do 2º ensaio para a *Chlorella* sp em condições laboratoriais: A) Concentração celular final; B) Peso seco final; C) Percentagem de proteínas; D) Percentagem de lípidos

Neste ensaio não se registaram diferenças significativas entre os diferentes meios de cultura testados na concentração celular e peso seco final (Kruskal Wallis, valor p: 0.251; ANOVA, valor p: 0.599). O tratamento com 50 $\mu\text{l/l}$ registou concentração celular e peso seco final de 1.16×10^8 cel/ml e 0.82 g/l, respectivamente.

Todos os meios testados apresentaram aproximadamente a mesma percentagem de proteínas não havendo diferenças significativas entre os diferentes meios testados (Kruskal Wallis, valor p: 0.111; Fig. 12C).

Quanto à composição lipídica, regista-se neste ensaio uma maior dispersão de valores entre os diferentes meios testados, não ocorrendo no entanto diferenças significativas entre os diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.057; Fig. 12D).

A Tabela 4 mostra o resumo dos parâmetros bióticos e bioquímicos calculados para os diferentes meios e o valor obtido nos testes estatísticos realizados.

Tab. 4 – Resultados finais registados para os diferentes parâmetros calculados no 2º ensaio da fase laboratorial

Meios de cultura	Densidade óptica (540 nm)	Concentração celular ($\times 10^8$ cel/ml)	Peso seco (g/l)	Proteínas (% P.S.)	Lípidos (% P.S.)
Walne	3.76	1.55	0.77	41.4	15.3
Macro	3.73	1.54	0.79	43.8	12.1
Macro + AM (50)	3.84	1.66	0.82	41.4	14.6
Macro + AM (100)	3.76	1.51	0.80	40.8	16.2
Macro + AM (200)	3.74	1.60	0.76	43.5	17.1
Valor p	0.542 ¹	0.251 ²	0.599 ¹	0.111 ²	0.057 ¹

¹ ANOVA; ² Kruskal Wallis

5.1.2 Optimização da solução de ferro

5.1.2.1 *Nannochloropsis oculata*

Neste ensaio as culturas foram mantidas durante 13 dias. Em consonância com o ensaio anterior com esta espécie as culturas também desenvolveram uma cor amarelada no final do ensaio. Registou-se em todos os tubos pH final perto de 9 e a salinidade manteve-se em 35 ‰.

No Gráfico 13 estão representadas as curvas de crescimento das culturas seguidas pelas leituras de densidade óptica (540 nm).

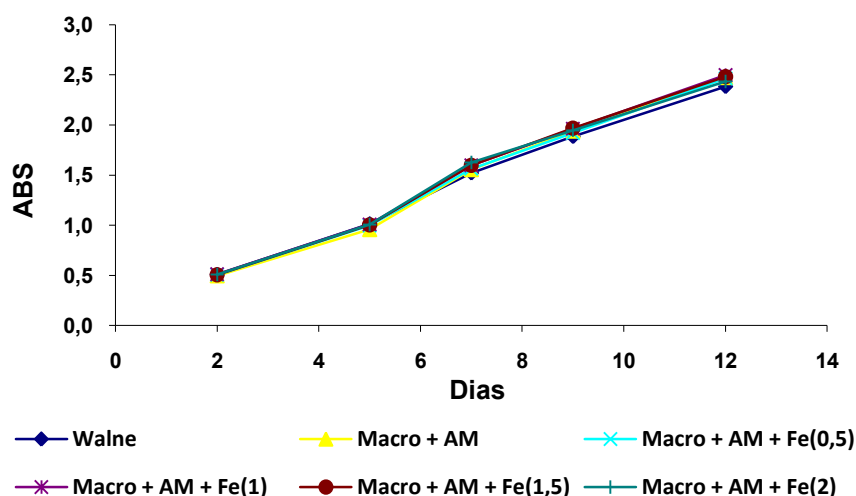


Fig. 13 – Gráfico representativo das curvas de crescimento obtidas através das leituras de densidade óptica (540 nm) nos diferentes meios testados no 3º ensaio em condições laboratoriais para a *N. oculata*

Como se pode observar no gráfico, todos os meios testados apresentaram aproximadamente a mesma curva de crescimento, não se registando diferenças significativas entre os diferentes meios (ANOVA, valor p: 0.069). Todos os tratamentos com suplementação de ferro registaram valores de absorvância superiores a ambos os controlos (meio de Walne e o meio Macro + AM sem suplementação de ferro), registando o tratamento com 1 ml de ferro o valor mais elevado.

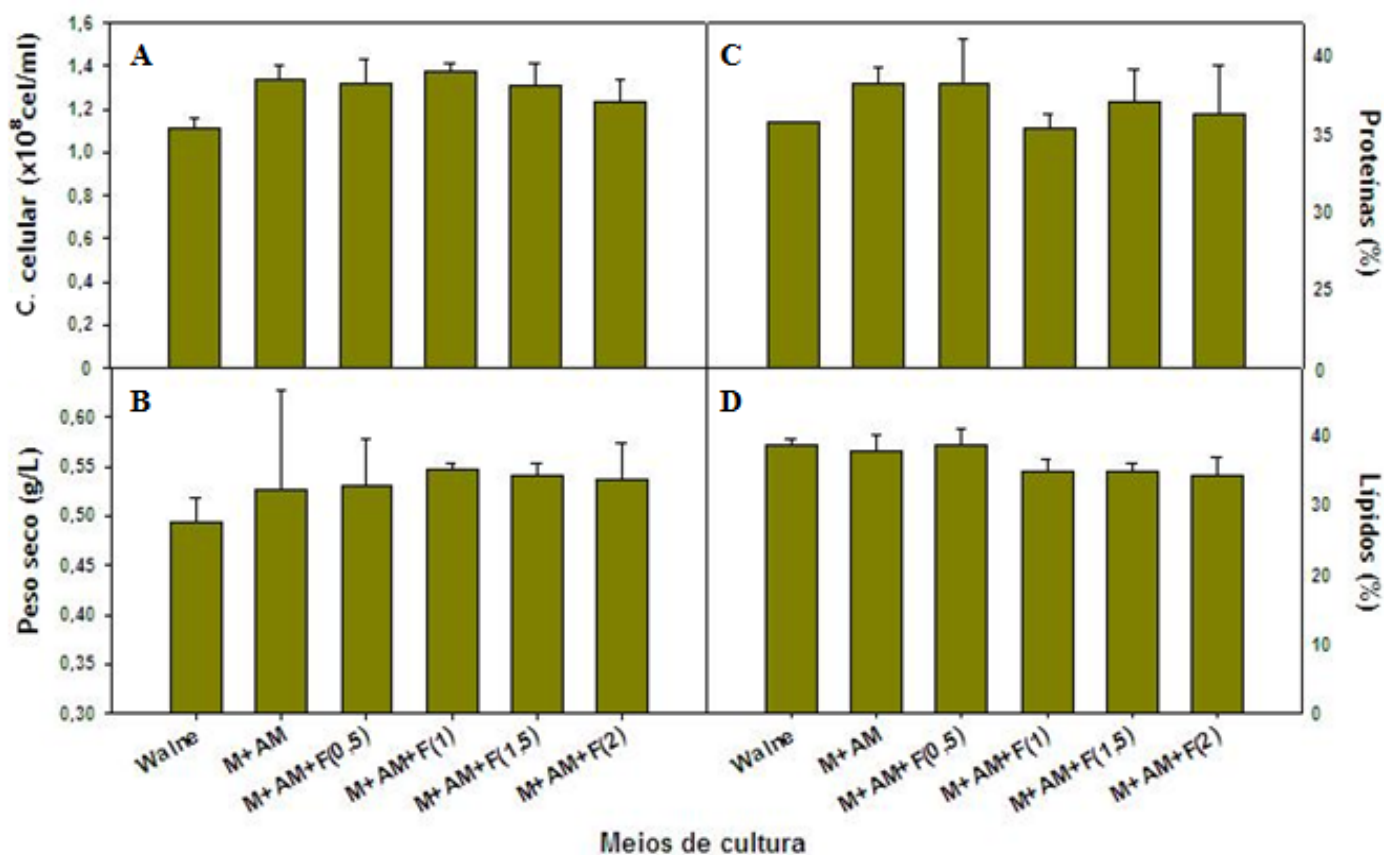


Fig. 14 – Representação gráfica dos parâmetros bióticos e bioquímicos calculados no decorrer do 3º ensaio na fase laboratorial; A) Concentração celular; B) Peso seco final; C) Percentagem de proteínas; D) Percentagem de lípidos

Nas medidas de concentração celular e peso seco final também não se registaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (ANOVA, valor p: 0.830, 0.095; Fig. 14 A,B).

Relativamente às proteínas, os meios testados apresentam valores ligeiramente superiores aos registados no 1º ensaio (Fig. 14C), entre 36 e 38%, não se observando diferenças significativas entre os diferentes meios (ANOVA, valor p: 0.078).

Quanto aos lípidos, não se verificaram neste ensaio diferenças significativas na produção lipídica entre os diferentes meios (Kruskal Wallis, valor p: 0.057). O meio de

Walne e o tratamento com 500 µl/l de ferro registaram maior percentagem de lípidos, 38.8 e 38.7% do peso seco respectivamente (Fig. 14D). Os restantes tratamentos registaram uma produção lipídica inferior, cerca de 35% do peso seco.

A Tabela 5 mostra os valores obtidos para os diferentes parâmetros bióticos e bioquímicos calculados para os diferentes meios e o valor registado para os testes estatísticos efectuados.

Tab. 5 – Resumo dos resultados obtidos nos parâmetros bióticos e bioquímicos registados neste ensaio

Meios de cultura	Densidade óptica (540 nm)	Concentração celular ($\times 10^8$ cel/ml)	Peso seco (g/l)	Proteínas (% P.S.)	Lípidos (% P.S.)
Walne	2.38	1.23	0.49	35.8	38.8
Macro + AM (50)	2.47	1.34	0.53	38.3	37.9
Macro + AM + Fe (0.5)	2.47	1.32	0.53	38.2	38.7
Macro + AM + Fe (1)	2.50	1.37	0.55	35.5	35.1
Macro + AM + Fe (1.5)	2.48	1.31	0.54	37.1	35.1
Macro + AM + Fe (2)	2.44	1.23	0.54	36.4	34.5
Valor p	0.069 ¹	0.095 ¹	0.830 ¹	0.078 ²	0.057 ²

¹ ANOVA; ² Kruskal Wallis

5.1.2.1 *Chlorella sp*

Este ensaio decorreu durante 16 dias. Os valores de pH finais registados neste ensaio encontraram-se entre 8.5 e 9, e a salinidade manteve-se estável em 2 ‰.

No gráfico seguinte estão representadas as curvas de crescimento, em função dos dados de densidade óptica a 540 nm, obtidas para os diferentes meios testados neste ensaio.

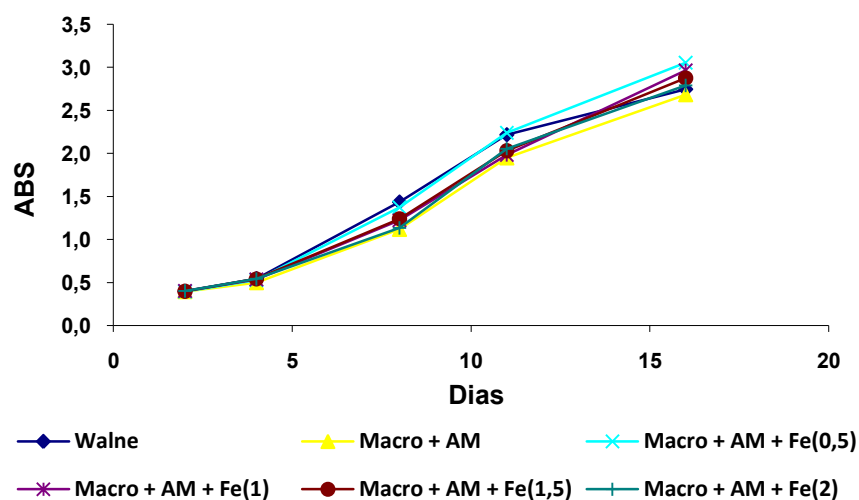


Fig. 15 – Representação gráfica das curvas de crescimento seguidas pelas leituras de D.O. em função dos dias registadas no 4º ensaio em condições laboratoriais na *Chlorella sp*

Segundo as leituras de densidade óptica, o meio de cultura que registou melhor crescimento foi o tratamento com 500 $\mu\text{l/l}$ de solução de ferro, ocorrendo um decréscimo no crescimento com o aumento da concentração de ferro. Todos os tratamentos com ferro registaram melhor crescimento que ambos os controlos, registando-se diferenças significativas entre os diferentes meios testados (ANOVA, valor p: 0.002). Quando comparando os diferentes meios entre si, o tratamento com 500 $\mu\text{l/l}$ de solução de ferro evidencia diferenças significativas em relação aos dois controlos, meio de Walne e Macro + AM (Tukey HSD, valor p: 0.008, 0.002).

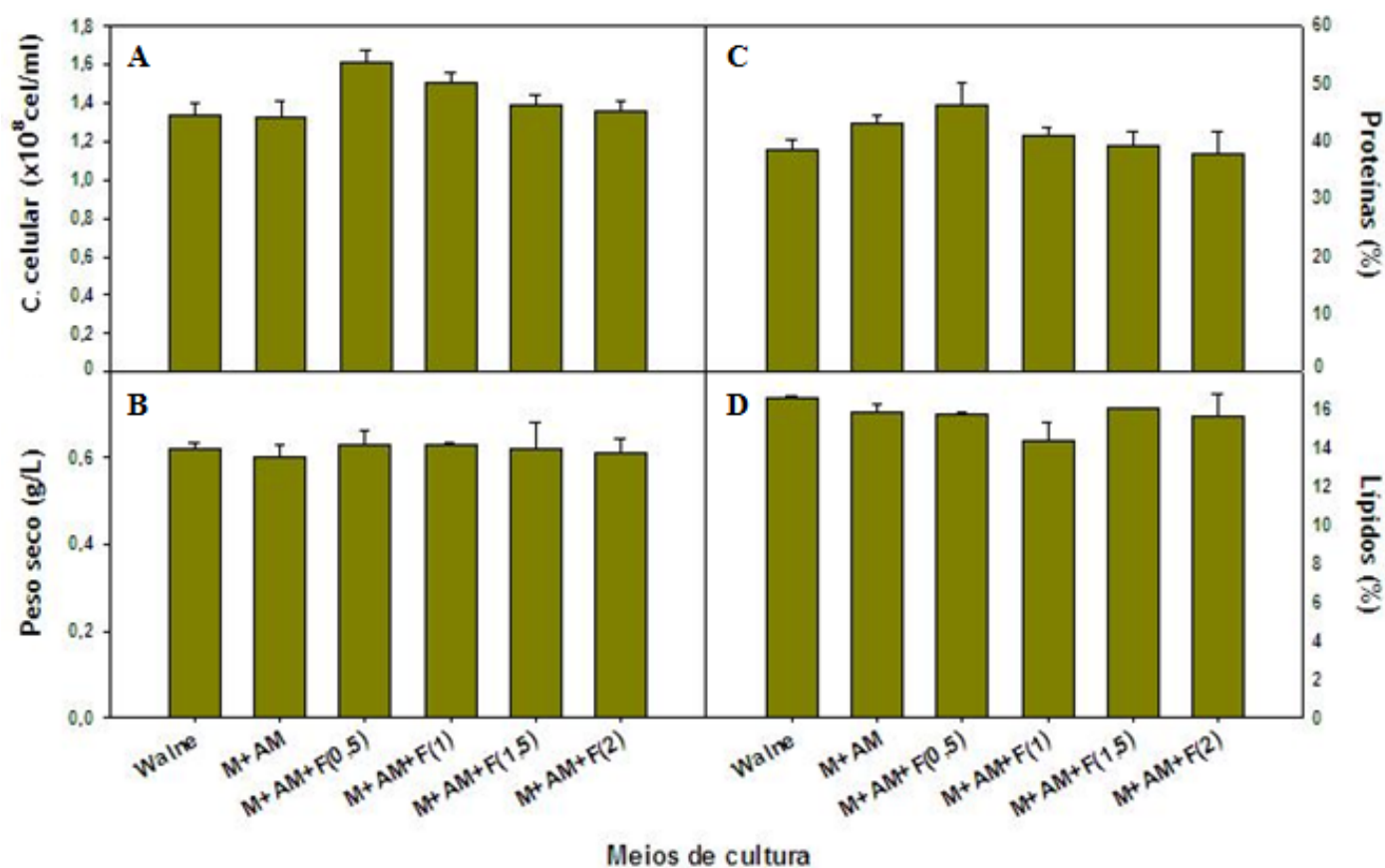


Fig. 16 – Gráfico representativo dos valores obtidos nos parâmetros calculados no 4º ensaio em condições laboratoriais na *Chlorella* sp: A) Concentração celular final; B) Peso seco final; C) Percentagem de proteínas registada; D) Percentagem de lípidos

Os valores de concentração celular acompanham os valores de densidade óptica, registando o tratamento com 500 $\mu\text{l/l}$ de ferro o valor de concentração celular mais elevado no fim da experiência (Fig. 16A). Verificaram-se também neste caso diferenças significativas nos meios de cultura testados (ANOVA, valor p: 0.001). No entanto, não se registaram diferenças significativas nos valores de peso seco obtidos (Kruskal Wallis, valor p: 0.872).

O tratamento com 500 µl/l de ferro foi também o meio que registou maior produção proteica, 46.3% do peso seco (Fig. 16C), decrescendo depois a produção de proteínas com o aumento da concentração de ferro no meio, verificando-se também diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (ANOVA, valor p: 0.014).

Quanto à produção lipídica, não se verificaram diferenças significativas nos meios testados (Kruskal Wallis, valor p: 0.155), todos os meios registaram aproximadamente 16% do peso seco de lípidos (Fig. 16D).

Neste ensaio, como mostra a Tabela 6, os benefícios do meio são notórios, registando-se diferenças significativas em todos os parâmetros calculados, com excepção do peso seco e lípidos.

Tab. 6 – Resumo dos resultados obtidos nos parâmetros bióticos e bioquímicos calculados

Meios de cultura	Densidade óptica (540 nm)	Concentração celular (x10 ⁸ cel/ml)	Peso seco (g/l)	Proteínas (% P.S.)	Lípidos (% P.S.)
Walne	2.74	1.34	0.62	38.6	16.6
Macro + AM (50)	2.68	1.33	0.60	43.2	15.9
Macro + AM + Fe (0.5)	3.05	1.61	0.63	46.3	15.8
Macro + AM + Fe (1)	2.96	1.50	0.63	40.9	14.4
Macro + AM + Fe (1.5)	2.87	1.39	0.62	39.3	16.1
Macro + AM + Fe (2)	2.78	1.35	0.61	37.8	15.7
Valor p	0.002 ¹	0.001 ¹	0.872 ²	0.014 ¹	0.155 ²

¹ ANOVA; ² Kruskal Wallis

5.2 Fotobiorreactores – “Green Wall”

Os ensaios realizados no exterior com a espécie *Chlorella* sp decorreram durante 10 dias até ao início da fase estacionária. A salinidade não sofreu qualquer alteração no decorrer de ambos os testes, mantendo-se perto de 1 ‰. O pH foi ajustado através de injeção directa de CO₂ nos fotobiorreactores de maneira a manter-se perto de 9.

5.2.1 Solução de oligoelementos AM

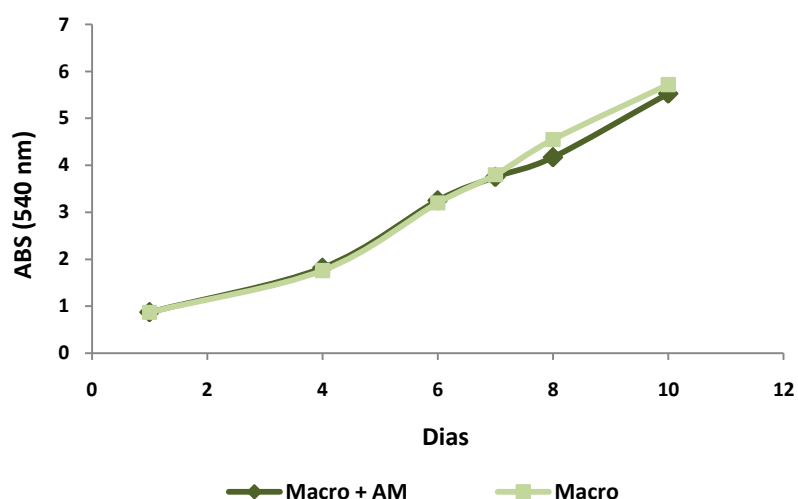


Fig. 17 – Curvas de crescimento obtidas para ambos os meios testados, seguidas através das leituras de densidade óptica a 540 nm, no 1º teste realizado na fase piloto em fotobiorreactores

Como se pode constatar na Figura 17, ambos os meios registaram concentração final semelhante. O tratamento Macro + AM (50 µl/l) apresentou uma taxa de crescimento ligeiramente inferior no decorrer do ensaio, no entanto terminou o ensaio com concentração final idêntica ao controlo, o meio Macro.

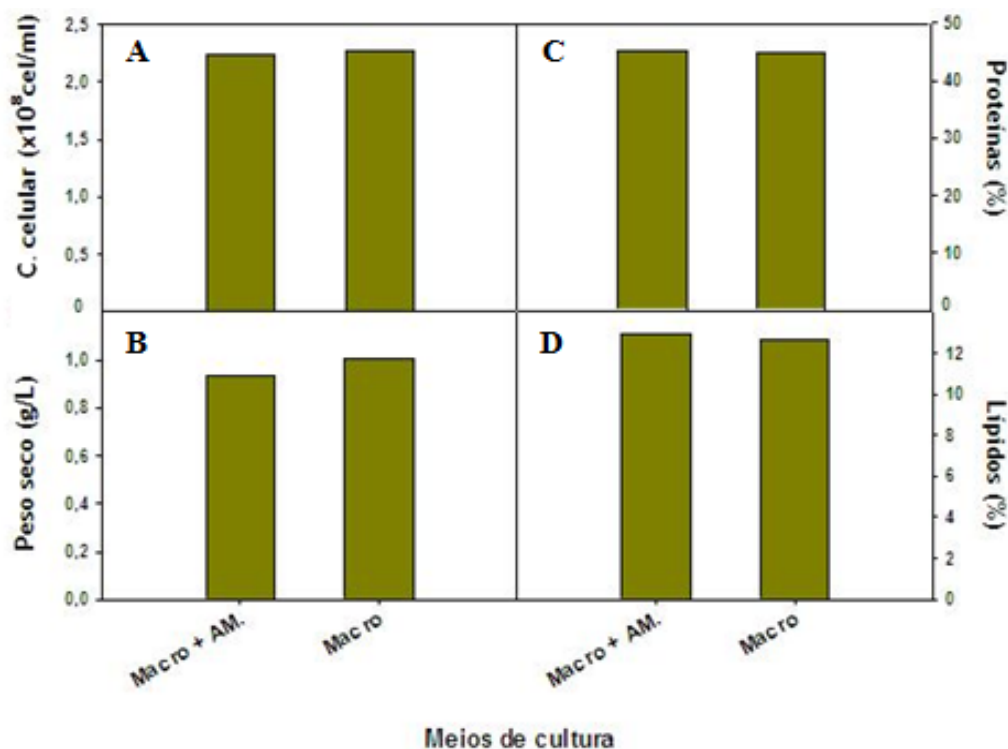


Fig. 18 – Gráfico representativo dos parâmetros de biomassa e bioquímicos calculados no decorrer do 1º teste na fase piloto para a *Chlorella* sp; A) Concentração celular; B) Peso seco final; C) Proteínas; D) Lípidos

Quanto à concentração celular e peso seco, observaram-se os mesmos resultados obtidos para a densidade óptica, registando-se em ambos os parâmetros, valores finais aproximados (Fig. 18A, 18B)

O conteúdo proteico e lipídico registado foi igual para ambos os meios testados: 45 e 13%, respectivamente (Fig. 18C, 18D).

5.2.2 Meio completo Macro + AM + Fe

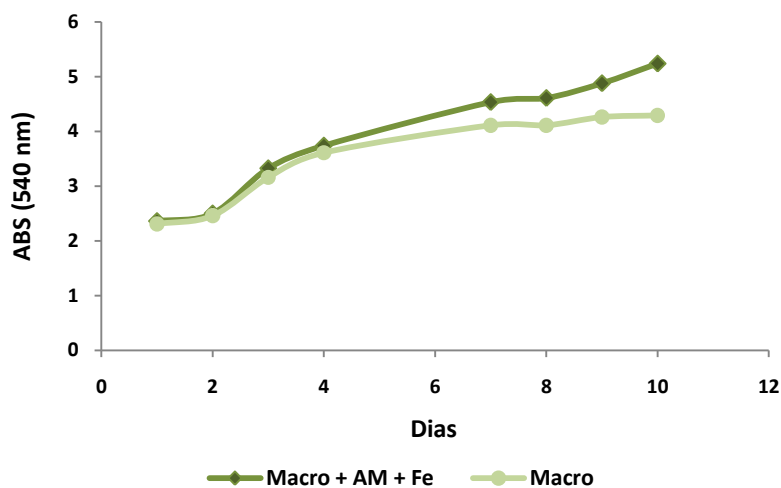


Fig. 19 – Representação gráfica das curvas de crescimento das culturas obtidas através das leituras de D.O._{540 nm} em função dos dias no 2º teste realizado na fase piloto para a *Chlorella* sp

No teste com o meio completo Macro + AM + Fe, com as concentrações optimizadas para a espécie *Chlorella* sp (AM 50 µl/l; Fe 500 µl/l), é possível observar diferenças entre o tratamento e o controlo (Fig. 19), registando o meio desenvolvido valores de absorvância superiores ao controlo, apenas constituído pela solução de macronutrientes.

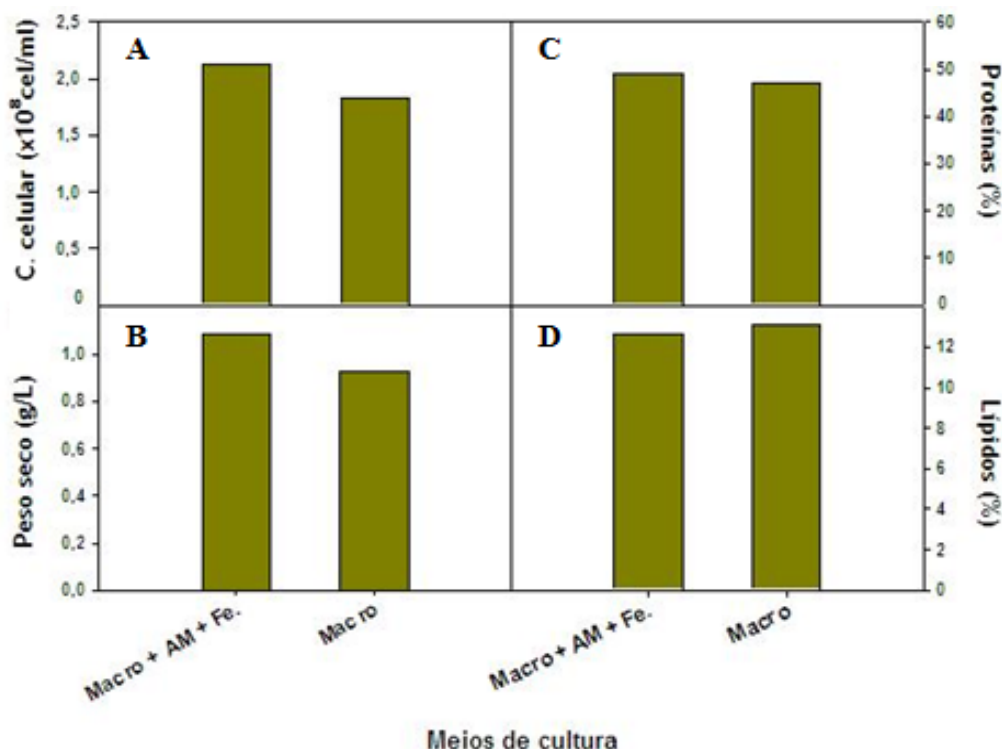


Fig. 20 – Gráfico representativo dos valores registados para os parâmetros bióticos e bioquímicos obtidos para a *Chlorella* sp no 2º teste da fase piloto: A) Concentração celular; B) Peso seco; C) Proteínas; D) Lípidos

A concentração celular e peso seco registaram os mesmos resultados obtidos para a densidade óptica, registando ambos os tratamentos resultados satisfatoriamente melhores que o controlo (Fig. 20A, 20B).

Relativamente às proteínas, o tratamento registou uma percentagem ligeiramente superior ao controlo: 49 e 47%, respectivamente (Fig. 20C). O conteúdo lipídico não sofreu alterações nos meios testados, registando ambos os meios valores muito próximos, cerca de 13% do peso seco (Fig. 20D).

5.3 Identificação e quantificação dos ésteres metílicos

A Figura 21 mostra o cromatograma obtido para a *N. oculata*, com os principais picos identificados.

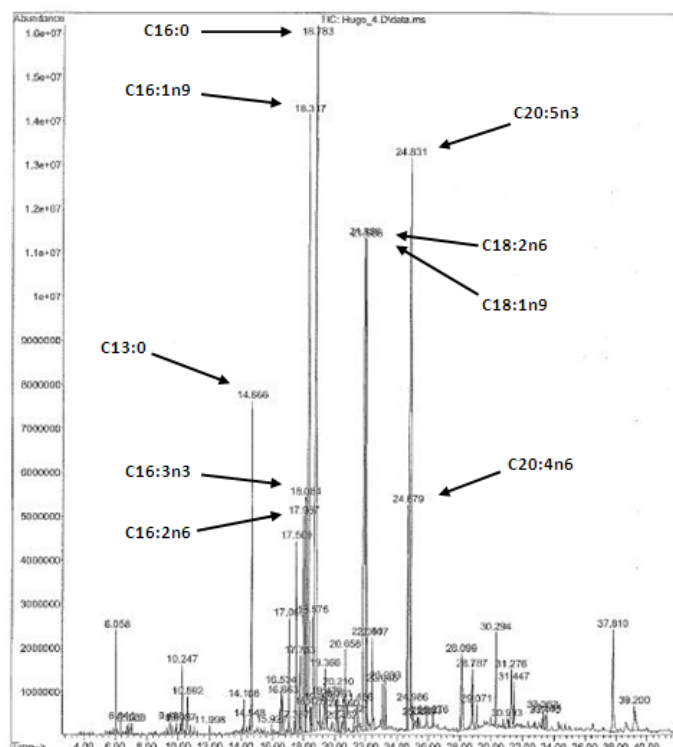


Fig. 21 – Cromatograma representativo do perfil de ésteres metílicos numa amostra de *N. oculata*

Como se pode constatar no cromatograma, registaram-se três picos principais com valores elevados de abundância, constituídos pelos ésteres metílicos dos ácidos gordos (EMAG) C16:1n9, C16:0 e C20:5n3. Podem-se também constatar outros picos com menor abundância, como o caso do C13:0, e dos ésteres insaturados: C16:2n6, C16:3n3, C18:2n6, C18:1n9 e C20:4n6.

A Figura 22 mostra um gráfico de barras com os diferentes EMAG quantificados e o desvio padrão associado a cada composto.

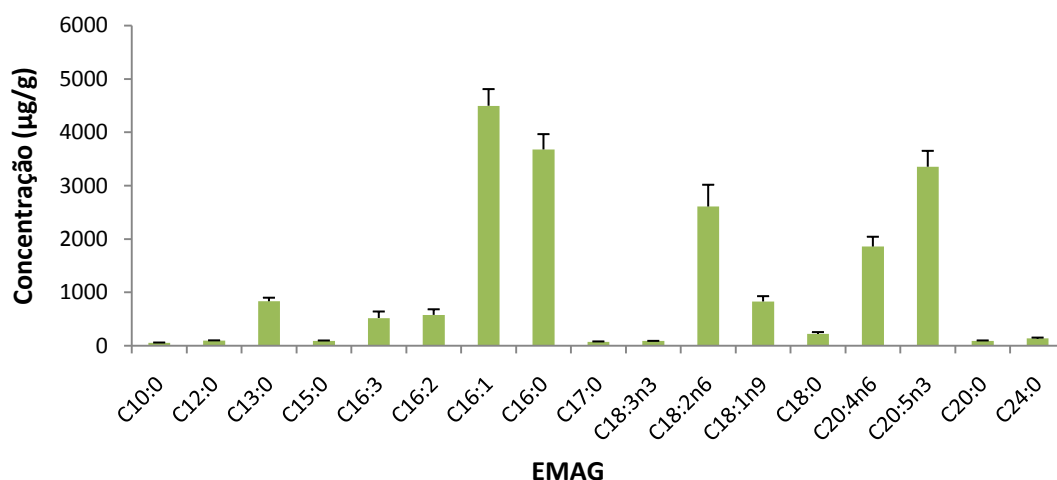


Fig. 22 – Concentração dos ésteres metílicos dos ácidos gordos em µg/g de biomassa seca, identificados e quantificados por GC-MS, para a *N. oculata*

O gráfico mostra que o EMAG com maior concentração é o C16:1, 4496 $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca, correspondendo este valor à soma de três isómeros C16:1, bem separados, mas não identificados por GC-MS. O C16:0 foi o segundo ácido gordo com concentração mais elevada, cerca de 3677 $\mu\text{g/g}$. Esta espécie regista também elevada concentração de EPA (C20:5n3), superior a 3300 $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca. Os ésteres polinsaturados C18:2n6 e C20:4n6 apresentam também concentração elevada no perfil de ésteres metílicos nesta espécie, registando os restantes ésteres concentrações inferiores a 1000 $\mu\text{g/g}$.

O cromatograma obtido para a *Chlorella* encontra-se abaixo representado (Fig. 23).

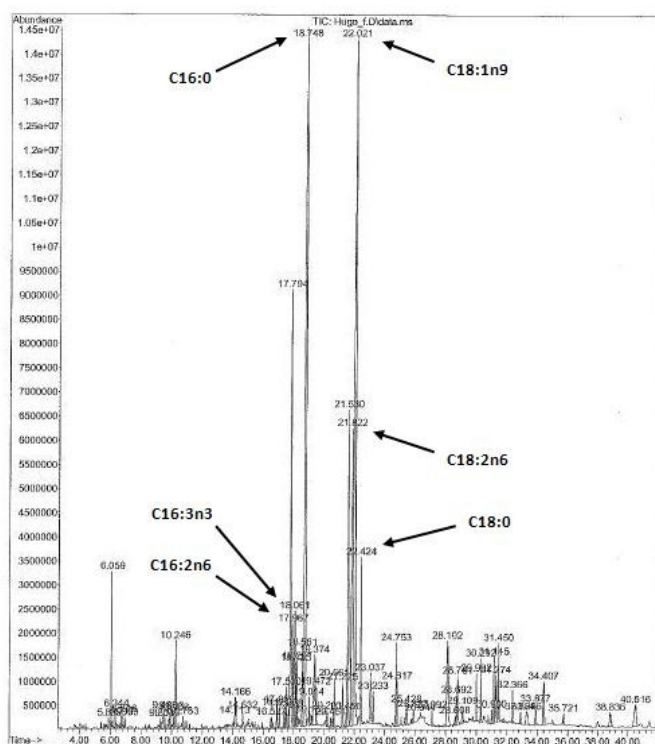


Fig. 23 – Cromatograma obtido para a *Chlorella*, resultante das análises efectuadas por GC-MS

Pode-se constatar pelo cromatograma obtido que existem dois picos principais bem definidos, constituídos pelos ésteres metílicos C16:0 e C18:1n9 com abundância superior. Os ésteres C18:2n6, C18:0, C16:3n3 e C16:2n6 registam também abundância considerável, comparativamente aos restantes EMAG observados.

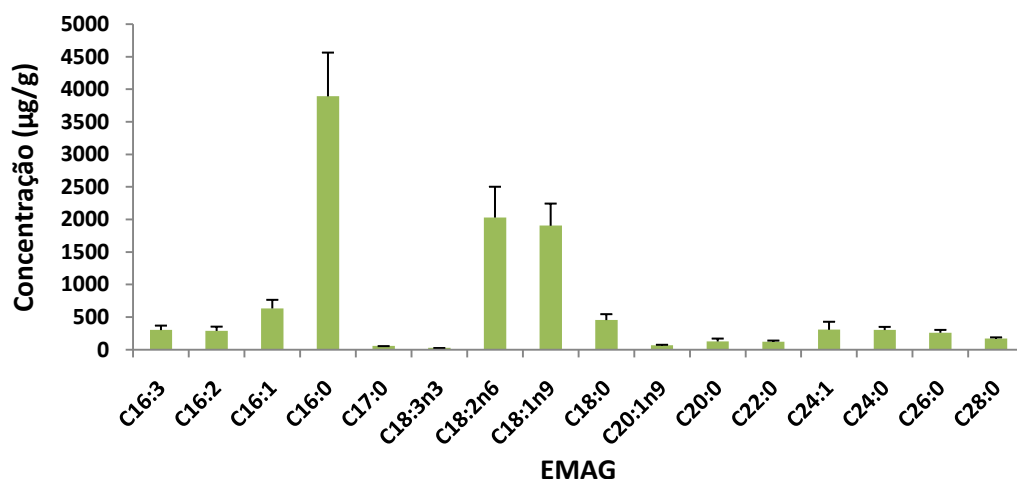


Fig. 24 – Quantificação dos ésteres metílicos obtidos a partir da espécie *Chlorella* sp, a concentração encontra-se representada em µg/g de biomassa seca

Nesta espécie, em consonância com o cromatograma obtido, os ésteres metílicos saturados C16:0 registaram concentração superior, cerca de 3892 µg/g (Fig. 24). Seguidamente, os ésteres C18:2n6 e o C18:1n9, com concentração perto de 2000 µg/g de biomassa seca. Os ésteres C16:1 e o C18:0 registaram concentração superior a 450 µg/g. Os restantes ésteres metílicos apresentaram concentração inferior a 400 µg/g de biomassa seca.

No teste estatístico realizado nesta fase, verificaram-se diferenças significativas entre as duas espécies, a espécie *N. oculata* registou concentração final de EMAG totais significativamente superior comparativamente à *Chlorella* (*t-student*, valor p : 0.000), 19597 e 10952 µg/g de biomassa seca, respectivamente.

A Tabela 7 mostra a média obtida para os diferentes EMAG quantificados no decorrer deste trabalho para ambas as espécies e o desvio padrão associado para o peso seco. Pode-se constatar nesta tabela a ausência dos ésteres metílicos com cadeia carbonada mais curta, C10:0, C12:0, C13:0 e C15:0 e os ésteres polinsaturados C20:4n6 e C20:5n3 na *Chlorella* sp. Na *N. oculata* pode-se notar a ausência dos ésteres metílicos com a cadeia carbonada mais longa como o C22:0, C26:0 e o C28:0.

Tab. 7 – Concentração em $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca dos ésteres metílicos quantificados para ambas as espécies

EMAG		<i>N. oculata</i>		<i>Chlorella sp</i>	
		$\mu\text{g/g P.S.}$	%	$\mu\text{g/g P.S.}$	%
Cáprico	C10:0	57 \pm 2	0.3	-	-
Laúrico	C12:0	94 \pm 6	0.5	-	-
Tridecanóico	C13:0	832 \pm 67	4.3	-	-
Pentadecanóico	C15:0	88 \pm 8	0.5	-	-
Palmitico	C16:0	3677 \pm 287	18.8	3892 \pm 672	35.5
Palmitoleico	C16:1	4496 \pm 313	22.9	635 \pm 132	5.8
Hexadecadienóico	C16:2	577 \pm 105	2.9	290 \pm 65	2.6
Hexadecatrienóico	C16:3	519 \pm 122	2.7	302 \pm 69	2.8
Etadecanóico	C17:0	72 \pm 7	0.4	56	0.5
Estearico	C18:0	219 \pm 35	1.1	455 \pm 92	4.2
Oleico	C18:1n9	738 \pm 99	4.2	1877 \pm 341	17.4
Linoleico	C18:2n6	2697 \pm 408	13.3	2058 \pm 473	18.5
Linolénico	C18:3n3	90	0.5	27	0.2
Araquídico	C20:0	92 \pm 6	0.5	128 \pm 44	1.2
Eicosenóico	C20:1n9	-	-	69 \pm 8	0.6
Araquidónico	C20:4n6	1858 \pm 183	9.5	-	-
Eicosapentenóico	C20:5n3	3354 \pm 297	17.1	-	-
Beénico	C22:0	-	-	124 \pm 18	1.1
Lignocérico	C24:0	136 \pm 15	0.7	303 \pm 49	2.8
Nervónico	C24:1	-	-	307 \pm 124	2.8
Cerótico	C26:0	-	-	261 \pm 44	2.4
Montanílico	C28:0	-	-	169 \pm 21	1.5
Total	EMAG	19598	100	10952	100

Os ésteres metílicos, tendo em conta o tamanho da sua cadeia carbonada, podem ser úteis na produção de derivados distintos, obtidos a partir do óleo das microalgas. O gráfico seguinte mostra a divisão dos ésteres relativamente aos produtos derivados do óleo obtido das microalgas (Wittcoff *et al*, 2004).

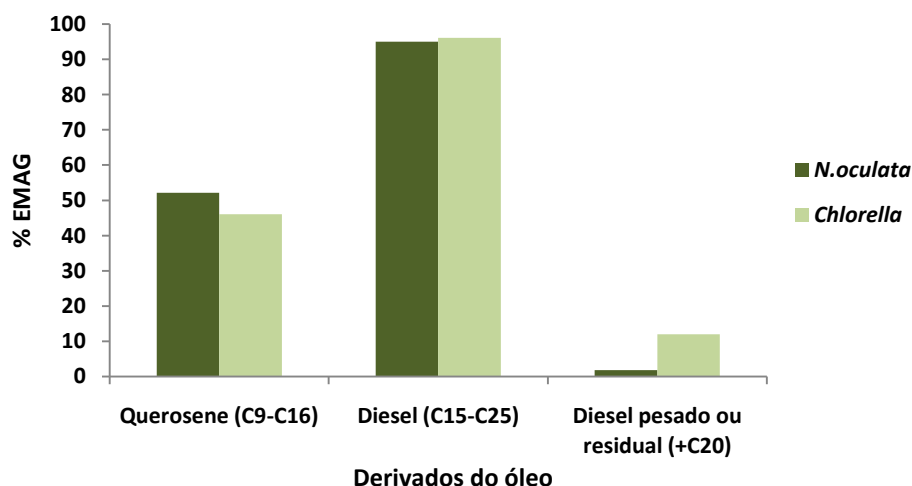


Fig. 25 – Percentagem de ésteres metílicos registados para ambas as espécies em função dos derivados que podem ser obtidos a partir do óleo

A espécie *N. oculata* registou no presente trabalho uma percentagem de EMAG ideais para a produção de bioquerosene superior à *Chlorella*, 52 e 46%, respectivamente. Ambas as espécies registaram aproximadamente 95% dos ésteres metílicos totais, úteis para a produção de biodiesel relativamente ao tamanho da cadeia carbonada. A *Chlorella* apresenta uma maior percentagem de compostos ideais para a produção de diesel pesado e residual cerca de 12% comparativamente à outra espécie, que regista apenas 1.8% destes ésteres metílicos (Fig. 25).

O Gráfico 26 representa as diferentes classes de ácidos gordos para as duas espécies, divididos quanto à sua composição química em ésteres metílicos saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

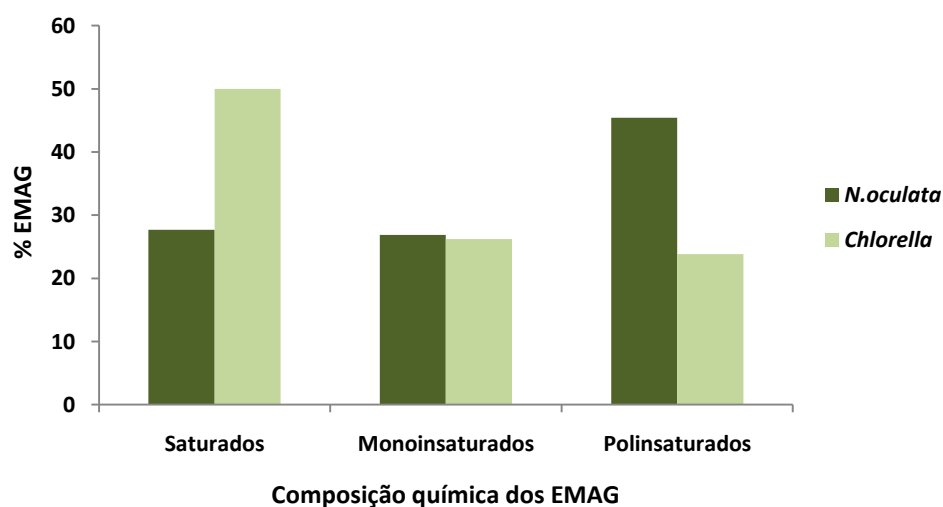


Fig. 26 – Percentagem de EMAG divididos quanto à sua composição química para ambas as espécies

A espécie *N. oculata* registou uma concentração de EMAG saturados inferior comparativamente à *Chlorella*, na qual os ésteres metílicos saturados representam cerca de 50% do total. Esta espécie é a mais rica em ésteres metílicos polinsaturados, representando estes 45% do total de ésteres metílicos. A *Chlorella* apresenta uma percentagem bastante inferior, cerca de 20% do total. Ambas as espécies registam aproximadamente a mesma percentagem de ésteres metílicos monoinsaturados, entre 26 e 27%.

A Tabela 8 mostra a concentração e percentagem dos EMAG obtidos, divididos quanto à sua composição química para ambas as espécies.

Tab. 8 – Percentagem e concentração de ésteres metílicos divididos quanto à sua composição química para ambas as espécies

Composição química	<i>N. oculata</i>		<i>Chlorella sp</i>	
Saturados	1812 µg/g	27.7 %	1223 µg/g	50.0 %
Monoinsaturados	1757 µg/g	26.9 %	641 µg/g	26.2 %
Polinsaturados	2971 µg/g	45.4 %	583 µg/g	23.8 %
Total	6540 µg/g	100 %	2447 µg/g	100 %

6 Discussão

6.1 Crescimento

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que as duas espécies estudadas, *N. oculata* e *Chlorella* sp., apresentam ligeiras diferenças quanto ao crescimento.

Nos resultados obtidos a nível laboratorial, a influência da solução de oligoelementos AM no crescimento de *N. oculata* não é significativa. Verificou-se que os oligoelementos existentes nos meios de cultura, (a solução AM e os oligoelementos existentes no meio de Walne) não modificam a taxa de crescimento desta espécie. O tratamento com concentração mais reduzida de AM (50 µl/l) foi o meio que registou melhor crescimento, decrescendo a taxa de crescimento com o aumento da concentração de AM, sugerindo que o AM com concentração de 50 µl/l pode ser benéfico no crescimento desta espécie apesar de não se registarem diferenças significativas. Sabe-se que os nutrientes podem inibir ou melhorar o crescimento dependendo da sua concentração (Carvalho & Malcata, 2000) e que as microalgas possuem a capacidade de usar os nutrientes a concentrações bastante baixas (Fábregas *et al*, 1984), uma vez que possuem mecanismos que permitem regular a entrada de cada elemento. Estes mecanismos servem para manter a sua composição bioquímica e permitir o crescimento (Fábregas *et al*, 1984). Ensaios preliminares à realização desta tese mostraram que, com a concentração de 25 µl/l de AM, se obtêm resultados inferiores quanto ao crescimento do que com 50 µl/l de AM (Necton S.A., dados não publicados); concentrações superiores a 50 µl /l de AM podem ser tóxicas para esta espécie, segundo os resultados obtidos.

A suplementação com ferro nesta espécie registou melhores resultados quanto ao crescimento que o meio Macro + AM 50 µl/l, o tratamento com concentração de 1 ml/l de solução de ferro registou resultados ligeiramente superiores, não se verificando novamente diferenças significativas. O tratamento com 2 ml/l de ferro registou uma concentração final inferior que o meio apenas com a solução de macronutrientes e suplementação de AM, sugerindo que o ferro, a estas concentrações inibe o crescimento desta espécie (Lamela T., comunicação pessoal). Uma explicação para a ineficácia dos oligoelementos nesta espécie pode dever-se aos

nutrientes existentes na água salgada, que conseguem ser absorvidos pelas microalgas, não apresentando desta maneira os oligoelementos benéficos no crescimento de culturas salinas (Navalho J., comunicação pessoal).

Os dados obtidos neste trabalho parecem indicar que, para a produção de *N. oculata* em larga escala, é necessária apenas a utilização da solução de macroelementos, reduzindo-se assim consideravelmente os custos de produção e operação.

Em relação à *Chlorella* sp, a concentração otimizada da solução de oligoelementos AM é igual à outra espécie estudada, 50 µl/l, decrescendo também o crescimento com o aumento da concentração de AM. Contudo, não se verificaram novamente diferenças significativas entre os diferentes meios testados, sugerindo também a ineficácia da solução de oligoelementos AM no crescimento desta espécie.

Nos ensaios laboratoriais com suplementação de ferro, verificaram-se diferenças significativas entre os meios de cultura testados (ANOVA, valor p: 0.002). O tratamento com concentração de 500 µl/l de solução de ferro foi o meio que obteve melhores resultados quanto ao crescimento, registando diferenças significativas em relação aos dois controlos, o meio de Walne (Tukey HSD, valor p: 0.008) e o meio Macro + AM 50 µl/l (Tukey HSD, valor p: 0.002). Todos os meios com suplementação de ferro, com excepção do tratamento com 2 ml/l de ferro, obtiveram melhores resultados que ambos os controlos, mostrando claramente os benefícios do ferro no crescimento desta espécie. Pôde-se, no entanto, constatar o efeito inibitório no crescimento das outras concentrações testadas, comparativamente à concentração de 500 µl/l. A concentração ideal de ferro no meio de cultura registada para o cultivo desta estirpe de *Chlorella*, 10 µM, é muito inferior ao valor registado por Estevez *et al* (2001) para a *Chlorella vulgaris*, que registou melhores resultados com concentração de 90 µM de ferro, também em condições laboratoriais.

Verificou-se com este trabalho que o meio de Walne não apresenta a concentração de ferro otimizada para ambas as espécies estudadas, uma vez que o controlo registou taxa de crescimento inferior comparativamente ao meio desenvolvido. A suplementação com ferro foi introduzida no meio desenvolvido, porque a solução AM é deficitária em ferro. Este oligoelemento assume elevada importância no crescimento de diversas espécies, uma vez que é considerado como

principal nutriente limitante da produtividade primária em determinadas zonas oceânicas (Guerinot & Yi, 1994). O ferro assume um papel preponderante como co-factor na respiração e fotossíntese (Schwarz *et al*, 2003), desempenhando funções essenciais nas reacções de oxidação-redução, assimilação de nitratos e na síntese de clorofila *a*, ADN e ARN (Weinberg, 1989; Hutchins, 1995; Naito *et al*, 2005). Apresenta também um papel importante na regulação enzimática de processos metabólicos, principalmente na enzima aconitase, que liberta iões de ferro, impedindo a formação de ácido cítrico e isocítrico, sendo estes processos metabólicos essenciais na formação de ATP (Berg *et al*, 2002; Weng *et al*, 2008). Assim sendo, concentrações deficitárias de ferro nos cultivos afectam os processos metabólicos e diminuem o crescimento das culturas. Por sua vez, concentrações excessivas de ferro promovem a conversão de radicais hidróxido (OH) a partir do radical anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que provocam danos graves nas proteínas, membranas e ADN, limitando também o seu crescimento (Halliwell & Gutteridge, 1984, Estevez *et al*, 2001).

Nos cultivos no exterior em fotobiorreactores do tipo “Green Wall”, comprovou-se a ineficácia da solução de oligoelementos AM para a produção da espécie *Chlorella* sp, uma vez que o crescimento obtido com o meio optimizado (Macro + AM 50 µl/l) foi idêntico ao controlo, que continha apenas a solução de macronutrientes. A suplementação com ferro regista, em consonância com os resultados obtidos no laboratório, diferenças notórias entre o meio optimizado (Macro + AM 50 µl/l+ Fe 500 µl/l) e o controlo, confirmando a importância que o ferro tem no crescimento desta espécie.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, para produção desta espécie em larga escala, o crescimento pode ser potenciado através da adição da solução de ferro à solução de macronutrientes, em detrimento da solução de oligoelementos, reduzindo também os custos de produção e operação.

Quanto ao peso seco, registou-se de uma maneira geral uma relação linear com a densidade óptica e concentração celular. Em nenhum dos ensaios realizados na fase de laboratório se registaram diferenças significativas no peso seco final nos diferentes meios testados. Recomenda-se assim, em trabalhos futuros, a utilização apenas dos

dados obtidos a partir da densidade óptica com o objectivo de facilitar as tarefas de operação diária.

6.2 Proteínas

Quanto às proteínas, em *N. oculata* registaram-se valores entre 35 e 38% do peso seco, valores ligeiramente inferiores aos obtidos para *Chlorella*, entre 36 e 48%, existindo uma maior dispersão de valores nesta espécie. Os valores obtidos para *N. oculata* estão de acordo com os registados normalmente em produtos comerciais, entre 30-35% (Necton Phytobloom®). Em *Chlorella* sp os valores registados neste trabalho são inferiores aos normalmente registados para as espécies de *Chlorella* entre 50 e 58% (Becker *et al*, 1994; Demirbas, 2009).

Em todos os ensaios realizados para ambas as espécies não se registaram diferenças significativas na percentagem proteica obtida entre os diferentes meios de cultura, com excepção do ensaio para optimização da solução de ferro na *Chlorella* sp. Neste ensaio, o tratamento que registou maior crescimento (Macro + AM + Fe 500 µl/l) foi também o que registou maior percentagem de proteínas (\approx 47%). Estes dados parecem indicar que a concentração de ferro tem uma relação inversa com o crescimento e conteúdo proteico das culturas, provavelmente devido ao aumento excessivo da concentração deste nutriente, que se encontrava em concentrações tóxicas nas culturas, provocando a formação de radicais livres, como explicado anteriormente.

Nos cultivos no exterior, registaram-se valores superiores de conteúdo proteico entre 48 e 50%, valores mais próximos aos registados na bibliografia consultada (Becker *et al*, 1994). Nesta espécie, maior crescimento parece estar associado a um aumento da percentagem de proteínas das culturas, em detrimento da acumulação de lípidos, como verificado por Molina-Grima (1994) e Cohen (1999) em espécies distintas das estudadas neste trabalho, *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*, respectivamente.

6.3 Produção de lípidos

Em ambos os ensaios realizados com *N. oculata* não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes meios testados, verificando-se assim que o meio de

cultura ensaiado e as suas soluções constituintes não influenciam a produção lipídica desta espécie. A elevada percentagem de lípidos registada em ambos os ensaios com esta espécie, aproximadamente 40% do peso seco, é bastante superior ao registado normalmente em produtos comerciais e na bibliografia consultada, entre 13-20% e 25-30% e do peso seco respectivamente (Necton Phytobloom®) (Rodolfi *et al*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009). Nos ensaios realizados, as culturas ao fim de uma semana começaram a desenvolver uma cor amarelada em detrimento do tradicional verde, cor correspondente a culturas desta espécie, ideais para utilização na técnica da água verde. Esta cor que se desenvolveu é indicativa de condições stressantes nos cultivos. A principal explicação para este facto deve-se provavelmente ao excesso de luz que pode ter incidido nas culturas, degradando as clorofilas e expondo os carotenóides, visto serem estes pigmentos que dão cor amarela às culturas (Lamela T., comunicação pessoal).

Na *Chlorella* sp, o meio Macro + AM + Fe também não regista alterações na sua produção lipídica, os tratamentos apresentam aproximadamente o mesmo teor de lípidos que os controlos, não existindo diferenças significativas nos ensaios efectuados. Os valores de conteúdo lipídico registados para esta espécie, entre 12 e 17% do peso seco, são inferiores aos registados por Rodolfi *et al* (2008), em trabalhos anteriores para outras *Chlorellas* dulçaquícolas, entre 18 e 19%, sendo no entanto superiores aos obtidos por Ferrentino (2007), que registou perto de 10% do peso seco, também para uma estirpe de *Chlorella* de água doce. Nos cultivos ao ar livre comprovaram-se os resultados obtidos na fase laboratorial onde não se verificaram alterações na produção lipídica entre tratamentos e controlo. Verificou-se que o meio desenvolvido e os seus constituintes, às concentrações testadas neste trabalho, não parecem influenciar a produção lipídica nesta espécie.

Embora neste trabalho não se registem diferenças significativas na produção lipídica entre os diferentes meios, o ferro apresenta uma função muito importante na sua regulação. Complexos de ferro, como nucleótidos ferro-adenina e ferro-citrato são catalisadores activos da peroxidação dos lípidos nas microalgas (Estevez *et al*, 2001) contudo, diversas espécies (p.ex. *Chlorella*) possuem anti-oxidantes que permitem minimizar os efeitos de elevada concentração de ferro. Sabe-se actualmente que as vias metabólicas relacionadas com a acumulação de lípidos são reguladas por este

oligoelemento, Liu *et al* (2008), provaram que elevada concentração de ferro no meio de cultura (bastante superior à estudada neste trabalho) aumenta significativamente a produção lipídica das culturas, cerca de 56.6% de lípidos/peso seco na *Chlorella*.

Apesar de diversas espécies possuírem elevadas concentrações lipídicas, por norma, estas elevadas concentrações não se verificam em espécies com elevadas taxas de crescimento. A baixa produção lipídica das microalgas nos cultivos em larga escala é um dos impedimentos que inviabiliza economicamente a produção de biocombustíveis. Assim que as microalgas possuam um conteúdo lipídico superior a 60%, com o crescimento registado actualmente, o custo dos biocombustíveis obtidos baixa para sensivelmente metade (Chisti, 2007), sendo esta uma das metas a atingir para o desenvolvimento desta indústria. Existem diversas estratégias que permitem potenciar a produtividade lipídica, que registam diferenças significativas nas culturas de diferentes espécies. Muitas destas estratégias prendem-se com a indução de stress fisiológico nas culturas, nomeadamente a elevada salinidade ou condições deficitárias/excessivas de nutrientes no meio de cultura (Courchesne *et al*, 2009). As condições de cultivo modificam a composição bioquímica das culturas, principalmente o conteúdo lipídico e ácidos gordos (Demirbas, 2009). Quando expostas a condições de cultivo não optimizadas, as culturas têm tendência a acumular lípidos em detrimento da divisão celular, podendo no entanto resultar em produtividades lipídicas mais baixas. Diversos autores estudaram a limitação de nutrientes no meio de cultura, principalmente nitratos, e verificaram que a limitação e privação deste nutriente resulta numa maior acumulação lipídica: 40% peso seco na *Chlorella vulgaris* (Illman *et al*, 2000) e 60% peso seco para a *N. oculata* (Rodolfi *et al*, 2008). O cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* também resulta em elevadas produções lipídicas, 57.6% do peso seco (Miao & Wu, 2004), bastante superiores aos cultivos autotróficos, cerca de 15% do peso seco.

Recentemente, com o contributo da engenharia genética desenvolveram-se novas estratégias para potenciar a produção lipídica das culturas. Foram efectuados avanços significativos na compreensão das vias metabólicas relacionadas com a acumulação de lípidos, estando actualmente já descritas diversas enzimas e genes que têm influência directa na regulação das vias metabólicas. Estas estratégias de indução lipídica permitem regular a expressão destas enzimas de maneira a promover a síntese

de lípidos, parecendo estas estratégias mais promissoras a longo prazo (Courchesne *et al* 2009).

6.4 Produção de ésteres metílicos para biocombustíveis

Para aferir sobre o potencial dos biocombustíveis obtidos a partir de biomassa algal, é necessário avaliar o perfil de ésteres metílicos dos ácidos gordos formados após a esterificação das amostras. As propriedades destes ésteres vão ser responsáveis pela qualidade final do biodiesel produzido a partir de biomassa (Demirbas, 2009). Os ésteres metílicos obtidos, dependendo do tamanho da cadeia carbonada e da sua composição química, apresentam aplicações distintas como biocombustíveis. Não existe no entanto uma concordância geral entre autores quanto ao tamanho da cadeia carbonada dos ésteres mais apropriados para produção de biocombustíveis. Neste trabalho, categorizou-se os diferentes destilados obtidos a partir de óleos como proposto por Wittcoff *et al*, (2004): (i) compostos com cadeia carbonada curta constituem a fracção com características mais adequadas à produção de combustíveis similares ao gás natural; (ii) os compostos com cadeia carbonada, entre C₅ e C₉, poderão ser utilizados na produção de Nafta, utilizada na indústria petroquímica, e na produção de gasolina; (iii) os compostos compreendidos entre o C₉ e C₁₆, são particularmente úteis para a produção de querosene, utilizado principalmente na indústria de Jetfuel e produção de combustíveis para tractores; (iv) por último, a gama de EMAG ideal para a produção de diesel encontra-se entre o C₁₅ e C₂₅, sendo os ésteres com mais de 20 carbonos particularmente utilizados como óleos lubrificantes.

Os EMAG podem ainda ser divididos quanto à sua composição química em ésteres saturados, monoinsaturados e polinsaturados, dependendo da existência e número de ligações duplas. Os biocombustíveis são preferencialmente constituídos por ésteres metílicos saturados e monoinsaturados, que apresentam maior volatilidade e não provocam problemas nos motores (Basha *et al*, 2008).

O perfil de EMAG registado em *N. oculata* é constituído maioritariamente por ésteres com 16 e 18 carbonos, mais os ésteres polinsaturados C₂₀:4n6 e C₂₀:5n3, representando estes mais de 80% do total. Os ésteres C₁₆:0 e C₁₆:1 foram os compostos que apresentaram maior concentração nesta espécie, registando cerca de 40% do total de EMAG, valores inferiores aos obtidos por Gouveia & Oliveira (2009),

no qual estes ésteres representaram cerca de 50% do total nesta espécie. Quanto aos ésteres com 18 carbonos, representam apenas 18% do total de EMAG registados, sendo estes valores superiores aos registados na bibliografia, cerca de 13% (Gouveia & Oliveira, 2009). Estes ésteres, quando em concentrações elevadas, são indicativos de biodiesel de elevada qualidade (Xu *et al*, 2006).

Quanto à sua composição química, os ésteres desta espécie apresentam elevada quantidade de ésteres polinsaturados, cerca de 50% do total registado. Este facto está directamente relacionado com a elevada produção de ácido araquidónico (C20:4n6) e ácido eicosopentaenóico (C20:5n3), característico desta espécie, que representam cerca de 26% do total de EMAG. Os óleos vegetais, como os obtidos a partir de microalgas, estão normalmente associados a ésteres polinsaturados. Apesar de estes ésteres não serem ideais para a produção de biodiesel, é possível através de hidrogenação convertê-los em ésteres com composição química ideal para a sua produção (Dijkstra, 2006; Meng *et al*, 2009). Concentrações elevadas de ésteres polinsaturados no biodiesel produzido estão normalmente associadas à diminuição da sua estabilidade e viscosidade (Demirbas, 2009), uma vez que são mais susceptíveis à oxidação, diminuindo a aceitação do biodiesel produzido (Chisti, 2007; Meng *et al*, 2009). No entanto, estes ésteres diminuem o ponto de fusão do biodiesel, melhorando o seu desempenho a baixas temperaturas, um dos principais problemas do biodiesel em geral (Robles-Medina *et al*, 2009; Demirbas, 2009).

Esta espécie apresenta um perfil de ésteres metílicos mais diversificado, os ésteres saturados de cadeia curta que representam a fracção do bioquerosene, representam cerca de 52.8% do total dos ésteres ou 10340 µg/g de biomassa seca. Para a produção deste biocombustível nesta espécie, a hidrogenação não parece necessária, uma vez que os EMAG que constituem esta fracção são maioritariamente saturados e monoinsaturados, representando estes 50% do seu total ou 9244 µg/g. Estes resultados demonstram que esta espécie apresenta um perfil com boa capacidade para produção de Jetfuel. Relativamente à produção de biodiesel, 95% dos ésteres ou 18614 µg/g do peso seco apresentam compostos com o tamanho da cadeia carbonada ideal para a sua produção. Contudo, o processo de hidrogenação parece ser fundamental na produção deste biocombustível, uma vez que apenas 49.6% do total de EMAG ou 9610 µg/g de biomassa seca apresentam a composição química

necessária que permite o bom funcionamento dos motores. No entanto, a hidrogenação está associada ao aumento dos custos finais de produção, devido à tecnologia necessária e fornecimento de hidrogénio. Este processo consiste na adição de hidrogénio (H₂) às ligações duplas dos compostos, na presença de um catalisador, resultando na saturação dos compostos (Amin, 2009).

Quanto à *Chlorella* sp, apresenta menor variedade de ésteres metílicos no seu perfil, o que é característico do género *Chlorophyta* que normalmente apresenta ácidos gordos de cadeia carbonada longa, variando normalmente entre 16 e 22 carbonos (Ferrentino, 2007). Nesta espécie, os EMAG com 16 e 18 carbonos predominam, representando cerca de 80% do total de ésteres registados, nomeadamente os ésteres C16:0 e C16:1, que registaram metade deste valor. Os ésteres C18:0, C18:1 e C18:2 registam também aproximadamente 40% do total de EMAG. Os resultados obtidos para esta estirpe de *Chlorella* diferem dos registados em trabalhos anteriores para a *Chlorella* sp e *Chlorella protothecoides*, que apresentaram aproximadamente 80% do total de EMAG em ésteres de 18 carbonos (Xu *et al*, 2006; Ferrentino, 2007). Verificou-se no entanto que esta espécie apresenta elevada concentração de ácido oleico (C18:1n9), cerca de 17% do total, sendo este EMAG considerado o mais adequado para a produção de biodiesel (Knothe, 2005), pelas razões acima mencionadas.

Embora os resultados obtidos mostrem que esta espécie apresenta concentração inferior de EMAG comparativamente a *N. oculata*, regista quanto à sua composição química um perfil preferível para a produção de biodiesel. Aproximadamente 76% dos ésteres são saturados e monoinsaturados de cadeia carbonada longa, registando os ésteres polinsaturados apenas 24% do total. Estes resultados são significativamente superiores aos resultados obtidos em trabalhos anteriores, onde se registaram 62% de ésteres polinsaturados e apenas 10% de ésteres metílicos saturados na *Chlorella protothecoides* (Demirbas, 2009).

Este trabalho demonstra que o perfil de EMAG desta espécie apresenta diversos compostos com cadeia carbonada longa que não se registaram na *N. oculata*, nomeadamente os ésteres C22:0, C26:0 e C28:0, não se observando os EMAG com cadeia mais curta presentes na outra espécie, como os ésteres C10:0, C12:0, C13:0 e C15:0.

Relativamente à produção de bioquerosene, apesar da *Chlorella* não apresentar no seu perfil de EMAG, ésteres de cadeia curta, a concentração de ésteres com 16 carbonos saturados e monoinsaturados representam 40% do total de ésteres, ou 4528 µg/g de biomassa seca, mostrando também esta espécie uma percentagem muito representativa de EMAG para a produção deste biocombustível. Quanto à produção de biodiesel, cerca de 10522 µg/g ou 95% do total dos ésteres metílicos registados nesta espécie, podem ser utilizados na sua produção, recorrendo ao processo de hidrogenação. Porém, este processo pode não se justificar nesta espécie, uma vez que a maioria destes ésteres são saturados e monoinsaturados, representando neste trabalho 72% do total ou 7872 µg/g. Fica assim demonstrado que os óleos obtidos nesta espécie apresentam menores custos de hidrogenação, na produção de biodiesel comparativamente à outra espécie estudada, apresentando também um perfil com boa capacidade de produção de biodiesel.

Ambas as espécies apresentaram no seu perfil de EMAG quantidades muito baixas de ácido linolénico (C18:3n3), menos de 1%, o que está em conformidade com a norma europeia EN14214 para produção de biodiesel, que estabelece que a proporção deste éster tem que ser inferior a 12%.

Os resultados obtidos mostram que ambas as espécies apresentam perfil de EMAG para produção de biodiesel e bioquerosene, uma vez que praticamente todos os ésteres registados se encontram entre C10:0 e C25:0. A espécie *N. oculata* registou maior concentração final de ésteres metílicos comparativamente à *Chlorella*, registando-se diferenças significativas (*t-student*, valor p : 0.000), 19597 e 10953 µg/g de biomassa seca, respectivamente. No que se refere à utilização destas espécies para a produção de biodiesel, o total de EMAG ideais, registado para a *N. oculata* neste trabalho, é superior ao obtido para a *Chlorella*, 9610 e 7872 µg/g, respectivamente. Se tivermos em conta o processo de hidrogenação, a *N. oculata* apresenta uma concentração de ésteres metílicos ideais para a produção deste biocombustível superior em cerca de 176% comparativamente à *Chlorella*, 18614 e 10522 µg/g, respectivamente. O mesmo se regista no caso da utilização dos EMAG com o intuito de produzir bioquerosene.

Pode-se assim concluir que a espécie *N. oculata* apresenta mais potencial para a indústria de biocombustíveis do que a estirpe de *Chlorella* sp testada neste trabalho.

7 Conclusões

Conclui-se com este trabalho que o meio de cultura desenvolvido e optimizado foi o mais eficiente ao longo de todos os ensaios, registando resultados bastante satisfatórios particularmente na *Chlorella*. Verificou-se nesta espécie, que o ferro apresenta influência directa no crescimento das culturas, registando-se à concentração de 500 µl/l de solução de ferro diferenças significativas nos parâmetros bióticos de crescimento, nomeadamente na densidade óptica e concentração celular. No entanto, este nutriente não apresenta benefícios significativos no crescimento das culturas de *N. oculata*, registando-se um crescimento ligeiramente superior aos controlos com concentração de 1 ml/l da solução de ferro.

A solução de oligoelementos AM constituinte do meio de cultura pode ser excluída deste, uma vez que apesar de potenciar o crescimento, não traz benefícios significativos ao crescimento das culturas das espécies estudadas. A concentração óptima de cultivo determinada neste trabalho para ambas as espécies desta solução é de 50 µl/l.

Fica assim provado com este trabalho a ineficácia dos micronutrientes existentes nos meios de cultura no crescimento de ambas as espécies. Com o intuito de reduzir os custos finais de produção, a solução de oligoelementos pode ser removida do meio de cultura nos cultivos de *N. oculata*, sendo substituída apenas pela solução de ferro nos cultivos de *Chlorella*. Desta maneira é possível poupar tempo, trabalho e reduzir os custos finais de produção.

As propriedades bioquímicas estudadas neste trabalho, nomeadamente o conteúdo proteico e lipídico não registaram alterações no decorrer dos ensaios; não parecem assim ser afectados pelo meio desenvolvido e pelas suas soluções constituintes, com excepção do ensaio para optimização de ferro na *Chlorella*. Neste ensaio, registaram-se diferenças significativas na percentagem de proteínas registada nas culturas, sugerindo que concentrações elevadas de ferro diminuem o crescimento das culturas e o seu conteúdo proteico.

Conclui-se também que ambas as espécies estudadas apresentam boa capacidade para produção de biocombustíveis no seu perfil de EMAG, nomeadamente bioquerosene e biodiesel. Os ésteres com 16 e 18 carbonos predominam nas amostras

de ambas as espécies, registando-se na *N. oculata* valores mais elevados de ésteres polinsaturados que não se observaram na *Chlorella* sp, nomeadamente ácido eicosopentaenóico e araquidónico. Uma vez que os ésteres polinsaturados diminuem a aceitação dos biocombustíveis produzidos, parece ser necessário recorrer ao processo de hidrogenação para rentabilizar ao máximo os EMAG obtidos nesta espécie. A *Chlorella* apresenta, quanto à composição química dos EMAG, um perfil preferível para a produção de biocombustíveis, os ésteres saturados e monoinsaturados que permitem o bom funcionamento dos motores predominam, apresentando esta espécie menos custos de hidrogenação.

Contudo, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a *N. oculata* apresenta maior potencial para a indústria de biocombustíveis, registando-se diferenças significativas na quantidade de EMAG totais úteis para a produção de biodiesel e bioquerosene, sendo esta superior em cerca de 170% comparativamente à *Chlorella* estudada neste trabalho.

O uso de microalgas para produção de biocombustíveis em larga escala ainda não é presentemente economicamente viável, existindo no entanto diversos estudos e investimentos efectuados nesta área com o intuito de melhorar a eficiência de todo o processo. Uma solução para o desenvolvimento desta indústria pode ser o conceito de biorefinaria, essencial para o progresso desta tecnologia em larga escala. Este conceito está relacionado com a produção simultânea de materiais e químicos de elevado valor comercial, e outras formas de energia em conjunto com a transformação de biomassa em biocombustíveis (Fonseca, 2008). Embora o biodiesel e bioquerosene sejam os principais biocombustíveis de interesse, existe uma vasta gama de compostos, que podem ser obtidos como co-produtos através deste conceito, que poderão viabilizar economicamente a produção de microalgas para a produção de biocombustíveis. É necessário aproveitar todos os constituintes da biomassa obtida e assim rentabilizar ao máximo os diferentes produtos que podem ser obtidos a partir das microalgas e de outros tipos de biomassa em geral.

O diagrama seguinte mostra um exemplo do conceito de biorefinaria proposto por Fonseca (2008), que explora as microalgas como matéria-prima.

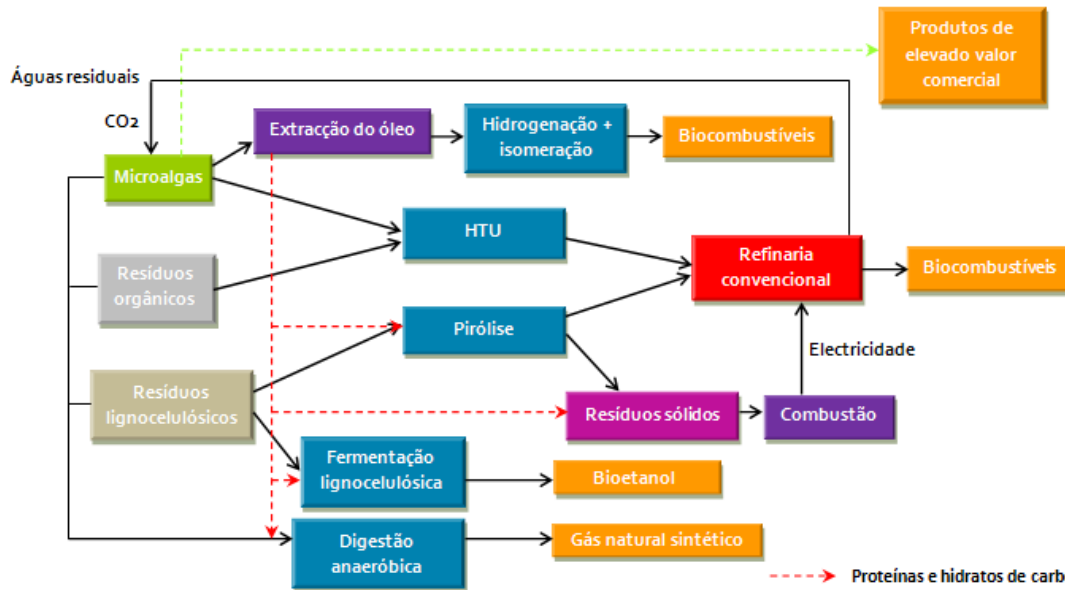


Fig. 27 – Exemplo representativo do conceito de biorefinaria para aproveitamento de todos os constituintes da biomassa algal (Adaptado de Fonseca, 2008)

As microalgas possuem diversos pigmentos com diversas potencialidades, como descrito anteriormente neste trabalho, que apresentam elevado valor comercial que podem e devem ser explorados antes da extração do óleo. As proteínas podem ser removidas e utilizadas em suplementos nutricionais, rações, ou transformadas em outros biocombustíveis. Os hidratos de carbono existentes nas microalgas podem também ser utilizados para produzir outros biocombustíveis, como por exemplo HMF (Hidroxymethylfurfural) (Mousdale, 2008). Os resíduos de biomassa obtidos podem ser usados mediante fermentação na produção de metanol e etanol (Rodolfi *et al*, 2008) ou por digestão anaeróbica para a produção de gás natural sintético. O CO₂ e a água residual libertados pela refinaria são reaproveitados nos cultivos para a produção em larga escala da matéria-prima algal. Ou seja, a variabilidade bioquímica das microalgas permite diversas combinações, possibilitando o máximo reaproveitamento de todos os componentes da biomassa algal.

A informação existente sobre diversos temas de todo o processo de produção de biodiesel a partir de biomassa algal é ainda pouca, devido principalmente à confidencialidade adjacente às empresas que financiam os projectos, ou também por ainda não terem sido estudados, impedindo em parte o avanço de novos estudos. Esta área necessita ainda de elevada compreensão para que os biocombustíveis obtidos a partir de biomassa algal possam de facto substituir os combustíveis fósseis.

8 Perspectivas futuras

O aumento da concentração de AM na *Chlorella* parece potenciar a sua produção lipídica, apesar de não se verificarem diferenças significativas, pois o valor p obtido no teste estatístico efectuado está muito próximo de 0.05 (0.057). Assim sendo, poderá algum dos nutrientes constituintes desta solução estar a stressar as culturas desta espécie, permitindo este aumento, um aspecto que merece atenção futura.

Tendo em conta o meio de cultura desenvolvido neste trabalho, seria ainda interessante estudar o efeito deste meio com elevada concentração de ferro como sugerido por Liu *et al* (2008), em ambas as espécies. Sendo esta uma estratégia de indução lipídica com um custo bastante reduzido, que pode apresentar resultados bastante satisfatórios. Contudo, é ainda necessária uma melhor compreensão destes mecanismos, para realmente perceber se existe um aumento significativo na produtividade lipídica final.

Diversas espécies de microalgas apresentam taxas de crescimento muito elevadas, podendo duplicar-se em apenas 24 horas, tornando-se assim ideais para a realização de um programa de selecção genética. Sabe-se que a produção lipídica está inversamente relacionada com a taxa de crescimento, como explicado anteriormente. Assim sendo, podem ser efectuadas duas abordagens com o intuito de aumentar a produtividade lipídica nas diferentes espécies: (i) seleccionar o conteúdo lipídico numa espécie com elevada taxa de crescimento, (ii) ou seleccionar para o crescimento uma espécie com elevado conteúdo de lípidos. Este método pode ser uma alternativa às outras estratégias de indução lipídica, ou pode ser utilizado complementarmente. Molina-Grima *et al* (1995) sugeriram um programa de selecção genética para aumentar a produção de EPA, resultando num aumento de 100% do conteúdo de EPA após apenas dois ciclos de selecção.

Em relação aos processos finais de transformação, é necessário otimizar ambos os processos comentados neste trabalho, uma vez que a informação sobre este tema é ainda reduzida nas microalgas. Por exemplo, seria interessante estudar qual a transesterificação mais eficiente no óleo das microalgas e quais os parâmetros que afectam o processo de hidrotratamento. A optimização destes processos poderá permitir uma redução significativa dos custos finais de produção.

Bibliografia

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

Andersen R. A. (2005) Algal culturing techniques; *Elsevier Academic Press*; USA

Barsanti L., Gualtieri P. (2006) Algae anatomy, biochemistry and biotechnology; *Taylor and Francis Group*; USA

Basha S. A., Gopal K. R., Jebaraj S. A. (2009) Review on biodiesel production, combustion, emissions and performance; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; **13**: 1628-1634

Becker E. W. (1994) Microalgae, Biotechnology and Microbiology; *Cambridge University Press*; **249**: 177-178

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002) Biochemistry. W.H. Freeman, New York

Borowitzka M. A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters; *Journal of Biotechnology*; **70**: 313-321

Brown, M. R. (2002) Nutritional value of microalgae for aquaculture; In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México

Brown M. R., Jeffrey S. W., Volkman J. K., Dunstan G. A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture; *Aquaculture*; **151**: 315-331

Carlsson A. S., Beilen J. B., Möller R., Clayton D. (2007) Micro and macroalgae utility for industrial applications; *Outputs from the EPOBIO project*; CPLPress

Carvalho A. P., Malcata F. X. (2000) Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*; *Cryptogamie, Algal*; **21**: 59-71

Carvalho A. P., Meireles, L. A., Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology*; **22**: 1490-1506.

Chisti Y. (2004) Who needs a conventional dairy industry? *Biotechnology advances*; **22(5)**: 361

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

Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T., Ong, S. C., Chen, C. H., Lin, C. S. (2009) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration; *Bioresources Technology*; **100**: 833-838.

Cohen Z. (1999) Chemicals from microalgae; Taylor & Francis Group; USA

Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., Borghi M. D. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production; *Chemical Engineering and Processing*; **48**: 1146-1151

Courchesne N. M. D., Parisien A., Wang B., Lan C. Q. (2009) Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches; *Journal of Biotechnology*; **141**: 31-41

Demirbas A. (2009) Production of biodiesel from algae oils; *Energy Sources*, **31**: 163-168

Demirbas A. (2009) Progress and recent trends in biodiesel fuels; *Energy Conversion and Management*; **50**: 14-34

Derner R. B., Ohse S., Villela M., Carvalho S. M., Fett R. (2006) Microalgas, produtos e aplicações; *Ciência Rural*, Santa Maria, **36**, n.6: 1959-1967,

Dijkstra A. J. (2006) Revisiting the formation of trans isomers during partial hydrogenation of triacylglycerol oils; *Eur J Lipid Sci Technol*; **108**: 249-64.

Estevez M. S., Malanga G., Puntarulo S. (2001) Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*; *Plant Science*; **161**: 9-17

European Standard EN 14214 (2004) Automotive fuels—fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines-requirements and test methods. AFNOR

Fábregas J., Abalde J., Herrero C., Cabezas B. V., Veiga M. (1984) Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations; *Aquaculture*; **42**: 207-215

Ferrentino J. (2007) Microalgal oil extraction and *in situ* transesterification; Thesis; Cornell University

Fonseca D. (2008) Biomass to liquid biofuels processes; Tese de mestrado; Mestrado integrado em engenharia química, FEUP/Algafuel, Porto

Gouveia L., Marques A. E., Silva T. L., Reis A. (2009) *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production; *J Ind Microbiol Biotechnol*; **36**: 821-826

Gouveia L., Oliveira A. C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production; *J Ind Microbiology Biotechnology*; **36**: 269-274

Graham L. E., Wilcox L. W. (2000) *Algae*; Prentice Hall, USA

Guckert J. B., Cooksey K. E. (1990) Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high PH-induces cell cycle inhibition; *Journal of phycology*; **26**: 72-79

Guerinot M. L., Yi Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available, *Plant Physiology*; **104**: 815-820.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease; in: Estevez M. S., Malanga G., Puntarulo S. (2001) Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*; *Plant Science*; **161**: 9-17

Hutchins, D.A. (1995) Iron and the marine phytoplankton community; In: Naito K., Matsui M., Imai I. (2005) Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron; *Harmful Algae*; **4**: 1021-1032

Hu Q., Fairman D., Richmond A. (1998) Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors, *Journal of Fermentation Bioengineering*; **85**: 230-236

Huber G. W., Iborra A., Corma A, (2006) Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts and engineering; *Chem. rev.*; **106**: 4044-4098

Illman A., Scragg A. H., Shales S. W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen medium; *Enzyme and Microbial Technology*; **27**: 631-635

Knothe G. (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters; *Fuel Processing Technology*; **86**: 1059- 1070

Lee J. S. & Lee J. P. (2003) Review of advances in biological CO₂ mitigation technology; *Biotechnology and Bioprocess Engineering*; **8**: 354-359

Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C. Q. (2008) Biofuels from microalgae; *Biotechnology Prog.*; **24**: 815-820

Li, Y. Q., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. and Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* *Appl. Microbiology Biotechnology*; **81(4)**: 629-636.

Liu Z. Y., Wang G. C., Zhou B. C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*; *Bioresource Technology*; **99**: 4717-4722

Majewski W. A. (2003) "Biodiesel", *Dieselnet Technology Guide*– Alternative Diesel Fuels, <http://www.dieselnet.com/>

Maruyama, I., Nakao, T., Shigeno, I., Ando, Y., Hirayama, K. (1997) Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*; *Live food in aquaculture*; Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium

Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms *Renewable Energy*; **34**: 1-5

Metting B., Pyne J. W. (1986) Biologically active compounds from microalgae; *Enz. Microb. Technol.*; **8**: 386-394.

Miao X., Wu Q. (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil; *Bioresource Technology*; **97**: 841-846

Molina-Grima E., Perez J. A., Camacho F. G., Fernandez F. G. A., Sevilla J. M., Sanz F. V. (1994) Effect of dilution rate on eicosapentanoic acid productivity of *Phaedactylum tricornutum* UTEX 640 in outdoor chemostat culture; *Biotechnology letters*; **16**: 1035-1040

Molina-Grima E., Perez J. A., Camacho F. G., Robles-Medina A., Gimenez A. G., Alonso D. L. (1995) The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification; *Process biochemistry*; **30**: 711-719

Molina-Grima E., Fernández J., Acien F. G., Chisti Y. (2000) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*; **92**: 113–131

Morales, J. C. (1982) "*Acuicultura Marina Animal*"; Ediciones Mundi-Prensa,

Mousdale D. (2008) *Biofuels biotechnology, chemistry and sustainable development*; Taylor and Francis Group; USA

Naito K., Matsui M., Imai I. (2005) Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron; *Harmful Algae*; **4**: 1021-1032

Otero, A., Fábregas, J. (1997) Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*; **159**: 111-123

Pulz O., Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae; In: Derner R. B., Ohse S., Villela M., Carvalho S. M., Fett R. (2006) *Microalgas, produtos e aplicações*; *Ciência Rural*, Santa Maria; **36(6)**: 1959-1967,

Reitan K. I., Rainuzzo, J. R., Gunvor O., Olsen Y. (1997) A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae; *Aquaculture*; **155**: 207-221

Robles-Medina A., González-Moreno P. A., Esteban-Cerdán L., Molina-Grima E. (2009) Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production *Biotechnology Advances*; **27**: 398-408

Rodolfi L., Zittelli G. C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M. R. (2009) Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor; *Biotechnology and Bioengineering*; **102**: 100-112

Sargent, J. R.; Bell, J. G.; Bell, M. V.; Henderson, R. J., Tocher D. R. (1995). Requirement criteria for essential fatty acids, *Journal of Applied Ichthyology*; **11**: 183-198.

Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell, J. G., (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*; **155**: 117-127

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008) Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production; Australia, Springer science

Schwarz M., Sal-Man N., Zamir A., Pick U. (2003) A transferrin-like protein that does not bind iron is induced by iron deficiency in the alga *Dunaliella salina*; *Biochimica et Biophysica Acta*; **1649**: 190-200

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. (1998) A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from Algae. *National Renewable Energy Laboratory*, NREL/TP-580-24190.

Somashekar D., Venkateshwaran G., Srividya C., Krishnanand, Sambaiah K., Lokesh B. R. (2001) Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures; *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; **17**: 317-320

Spaargaren D. H. (1996) The design of culture media based on the elemental composition of biological material; *Journal of Biotechnology*; **45**: 97- 102

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006) Commercial Applications of Microalgae; *Journal of bioscience and bioengineering*; **101(2)**: 87-96.

Su C., Giridhar R., Chen C. W., Wu W. T. (2007) A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity; *Bioresource Technology*; **98**: 3012-3016

Takeda, H. (1991) Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae) in: Graham & Wilcox

Ugwu C. U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae; *Bioresource Technology*; **99**: 4021-4028

Weinberg, E.D. (1989) Cellular regulation of iron assimilation.in: Naito K., Matsui M., Imai I. (2005) Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron; *Harmful Algae*; **4**: 1021-1032

Weng H. X., Qin Y. C., Sun X. W., Chen J. F. (2008) Limitation and combined effects of iron and phosphorus on the growth of *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyceae) and *Cryptomonas* sp. (Cryptophyceae) *Environ Geol*; **55**: 1431-1436

Wittcoff H. A., Reuben B. G., Plotkin J. S. (2004) Industrial organic chemicals; *A John Wiley & Sons, Inc. Publication*; New Jersey

Wu Q. Y., Yin S., Sheng G. Y., Fu J. M. (1994) New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae; *Science China*; **37**: 326-335

Xu H., Miao X., Wu Q. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters; *Journal of Biotechnology*; **126**: 499-507